

81

VARIATIONS MÉTABOLIQUES DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES LORS D'UNE POLLUTION PAR PÉTROLE BRUT, AVEC OU SANS TRAITEMENT.

B.P. CAUCHI

Fondation Océanographique Ricard - 83140 SIX-FOURS-LES-PLAGES- (FRANCE)

RÉSUMÉ - Les potentialités métaboliques des communautés bactériennes d'une eau de mer polluée par pétrole brut (Arabian Light) et d'une eau de mer polluée et traitée (apport d'une solution nutritive : Inipol EAP 22) ont été étudiées et comparées. De l'analyse des données : droites de régression, classification hiérarchique ascendante et analyse factorielle des correspondances multiples, il ressort que ce traitement entraîne la conservation et même l'augmentation du pool enzymatique (second jour) de l'échantillon bactérien ainsi qu'une homogénéité métabolique d'ensemble à l'inverse des effets de la pollution. L'assimilation des hydrocarbures par les bactéries semble être plus régulière et plus lente sans traitement.

Mots clés : pollution marine, pétrole brut, microbiologie, physiologie des communautés, analyse des données.

ABSTRACT - Metabolic potentialities of bacterial communities in marine water after Crude Oil pollution (Arabian Light) and in marine water after pollution and treatment (enrichment: Inipol EAP 22) have been studied and compared. With data analysis: regressions, hierarchical ascending classification and multifactor correspondence analysis, we observe that the treatment give rise to conservation and one increase of enzymatic pool (second day) of the bacterial sample as a combined metabolic homogeneity contrary to pollution impact. The direct assimilation of hydrocarbons looks more regular and slow without treatment.

Key words : marine pollution, crude oil, microbiology, physiology of communities, data analysis.

Différents genres bactériens sont impliqués dans les processus de biodégradation des hydrocarbures (Atlas et Bartha, 1973a, 1977; Austin *et al.*, 1977; Holloway *et al.*, 1980). Bien qu'en présence de pétrole brut on puisse observer une inhibition initiale de l'activité métabolique des communautés bactériennes (Walker *et al.*, 1975), divers essais ont été tentés afin d'utiliser ces capacités de biodégradation et même de les amplifier par addition de fertilisants (Atlas et Bartha, 1973b; Olivieri *et al.*, 1976, 1978).

Nous avons étudié l'effet d'un pétrole brut et d'un traitement réalisé par apport d'une formulation nutritive (enrichissement azoté et phosphaté) sur les communautés bactériennes naturelles associées dans des écosystèmes expérimentaux de grand volume en milieu littoral. Les données ont été traitées par des méthodes statistiques pour tenter de différencier les états successifs des échantillons de souches bactériennes testées.

MÉTHODOLOGIE

Dispositif et Protocole expérimental

- L'essai a été réalisé dans deux bassins de béton, soumis aux conditions climatiques extérieures situés sur l'île des Embiez (Var);

- chaque bassin d'un volume utile de 18 m³ (3 m x 3 x 2) est équipé d'une pompe immergée associée à un hydroéjecteur permettant un brassage et une saturation en O₂ constants dans la masse d'eau ;
- l'eau de mer naturelle est pompée dans la lagune du Brusco ;
- la pollution est créée par un apport de pétrole brut (Arabian Light) à raison de 4 litres par bassin ;
- le traitement du pétrole brut est réalisé par apport d'un mélange de nutriments (Inipol EAP 22) composé d'acide oléique, urée, phosphore (Sirvins *et al*, 1982). Sa quantité ajoutée est de 10 % du volume de pétrole brut ;
- le pétrole brut seul ou additionné initialement de la solution nutritive est injecté au fond de la masse d'eau (cas de fuite d'un puits de forage, etc.) ;
- l'essai dure 8 jours avec dans chaque bassin une eau non renouvelée.

Analyses

- Estimation d'abondance

La microflore hétérotrophe totale viable a été estimée par numérations indirectes sur milieu Marine Agar Difco. Les prélèvements ont été réalisés dans les nappes et à - 25 cm : à t₀, 2 h après pollution, 24 h, 48 h, 3 j, 4 j, 5 j, 7 j.

- Étude des souches

Les souches sont isolées à partir des milieux de numération et purifiées. L'échantillon étudié est de 25 souches par prélèvement dans la nappe (t₀, 1 j, 4 j, 7 j) dans chacun des bassins.

