

EVOLUTION DES HYDROCARBURES ET ACTIVITE BACTERIENNE
DANS LES SEDIMENTS COTIERS MEDITERRANEENS

E. AZOULAY¹, J. DUBREUIL¹, M. COLIN¹, H. DOU², G. MILLE², G. GIUSTI².

1. Laboratoire de Structure et Fonction des Biomembranes
Faculté des Sciences de Luminy E.R. 143-13288 MARSEILLE
Cedex 9.
2. Laboratoire de Chimie Organique - Faculté de St-Jérôme
13397 MARSEILLE Cedex 4.

SUMMARY

RELATIONSHIP BETWEEN HYDROCARBONS AND BACTERIAL ACTIVITY IN THE MEDITERRANEAN SEDIMENTS

The evolution of the hydrocarbons in the marine sediments of the mediterranean coast was studied by two different but complementary methods. In the first part of this study we describe results obtained through a technique specially adapted to sediments. It leads to a relatively accurate and reproducible determination of the hydrocarbon concentrations in sediments collected at many sites of the mediterranean coast polluted or not by chronic petroleum input (Brusc lagoon, zones of Embiez, Fos, Carry-le-Rouet, and Etang de Berre).

The hydrocarbon concentrations in the non-polluted sediments are always inferior to 300 mg/kg of dry sediment with important variations according to seasons (x 4 during winter).

In the polluted sediments the hydrocarbon concentrations are superior to 300 ppm with variations hard to interpret. Moreover, the analytical profile of these hydrocarbons shows considerable differences with respect to that obtained with the hydrocarbon fraction extracted from the non-polluted sediments. These differences concern principally the relative concentrations of odd and even carbon numbered hydrocarbons and the presence of aromatic or polyaromatic compounds specific of petroleum fractions.

Marine sediments from the mediterranean coast polluted by oil spills (Etang de Berre) contain high bacterial activity responsible of the auto purification of these biotopes. In agreement with this concept we have shown that in the samples collected in these coast area active with hydrocarbons, the bacterial density is higher (6000-8000 times) than in samples collected in non-polluted areas (Isle of Embiez).

We developed a performant method for the determination of the activity of these bacterial population with different classes of hydrocarbons (alkanes, isoalkanes, cycloalkanes and aromatics).

The different hydrocarbons are degraded 2 or 3 times less by bacteria coming from non-polluted sediments than by isolated bacteria "strains MLP" from polluted sediments. Moreover this mixed bacterial population "MLP" active with aromatic or cyclic hydrocarbons, are able to degrade them in non negligible proportions even with light alkanes. The high bacterial molecular weight metabolite (peak near the n-C₂₅ on the chromatogram) can interfere with residual hydrocarbons which are in the organic matter extracted by solvents.

The ability of degradation of these bacteria is performant but can be prevent when the nitrogen source is nitrate. This fact can explain the accumulation of polyaromatic or cyclic hydrocarbons in the polluted sediments which do not contain ammonium as nitrogen as carbon source.

INTRODUCTION

Polluants très apparents de l'environnement marin, les hydrocarbures et leurs effets ont souvent été étudiés dans le cadre de déversements massifs par accidents ou d'introductions chroniques associées à des activités industrielles. Les apports totaux de pétrole dans cet environnement représentent globalement six millions de tonnes par an, parmi lesquels deux millions proviennent du seul transport par les pétroliers (Blumer, 1971), (Zobell, 1971), (Tissier et Dastillung, 1978), (Tissier et Oudin, 1974), (Blumer et Youngblood, 1975), (Hites et Bieman, 1972), (Gign et Schaffner, 1977). Les effets de tels déversements ont malheureusement été souvent interprétés de façon contradictoire par les différents spécialistes appelés à combattre les "marées noires" résultant d'accidents de pétroliers en mer et ceci pour plusieurs raisons : la première est paradoxalement liée au fait que les organismes vivants marins synthétisent, sur la base d'estimations réalisées à partir de la production primaire, des quantités d'hydrocarbures non négligeables et du même ordre de grandeur que celui correspondant aux hydrocarbures anthropogéniques annuellement déversés dans les océans. La deuxième raison tient au fait que le pétrole est un mélange complexe comportant au minimum dix mille produits différents et que parallèlement le milieu marin est le siège d'une multitude de phénomènes tant physiques, chimiques, biologiques que géologiques (Farrington et Meyers, 1975), (Blumer, 1971), (Zsolnay, 1977), (Farrington et Tripp, 1977), (Yen, 1975), (Tissier et Spyckerelle, 1977), (Marty et al. 1978).

Si l'action nocive des hydrocarbures sur la flore et la faune apparaît de façon évidente, l'impact réel associé aux effets à long terme de ces constituants sur le milieu reste difficile à définir. Souvent introduits en masse, les hydrocarbures se maintiennent à la surface de l'eau à cause de la faible densité d'une partie de leurs constituants et s'étalent en film en association avec des composés tensio-actifs. Leur dispersion est influencée par leurs caractéristiques physico-chimiques et les phénomènes hydrodynamiques, auxquels s'ajoutent des phénomènes de photo-oxydation décrits par Hansen (1975).

Les difficultés d'interprétation des observations réalisées en grand nombre par plusieurs auteurs sur la présence d'hydrocarbures et leur nature dans les sédiments, l'eau de mer et les organismes, tiennent principalement aux faibles concentrations de ces constituants dans les milieux (Marty et Saliot, 1976), (Marty et al., 1978), (Goutx et Saliot 1980). Par ailleurs, la définition des processus d'incorporation et de transformation des hydrocarbures en milieu marin a été généralement établie à partir d'extrapolations des résultats obtenus dans des systèmes réactionnels contenant des concentrations en hydrocarbures relativement élevées et dans des conditions expérimentales qui s'éloignaient souvent de conditions écologiques naturelles. Enfin en dernière analyse nous insisterons sur le fait que ces nombreuses études ont été réalisées dans des sites privilégiés et que des différences notables ont été constatées lorsque ces études sont transposées à d'autres sites marins.

Les micro-organismes sont généralement considérés comme les meilleurs agents de destruction de la matière organique apportée au cours des épandages de pétrole, chroniques ou accidentels. Ils sont de ce fait spécifiquement impliqués dans les mécanismes d'auto-épuration des milieux marins. Les potentiels d'auto-épuration de ces milieux restent cependant très mal connus dans la mesure où ils mettent en jeu divers micro-organismes, identifiés ou non, dont la physiologie est liée à des mécanismes complexes de régulation comportant des synergies, des symbioses, des antagonismes et des inhibitions pouvant conduire à des disparitions ou à des accumulations préférentielles de métabolites.

L'étude *in situ* et *in vitro* des effets des hydrocarbures et de leur toxicité vis à vis des organismes marins a fourni un certain nombre de résultats sur leur utilisation par ces organismes (Floodgate, 1972), (Blumer *et al.*, 1973), (Pierce *et al.*, 1975). Leur dégradation par les bactéries se porterait sélectivement sur les n-alcanes de faible poids moléculaire puis que les isoalcanes, les cycloalcanes et les aromatiques et serait fonction de la concentration en nutriments (Blumer et Sass, 1972a), (Bartha, 1976), (Walker *et al.*, 1976) (Walker et Colwell, 1976), (Atlas, 1977).

Il nous a paru important de nous intéresser aux sédiments marins en bordure des côtes méditerranéennes, d'une part dans des sites considérés comme non soumis à des pollutions chroniques ou accidentelles (Zones des Embiez et de Carry), d'autre part dans des lieux où la pollution par les hydrocarbures est permanente comme par exemple les zones portuaires (Etang de Berre, Fos). Les résultats consignés dans cette étude ont porté sur des observations réalisées durant deux années consécutives.

Dans un premier temps nous nous sommes attachés à améliorer l'efficacité des techniques d'analyse de ces hydrocarbures dans différents sédiments, nous avons ensuite tenté d'interpréter le rôle des bactéries présentes dans ces sédiments. Cette activité bactérienne sur les hydrocarbures a été étudiée dans des conditions expérimentales permettant une accélération des processus de transformation des hydrocarbures normalement présents dans les sédiments, ceci afin de pouvoir déterminer les corrélations susceptibles d'exister entre cette activité bactérienne et l'accumulation préférentielle de constituants pétroliers (Azoulay *et al.*, 1979).

Les études entreprises dans ce domaine devraient conduire à une meilleure connaissance des potentialités d'auto-épuration générales ou locales du milieu marin. Ces potentialités, très mal connues, constituent de loin les processus qui contribuent pour la plus grande part à la disparition dans le milieu marin des produits pétroliers. (Azoulay *et al.*, 1979), (Blumer et Sass, 1972b). Ces études ont été poursuivies dans un contexte particulier où ont été effectuées parallèlement des recherches sur la nature et la concentration des espèces chimiques résultant de la transformation des hydrocarbures d'une part et d'autre part sur une meilleure connaissance de la microflore impliquée dans ces transformations.

Sur le plan biologique, l'intervention des différents organismes vivants ne peut se concevoir que dans le cadre d'une analyse globale. Ainsi il conviendra de tenir compte de la contribution des plantes et du phytoplancton dans l'accroissement de la matière organique et plus particulièrement des hydrocarbures dans les sédiments (Stock et Antia, 1976), (Lacaze, 1978), (McAuliffe, 1977). Cette contribution ne peut être évaluée qu'à partir de la détermination précise des différents types d'hydrocarbures avec mise en évidence de la prédominance de certaines classes de constituants par rapport à d'autres. Par ailleurs, le rôle des micro-organismes, considérés comme les agents privilégiés dans la dégradation des hydrocarbures, ne peut être précisé que dans le cadre d'une action globale où interviendra toute une population. La complexité de cette intervention pourrait être surmontée en s'intéressant à l'évolution de la dégradation des hydrocarbures pour des conditions de milieu différentes. Dans cette démarche, nous considérerons toujours l'action de la flore microbienne totale, en dressant des bilans comparatifs qui nous permettront dans une certaine mesure de comprendre la "dynamique physiologique" d'un sédiment (Walker et Colwell, 1976).

Nous rappellerons que cette dynamique physiologique implique des inter-actions entre micro-organismes où les sources de carbone, azote et phosphore interviennent dans des conditions complexes sans négliger par ailleurs le potentiel d'oxydo-réduction de ce sédiment et les conditions d'oxygénation.

METHODES

Sites de prélèvement

Les prélèvements ont été effectués à différentes périodes de l'année à proximité des côtes méditerranéennes entre 5 et 15 m de fond. Les points de localisation, dans la zone des Embiez (Ile de la Cauvelle, plage du Rayollet) de la lagune du Bruscat (sites de 1 à 4), de Carry le Rouet et de Fos sur Mer sont indiqués dans la figure 1.

Les sédiments de la lagune du Brusac sont sablo-vaseux, ceux de la Cauvelle et de la plage du Rayollet sont sableux. Il en est de même des sédiments prélevés dans la zone de Fos, de Carry le Rouet ou de l'Etang de Berre.

Les prélèvements d'échantillons doivent être de l'ordre de 100 g, pour pouvoir réaliser des extractions de matière organique significatives. Les échantillons sont prélevés en différents points du site à partir de carottages en surface et sont immédiatement utilisés pour les études microbiologiques ou stockés au congélateur à - 20°C pour les analyses chimiques.

