

78

BIODÉGRADATION DU PÉTROLE EN MER INFLUENCE DE L'APPORT D'AZOTE ET DE PHOSPHORE SOUS FORME MINÉRALE.

J. LE PETIT*, J. GUIOT**, Y. MARTIN*** et S. TAGGER*.

* Laboratoire de Microbiologie ;

** Laboratoire de Botanique Historique et Palynologie.

* et ** : Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Jérôme, rue H.-Poincaré,
13 397 MARSEILLE Cedex 13 (FRANCE)

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

RÉSUMÉ - Dans le but d'exploiter la présence en mer de micro-organismes susceptibles de dégrader des produits pétroliers, un engrais minéral, contenant de l'azote et du phosphore immédiatement assimilables, a été utilisé pour provoquer l'augmentation du nombre de ces micro-organismes et de ce fait du potentiel de dégradation des eaux polluées traitées. L'apport d'engrais détermine en toute saison une augmentation du nombre de bactéries hétérotrophes et de bactéries capables de métaboliser le pétrole, ainsi que de la biomasse phytoplanctonique. Celle-ci est caractérisée par une sélection toujours modérée ; elle constitue un apport important de matières organiques et est à l'origine d'un enrichissement en oxygène dissous indispensable à la biodégradation du pétrole. La résultante des effets de l'apport d'engrais est une augmentation du potentiel de dégradation des eaux traitées à l'égard du pétrole polluant se traduisant par une évolution chimique et physique de ce pétrole.

Mots clés : mer, pétrole, biodégradation, engrais minéral.

ABSTRACT - To exploit the presence in the sea of microorganisms capable of degrading petroleum products a mineral fertilizer, containing immediatly assimilable nitrogen and phosphorus compounds, was used to increase the microbial population and therefore, the degradation potential of treated polluted waters. The fertilizer supply caused an increase in heterotrophic and hydrocarbon-splitting bacteria and an increase in the phytoplanktonic biomass. The latter is characterized by an increase in a few selected species ; it constitutes an important supply of organic substances, and it is responsible for increasing the dissolved oxygen which is essential for petroleum oxidation. Supplying the fertilizer results in an increase in the treated water degradation potential and a faster chemical and physical evolution of the petroleum.

Key words : sea, hydrocarbon, biodegradation, mineral fertilizer.

INTRODUCTION

Le but de cette étude a été de contrôler l'influence de l'apport d'un engrais minéral sur la vitesse de biodégradation de produits pétroliers déversés en mer et de déterminer l'impact d'un tel traitement sur les microflores bactériennes et phytoplanctoniques.

L'utilisation de cet engrais minéral a été envisagée à la suite des différents travaux (Atlas, 1981) qui ont mis en évidence la présence en mer de micro-organismes susceptibles de métaboliser les hydrocarbures. Ceux-ci ne peuvent toutefois intervenir que lentement par suite des conditions défavorables de milieu et en particulier de la carence en azote et en phosphore. Il apparaissait donc nécessaire de provoquer l'accroissement du nombre de ces micro-organismes. Or l'apport de bactéries exogènes, même aptes à biodégrader les

hydrocarbures et adaptées au milieu marin, s'est révélé inefficace (Tagger *et al.*, 1983), ces bactéries étant très rapidement éliminées de la microflore dominante après leur déversement en mer. L'utilisation d'un engrais azoté et phosphoré immédiatement assimilable, ajouté aux eaux polluées, a été envisagée.

Cependant, l'apport d'un engrais minéral et l'augmentation de la concentration dans les eaux de produits du métabolisme des hydrocarbures doivent avoir une répercussion sur les autres organismes et en particulier sur le phytoplancton. Il est donc nécessaire de distinguer les effets respectifs du pétrole, de l'engrais et de l'ensemble de ces deux éléments.