Ces souches sont caractérisées par :

. 16 tests de galeries API 20 B

. 52 tests de croissance substrats carbonés: Xylose, Glucose, Saccharose, Lactose, Ribose, Mannose, Rhamnose, Alanine, Serine, Glycine, Aspartate, Asparagine, Leucine, Glutamate, Arginine, Proline, Histidine, Tyrosine, Tryptophane, Malonate, Succinate, Fumarate, Acétate, Propionate, Caprylate, Caprate, Laurate, Palmitate, Stéarate, Oléate, Glycérol, Sorbitol, Mannitol, Benzol, Glycollate, Pyruvate, Urée, Benzoate, Pentane, Hexane, Hexadécane, Dodécane, Cyclohexane, Heptane, Toluène, Xylène, Benzène, Eicosane, Gelatine, D-nase, Amidon, Tween.

. 10 tests physiologiques: croissance à 4°C, 12°C, 37°C, 45°C, 0°/oo, 75°/oo, 100°/oo, 175°/oo; Oxydase et Catalase.

Traitement des données

- Régressions

Calcul des équations définissant les croissances bactériennes en fonction du temps dans l'échantillon (x, y) et dans l'estimation moyenne de la population (x₀, y₀). L'effectif de l'échantillon étant petit, on n'utilisera pas le ϕ t de la loi normale, mais la loi de Student (Danielli, 1975).

Droite de régression de l'échantillon analysé: $y = f(x)$

x = temps (jours)

y = concentration bactérienne exprimée en log₁₀ (bact.ml¹)

Droite de régression estimée de la population: $y_0 = f(x_0)$

x₀ = x = temps (jours)

y₀ = concentration bactérienne exprimée en log₁₀ (bact.ml¹)

- intervalle de confiance de y₀ à la probabilité associée :

$y_0 \pm t.Sy_0$

t = valeur du t de Student pour la probabilité associée

Syo # écart-type de yo

$$S_{yo}^2 = S_{y/x}^2 \cdot \left(\frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{Dx} \right)$$

n = nombre de points observés dans l'échantillon

xo = x = nombre de jours

\bar{x} = moyenne des x

Dx = dispersion des x

- Classification hiérarchique ascendante

Les échantillons de souches bactériennes étudiées à chaque prélèvement feront l'objet de cette classification. A partir des fréquences relatives des substrats carbonés et des réponses aux tests API, est élaborée la matrice des corrélations transformée en matrice des distances ($D = \sqrt{1 - r^2}$). La classification est réalisée par agglomération des classes selon le calcul de la distance moyenne :

$$Dm(x, AUB) = \frac{Dm(x UB) + Dm(x UA)}{Card B + Card A}$$

Dm = distance moyenne.

Card A = cardinal de A

- Analyse factorielle des correspondances multiples

Réalisée à partir des 52 tests de croissance sur substrats carbonés et les 10 tests physiologiques. Chaque test correspond à une variable nominale-question (réponse au test) divisée en deux modalités : croissance positive = + ; croissance nulle = -. La matrice des données finale sera : 175 souches (I) x 62 x 2 modalités actives (J). A partir du tableau disjonctif complet des modalités actives épurées, un tableau de Burt est élaboré, représentant les tableaux de contingence croisant tous les couples de questions actives. L'orthonormalisation est réalisée par la méthode de Gram-Schmidt modifiée. La tridiagonalisation de la matrice est réalisée par réduction tridiagonale de House Holder : les valeurs et vecteurs propres sont calculés (Wilkinson, Reinsh, 1971). La métrique utilisée est le Khi 2.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Évolution des abondances

Dans l'intérêt d'une estimation globale de la population bactérienne dans chaque bassin, les croissances bactériennes mesurées dans la nappe est à - 25 cm ont été associées dans chaque bassin à chaque prélèvement pour réaliser ces régressions. (fig. 1)

Les croissances bactériennes hétérotrophes totales sont significativement supérieures dans le bassin pollué traité par rapport au non traité et cela dès 48 heures après traitement pour toutes les masses d'eau (population totale) avec un domaine de confiance de 99 %

Évolution globale des communautés bactériennes

Une forte proximité est établie entre le prélèvement au 7^e jour dans le bassin pollué et le prélèvement au 2^e jour dans le bassin pollué traité avec une distance de 0,392 (fig. 2). C'est à ces deux stations que semble lié le Po. Cette classification paraît annoncer que la pollution crée des perturbations métaboliques accrues durant les sept premiers jours par rapport au Po ; mais qu'un traitement atténue cette perturbation et que l'état métabolique des communautés bactériennes dans le bassin pollué traité est réalisé cinq jours plus tôt par rapport à celui du bassin pollué (fig. 2).