Méthodes analytiques

Traitement des sédiments : La technique généralement utilisée est inspirée de la méthode de Farrington et Tripp (1977) pour l'extraction des sédiments de la matière organique soluble dans les solvants.

Nous distinguerons en premier lieu la méthode complète de Farrington qui préconise l'extraction de la matière organique au Soxhlet par un mélange de solvants mixte toluène-méthanol ou benzène-méthanol. Cette méthode, longue, extrait totalement les composés organiques différents des hydrocarbures tels que pigments, caroténoïdes, corps jaune etc... L'acidification par l'HCl élimine certains composés azotés basiques et la saponification, dans l'étape ultérieure, permet de séparer un certain nombre d'esters avec les acides gras. Les modifications apportées à la technique de Farrington, comportant en particulier une digestion alcaline ou une extraction aux ultrasons ou même une extraction aux ultrasons après acidification, améliorent les temps d'extraction et peuvent être utilisés dans le cas de certains sédiments (sédiments calcaires). Les modifications apportées par Azoulay *et al.*, (1979) et Mille *et al.*, (1981) à la technique initiale de Farrington sont décrits dans la Figure 2.

Fractionnement de l'insaponifiable : Ce fractionnement réalisé sur la matière organique obtenue après saponification et extraction par les solvants permet de séparer les différentes familles de composés constituant l'insaponifiable. Dans notre protocole expérimental, nous avons utilisé les Sep-Pak de Waters, qui sont des micro colonnes de silice comprimées. L'extrait comportant environ 50 à 52 mg de matière organique dissoute dans de l'hexane, du cyclohexane ou de l'heptane, est chargé sur la colonne ; trois fractions sont ensuite éluées successivement avec 40 ml d'hexane, fraction A (FA) - 20 ml de chloroforme, fraction B (FB) et 15 ml de méthanol qui permet de récupérer les constituants normalement éluables par le chloroforme et identiques aux constituants de la fraction B. Dans chaque expérience, nous avons vérifié l'efficacité de l'élué en évaluant le pourcentage de matière organique récupérée qui doit correspondre à 96 - 98 % de la matière organique initiale.

Séparation et analyse des hydrocarbures : La fraction FA, obtenue par passage sur Sep-Pak, contient la totalité des hydrocarbures saturés et aromatiques. Elle est analysée par chromatographie en phase gazeuse capillaire en utilisant des étalons standards, certains pourront être internes (Appareil Carlo-Erba, colonne capillaire SE 1 de 15 mètres, gaz vecteur : helium, pgm de 70 à 275° à 2° C/min⁻¹).

Les concentrations en hydrocarbures sont calculées à partir des chromatogrammes sur colonnes capillaires de la fraction FA en déterminant les aires des pics correspondants à chaque constituant, identifié à partir de son Rf. Les teneurs en n-alcanes à nombre d'atomes de carbone inférieur à 21, pairs ou impairs sont déterminées sur la base des rapports des aires des pics correspondants aux C₁₇/pristane et C₁₈/phytane. Les valeurs de ces rapports permettent de mettre en évidence l'importance des constituants d'origine biologique dans le mélange analysé, lorsque celui-ci est susceptible de subir une contamination par des fractions pétrolières.

Le pétrole renferme généralement des séries homologues d'hydrocarbures, les termes adjacents étant présents à des concentrations sensiblement égales, par exemple dans le cas des n-alcanes, il n'existe pas de prédominance des hydrocarbures à chaîne carbonée paire, par rapport à ceux possédant des chaînes impaires. Par contre pour les organismes vivants, il existe une forte prédominance des alcanes à chaîne impaire, notamment entre C₁₅ et C₂₁. De plus, le pétrole contient une variété beaucoup plus grande de cycloalcanes et d'aromatiques, les composés cycliques alkylés étant plus rares dans les organismes vivants. Enfin, le pétrole contient des hydrocarbures naphthéno-aromatiques absents des organismes marins.

La prédominance des alcanes impairs sur les alcanes pairs dans les sédiments testés a été établie en se référant à "l'indice de prédominance" ou C.P.I. (Carbone Préférence Index) selon Clark *et al.* Ce rapport est calculé à partir des aires des pics mesurés sur les chromatogrammes en colonnes capillaires :

$$C.P.I. = \frac{2(C_{23} + C_{25} + C_{27})}{C_{22} + 2C_{24} + 2C_{26} + C_{28}}$$

Traitement de l'eau de mer ou des milieux de culture : L'échantillon de 100 ml est mélangé à 50 ml de n-hexane sous agitation vigoureuse, la phase organique est récupérée, la phase aqueuse est soumise à un même traitement avec 2 fois 50 ml de n-hexane. Les trois extraits ainsi obtenus, sont réunis, séchés une nuit sur sulfate de sodium anhydre, évaporés, repris à l'hexane.

Cette dernière solution est chromatographiée par passage sur SEP PAK. La première fraction FA est obtenue après élution par l'hexane (10 ml) ; cette fraction qui contient la totalité des hydrocarbures de l'échantillon est desséchée par évaporation, pesée et analysée par chromatographie en phase gazeuse sur colonne capillaire.

Analyses microbiologiques des sédiments.

Milieux de culture : L'isolement et l'entretien des micro-organismes présents dans les sédiments ont été effectués sur des milieux nutritifs contenant : 1) soit une solution saline complète dont la composition, permettant de l'assimiler à une eau de mer synthétique (EMS), a été décrite par Bertrand et al., (1976) 2) soit de l'eau de mer naturelle prélevée dans la Lagune du Brusac (EM) préalablement filtrée sur filtre Millipore stérile pour éliminer les particules et les bactéries présentes et stockée à l'obscurité à 0°C. Cette eau de mer est supplémentée avec du chlorure d'ammonium (0,07 M) ou du nitrate de sodium (0,035 M). Il en est de même pour les milieux EMS qui peuvent contenir comme seule source d'azote NH_4Cl ou NH_4NO_3 à des concentrations identiques. Ces milieux nutritifs sont stérilisés à 120°C pendant 20 minutes après ajustement à pH 7,3 pour les milieux EMS et pH 8,0 pour l'eau de mer naturelle, (EMN).

La source de carbone est constituée pour les milieux riches (EMR) de bio-trypcase Mérieux (15 g/l) et de phytone Mérieux (5 g/l). Les autres milieux nutritifs (EMS ou eau de mer naturelle, EMN) contiennent les hydrocarbures comme seule source de carbone à la concentration de 2 g/l : Le fuel FD 1 est un gazoil léger comprenant en majeure partie des hydrocarbures aliphatiques ; Le carbexol est un produit naturel d'origine pétrolière fourni par la Société ELF-ERAP, constitué par un mélange d'hydrocarbures benzéniques ramifiés à chaîne contenant en moyenne 20 atomes de carbone ; Le pétrole brut est un pétrole léger (Arabian light) ; le FD 2 est un gazoil lourd constitué en majorité par des hydrocarbures aromatiques, des constituants contenant des hétéroatomes (P, S, O) et de l'asphaltène en faible concentration ; le constituant désigné sous le terme de HCM est composé de FD 1 (20 ml), d'une coupe pétrolière comprenant des hydrocarbures aliphatiques C_{12} à C_{18} (5 ml), de pétrole brut (0,2 ml) de FD 2 (1 ml), de dodécyl-benzène (5 ml), d'huile de parafine (1 ml), de pristane (5 ml), d'hexadécène (1 ml) de cyclohexane (1 ml), de benzène (1 ml) de méthyl-1-naphtalène (1 ml), de naphtalène (1 ml) et de phénantrène (1 ml). Les milieux solides sont préparés en ajoutant du bacto-agar à la concentration de 15 g/l aux milieux nutritifs liquides précédemment décrits.

Développement des micro-organismes : La détermination du nombre de bactéries présentes dans les sédiments a été réalisée dans les conditions classiques comportant la mise en suspension des cellules dans l'eau de mer naturelle, par agitation vigoureuse pendant 1 heure. Le liquide obtenu après décantation est utilisé pourensemencer, dans une gamme de dilutions allant de 10^{-2} à 10^{-8} , des milieux nutritifs EMR, EMS ou EMN, supplémentés en azote. La détermination du nombre de bactéries est ramenée à 1 g de sédiment humide après comptage du nombre de colonies dans les bonnes dilutions. Technique de Pochon et Tardieux (1962) et tables de MacGrady (1918). Les différentes colonies isolées sont ensuite conservées sur le milieu nutritif initial d'isolement.

Les populations mixtes comprenant l'ensemble des souches bactériennes isolées dans un sédiment, sont conservées à leur plus forte concentration sur des milieux EMR. Aucune identification de ces micro-organismes n'a été entreprise dans le cadre de ce travail.

Les croissances de la population bactérienne mixte isolée de ces sédiments, sont suivies par néphélométrie à 450 nm et exprimées en unités de densité optique (mesurée avec un spectrophotomètre ZEISS PM Q II). Ces croissances sont étudiées sur des milieux nutritifs EMS ou EMN supplémentés en NH_4Cl ou NH_4NO_3 contenant différents hydrocarbures comme seule source de carbone à des concentrations de 2 g/l et ensemencées avec un inoculum préparé à partir d'une population bactérienne totale recueillie sur un milieu nutritif solide EMR.

Pour établir une corrélation entre la turbidité du milieu exprimée en unité de D.O. et la matière bactérienne sèche, des aliquotes (environ 50 ml) de milieu de culture sont soumises à centrifugation, les cellules obtenues après lavage à l'eau de mer naturelle sont desséchées et pesées ; les corrections quant au poids réel de matière cellulaire sèche ont été effectuées selon les méthodes décrites par Bertrand et al. A titre indicatif, une D.O. de 1 correspond à une concentration cellulaire de 0,2 à 0,4 g/l selon la population mixte testée.

La dégradation des hydrocarbures par les différentes populations mixtes est déterminée dans les surnageants des milieux de culture débarassés par centrifugation de leurs micro-organismes ; ces surnageants sont traités dans les mêmes conditions que celles décrites pour le sédiment (Voir Méthodes Analytiques).

La dégradation bactérienne des hydrocarbures est réalisée :

1) en culture discontinue dans des fioles de Fernbach de 2 l contenant 500 ml de milieu liquide soumise à agitation à 200 tours/minutes à la température de 30°C, dans des conditions d'incubation de 2 à 10 jours, mais dans la plupart des cas, le temps d'incubation est limité à 48 heures.

2) en culture continue dans un fermenteur Ultraferm L.K.B. de 7 litres avec un volume utile de 4 l et dans les conditions suivantes : température 30°C, agitation 1000 RPM, concentration d'oxygène 30 vol/vol/heure, pH ajusté à 7,8 sous régulation continue par addition de soude 0,1 N, les taux de dilutions de l'ordre de 0,15 à 0,20 1/h sont calculés sur la base de temps de division cellulaire de 3 h à 4 h, les concentrations en hydrocarbures étant égales à 2 g/litre.

RESULTATS

Concentrations en hydrocarbures dans différents sédiments méditerranéens.

