

## 80

### EVOLUTION A COURT TERME DES MICROFLORES UTILISANT LES HYDRO-CARBURES EN MILIEU SUBANTARCTIQUE. COMPARAISON DES SYSTEMES D'INCUBATION NATURELS ET ARTIFICIELS.

G. CAHET, D. DELILLE et N. VAILLANT

Laboratoire Arago, 66650 BANYULS-SUR-MER, (FRANCE)

**RÉSUMÉ** - La dégradation à court terme (6 jours maximum) d'hydrocarbures bruts "Arabe léger" a été suivie à différentes saisons de l'année à l'aide de divers paramètres biologiques et chimiques. A intervalle régulier ont été mesurés : la population bactérienne totale (épifluorescence) et hétérotrophe, la microflore se développant sur hydrocarbure, les potentiels hétérotrophes sur glucose, glutamate, et naphthalène marqués au  $^{14}\text{C}$ . Sur certaines expériences un contrôle taxonomique succinct de l'évolution des microflores a également été réalisé (API 20 B). Une nette élévation des M.P.N. totaux et spécifiques des hydrocarbures ainsi que des réponses rapides des potentiels hétérotrophes sont observées dans ces régions froides ( $8^{\circ}\text{C}$  max.). L'utilisation d'une incubation en système naturel permet de se dégager de l'effet de confinement généralement observé en milieu clos.

*Mots clés* : effets des hydrocarbures, microflore hétérotrophe, potentiels hétérotrophes, subantarctique.

**ABSTRACT** - The short time degradation of crude oil "Arabe leger" was followed at various seasons using different biological and chemical parameters. Regular sampling allowed to measure total epifluorescent microflora, heterotrophic and hydrocarbon microflora, heterotrophic potentials with  $^{14}\text{C}$  glucose, glutamate and naphthalene. Some experiments concern taxonomic control of microflora development (API 20 B). Shifts in M.P.N. numbers of total and specialized heterotrophic bacteria and quick responses in heterotrophic potentials appear in these cold area ( $8^{\circ}\text{C}$  max.). Incubation in natural ecosystems allows to reduce the confinement effect observed in closed systems.

*Key words* : crude oil effects, heterotrophic microflora, heterotrophic potentials, subantarctic.

### INTRODUCTION

La dégradation des hydrocarbures reste un problème fondamental pour les environnements aquatiques. L'importance des microflores hétérotrophes dans ce processus n'est plus à démontrer, mais s'il existe de nombreux travaux dans ce sens, l'impact des hydrocarbures sur les microflores est relativement moins étudié (Mac Kinley *et al* 1982).

Une grande part des travaux menés jusqu'ici l'ont été consécutivement à des accidents involontaires et se sont ainsi trouvés orientés vers des recherches à long terme. Les effets initiaux à très court terme (de l'ordre de quelques jours) n'ont été que peu envisagés. Leur étude nécessite des pollutions artificielles qui sont généralement menées en milieu clos (Menzel et Gaze, 1977 ; Tagger *et al.*, 1983 etc.). Horowitz et Atlas (1977) ont essayé de tourner la difficulté en utilisant un système de culture continue, mais il nous a paru intéressant d'utiliser un système d'incubation *in situ*. De telles expérimentations ont déjà été conduites, mais généralement sur le sédiment (Atlas *et al.*, 1978).

---

Ce travail a été réalisé avec l'aide financière des Terres Australes et Antarctiques Françaises (programme Microbioker), et de la société ELF-ERAP.

La très forte réactivité associée à une grande simplicité du modèle représenté par les microflores subantarctiques (Delille, 1977) font de l'archipel de Kerguelen une station de premier ordre pour ce type d'études. Le choix de ce site présente par ailleurs l'avantage d'utiliser une microflore vierge de toute agression antérieure et permet de combler un vide géographique très important car si l'Arctique est très étudié (Horowitz et Atlas, 1977, Sparrow *et al.*, 1978, Jordan *et al.*, 1978, Griffiths *et al.*, 1981 etc.) toute la partie sud de l'Océan mondial n'a été qu'effleurée jusqu'à présent (Clarke et Law, 1981 ; Platt *et al.* 1981).