Cette étude a été réalisée dans des écosystèmes expérimentaux de grand volume (10 m³) installés sur l'île des Embiez (Var). Ce processus a permis de contrôler tous les paramètres envisagés dans des bassins, correspondant soit à la nappe de pétrole traitée soit à des témoins permettant d'estimer l'effet dû à la seule présence du pétrole ou de l'engrais sur les microflores bactériennes et phytoplanctoniques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Dans des salines désaffectées, des masses d'eau de mer de 10 m³ sont délimitées par des feuilles de plastique semi-rigide et présentent une surface d'exposition de 16 m² environ. Quatre périodes expérimentales ont été réparties selon les saisons afin de tenir compte chaque fois d'un développement phytoplanctonique éventuellement différent.

Pour chaque série d'expériences, 4 bassins étaient utilisés : un bassin témoin T servant de référence pour l'évolution de la microflore bactérienne, du phytoplancton et de la concentration en sels minéraux dans les eaux ; un bassin E recevant l'engrais seul en quantité telle que les concentrations en azote et phosphore soient proches de 100 µmoles/litre ; un bassin H recevant un litre de pétrole Arabian light étêté à 110° C ; un bassin HE recevant à la fois le pétrole et l'engrais en proportions identiques à celles reçues séparément par les bassins E et H.

Les teneurs en chlorophylle *a* ont été mesurées par une méthode basée sur celles de Richards et Tompson (1982) et Creitz et Richards (1955), leur calcul étant fait selon la méthode préconisée par l'UNESCO (anonyme, 1966). La diversité pigmentaire est estimée selon Margaleff et Ryther (1960).

Les dénombrements de microflore hétérotrophe ont été réalisés sur Marine Agar Difco et ceux de la microflore apte à dégrader le pétrole selon la méthode de Le Petit *et al.* (1977), le pétrole Arabian light constituant la source de carbone.

Le potentiel de dégradation des eaux à l'égard du pétrole polluant est mesuré selon la technique de Tagger *et al.* (1983), le temps d'incubation étant cependant ramené à 2 jours (PD₂). Chaque valeur indiquée correspond à la moyenne de 3 essais.

L'activité respiratoire des eaux a été mesurée par la méthode de Warburg (Umbreit *et al.*, 1964).

L'évolution chimique du pétrole a été estimée par chromatographie phase vapeur (CPV), chromatographie liquide haute pression (CLHP) et résonance magnétique nucléaire ¹H (Petrakis *et al.*, 1980).

Les niveaux de confiance donnés dans cet article sont à 0,95.

RÉSULTATS

Étude des phénomènes biologiques.

Les deux séries d'expériences réalisées en novembre-décembre et mars-avril se distinguent nettement de celles réalisées en juin-juillet et septembre-octobre. Les périodes "froides" correspondent à des teneurs en chlorophylle *a* relativement faibles (tab. 1). L'apport

	Novembre-Décembre	Mars-Avril	Juin-Juillet	Septembre-Octobre
	X	X	X	X
Bassin T	1,03 ± 0,68	1,55 ± 0,31	5,50 ± 2,38	3,06 ± 0,64
Bassin H	1,78 ± 0,46	0,59 ± 0,13	20,40 ± 5,48	11,22 ± 1,98
Bassin E	5,70 ± 0,72	4,09 ± 2,84	34,40 ± 15,47	20,42 ± 12,68
Bassin HE	1,87 ± 1,27	1,99 ± 1,02	145,40 ± 71,65	29,28 ± 9,83

Tableau 1 : Valeurs moyennes de la teneur en chlorophylle *a* mesurée dans les bassins expérimentaux au cours des 4 séries de mesures. (Les moyennes et les intervalles de confiance sont calculés pour 11 observations).

d'engrais permet logiquement l'augmentation de la teneur en chlorophylle mais l'effet du pétrole se fait sentir car le développement algal est nettement plus limité dans les bassins où il est présent. Le rôle de ces deux facteurs est beaucoup plus évident dans les périodes "chaudes" et en particulier en juin-juillet. En effet, le développement algal est alors considérable, qu'il soit dû à l'apport de pétrole ou d'engrais, mais l'apport simultané des deux éléments multiplie par un facteur 5 le développement obtenu avec l'engrais seul. La diversité pigmentaire (tab. 2) est alors plus faible, en particulier dans le bassin HE. La communauté phytoplanctonique de ce bassin est paucispécifique et la forte biomasse rencontrée est constituée essentiellement par de petites Chlorophycées (taille moyenne : 1 à 2 μm). Ce même type de peuplement se retrouve dans le bassin H avec cependant une biomasse plus faible alors que le bassin T présente une communauté plus diversifiée avec, outre les Chlorophycées, plusieurs espèces de Dinoflagellés de grande taille (50 à 100 μm). Par contre, dans le bassin E se rencontrent à la fois des Chlorophycées et surtout une forte proportion de cellules appartenant à l'espèce *Prorocentrum micans* (Dinoflagellés) qui semble dominante dans la communauté de ce bassin.