Les teneurs en hydrocarbures totaux présents dans les différents sédiments de la côte méditerranéenne varient dans de larges proportions suivant l'origine du sédiment testé (Tableaux 1 et 2). Il convient cependant de noter que les teneurs en carbone organique (C-AV-SP) varient aussi dans des proportions assez larges et l'évolution du rapport du carbone déterminé avant saponification sur le carbone mesuré après saponification donne une indication relativement bonne sur l'origine de ce carbone organique. En effet, les composés organiques saponifiables sont considérés en grande partie comme constitués par des acides gras estérifiés ou non dont la présence est consécutive à une activité biologique complexe comprenant, entre autres les produits de la transformation métabolique bactérienne des hydrocarbures biogéniques synthétisés par le phytoplancton et les végétaux marins ou anthropogéniques accumulés à la suite de déversements.

L'examen du Tableau 2 conduit à constater que les sédiments soumis à une forte pollution par des hydrocarbures anthropogéniques et à faible activité biologique présentent un rapport C-AV/C-AP voisin de l'unité, dans le cas contraire ce rapport est relativement important, voisin de 4 dans le cas d'un sédiment provenant d'un site n'ayant subi aucune pollution pétrolière. A titre indicatif, nous avons noté dans le Tableau 2 les différentes concentrations en carbone organique dans un sédiment prélevé dans la zone de contamination après l'accident de l'Amoco-Cadiz ; dans ce cas là, la concentration en hydrocarbures est de l'ordre de 33 g/kg de sédiment et le rapport C-AV/C-AP est égal à 1, ce qui laisse supposer une faible activité de dégradation de ces hydrocarbures dans ce sédiment pour des raisons sur lesquelles nous reviendrons ultérieurement.

Les arguments d'ordre expérimental permettant de justifier l'activité biologique et de sa répercussion sur le contenu en hydrocarbures dans un sédiment, peuvent être trouvés dans les résultats de l'analyse de ces hydrocarbures (aliphatiques ou aromatiques) et dans la détermination des taux respectifs des différents constituants de la fraction FA extraite des sédiments testés.

L'examen du Tableau 1 illustrant l'importance des hydrocarbures impairs et pairs à faible nombre d'atomes de carbone (inférieur à 21), permet de constater que pour le sédiment de l'île de la Cauvelle, considérée comme faiblement contaminée par des hydrocarbures anthropogéniques, l'indice de prédominance (C.P.I.) est voisin de l'unité. Cette valeur de l'indice de prédominance peut être considérée comme liée à une activité biologique non négligeable, si l'on se réfère en même temps aux valeurs des rapports C_{17} /pristane et C_{18} /phytane. En effet, la comparaison de ce sédiment avec ceux contaminés après l'accident de l'Amoco-Cadiz, conduit à constater que pour un C.P.I. identique et des rapports Pristane/Phytane voisins, les rapports C_{17} /pristane et C_{18} /phytane sont de 5 à 10 fois plus élevés, ce qui est corroboré par une prédominance des hydrocarbures légers C_{17} , C_{18} et C_{19} dans le sédiment de la Cauvelle et une concentration relativement plus faible en hydrocarbures aromatiques caractéristiques des pollutions pétrolières (phénantrène, 1-phénantrène, pyrène, fluorène).

Parallèlement nous noterons que la fraction FA, extraite d'un sédiment prélevé dans la zone portuaire de Fos ayant un rapport C-AV/C-AP élevé (Tableau 2), ne présente pas en prédominance des hydrocarbures légers mais contient, à des concentrations non négligeables, des hydrocarbures aromatiques d'origine pétrolière.

Evolution de la composition en hydrocarbures dans les sédiments méditerranéens.

Les variations dans les teneurs en hydrocarbures des sédiments prélevés en différents sites de la côte méditerranéenne, considérés comme non pollués par des épandages pétroliers, se retrouvent lorsque ces sédiments sont recueillis à différentes périodes de l'année. L'examen de la Figure 3, illustre cette observation et conduit à deux conclusions : la première portant sur le fait déjà constaté que les teneurs en hydrocarbures varient du simple au décuple en passant de la Lagune du Brusac à la Côte Bleue ; en second lieu nous noterons que les concentrations en hydrocarbures sont plus élevées en hiver qu'en été et ce pour les 2 types de sédiments. Cette variation est confirmée par les résultats consignés dans le Tableau 2 et illustrés par la figure 4, relatifs aux teneurs en hydrocarbures dans différents sites de la Lagune du Brusac et ce, pendant deux années consécutives.

L'étude des fractions FA extraites de sédiments prélevées en un même site de l'Etang de Berre en hiver et en été, nous a permis de noter une variation importante, de 2,03 g/kg de sédiment en hiver à 0,700 g/kg de sédiment en été.

DEFINITION DES POPULATIONS MIXTES ACTIVES A L'EGARD DES HYDROCARBURES PRESENTS DANS LES SEDIMENTS DE LA COTE MEDITERRANEENNE.

Dénombrement des bactéries des sédiments du Brusac et de l'Etang de Berre.

Les difficultés d'interprétation des variations observées dans les teneurs en hydrocarbures dans les différents de la côte méditerranéenne, conduisent naturellement à s'intéresser aux agents responsables de la transformation de ces hydrocarbures dans ces sédiments. Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes penchés sur le rôle des micro-organismes. La microflore bactérienne totale qui correspond en fait dans notre expérimentation à la microflore hétérotrophe, peut être dénombrée en utilisant d'une part, une source de carbone assimilable par tous les micro-organismes (phytone, biotrypcase) et, d'autre part, une matière organique spécifique, en l'occurrence les hydrocarbures.

Pour des raisons méthodologiques, nous avons retenu deux types de sédiments, le premier prélevé dans un site non pollué (Lagune du Brusac), le deuxième dans une zone de pollution chronique et dans un milieu marin partiellement fermé (Etang de Berre).

1 - La densité des micro-organismes hétérotrophes des sédiments du Brusac est de l'ordre de 5.10^8 cellules par g de sédiment humide, valeur moyenne pour cinq sédiments prélevés dans le même site en hiver. La densité moyenne des bactéries se développant sur hydrocarbures (HCM) numérotées simultanément dans ce même sédiment est très nettement inférieure soit de l'ordre de 6.10^4 cellules par g de sédiment humide. On peut donc considérer que dans ce type de sédiment les bactéries capables de se développer sur hydrocarbures représentent en moyenne 0,01 % des micro-organismes hétérotrophes.

Ce faible pourcentage est consécutif à la présence en quantité importante de matière organique différente des hydrocarbures ou à la méthode utilisée pour le dénombrement qui ne permet pas de libérer toutes les bactéries absorbées sur les sédiments et donc de les compter.

Dans une autre série d'expériences nous avons optimisé ces conditions de milieu en vue du développement bactérien aux dépens de la matière organique présente dans le sédiment testé. Cette optimisation a été obtenue en introduisant 100 g de sédiment sec provenant de la Lagune du Brusac dans 500 ml d'eau de mer naturelle (EMN) supplémentée par de l'azote NH_4^+ et en laissant ce mélange incubé pendant 48 heures sous forte agitation et à température de 30°C. Une expérience identique a été réalisée en présence d'eau de mer (EMN) non supplémentée. En fin d'expérience la densité bactérienne hétérotrophe n'augmente pratiquement pas dans ces 2 types d'expériences, alors que le pourcentage de bactéries capables de se développer sur hydrocarbures augmente notablement, il représente en moyenne 1 % des micro-organismes hétérotrophes dans le cas du premier type d'expériences et de 10 % pour le 2ème type d'expériences.

Après ces incubations les sédiments sont recueillis et analysés, leurs concentrations en hydrocarbures diminuent respectivement de 60 et 95 % par rapport aux concentrations initiales. Enfin dans une 3ème série d'expériences l'eau de mer naturelle (EMN) utilisée pour ces incubations a été supplémentée avec de l' NH_4Cl et du gazoil FD 1 à une concentration de l'ordre de 200 mg de FD 1 par kg de sédiment sec. Le dénombrement des bactéries après 48 Heures d'incubation conduit à mettre en évidence une densité en bactéries hétérotrophes de l'ordre de 10^9 cellules par g de sédiment humide et un pourcentage de l'ordre de 60 à 90 % de bactéries aptes à se développer sur hydrocarbures.

2 - Les mêmes expériences de dénombrement bactérien ont été entreprises sur le sédiment de l'Etang de Berre prélevé en hiver et présentant une teneur en hydrocarbures nettement plus forte (environ 10 fois) que celle déterminée sur un sédiment de la Lagune du Brus.

La densité des micro-organismes hétérotrophes est nettement plus élevée, de l'ordre de 10^{12} cellules par g de sédiment humide avec un pourcentage en bactéries capables de se développer sur hydrocarbures de l'ordre de 60 à 80 %. L'incubation en (EMN) supplémentée en NH_4Cl dans les conditions d'incubation décrites plus haut conduit à un accroissement du nombre de bactéries 10^{13} cellules par g de sédiment humide et à un taux de dégradation des hydrocarbures de l'ordre de 55 à 60 %. L'analyse chimique de la fraction FA extraite du sédiment traité nous a permis de vérifier que dans ces conditions d'incubation les hydrocarbures résiduels non dégradés sont essentiellement des aromatiques.

Comportement des populations bactériennes mixtes isolées des sédiments (Brusc) de l'Etang de Berre (MLP) et du Brus (Brusc).

La population bactérienne mixte isolée du sédiment prélevé dans la Lagune du Brus, capable de se développer sur hydrocarbures, est composée de 7 souches différentes si l'on se réfère à l'aspect des colonies elle a été désignée sous le terme de population "Brusc". Une population mixte identique a été isolée du sédiment prélevé dans l'Etang de Berre, désignée sous le terme de "MLP" elle est composée de 5 souches différentes. Les différences essentielles entre ces 2 populations mixtes ne peuvent être dans l'état actuel de notre expérimentation précisées, aucune identification taxonomique n'ayant été réalisée ; cependant sur la base des différences morphologiques des colonies nous pouvons, en première approximation, conclure que les souches observées dans ces 2 populations sont différentes. Nous ajouterons que ces 2 populations mixtes prises globalement, ont un comportement différent à l'égard de la source d'azote, (NH_4Cl ou NH_4NO_3). En effet, l'incubation des 2 sédiments (Brusc et Etang de Berre) en eau de mer naturelle (EMN) supplémentée par du nitrate à la place de l'ammonium conduit à des résultats différents si on prend en considération la densité des bactéries capables d'utiliser les hydrocarbures par rapport aux bactéries hétérotrophes totales.

Dans le cas du sédiment "Brusc" après 8 Jours d'incubation le nombre de bactéries hétérotrophes ne change pratiquement pas (10^8 cellules/gramme de sédiment humide), par contre la concentration en bactéries aptes à se développer sur hydrocarbures est inférieure à 10^3 cellules/gramme de sédiment humide, soit environ 0,001 % de la population d'hétérotrophes. La même expérience réalisée avec le sédiment de l'Etang de Berre conduit aussi à une diminution de la concentration des bactéries utilisant les hydrocarbures, concentration qui passe de 80 % à 0,01 % lorsque le nitrate remplace l'ammonium.