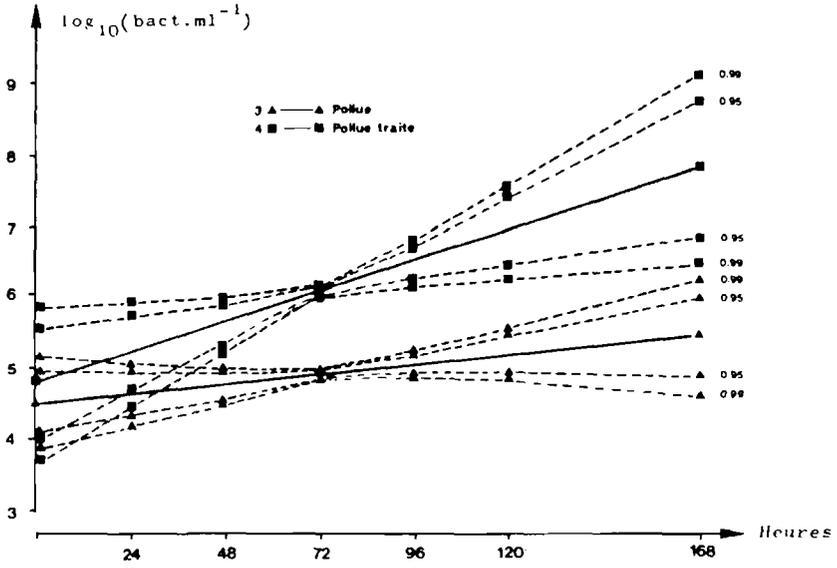


Figure 1 : Croissances bactériennes

Les équations sont les suivantes :

- Bassin pollué :

Echantillon : $y = 0,00529.x + 4,539$

Population : 95 % limite supérieure : $y_0 = 0,01111.x_0 + 5,0799$

limite inférieure : $y_0 = -0,00053.x_0 + 3,998$

99 % limite supérieure : $y_0 = 0,01344.x_0 + 5,2973$

limite inférieure : $y_0 = -0,00286.x_0 + 3,7807$

- Bassin pollué traité :

Echantillon : $y = 0,0177.x + 4,781$

Population : 95 % limite supérieure : $y_0 = 0,0277.x_0 + 5,695$

limite inférieure : $y_0 = 0,0077.x_0 + 3,867$

99 % limite supérieure : $y_0 = 0,0317.x_0 + 6,063$

limite inférieure : $y_0 = 0,0037.x_0 + 3,499$

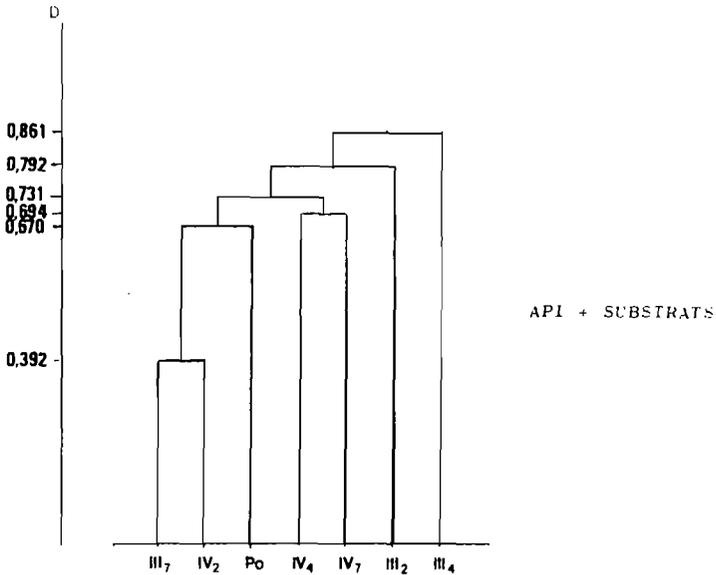


Figure 2 : Classification hiérarchique des prélèvements

Analyse détaillée du comportement des communautés bactériennes

. Les pourcentages d'inertie extraits par les cinq premiers axes sont respectivement : 18,2 - 11,92 - 9,9 - 6,86 et 5,2%. On doit dès maintenant remarquer l'importance relative du premier axe (fig. 3).