Nous disposons à l'heure actuelle d'un vaste arsenal de techniques adaptées à ce genre d'études (comptages directs, comptages viables hétérotrophiques, numérations de microflores spécifiques des hydrocarbures avec ou sans traceur radioactif, déterminations taxonomiques, potentiels hétérotrophiques sur substrats généraux ou directement sur hydrocarbures). Chacune de ces méthodes présente ses propres avantages mais aussi ses inconvénients. Rares sont les travaux qui, tels ceux de Jordan *et al.*, 1977 et Sayler *et al.*, (1983), utilisent conjointement la plupart de ces méthodes. Il nous a donc semblé utile de réunir le plus grand nombre possible de données différentes à partir d'un même échantillon.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les deux incubateurs flottants destinés aux études *in situ* sont constitués chacun de quatre chambres de 60 cm de diamètre en contact direct avec le milieu marin par leur face inférieure. Ils sont mouillés à l'intérieur d'une petite anse abritée. Les expériences en milieu clos sont menées dans des enceintes de 3 m<sup>3</sup> alimentées par de l'eau de mer prélevée au large de la station de Port-aux-Français. Dans les deux types d'expérimentation, les incubations sont conduites dans des conditions climatiques voisines: températures situées entre 0 et 8°C, vent d'Ouest dominant pouvant atteindre 50 m/s.

L'évolution des populations bactériennes est suivie à intervalle régulier après addition de pétrole brut "Arabe Léger" (500 ml / m<sup>2</sup>, ce qui correspond à une épaisseur théorique de 500 µm).

La biomasse bactérienne totale est estimée par comptage direct en épifluorescence (Hobbie *et al.* 1977, microscope Olympus BHA).

La microflore viable hétérotrophe totale est évaluée par étalement sur boîtes de milieu de Zobell 2216 (Marine Agar Difco).

La microflore hétérotrophe spécifique des hydrocarbures est dénombrée par "M.P.N." sur un milieu de base minéral additionné du brut "arabe léger" constituant la seule source de carbone disponible (Mills *et al.* 1978).

L'activité hétérotrophe est mesurée par adjonction de 15 µl de substances radioactives (glucose, glutamate et naphthalène <sup>14</sup>C; 1 µCi/ml) à des aliquots de 30 ml. Après divers essais la durée d'incubation a été fixée à 2 h pour le glucose et l'acide glutamique et à 24 h pour le naphthalène. Le potentiel hétérotrophe correspond au pourcentage de <sup>14</sup>C biotransformé (<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> + <sup>14</sup>C particulaire) par rapport à la quantité initiale introduite.

Lors de l'utilisation d'hydrocarbures marqués au <sup>14</sup>C (hexadécane ou naphthalène) quelques auteurs mentionnent certaines difficultés aussi bien dans la mise en solution des hydrocarbures qu'au niveau de la récupération du <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> ou du <sup>14</sup>C assimilé. Difficilement solubles, ces hydrocarbures doivent être mis en solution dans un aliquot d'alcool, d'acétone ou de xylène; mais ceci n'empêche nullement les échanges d'hydrocarbures

entre la phase aqueuse de l'échantillon et la phase aérienne surnageante (Hodson *et al.*, 1977). Généralement la récupération de  $^{14}\text{CO}_2$  est effectuée dans un récipient muni d'une cupule contenant un absorbeur alcalin. Ce type de produit, qu'il soit minéral ou organique, fixe indifféremment l'hydrocarbure et le  $\text{CO}_2$ . Il convient donc d'éliminer l'hydrocarbure fixé, par entraînement gazeux et fixation sur Tenax à basse température (Button *et al.*, 1981), par mise en solution (Herbes et Schall, 1978 ; Saltzmann, 1982) ou, comme dans l'étude, par distillation en pH alcalin ; sinon il convient d'adopter un coefficient rectificatif (Jordan *et al.*, 1978). En ce qui concerne le  $^{14}\text{C}$  assimilé, le filtre a tendance à retenir en plus du  $^{14}\text{C}$  bactérien une fraction de l'hydrocarbure marqué restant en solution. Un lavage du filtre (Jordan *et al.*, 1978) risque d'entraîner une perte au niveau des métabolites les plus labiles. Nous avons donc opté pour une mesure directe sans lavage préalable, les résultats étant systématiquement comparés, comme pour le  $\text{CO}_2$ , à ceux d'un témoin stérile servant d'étalon interne. L'interprétation reste néanmoins délicate et seul le  $^{14}\text{C}$  respiré sera évoqué en tant qu'indicateur métabolique. Le résultat est exprimé en pourcentage par rapport à la quantité initiale ajoutée.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Un total de trente expériences (quinze en *in situ* notées N, et quinze en milieu clos notées C) a été réalisé. Les phénomènes observés présentent une grande variabilité dans le temps surtout au niveau des potentiels hétérotrophiques. Cette observation, déjà rapportée par Griffiths *et al.*, (1981), est certainement liée à l'état initial des populations. Elles peuvent en effet se différencier de multiples façons : importance quantitative des diverses microflores et des différents taxons présents, état physiologique des cellules qui apparaît aussi bien au niveau des potentiels hétérotrophes que des rapports numérations directes/numérations viables.