Il résulte de ces observations qu'en fonction de la source d'azote ces populations bactériennes des sédiments ont un comportement à l'égard des hydrocarbures différent. Pour une meilleure compréhension de ce phénomène nous avons utilisé les 2 types de populations mixtes "Brusc" ou "MLP" dans des milieux nutritifs (EMN) contenant soit du nitrate, soit de l'ammonium comme source d'azote et différents hydrocarbures comme source de carbone. Les résultats obtenus et consignés dans le Tableau 3 montrent l'importance de la source d'azote. Ainsi nous constatons qu'à l'égard des hydrocarbures aliphatiques le développement est possible en présence de nitrate mais reste très nettement inférieur à celui obtenu en présence d'ammonium. Par contre le développement sur les hydrocarbures cycliques ou aromatiques est pratiquement nul en présence de nitrate pour les 2 types de populations. De plus, nous noterons qu'en accord avec notre précédente conclusion, le mélange MLP est plus actif à l'égard des hydrocarbures quelle que soit la source d'azote que le mélange du Brus.

Dégradation des hydrocarbures par la population mixte MLP, isolée du sédiment de l'étang de Berre.

Cette population mixte comportant 5 souches différentes a été testée dans une série d'expériences de croissance sur différents hydrocarbures. Après 48 heures d'incubation en culture discontinue, nous nous sommes intéressés à identifier les souches présentes dans chacun des milieux. L'examen des résultats consignés dans le tableau 4 permet de constater que certaines souches n'apparaissent pas lorsque la population se développe sur les hydrocarbures aromatiques cycliques ou branchés.

Parallèlement si nous nous intéressons au taux de dégradation des différents constituants par la population mixte MLP dans des milieux nutritifs EMN-NH₄Cl, nous constatons que les hydrocarbures cycliques aromatiques et branchés sont moins bien dégradés que les hydrocarbures aliphatiques (Tableau 5).

Dans une autre série d'expériences nous avons utilisé des sédiments provenant de la lagune du Brusç, préalablement débarrassés de toute matière organique. Après dessiccation ces sédiments ont été mélangés avec différents hydrocarbures. Ce matériel est ensuite incubé pendant 8 jours dans un milieu nutritif contenant un inoculum bactérien MLP (10^8 cellules/gramme de sédiments). En fin d'incubation ce sédiment est recueilli et soumis à une extraction dans les conditions indiquées dans matériel et méthodes. La fraction FA obtenue est analysée. Les résultats de cette analyse différeront en fonction de la nature des hydrocarbures utilisés. Dans la figure 5 nous montrons que le pétrole brut après traitement subit une transformation portant sur la disparition préférentielle des hydrocarbures aliphatiques. Lorsqu'on utilise le mélange suivant : hydrocarbure aliphatique (tridécané), hydrocarbure branché (pristane), hydrocarbure cyclique branché (nonyl-benzène) dans une concentration équimoléculaire à raison de 2,4 g/kg de sédiment sec, nous obtenons après 8 jours d'incubation une dégradation des 3 constituants dans des proportions respectivement égales à 77 %, 30 % et 74 %. Ce résultat est indicatif d'une dégradation simultanée des 3 types de constituants avec une attaque plus efficace sur les hydrocarbures aliphatiques. Il est important de noter que cette population mixte M.L.P. dégrade les hydrocarbures cycliques même en présence d'hydrocarbures aliphatiques. (Tableau 5).

Pour une meilleure interprétation de l'aptitude de la population M.L.P. à dégrader les mélanges complexes d'hydrocarbures, nous avons expérimenté cette population en culture continue dans un fermenteur de 7 l. A la sortie du fermenteur, nous avons déterminé la biomasse qui est de l'ordre de 1 g/l c'est à dire un rendement de 50 % et un taux de dégradation du fuel de l'ordre de 75 %. L'analyse des constituants présents dans ce fuel avant et après dégradation est illustrée par la figure 6. Nous noterons qu'après dégradation, le profil du chromatogramme de la fraction contenant les hydrocarbures résiduels est totalement différent de celui obtenu avec le fuel non dégradé. Les prédominances étant indicatives d'une activité bactérienne portant sur certaines classes d'hydrocarbures. Le fait expérimental intéressant dans cette analyse est relatif à l'apparition d'un pic très important dans les chromatogrammes au niveau de C₂₅ (Figure 6). Ce pic pourrait correspondre à l'apparition d'un hydrocarbure aliphatique synthétisé en cours de culture sur fuel domestique par la population bactérienne mixte M.L.P. Cependant le traitement énergique de cette fraction par de la KOH à forte concentration pendant 8 heures, permet de dissocier ce pic avec apparition d'une fraction saponifiable qui est éliminée. L'analyse de ce nouvel insaponifiable nous a conduit à mettre en évidence une diminution importante du pic en C₂₅ qui correspond probablement à un ester accumulé en cours de culture, constituant dont la nature reste à élucider.

CONCLUSION

Les résultats obtenus dans l'étude entreprise sur l'évolution des hydrocarbures présents dans divers sédiments de la côte méditerranéenne, nous permettent d'avancer en première approximation, un certain nombre de conclusions qu'il conviendrait de conforter par une expérimentation complémentaire.

Dans un premier temps nous nous sommes attachés à mettre au point des techniques analytiques efficaces, pour une bonne interprétation de nos analyses. Il convient de souligner les difficultés rencontrées par l'analyste pour extraire totalement la matière organique présente dans un sédiment marin, compte tenu des capacités d'absorption de ce matériel. Ainsi, il résulte de notre expérimentation que les extractions en soxhlet par un mélange de méthanol-toluène paraissent convenir le mieux aux différents types de sédiments testés. Les fractionnements sur colonne Sep-Pak conduisent à une séparation rapide et relativement bonne

de la fraction insaponifiable contenant la totalité des hydrocarbures (fraction FA).

Les résultats consignés dans les divers tableaux et figures de la première partie de cette étude conduisent à constater que tous les sédiments testés de la côte méditerranéenne contiennent des hydrocarbures dont les concentrations varient d'un site de prélèvement à un autre et ce en fonction des saisons. Ces variations sont très probablement liées à une activité biologique (phytoplancton, plantes etc...) qui a été signalée par de nombreux auteurs pour d'autres sédiments mais qui reste à déterminer. Les hydrocarbures d'origine biologique des sédiments situés dans des sites considérés comme non pollués présentent toujours des profils analytiques assez spécifiques avec des prédominances de constituants qui peuvent être parfaitement évaluées. Il résulte de nos observations que des teneurs en hydrocarbures de l'ordre de 0,3 g/kg de sédiment sec, constituent les limites supérieures au delà desquelles nous pouvons penser à des accumulations d'hydrocarbures anthropogéniques. Effectivement, dans les zones polluées (sédiments de l'Etang de Berre), les concentrations en hydrocarbures sont fortes avec un profil impliquant une teneur élevée en hydrocarbures cycliques et aromatiques. L'interprétation des variations observées dans les teneurs en hydrocarbures dans certains sédiments reste difficile lorsque ceux-ci sont situés dans des zones soumises à des pollutions chroniques non négligeables mais où l'activité bactérienne reste importante et efficace. Dans ces cas particuliers seule l'analyse des divers constituants de la matière organique par des méthodes performantes, peut apporter une réponse.

Nous ajouterons que la détermination des teneurs en hydrocarbures dans différents sédiments est intéressante lorsque il est nécessaire d'établir pour l'ensemble des biotopes naturels en Méditerranée comme ailleurs (Océans Pacifique et Atlantique) un inventaire aussi large que possible. Nos observations apportent une contribution non négligeable dans ce domaine. Elles montrent, en particulier, qu'il existe une fourchette de concentrations en hydrocarbures dans les sédiments côtiers de la Méditerranée. Notre démarche consistera donc à l'avenir à conforter ces observations par des analyses sur des sédiments prélevés dans des sites méditerranéens différents de ceux où nous avons effectué notre étude. Un complément indispensable à cette analyse sur les teneurs en hydrocarbures dans les sédiments se trouvera dans une détermination plus précise, sur le plan analytique, des autres constituants de la matière organique extraite (acide gras, cétones, pigments, cires ...).

Enfin, il convient de préciser que l'étude de l'évolution de la matière organique dans un milieu naturel, ne peut se concevoir qu'en complément d'une étude biologique sur des organismes vivants, et plus particulièrement les micro-organismes, impliqués dans la transformation de cette matière organique.

Les résultats décrits dans la deuxième partie de ce mémoire complètent nos observations précédentes sur la nature et l'évolution des hydrocarbures des sédiments marins, prélevés dans divers sites de la Côte Méditerranéenne.

En premier lieu, nous avons noté que la densité de la population bactérienne, active à l'égard des hydrocarbures, par rapport à la population hétérotrophe totale, était nettement plus élevée dans les sédiments pollués par des hydrocarbures. En accord avec cette observation, nous avons montré en laboratoire que l'addition d'hydrocarbures à un sédiment non pollué entraînait un accroissement significatif de la population bactérienne active à l'égard des hydrocarbures.

Le deuxième élément d'interprétation de nos résultats est relatif à l'activité métabolique des populations mixtes isolées de chacun de ces sédiments. Nous avons aussi montré que les souches isolées de l'Etang de Berre (M.L.P.) ont un spectre d'activité à l'égard des différentes classes d'hydrocarbures plus large que les souches isolées de la Lagune du Brus. Par voie de conséquence, la biomasse d'origine bactérienne sera nettement plus importante dans les sédiments pollués.

Il convient de souligner que les mécanismes de dégradation des hydrocarbures par la population bactérienne active dans des sédiments pollués ou non, est directement fonction de la nature de la source d'azote présente dans ces sédiments. Nos résultats établissent de manière très précise, qu'en présence de nitrate la dégradation des hydrocarbures aliphatiques est relativement faible alors que les hydrocarbures cycliques ou aromatiques ne sont pratiquement pas métabolisés. Ce point particulièrement important de notre étude nous amènera ultérieurement à nous intéresser au cycle de l'azote dans les sédiments où nous désirons étudier l'évolution de la matière organique.

L'analyse fine du comportement d'une population mixte dans un milieu de culture parfaitement contrôlé, en laboratoire, nous a conduit à des difficultés d'interprétation des résultats expérimentaux obtenus, au cours soit du développement, soit de l'activité métabolique de cette population. Il semble, au vu de nos résultats, qu'en présence d'une source de carbone unique, la sélection s'opèrera très rapidement au profit d'une seule souche qui dégrade le constituant de manière préférentielle. L'intérêt de ces cultures mixtes se manifeste dans le fait que les autres souches se maintiennent à un niveau bas, mais non négligeable. L'introduction dans le milieu de culture d'un mélange d'hydrocarbures entraîne simultanément le développement de l'ensemble des souches avec une dégradation de ces différents constituants

relativement large si l'on se réfère aux résultats consignés dans le Tableau 8. Il est évident que la transposition de cette étude dans un milieu naturel ne permettra pas de résoudre pour autant les problèmes complexes soulevés par notre étude en laboratoire.