. 38 modalités actives sont abandonnées de par leurs faibles contributions relatives (CTR)

- l'axe 1 traduit, de son pôle - vers son pôle +, l'opposition existant chez les microflores testées entre potentialités métaboliques élevées et faibles, traduites par des tests de croissances positifs à négatifs. Plus on s'éloigne de la zone centrale, que le pôle soit + ou -, plus les modalités en cause sont, de par leurs masses respectives calculées, peu représentées ou rares. C'est donc un axe de décroissance des capacités métaboliques vis-à-vis des tests effectués, avec de part et d'autre du centre une représentation sélective d'un degré de potentiel métabolique caractérisant le résultat positif ou négatif d'un test déterminé. L'axe 2 est très lié à son pôle + avec les croissances positives sur hydrocarbures de par leurs CTR et à son pôle - avec la présence d'exoenzymes et à un plus faible degré une non croissance sur hydrocarbures. Cet axe traduit donc de son - vers son + une spécialisation dans la métabolisation des hydrocarbures (fig. 3).

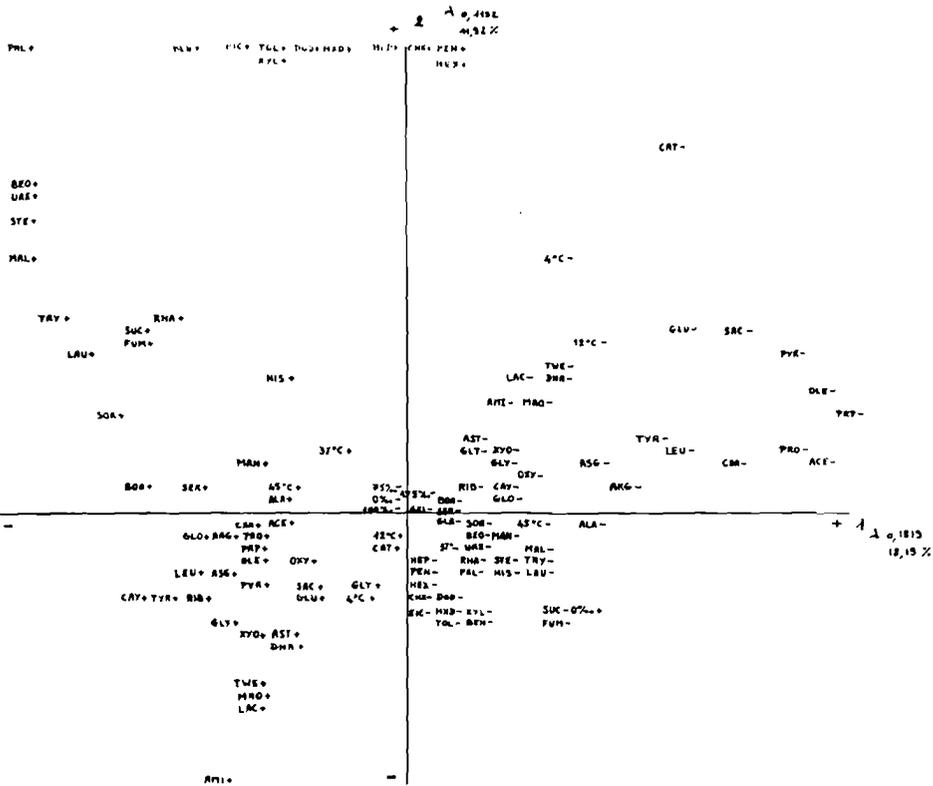


Figure 3 : Analyse des correspondances multiples. Projection des modalités des variables, axes 1 et 2.