Nous présenterons uniquement les séries d'expériences qui nous paraissent les plus significatives (fig 1 et 2) et tenterons d'en dégager les grands lignes fondamentales.

Les réponses bactériennes à l'addition d'hydrocarbures sont précoces (souvent sans aucun temps de latence mesurable) et très rapides. L'impact peut être très important quantitativement et n'est presque jamais répressif.

Les résultats obtenus en toute saison confirment ceux des premiers essais menés en saison estivale (Delille et Cahet, 1982).

Les numérations directes fournissent la meilleure image de la microflore totale mais elles ne tiennent pas compte de l'état physiologique des cellules. Leur évolution est très amortie vis-à-vis de celle des autres paramètres. Ainsi, dans un premier temps, les fortes croissances enregistrées au niveau de la microflore viable ne se concrétisent pas au niveau de la biomasse totale. Nous sommes en présence d'une phase de "réactivation" de la population originelle présente. Passé un certain seuil, où numérations viables et directes sont très voisines, il y a croissance de la population totale (cas de C4, N3 et N9 en fin d'expérience, nous avons enregistré au total plus de vingt réactions de ce type). Si la croissance hétérotrophe est insuffisante nous n'observons aucune réaction sur la biomasse totale (cas de C9 et C10). Lors des poussées hétérotrophes les plus spectaculaires telle celle de N4, nous devons signaler un phénomène extrêmement singulier qui ne se produit qu'en milieu naturel. Les valeurs obtenues pour les numérations viables peuvent être significativement supérieures à celles obtenues pour les comptages directs. La seule hypothèse qui nous paraisse plausible pour expliquer ce phénomène est une réduction de la taille des bactéries lors de ce type de croissance. La présence des nombreuses cellules inférieures à  $0,2\mu$