En conclusion nous sommes amenés à nous interroger sur le type d'expérimentation nécessaire pour la compréhension, en laboratoire, des mécanismes d'utilisation de la matière organique par une population mixte, et principalement des interactions susceptibles d'exister lorsque plusieurs souches sont susceptibles de dégrader différents substrats carbonés présents en même temps, à des concentrations variables. Il est évident que l'une des voies d'approche porterait sur l'utilisation des cultures continues, à faible concentration en substrat, contrairement aux cultures continues de type industriel. Dans ces conditions, il est possible de définir les états d'équilibre en fonction des taux de dilution imposés aux milieux en ne s'intéressant pas à la biomasse produite, mais plutôt au taux de transformation de la matière organique introduite dans les réacteurs.

Travail réalisé avec l'aide du C.N.E.X.O., contrat n° 79/2032 et de l'A.T.P. du C.N.R.S. Océanographie chimique.

RESUME

L'évolution des hydrocarbures dans les sédiments marins de la côte méditerranéenne a été étudiée par deux méthodes d'approche différentes mais complémentaires.

Les techniques analytiques spécialement adaptées au matériel sédimentaire ont conduit à une détermination relativement précise et reproductible des concentrations en hydrocarbures dans des sédiments prélevés en plusieurs sites de la côte méditerranéenne pollués ou non par des épandages chroniques de pétrole. (Lagune du Brusq, Zone des Embiez, de Fos, Carry le Rouet, Etang de Berre).

Les concentrations en hydrocarbures dans des sédiments non pollués sont toujours inférieures à 0,3 g/kg de sédiment sec, avec des variations importantes selon les saisons (X 4 en hiver).

Dans les sédiments pollués, les concentrations en hydrocarbures sont toujours supérieures à 0,3 g/kg de sédiment avec des variations difficiles à interpréter. De plus, le profil analytique de ces hydrocarbures présente des différences notables par rapport à celui obtenu sur la fraction d'hydrocarbures, extraite des sédiments non pollués. Ces différences portent principalement sur les concentrations relatives en hydrocarbures pairs et impairs, sur les indices de prédominance et enfin sur la présence de composés aromatiques ou polyaromatiques, spécifique des fractions pétrolières.

Les analyses chimiques réalisées à diverses périodes de l'année sur des sédiments prélevés dans des zones portuaires soumises à des pollutions chroniques et à de fortes activités microbiennes ont conduit à montrer que l'existence de cette flore microbienne était responsable de l'accroissement des capacités autoépurations de ces biotopes. En conformité avec ces résultats, il a été noté que la densité de la population bactérienne active à l'égard des hydrocarbures par rapport à la population hétérotrophe totale était nettement plus élevée dans les sédiments pollués par des épandages pétroliers. Une étude physiologique plus précise sur le comportement des populations bactériennes mixtes présentes dans ces sédiments a permis d'apporter des éléments d'information sur les capacités métaboliques de ces populations prises individuellement ou globalement. Les aptitudes particulièrement larges et performantes des micro-organismes appartenant à ces populations peuvent être contrecarrées lorsque la source d'azote mise à la disposition de cette flore microbienne est constituée par du nitrate. Cette observation explique les accumulations des composés polyaromatiques ou cycliques dans des sédiments pollués ne contenant pas d'ammonium comme source d'azote.

MOTS CLES

Hydrocarbures - Sédiments côtiers méditerranéens - Populations bactériennes mixtes
Pollutions pétrolières - Biodégradation.

Composition :									
Matière Organique (g)	Fraction FA								
	Origine	Alc.	Ar.	Phe/C ₁ -Phe	Flu/Py	C ₁₇ /Pr	C ₁₈ /Phy	Pr/Phy	C.P.I.
C.AV.SP : 0.450	<u>Ile de la cauvelle</u>								
	Sample 1	C ₁₇ -C ₂₁	Flu, Phe, C ₁ -Phe	1	1.2	3.75	4	0.61	1.01
C.AP.SP : 0.300	" 2	C ₁₇ -C ₂₁	Idem	1	1.2	5.1	3.7	0.70	1.05
FA : 0.040	" 3	C ₁₇ -C ₂₁	Idem + C ₂ -Phe	0,97	1.2	5.2	3.3	0,56	1.01
FB : 0.200	<u>Amoco-Cadiz**</u>								
	AS 1					1	0.77	0.54	1
C.AV.SP : 1.50	AS 2		n.d.			0.68	0.39	0.54	1.02
C.AP.SP	AS 3					0.6	0.47	0.60	1

Tableau 1 : Hydrocarbures extraits des sédiments de la mer méditerranée à la station de "l'Ile de la Cauvelle" (Janvier 1980).

Le contenu relatif (n-C₁₇ et n-C₁₈) est évalué à partir de l'aire de chaque pic de la fraction FA mesurée dans la colonne capillaire en tenant compte de la surface des pics des 2 standards internes. Pristane (Pr) et Phytane (Phy). Les hydrocarbures prédominants alcanes (Al) ou aromatiques (Ar) sont sélectionnés à partir de la surface des pics des chromatogrammes.

nd : non déterminé, Fluorène (Flu), Pyrène (Py), Phenanthrène (Phe).

* : Les poids indiqués en g par kg de sédiments sont standardisés.

** : Ces valeurs correspondent aux sédiments collectés dans 3 sites (AS₁-AS₂-AS₃) de "Grande Ile" après l'accident de l'accident de l'Amoco-Cadiz.

TENEURS EN HYDROCARBURES DANS LES SEDIMENTS MEDITERRANEENS

SEDIMENTS	C-AV-SP	C-AP-SP	FA	FB	Poids	C-AV/C-AP
Ile de la Cauvelle (Hiver)	0,45	0,300	0,040	0,20	0,040	1,50
Lagune du Brusc (Hiver)	2	1,47	0,280	1,19	0,280	1,36
Plage du Rayollet (Printemps)	0,20	0,05	0,020	0,03	0,020	4,08
FOS (Hiver)	0,98	0,28	0,060	0,10	0,060	3,5
Etang de Berre (Hiver)	16,02	6,45	2,03	4,42	2,03	2,48
Amoco-Cadiz *	73,06	67,6	33	35,7	32,97	1,09

Tableau 2 : Les concentrations en hydrocarbures des sédiments, exprimées en g par kg de sédiment sec, sont déterminées pondérablement à partir de la fraction FA desséchée (voir matériel et méthodes). Les sédiments ont été prélevés en surface sur une épaisseur de 5 cm. C-AV-SP et C-AP-SP et correspondent aux concentrations en carbone organique (g/kg de sédimentsec) déterminées avant et après saponification de la fraction extraite après traitement par le méthanol-toluène en soxhlet. FA et FB correspondent respectivement aux fractions extraites après passage sur Sep-pak par l'hexane ou le chloroforme. Amoco-Cadiz* correspond à un sédiment prélevé à L'Ile Grande après l'accident de "l'Amoco-Cadiz".

DEGRADATION DES HYDROCARBURES PAR LES SOUCHES BACTERIENNES
ISOLEES DES SEDIMENTS

SUBSTRATS	Souches Brusc		Souches M.L.P.	
	avec NO ₃ ⁻	avec NH ₄ ⁺	avec NO ₃ ⁻	avec NH ₄ ⁺
Octane	NT	+	NT	++
Décane	NT	+	NT	++
Tridécane	+	+	+	++
Héxane	+	++	+	++
Eicosane	+	++	+	++
Iso-octane	+	+	±	+
Pristane	NT	+	NT	+
Hexadécène	++	±	++	++
Cyclooctane	-	±	-	++
Cyclododécane	-	+	-	+
Benzène	-	±	-	+
1-3 Diéthyl-benzène	-	±	-	-
Dodécyl-benzène	NT	+	NT	+
Naphtalène	-	+	-	+
Méthyl-1-naphtalène	+	+	±	+
Ethyl-2-naphtalène	-	±	-	++
Phénanthrène	-	+	-	+
Mélange HCM*	±	+++	±	+++
Adamentane	-	±	-	+++
Carbexol*	NT	NT	NT	++
FD 2*	-	±	-	+++
Pétrole brut	+	+	+	++
Huile de paraffine	+	+	+	+

Tableau 3 : Les cultures mixtes comprenant 7 souches isolées du sédiment de la Lagune du Brusc (Brusc) et comprenant les 5 souches isolées du sédiment de l'Etang de Berre (MLP), sont mises en incubation pendant 48 heures dans des milieux nutritifs (EMN, N-NO₃⁻) ou (EMN, N-NH₄⁺) contenant différents hydrocarbures à la concentration de 2 g/l. La croissance bactérienne est évaluée par mesure de D.O. à 450 nm, (+++) correspond à une D.O. supérieure à 3, (±) à une D.O. inférieure à 1.

* Mélange HCM, carbexol de FD 2 sont définis dans matériel et méthodes.

DEGRADATION DES HYDROCARBURES PAR LA CULTURE MIXTE (MLP)
ISOLEE DE L'ETANG DE BERRE

SUBSTRATS	M.L.P. 1	M.L.P. 2	M.L.P. 3	M.L.P. 4.	M.L.P. 5
Iso-octane	-	-	++	-	++
Cyclohexane	-	-	++	-	++
Cyclododécane	-	-	++	-	++
Diethyl-benzène	+	-	++	-	++
Adamentane	+	+	++	-	+
Mélange HCM	+	+	++	+	++
Naphtalène	+	-	++	-	++
Méthyl-1-naphtalène	-	-	+	-	++
Phénantrène	+	-	++	-	++

Tableau 4 : Les milieux nutritifs (EMN, $N-NH_4^+$) contenant différents hydrocarbures (2 g/l) comme seule source de carbone sontensemencés avec un inoculum provenant d'une culture mixte (MLP) sur le mélange HCM. Après 48 h d'incubation en culture discontinuée sous agitation vigoureuse à 30°C, les identifications des souches présentes dans chacun des milieux de culture sont entreprises dans les conditions décrites dans matériel et méthodes.

POURCENTAGE DE BIODEGRADATION DE DIVERS HYDROCARBURES
PAR LA POPULATION MIXTE MLP

Hydrocarbures	% de dégradation
Cyclododécane	30 à 50
Pristane	30
Ethyl-2-naphtalène	34
Phénanthrène	40 à 45
Nonylbenzène	70 à 72
nC ₁₃	77 à 80
nC ₁₅	environ 75

Tableau 5 : Les résultats obtenus proviennent d'une intrication entre les mesures effectuées à partir de sédiments "chargés", pour le pristane, le nC₁₃ et le nonyl-benzène, ou à partir de milieux de culture (EMN, NH₄Cl) contenant les autres hydrocarbures comme source de carbone. La biodégradation est réalisée en culture discontinue. La souche utilisée, MLP, a été isolée du sédiment de l'Etang de Berre.