	Novembre-Décembre	Mars-Avril	Juin-Juillet	Septembre-Octobre
	X	X	X	X
Bassin T	3,45 ± 0,35	2,75 ± 0,19	3,00 ± 0,20	3,09 ± 0,17
Bassin H	2,70 ± 0,37	4,45 ± 0,90	2,50 ± 0,14	2,60 ± 0,13
Bassin E	2,82 ± 0,08	2,59 ± 0,19	2,47 ± 0,14	2,77 ± 0,14
Bassin HE	3,16 ± 0,35	3,26 ± 0,50	2,09 ± 0,21	2,57 ± 0,23

Tableau 2 : Valeurs moyennes de la diversité pigmentaire ($DP = \frac{DO_{430}}{DO_{665}}$; Margalef and Ryther, 1960) mesurée dans les bassins expérimentaux au cours des 4 séries de mesures. (Les moyennes et les intervalles de confiance sont calculés pour 11 observations).

En septembre-octobre l'apport de pétrole ou d'engrais ou de ces deux éléments simultanément provoque un développement important avec une diversité pigmentaire plus faible lorsque le pétrole est présent.

Les périodes "chaudes" sont donc favorables au développement phytoplanctonique en présence d'engrais et de pétrole. Une sélection de certaines espèces se produit mais les diversités pigmentaires ne sont pas exagérément basses ce qui indique que, en dehors de la période estivale, la sélection est relativement modérée.