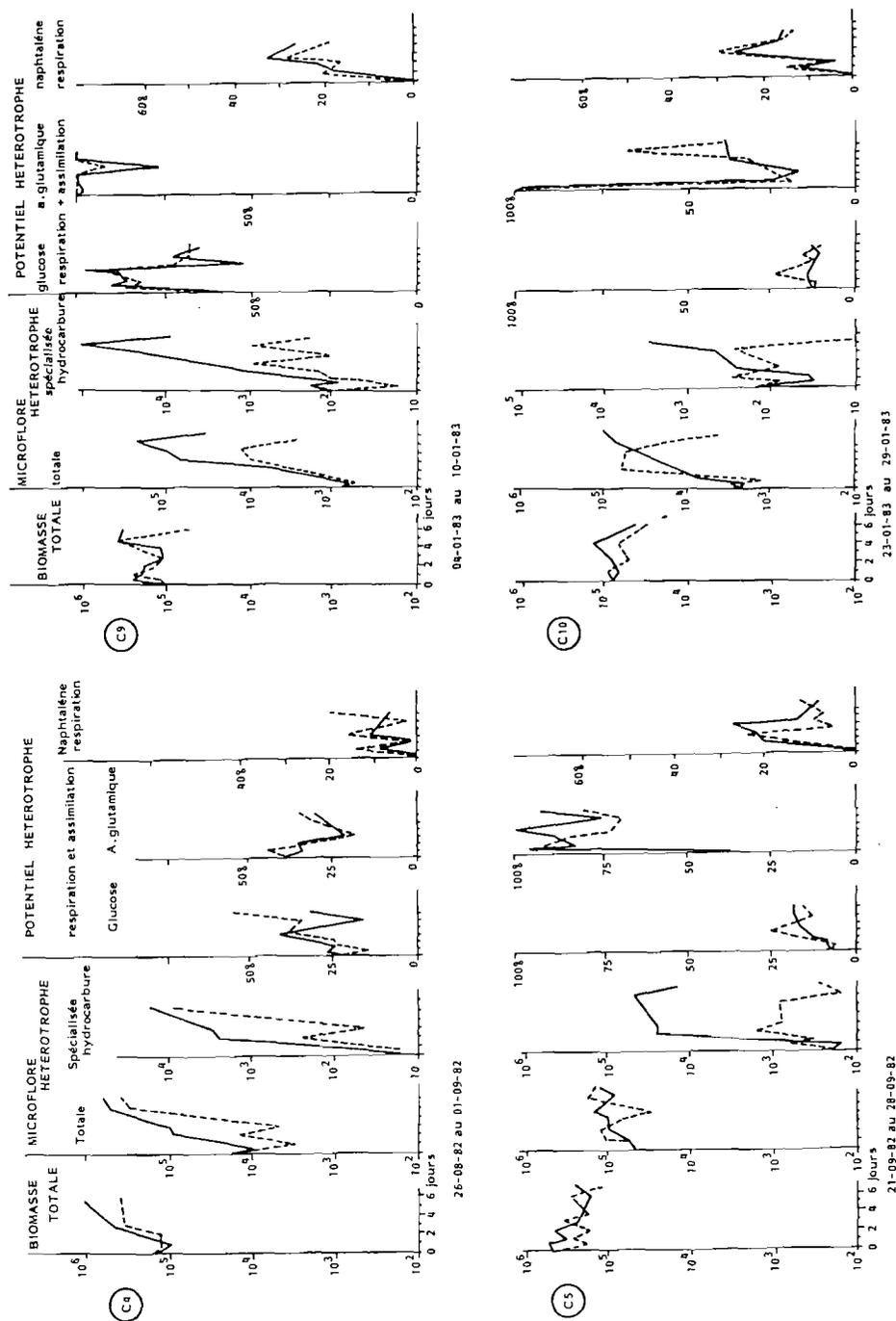


Figure 1 : Expériences *in vitro*. Les numérations bactériennes sont exprimées en bactéries par ml, les potentiels hétérotrophes en % de la radioactivité injectée. — : échantillon traité aux hydrocarbures. - - - - : échantillon témoin.