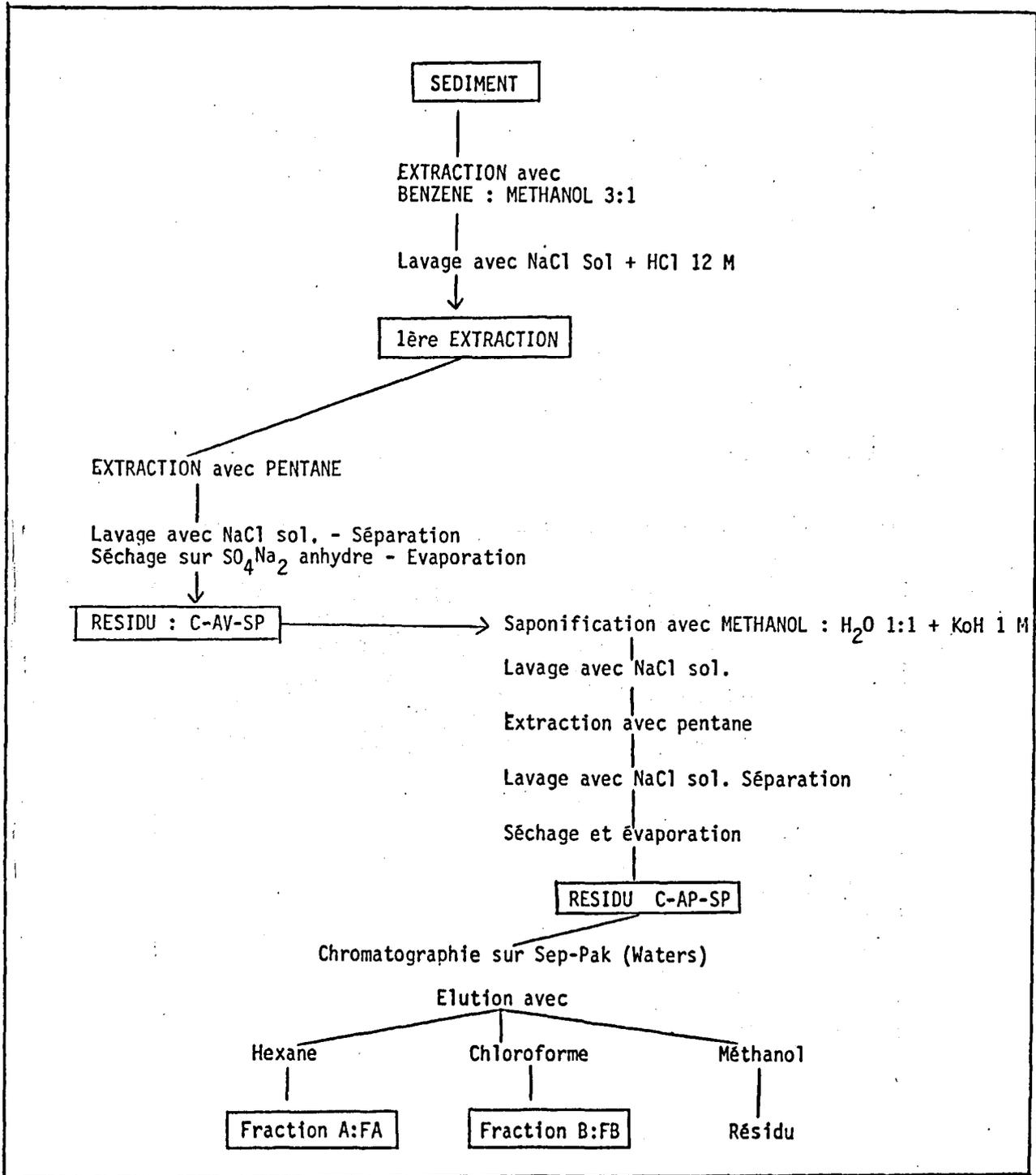


Figure 2 : Schéma d'extraction et de séparation des hydrocarbures contenus dans un sédiment marin (100 g de sédiment humide).

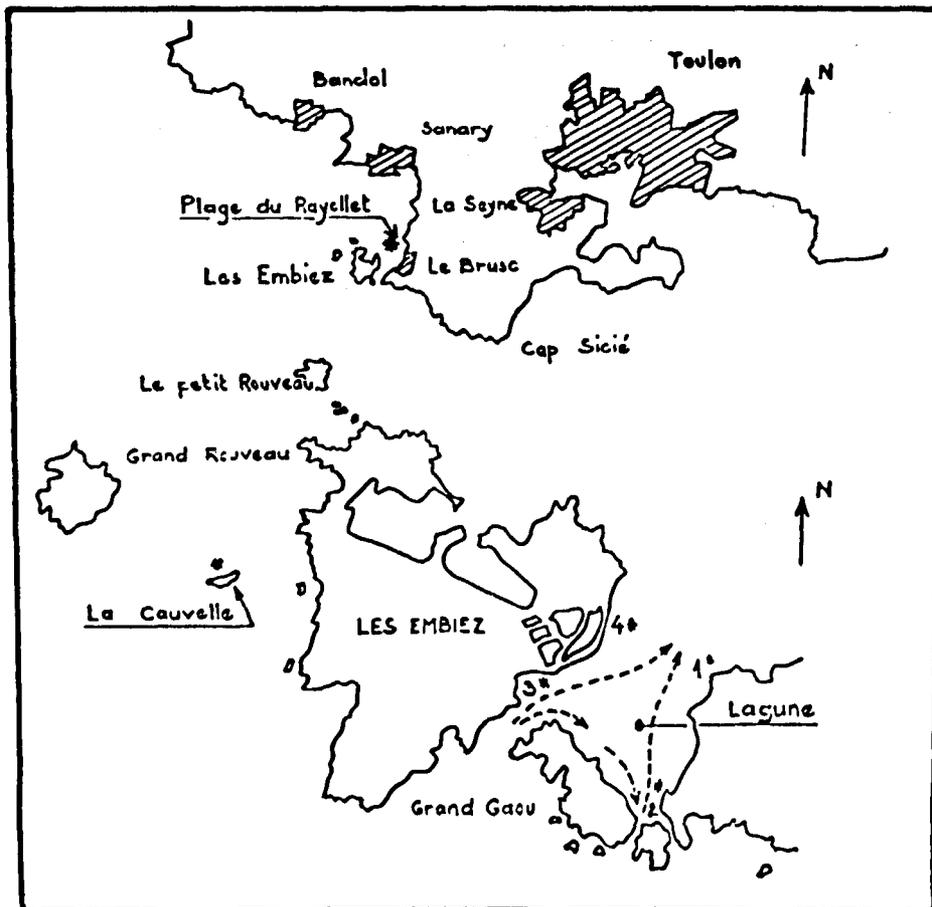
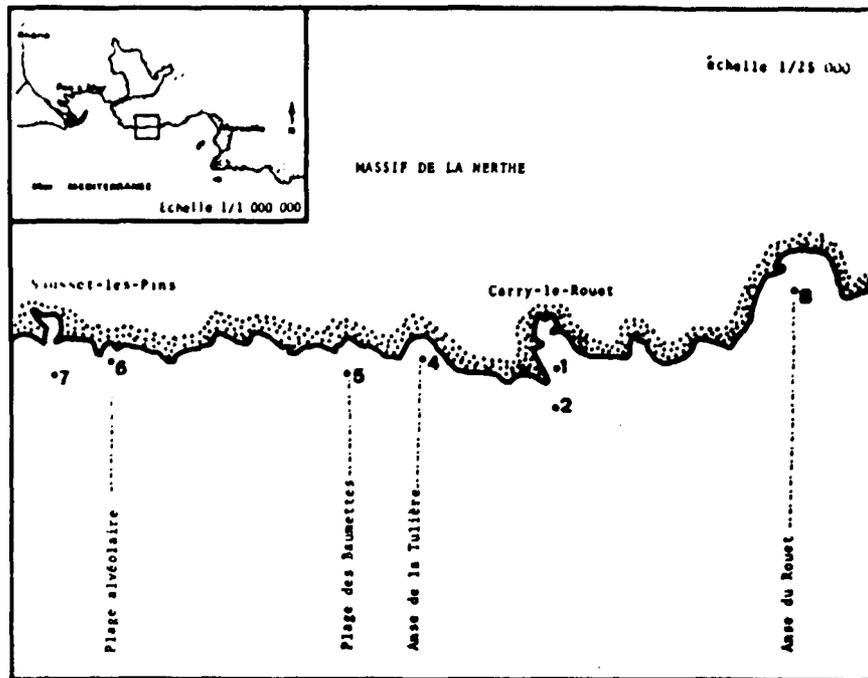


Figure 1 : Situation géographique de la zone littorale étudiée. Les numérotations utilisées correspondent aux sites de prélèvement.

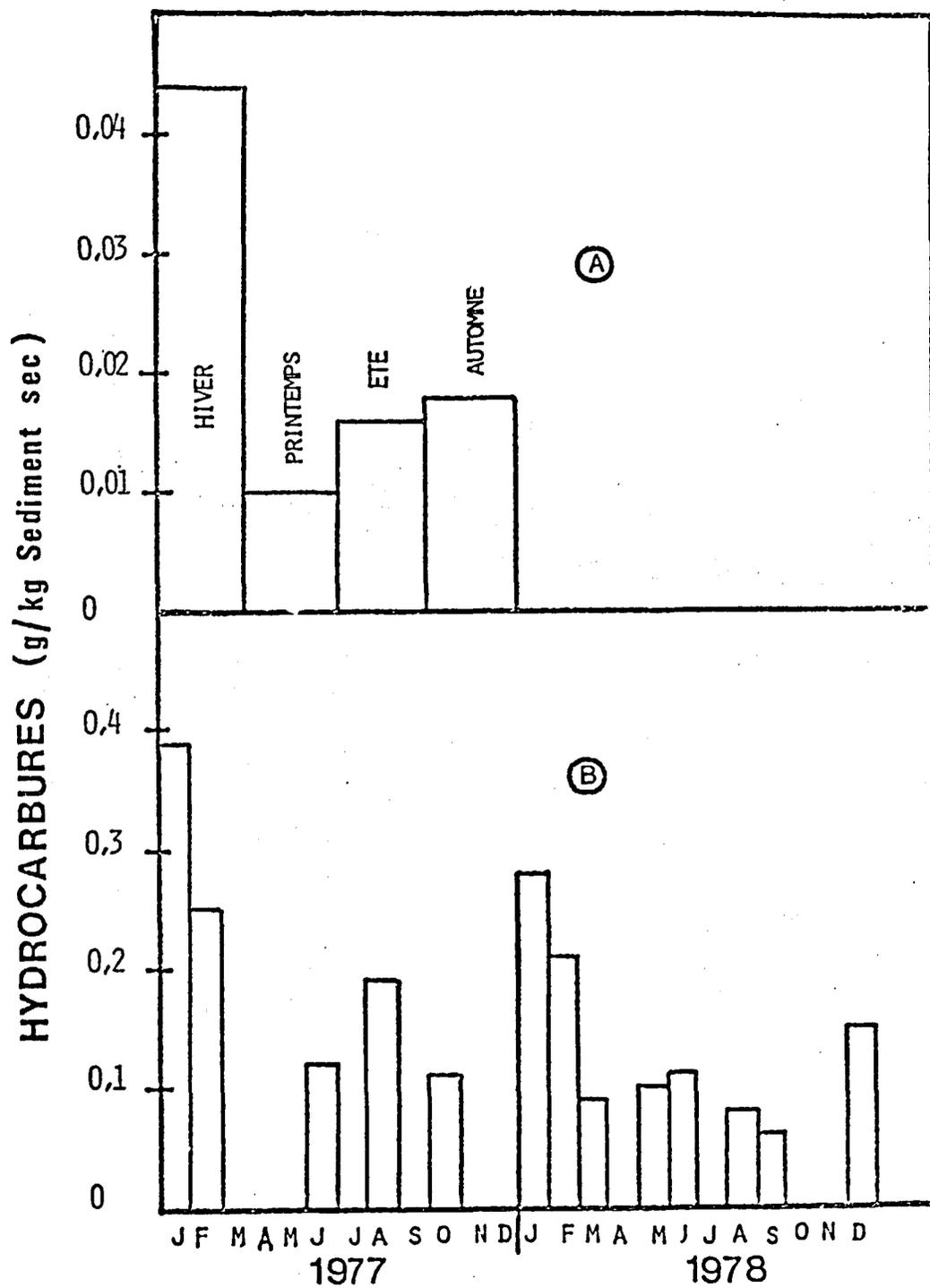


Figure 3 : Histogramme de la concentration en hydrocarbures à différentes périodes de l'année. A Plage des Beaumettes, Côte Bleue, B Lagune du Brusç.