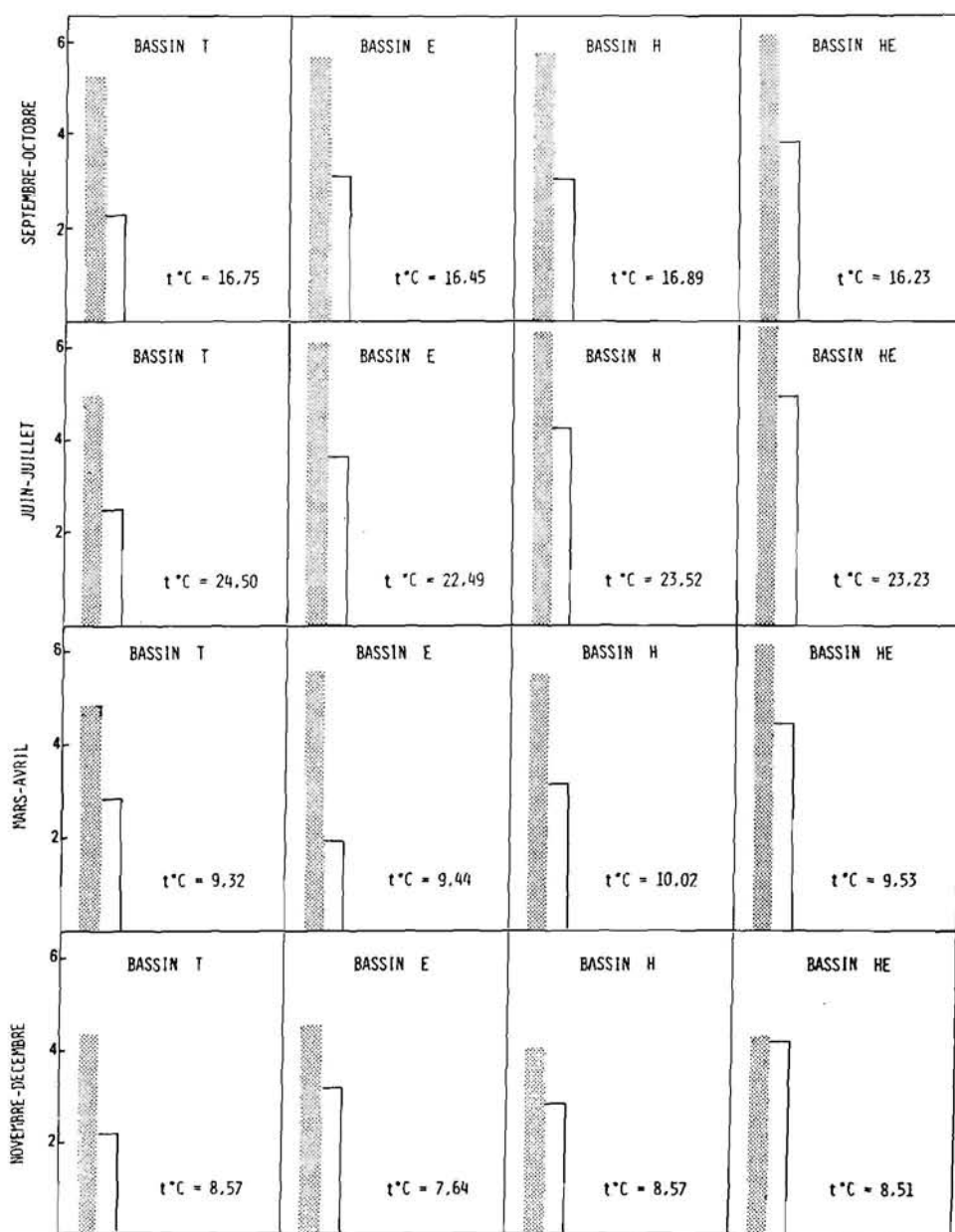


Figure 1 : Évolution des nombres moyens N de micro-organismes hétérotrophes (stippled) et de micro-organismes capables de dégrader les hydrocarbures (white) dans les eaux des bassins. (Les moyennes et les intervalles de confiance sont calculés pour 11 observations).

La figure 1 montre que le nombre total de bactéries hétérotrophes est en moyenne plus élevé dans les bassins E, H et HE que dans le bassin T si ce n'est en novembre-décembre où les valeurs obtenues sont à peu près identiques dans tous les bassins. Lors de l'expérience estivale (juin-juillet) les effectifs bactériens élevés, observés dans le bassin pollué traité,

sont à relier à un fort développement phytoplanctonique ainsi que l'atteste la corrélation obtenue entre les valeurs de microflore totale hétérotrophe et les teneurs en chlorophylle *a* ($r = 0.85$, $N = 11$, valeur critique = 0.55), développement qui s'accompagne généralement d'un accroissement de la teneur en matières organiques assimilables par les bactéries (Martin, 1980).

La figure 1 montre également une très nette augmentation de la microflore capable de métaboliser le pétrole dans le bassin pollué traité par rapport au bassin témoin, l'apport d'engrais ou de pétrole seuls ne provoquant pas de variations significatives dans les bassins E et H.