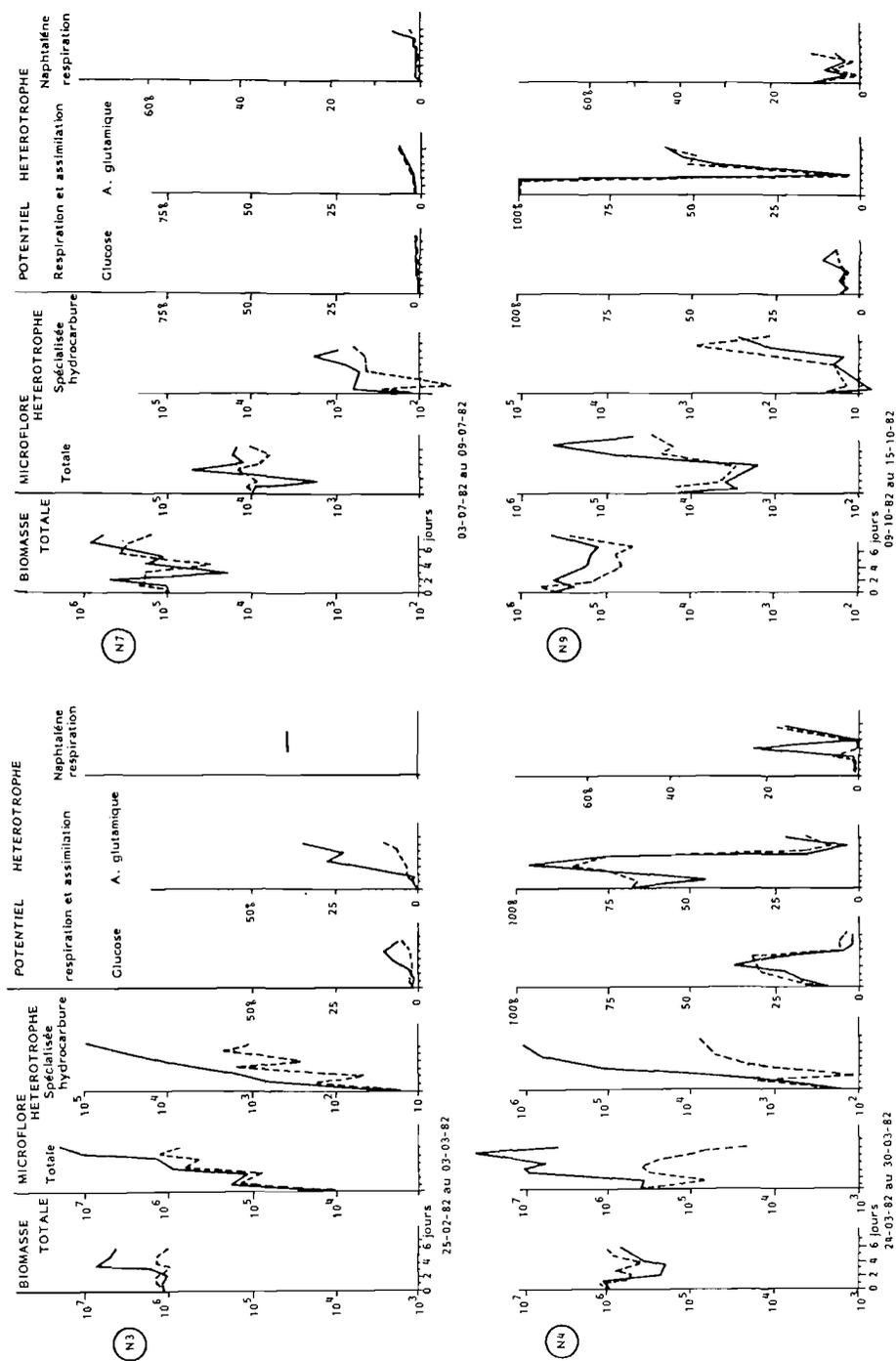


Figure 2 : Expériences *in situ*. Les numérations bactériennes sont exprimées en bactéries par ml, les potentiels hétérotrophes en % de la radioactivité injectée. — : échantillon traité aux hydrocarbures. - - - : témoin.

traversant le filtre nuclépore pourrait expliquer l'incapacité des numérations directes à rendre compte de l'évolution de la microflore. Une série de travaux en cours semble étayer cette hypothèse ; ils feront l'objet d'une communication ultérieure.

Le potentiel hétérotrophe apparaît comme l'indicateur le plus sensible de l'état physiologique des cellules, mais en raison même de cette sensibilité cette méthode est encore plus sélective que la classique numération sur le milieu de Zobell. Ainsi, selon les cas, les réactions à l'addition d'hydrocarbure peuvent être soit positives comme signalé par Alexander et Schwarz (1981) soit négatives en accord avec Hodson *et al.*, (1977) ; Griffiths *et al.*, (1981). Globalement sur l'ensemble de l'année, l'acide glutamique semble mieux métabolisé que le glucose. Les deux paramètres spécifiques utilisés (MNP sur hydrocarbure, utilisation de naphthalène) indiquent un enrichissement rapide de la microflore spécialisée, ce, aussi bien en milieu clos qu'en milieu naturel. Ainsi la population bactérienne spécifique des hydrocarbures, qui avec des valeurs initiales de l'ordre de  $10^2$  b/ml est relativement faible (Higashihara et Sato, 1979), peut croître de 4 ordres de grandeurs en 6 jours (N3, N4) et représente plus de 10% de la population totale en fin d'expérience, chiffre très important confirmé par la forte utilisation du naphthalène correspondante. L'utilisation rapide du naphthalène au niveau de l'eau est en accord avec les résultats obtenus sur le sédiment par Herbes et Schwall (1978) et Saltzmann (1982). Cette spécialisation précoce des microflores est confirmée par leur analyse taxonomique (fig. 3).