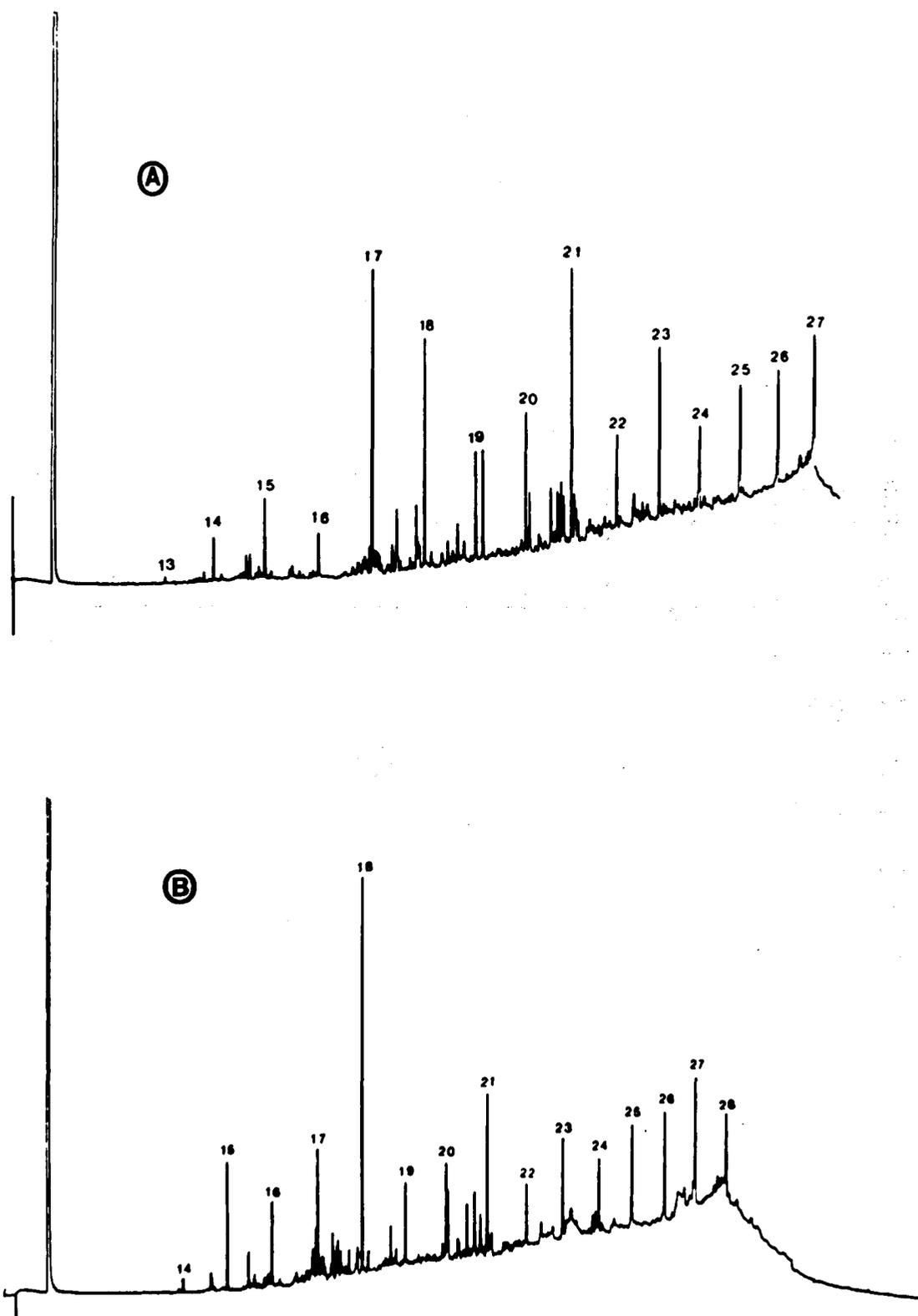


Figure 4 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse capillaire de la fraction FA obtenue par traitement en soxhlet d'un sédiment prélevé sur un site de la Lagune de Brusac en Janvier 1978 (chromatogramme supérieur) (A) et Mars 1978 (chromatogramme inférieur) (B).

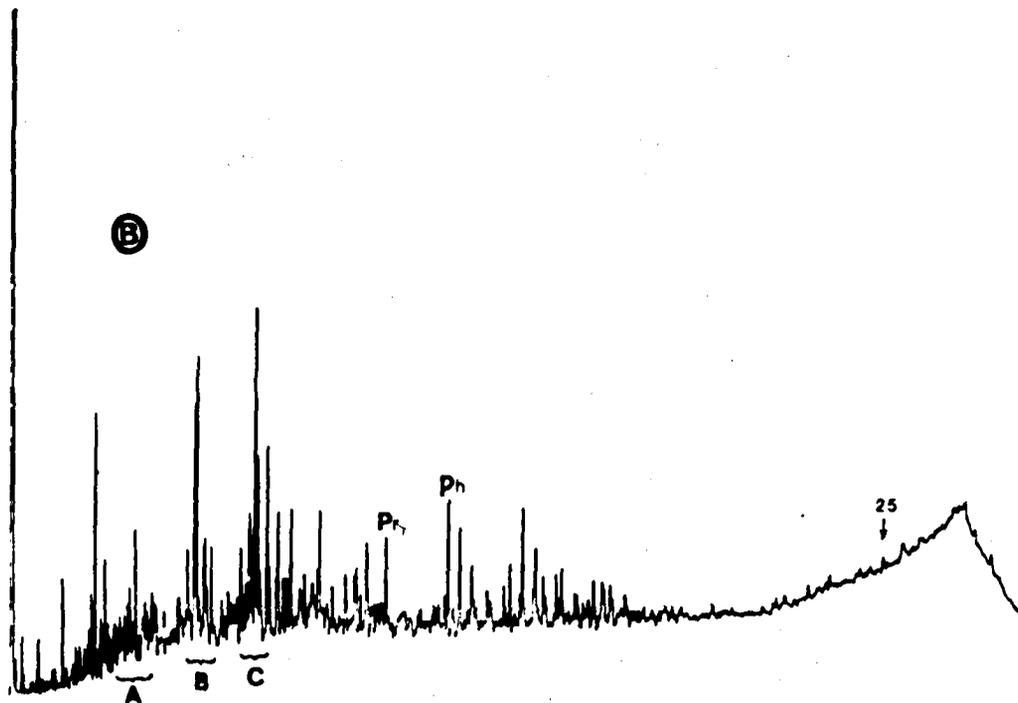
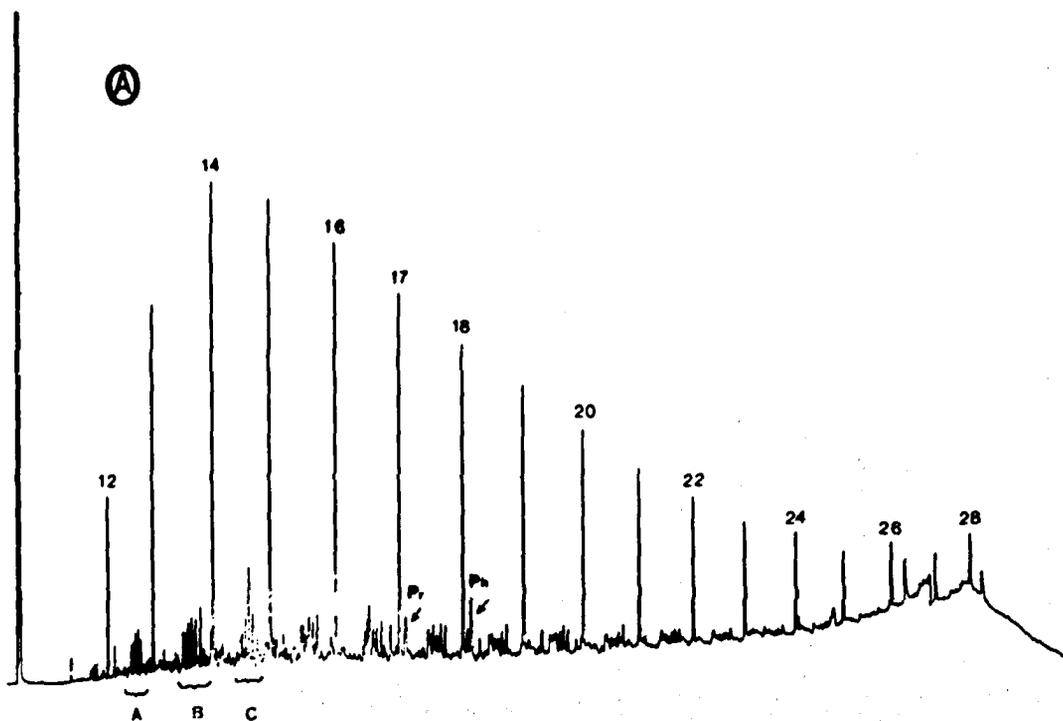


Figure 5 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse capillaire dans les conditions décrites dans matériel et méthodes, d'un pétrole brut Arabian Light (Figure supérieure) (A). Analyse identique réalisée sur la fraction FA extraite d'un sédiment du Brusac préalablement débarrassé de toute matière organique, séché et mélangé avec un pétrole brut Arabian Light (concentration de 200 mg/kg). Ce sédiment "chargé" est ensuite mis en incubation pendant 8 jours dans un milieu nutritif (EMS + N-NH₄⁺) contenant un inoculum bactérien MLP (10⁸ cellules par g de sédiment) (Figure inférieure) (B).