- le graphique (fig. 4) identique au précédent représente les "aires naïves" décrites par les familles de composés testés

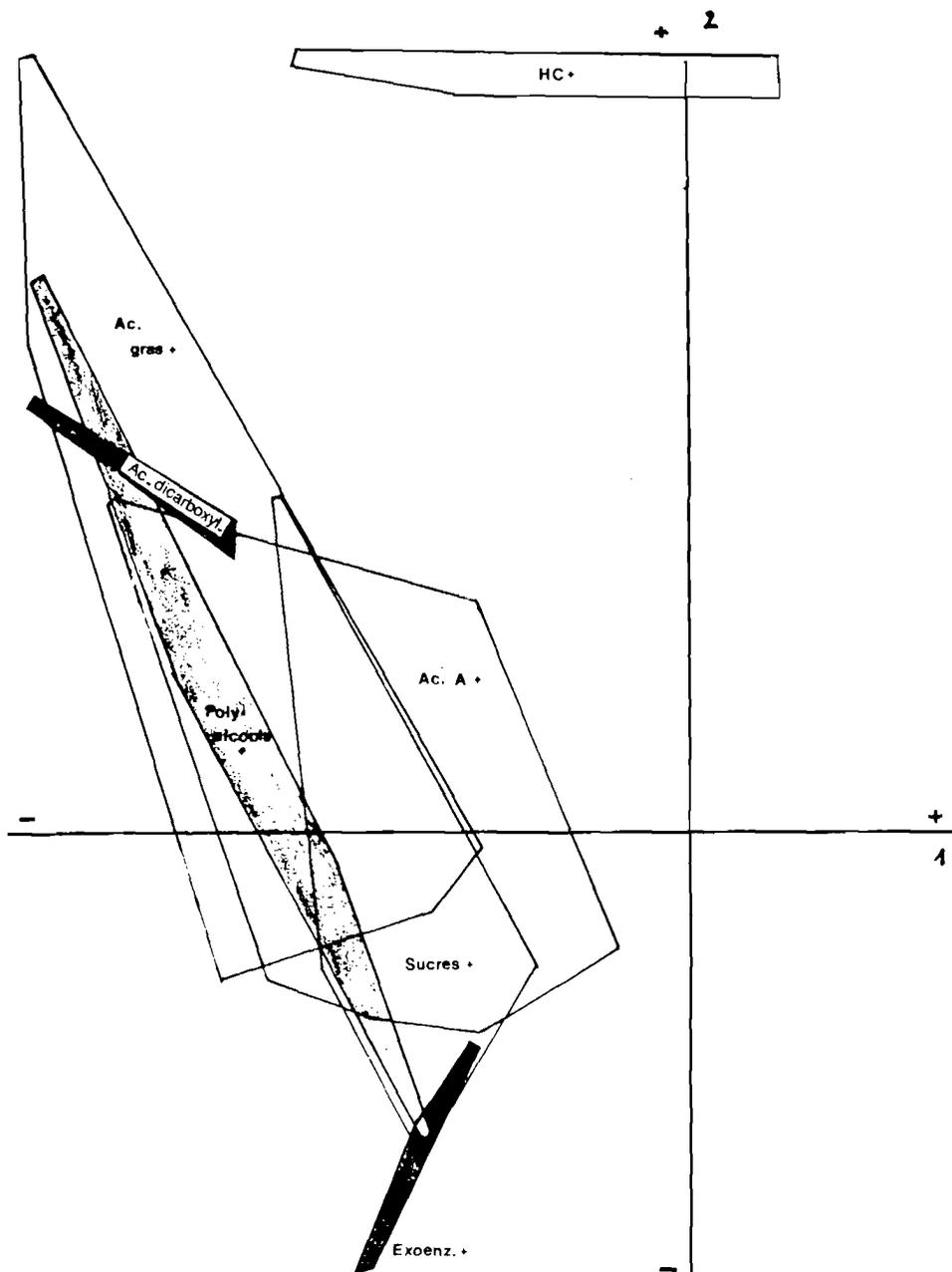


Figure 4 : Analyse des correspondances multiples. Représentation "naïve" de l'assimilation des diverses familles de composés carbonés. Axes 1 et 2.

On distingue trois groupes dans les relations d'assimilation entre composés testés et hydrocarbures (fig. 4):

- . Acides dicarboxyliques et beaucoup d'acides gras corrélés positivement.