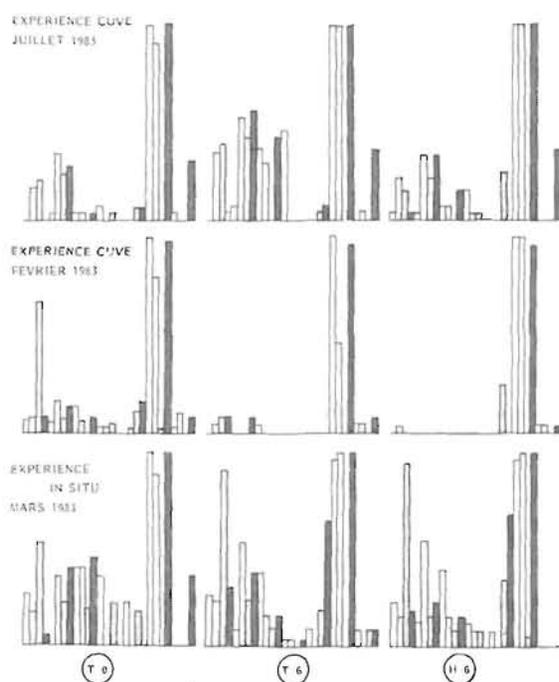


Figure 3 : Evolution de profils taxonomiques en cours d'incubation. Chaque barre représente le pourcentage de souche répondant positivement à chaque test, le maximum étant de 100%. Les tests sont, en partant de la gauche, Gélatine, Nitrite, ONPG, Saccharose, Arabinose, Manitol, Fructose, Glucose, Maltose, Amidon, Rhamnose, Galactose, Mannose, Sorbitol, Glycérol, Urée, Indol,  $H_2S$ , VP, Citrate, Oxydase, Catalase, OF, Mobilité, Gram, Cocci, Spore.

TO : témoin initial

T6 : témoin après 6 jours d'incubation

N6 : échantillon additionné d'hydrocarbures après 6 jours d'incubation.

L'impact de l'hydrocarbure est généralement plus accentué dans les expériences en milieu clos, bien que, dans les cas extrêmes, les niveaux atteints en milieu naturel soient équivalents à ceux des cuves. Ce phénomène qui est particulièrement marqué pour l'utilisation du naphthalène, est probablement dû à un effet de confinement qui apparaît nettement au niveau de l'analyse taxonomique (Fig. 3). L'utilisation de l'incubateur *in situ* permet de se dégager, au moins partiellement de cet effet parasite ; ce qui se traduit par des divergences très nettes entre essais et témoins (N3, N4). Il devient ainsi possible d'observer qu'en situation hivernale il peut y avoir absence complète de réponse en milieu naturel (N7), phénomène qui n'apparaît pas dans les expériences en milieu clos (cas de C4 à la même époque). Il existe donc une importante variation saisonnière qui confirme les travaux de Wyndham et Costerton (1981) sur le sédiment.

Les expériences *in situ* sont par contre sensibles aux variations extérieures. Ainsi la reprise tardive d'activité enregistrée lors de l'expérience N9 serait plutôt due à une évolution naturelle, sans rapport direct nécessaire avec l'addition d'hydrocarbure, qu'à la présence d'un temps de latence important. En effet, de telles reprises de croissance n'ont jamais été observées en milieu clos, alors que nous avons fréquemment enregistré de telles évolutions sur plusieurs cycles annuels d'observation sur des eaux prélevées en plusieurs points de la baie du Morbihan (Bouvy *et al.*, 1986). L'absence de réaction au niveau de l'utilisation du naphthalène pourrait confirmer cette hypothèse. La légère croissance enregistrée au niveau de la microflore spécifique de l'hydrocarbure ne serait que le reflet de la croissance hétérotrophe générale puisqu'il n'y a ni accroissement en pourcentage, ni différence sensible entre essai et témoin.

---

ALEXANDER S.K. et J.R. SCHWARZ, 1980. Short-term effects of south Louisiana and Kuwait crude oils on glucose utilization by marine bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 40 : 341-345.

ATLAS R.M., T.A. HOROWITZ et M. BUDOSH, 1978. Prudhoe crude oil in arctic marine ice water and sediment ecosystems : degradation and interactions with microbial and benthic communities. *J. Fish. Res. Board. Can* 35 : 585-590.

BOUVY M., M. LE ROMANEC et D. DELILLE. 1986. Significance of microheterotrophs in relation to the degradation process of subantarctic kelp beds (*Macrocystis pyrifera*). *Polar. Biol.* 5 : 1-5.