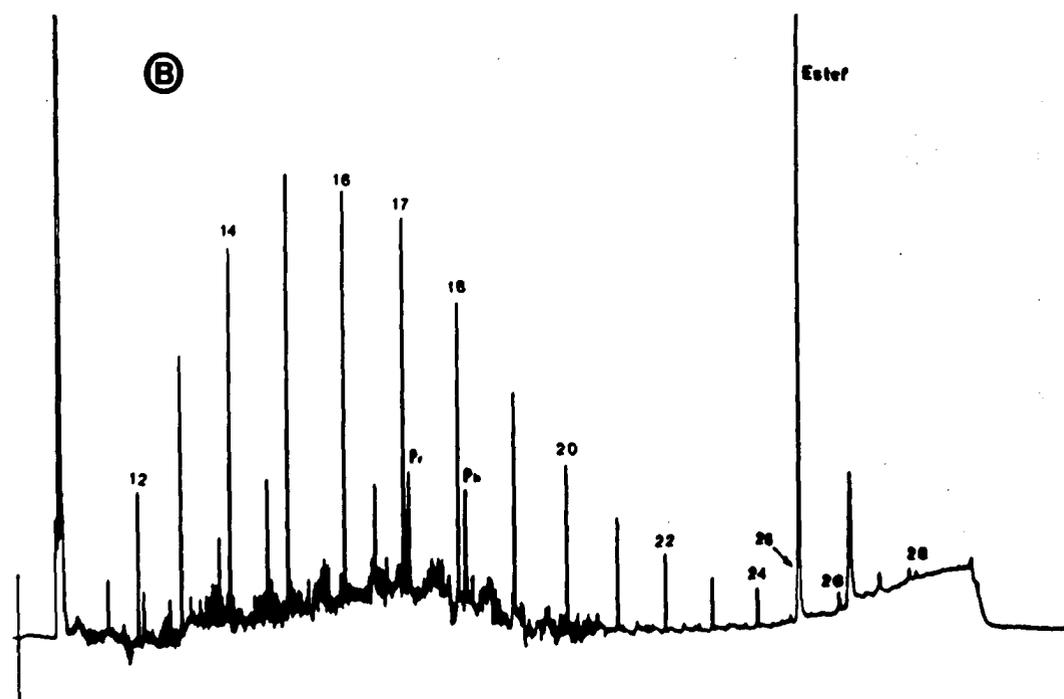
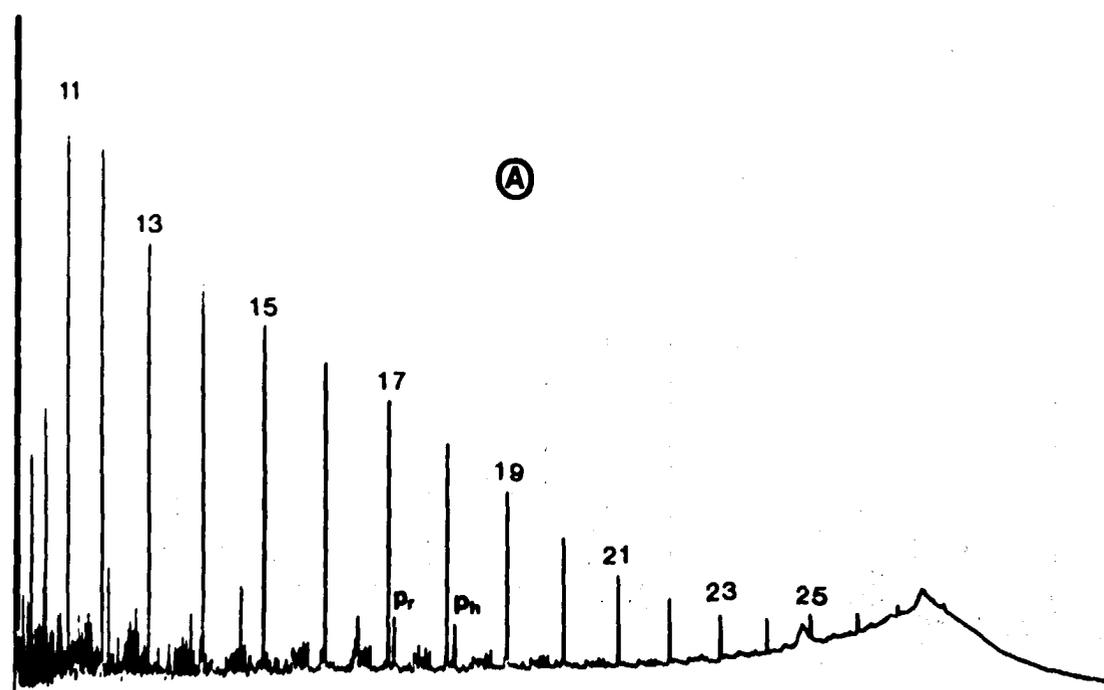


Figure 6 : Analyse par chromatographie en phase gazeuse capillaire du fuel domestique (figure supérieure A extrait en soxhlet, du milieu de culture, recueilli à la sortie du fermenteur de culture continue, de la population mixte M.L.P. sur fuel domestique et extrait en soxhlet (figure inférieure) (B).

REFERENCES

- Atlas, R.M. (1977). Stimulated petroleum biodegradation, in: C.R.C. Crit. Rev. in Microbiol. 5, 371-386.
- Azoulay, E., Dubreuil, J., Dou, H., Mille, G. and Giusti, G. (1981). Relationship between hydrocarbons and bacterial activity in the mediterranean sediments. I. Nature and concentration of the hydrocarbons in the sediments, in: Environ. Pollut. (in press).
- Azoulay, E., Tournoux, B., Zacek, M., Dou, H. et Giusti, G. (1979). Conditions d'accumulation dans les sédiments de composés aromatiques provenant de la dégradation bactérienne des hydrocarbures, dans : Colloque Int. C.N.R.S. - Biogéochimie de la matière organique à l'interface eau-sédiment marin, 293, 249-262.
- Bartha, R. (1976). Biodegradation of oil slicks in the marine environment in: Report of Nacry office of naval research N000 14 67 A.
- Bertrand, J.C., Mutafschiev, S., Henkel, M.G., Bazin, M. et Azoulay E. (1976). Isolement et étude d'une bactérie marine se développant sur hydrocarbures. I : Caractères physiologiques, in : Ann. Microb. Inst. Pasteur. 127, 373-391.
- Blumer, M. and Sass, J. (1972a). Oil pollution, persistence and degradation of spilled fuel oil, in : Science 167, 1120-1122.
- Blumer, M. and Sass, J. (1972b). Indigenous and petroleum derived hydrocarbons in a polluted sediment, in : Mar. Pollut. Bull. 3, 92-93.
- Blumer, M., Erhardt, M. and Jones, J.H. (1973). The environmental fate of standard crude oil, in : Deep. Sea. Res. 20, 239-259.
- Blumer, M. (1971)
Scientific aspects of the oil spill problem, Environ. Affairs, 1, 54-73.
- Blumer, M. and Youngblood, W.W. (1975). Polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and recent sediments. Science. 188, 53-55.
- Clark, R.C. and BLUMER, M. (1967). Distribution of n-paraffins in marine organisms and sediment in : Limnol. Oceanogr. 12, 79-87.
- Farrington, J.W. and Meyers, P.A. (1975). Hydrocarbons in the marine environment, in : Environmental chemistry, vol. 1, G. Eglinton éd., The Chemical Society, 109-136.
- Farrington, J.W., and Tripp, B.W. (1975). A comparison of analysis method for hydrocarbons in surface sediment, in : Marine chemistry in the coastal environment (Ed. TM. Church) ACS Symposium series n° 18 American Chemical Society, Washington, D.C. 267-284.
- Floodgate, G.D. (1972). Microbial degradation of oil, in : Mar. Pollut. Bull. 3, 41-43.
- Floodgate, G.D. (1972). Biodegradation of hydrocarbons in the sea, in : Water, Pollut. Microbiol. Mitchell, R. Edit. Wiley Interscience New York 153-171.
- Goutx, M. and Saliot, A. (1980). Relationship between dissolved and particulate fatty acid and hydrocarbons, chlorophyll a and zooplankton biomass in Villefranche by, Mediterranean sea, in : Mar. Chem., 8, 299-318.
- Hansen, H.P. (1975). Photochemical degradation of petroleum hydrocarbons surface film on sea water. Mar. Chem. 3, 183-195.
- Hites, R.A. and Biemann, W.G. (1972). Water pollution : organic compounds in the Charles River, Boston. Science, 178, 158-160.

- Lacaze, J.C. (1978). Etude expérimentale de l'influence des produits pétroliers sur la production primaire de l'environnement marin. Thèse Doctorat Sc. Nat. Paris.
- McAuliffe, C.D. (1977). Dispersal and alteration of oil discharged on a water surface, in : Proceedings of symposium on fate and effects of petroleum hydrocarbons in marine ecosystems and organisms (Wolfe D.) Pergamon Press, New York 19-35.
- Marty, J.C., Saliot, A. and Tissier M.J. (1978). Inventaire répartition et origine des hydrocarbures aliphatiques et polyaromatiques dans l'eau de mer, la microcouche de surface et les aérosols marins en Atlantique tropical est C.R. Acad. Sci. Paris, 286, 833-836.
- Mille, G., Bou, H., Cristiani, G. and Giusti G. (1981). Hydrocarbures présents dans des sédiments côtiers superficiels méditerranéens, in Environmental Pollution (in press).
- Pierce, R.M., Cundell, A.M. and Traxler, R.W. (1975). Persistence and biodegradation of spilled residual fuel oil on an estuarine beach, in : Appl. Microbiol. 29, 646-652.
- Stockner, J.G. and Antia, N.J. (1976). Phytoplankton adaptation to environmental stresses from toxicants nutrients and pollutants, in : J. Fish. Res. Board. Can. 33, 2089-2096.
- Tissier, M.J. and Dastillung, M. (1978). Des lipides à l'interface eau-sédiment, in : Géochimie organique des sédiments marins profonds, Orgon II, Atlantique -N-E Brésil. Ed. CNRS Paris, 275-283.
- Tissier, M.J. and Oudin, J.L. (1974). Influence de la pollution pétrolière sur la répartition des hydrocarbures de vases marines, in : Advances in organic geochemistry, B. Tissot et E. Biennet ed. Technip, Paris, 1029-1041.
- Tissier, M.J. and Spyckerelle, C. (1977). Hydrocarbures polyaromatiques des sédiments, in : Géochimie organique des sédiments marins profonds, Orgon I, mer de Norvège, Ed. CNRS, Paris 229-236.
- Walker, J.D. and Colwell (1975). Petroleum hydrocarbons in baltimore harbor of chesapeake bay : distribution in sediment cores, in : Environ. Pollut. 9, 231-238.
- Walker, J.D. and Colwell, R.R. (1976). Enumeration of petroleum degrading microorganisms, in : Appl. Environ. Microbiol. 31, 198-207
- Walker, J.D., Calomiris, J.J., Herbert, T.L. and Colwell, R.R. (1976). Petroleum hydrocarbons : degradation and growth potential for atlantic ocean sediment, in : Mar. Biol. 34, 1-11.
- Yen, T.F. (1975). Genesis and degradation of petroleum hydrocarbons in marine environments, in : Marine Chemistry in the coastal environment, T.M. Church éd. American Chemical Society, 231-266.
- Zobell, C.E. (1971). Sources and biodegradation of carcinogenic hydrocarbons, in : Proceedings of joint conference on prevention and control of oil spills, Washington E.P.A. A.P.I. V.S.C.G. 441-451.
- Zsolnay, A. (1977). Inventory of non volatile fatty acids and hydrocarbons in the oceans. Mar. Chem. 5, 465-475.