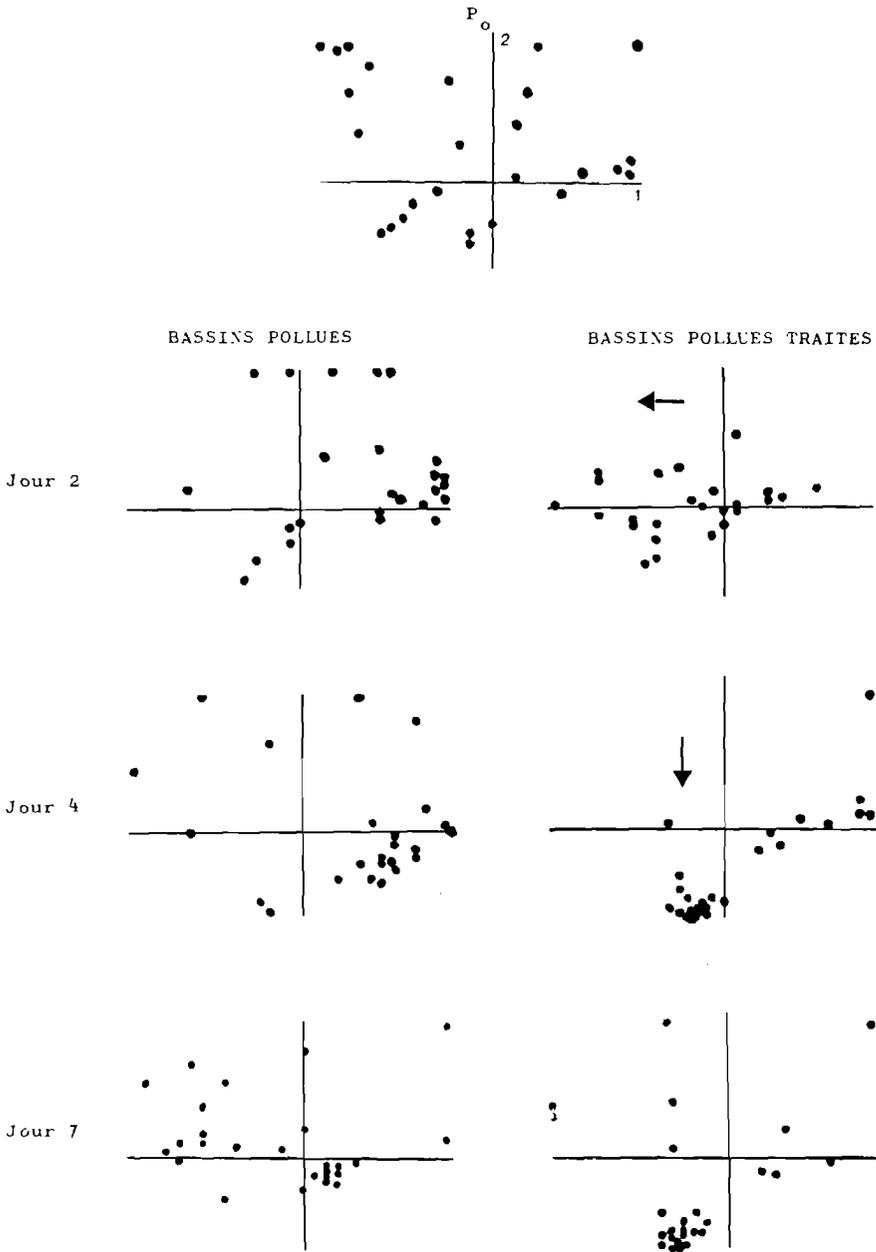


Figure 5 : Évolution comparative des bassins pollués et pollués traités.

- . Acides aminés et poly-alcools peu corrélés positivement ou négativement.
- . Sucres et présence d'exoenzymes corrélés négativement.
- les bactéries isolées (représentées par un point) ont été calquées sur les axes précédemment cités, prélèvement par prélèvement, pour chaque bassin (fig. 5). On notera le caractère évolutif des nuages de points-souches en fonction des bassins et du temps. Les

souches au Po sont partagées en effectifs entre celles capables de potentialités élevées et celles au potentiel plus pauvre (nuage étendu des points-souches). Ce Po est donc caractérisé par une hétérogénéité de ses potentialités métaboliques. Les évolutions du 2^e au 7^e jour des deux bassins se différencient comme suit (fig. 5):

. distribution métabolique de l'échantillonnage bactérien : le bassin pollué traité présente dans le temps une homogénéité croissante de répartition de ses 25 souches, preuve d'une uniformité d'ensemble de l'échantillon bactérien présent. Le bassin pollué garde lui un nuage étendu, preuve d'une hétérogénéité métabolique.