BUTTON D.K., B.R. ROBERTSON et K.S. CRAIG, 1981. Dissolved hydrocarbons and related microflora in a fjordal seaport : sources, sinks, concentrations and kinetics. *Appl. Environ. Microbiol.* 42 : 708-719

CAUCHI B., 1983. Impact écologique d'une pollution par hydrocarbure et de son traitement sur les communautés microplanctoniques et bactériennes d'un écosystème marin expérimental. *Thèse doct. 3<sup>e</sup> cycle Aix-Marseille.*, 193 p.

CLARKE A. et R.J. LAW, 1981. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in benthic invertebrates for two sites in antarctica. *Mar. Pollut. Bull.* 12 : 10-14.

DELILLE D., 1977. Cycles bactériens du soufre et de l'azote dans les dépôts sédimentaires du fjord Bossière. *Proc. 3<sup>th</sup> SCAR Symp. Antarctic Biol.* 159-180.

DELILLE D. et G. CAHET, 1984. Croissance de populations hétérotrophes subantarctiques soumises à des enrichissements azotés. Effets des hydrocarbures. *Cong. Intern. Bacteriol. Mar. Marseille 1982* : 213-219.

GRIFFITHS R.P., T.M. Mc NAMARA, B.A. CADWELL et R.Y. MORITA, 1981. Field observations on the acute effect of crude oil on glucose and glutamate uptake in samples collected from arctic and subarctic waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 : 1400-1406.

HERBES S.E. et L.R. SCHALL, 1978. Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum-contaminated sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 35 : 306-316.

- HIGSHIHARA T. et A. SATO, 1979. Distribution and abundance of hydrocarbons degrading bacteria in western north Pacific ocean, eastern Indian ocean and south china sea. *Bull. Jap. Soc. Fish* 45 : 473-483.
- HOBBIE J.E., R.J. DALEY et S. JASPER, 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 : 1225-1228.
- HODSON R.E., F. AZAM et R.F. LEE, 1977. Effects of for oils on marine bacterial populations controlled ecosystem pollution experimental. *Bull. Mar. Sci* 27 : 119-126.
- HOROWITZ A. et R.M. ATLAS, 1977. Continuous open flow-through system as a model for oil degradation in the Arctic ocean. *Appl. Environ. Microbiol* 33 : 647-653.
- JORDAN M.J., J.E. HOBBIE et R.J. PETERSON, 1978. Effects of petroleum hydrocarbons on microbial productions in an arctic lake. *Arctic* 31 : 170-179.
- MC KINLEY V.L., T.W. FEDERLE et J.R. VESTAL, 1982. Effects of petroleum hydrocarbons on plant litter microbiota in an arctic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 : 129-135.
- MILLS A.L., C. BREUIL et R.R. COLWELL, 1978. Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method. *Can. J. Microbiol.* 24 : 552-557.
- MENZEL D.W. et J. CASE, 1977. Concept and design controlled ecosystem pollution experiment. *Bull. Mar. Sci.* 27 : 1-7.
- PLATT H.M., P.R. MACKIE et A. CLARKE, 1981. Sources of antarctic hydrocarbons. *Mar. Pollut. Bull.* 12 : 407-410.
- SALTZMANN H.A., 1982. Biodegradation of aromatic hydrocarbon in marine sediments of three Northsea oil fields. *Mar. Biol.* 72 : 17-26
- SAYLER G.S., R.E. PERKINS, T.W. SHERRILL, B.K. PERKINS, M.G. REID, M.S. SHIELDS, H.L. KONG et J.W. DAVIES, 1983. Microcosms and experimental pond evaluation of microbial community response to synthetic oil contamination in freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol* 46 : 211-219.
- SPARROW E.B., C.V. DAVEPORT et R.C. GORDON, 1978. Response of microorganisms to hot crude oil spills on a subarctic taiga soil. *Arctic* 31 : 324-338.
- TAGGER S.A., BIANCHI M., JULLIARD J., LE PETIT et B. ROUX, 1983. Effect of microbial seeding of crude oil in seawater in a model system. *Mar. Biol.* 78 : 13-20.
- WYNDHAM R.C. et J.W. COSTERTON, 1981. Heterotrophic potentials and hydrocarbon biodegradation potentials of sediment microorganisms within the Athabasca oil sands deposit. *Appl. Environ. Microbiol.* 41 : 783-790.