. variation du potentiel métabolique : on constate dans le bassin pollué traité une évolution basée, dès le second jour, vers une meilleure métabolisation des substrats (←), donc un meilleur pool enzymatique global. Toutefois, à partir du 4^e jour, une seconde tendance : augmentation des capacités exoenzymatiques, vient compléter la première (↓). Le bassin pollué reflète à l'inverse une faible métabolisation des substrats testés. Le pool enzymatique global ne semble redevenir satisfaisant qu'au 7^e jour.

. métabolisme des hydrocarbures : au Po : 32% des souches sont aptes à croître sur hydrocarbures. Dans le bassin pollué "les souches spécifiques hydrocarbures" semblent plus nombreuses jusqu'au dernier jour que dans le bassin pollué traité où la métabolisation des hydrocarbures chute, à l'exception du jour 2. Cela signifie peut être que la métabolisation directe des hydrocarbures par les communautés bactériennes est plus stable dans le temps, dans le bassin pollué où la biodégradation directe est ralentie et durable.

CONCLUSION

L'enrichissement créé par le traitement permet de maintenir et d'augmenter le pool enzymatique des souches microbiennes alors que le pétrole brut entraîne lui, par sa présence unique, une chute des activités métaboliques (processus décrits par Walker *et al*, 1975). L'augmentation du pouvoir exoenzymatique des bactéries, dans les eaux polluées traitées, confirme le caractère plus "tonique" de leur activité métabolique par rapport à celles des eaux polluées non traitées. Ces potentialités enzymatiques sont aussi plus homogènes dans l'équipement des diverses souches testées, dans les milieux pollués traités que pollués.

ATLAS R.M., BARTHA R., 1973a. *Antonie van Leewenhoek*, 30 : 257-271.

ATLAS R.M., BARTHA R., 1973b. Stimulated biodegradation of oil slicks using oleophilic fertilizers. *Environ. Sci. Technol.*, 7 : 538-541.

ATLAS R.M., BARTHA R., 1977. The microbiology of aquatic oil spills. *Adv. Appl. Microbiol.*, 22 : 225-266.

AUSTIN B., COLWELL R.R., WALKER J.D., CALOMIRIS J., 1977. The application of numerical taxonomy to the study of petroleum degrading bacteria isolated from the aquatic environment. *Dev. Ind. Microbiol.*, 18 : 685-695.

DANIELLI, 1975. Théories et méthodes statistiques. Presses agronomique de Gembloux.

HOLLAWAY S.L., FAW G.M., SIZEMORE R.K., 1980. The bacterial community composition of an active oil field in the North western Gulf of Mexico. *Mar. Poll. Bull.* 11 : 153-156.

OLIVIERI R., BACCHIN P., ROBERTIELLO A., ODDO N., DEGEN L., TONOLO A., 1976. Microbial degradation of oil spills entranced by a slow-release fertilizer. *Appl. environ. Microbiol.*, 31 (5) : 629-634.

OLIVIERI R., ROBERTIELLO A., DEGEN L., 1978. Enhancement of microbial degradation of oil pollutants using lipophilic fertilizers. *Mar. Poll. Bull.*, 9: 217-220.

SIRVINS A., THOMAS M.F., 1982. Biodégradation des hydrocarbures. Étude de laboratoire. Rapport Départ. Recherches et Applications. Service Production SNEA (P), 428/82: 91 pp.

WALKER J.D., SEESMAN P.A., COLWELL R.R., 1975. Effect of South Louisiana crude oil and NO-2 fuel oil on growth of heterotrophic microorganisms including proteolytic, lipolytic, chitinolytic and cellulolytic bacteria. *Envir. Poll.*, 9: 13-33.

WILKINSON J.H., REINSCH C., 1971. Handbook for automatic computation. Springer-Verlag, Vol. 2.