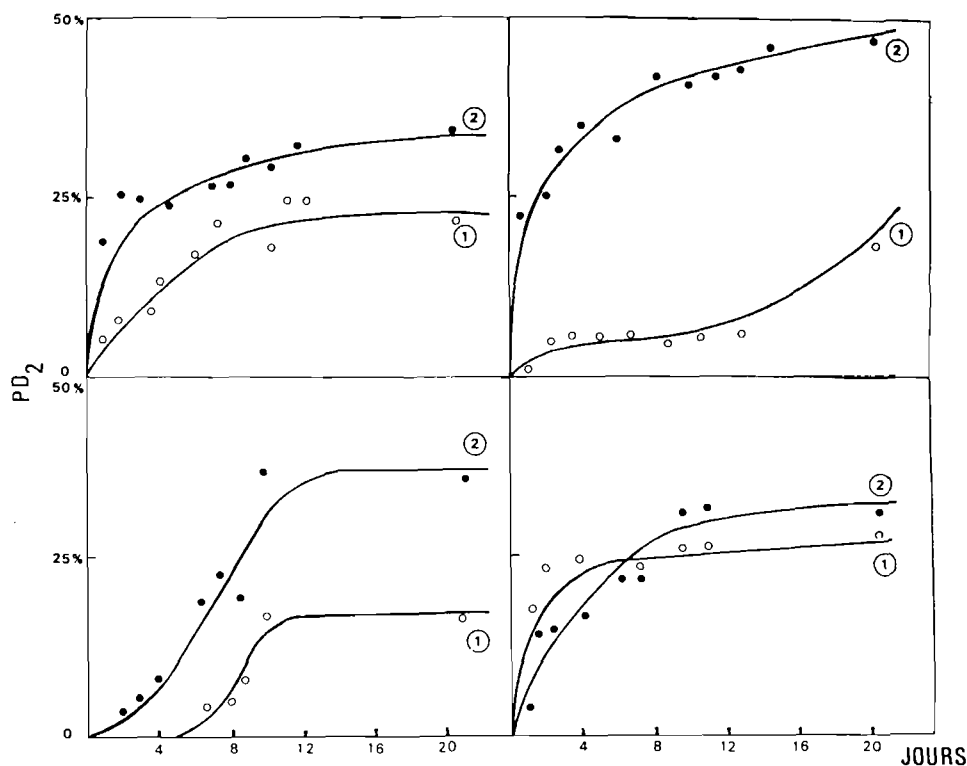


Figure 2 : Évolution du potentiel de dégradation (PD_2) des eaux des bassins H(1) et HE(2) en fonction du temps.

Évolution du potentiel de dégradation des eaux à l'égard de l'Arabian light.

La figure 2 montre que dans toutes les expériences réalisées le PD_2 est, en fin d'expérience, toujours plus élevé dans le bassin HE que dans le bassin H.

Ceci démontre que la microflore dans ces bassins est toujours mieux adaptée à la dégradation des produits pétroliers. Le PD_2 y est d'ailleurs très bien corrélé avec la durée de l'expérience ($r = 0.69$, $N = 44$, valeur critique = 0.28), le nombre de bactéries aptes à métaboliser les hydrocarbures ($r = 0.52$, $N = 43$, valeur critique = 0.29) et même le nombre de bactéries hétérotrophes $r = 0.47$, $N = 43$, valeur critique = 0.29 .

Les résultats obtenus en juin-juillet mettent en évidence, au travers du développement

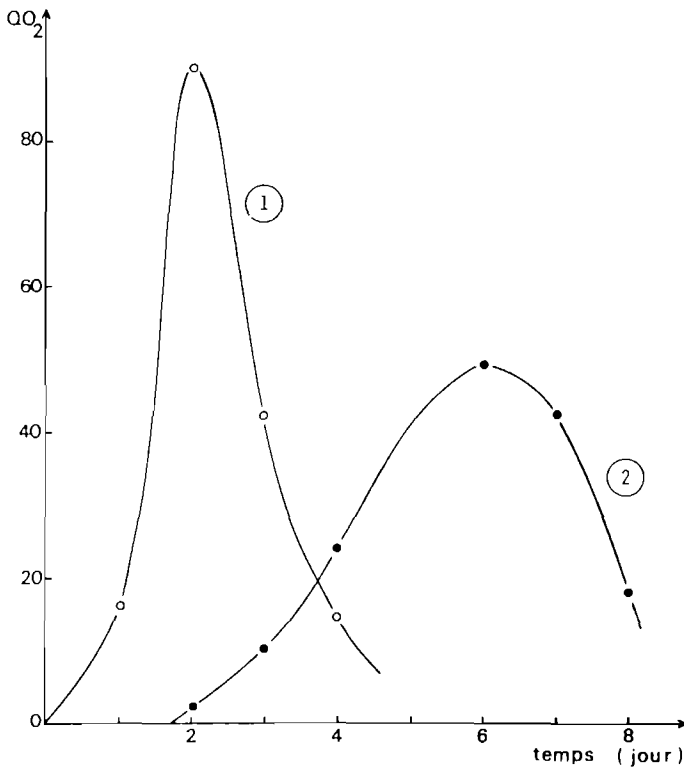


Figure 3 : Effet de la température sur l'activité respiratoire des eaux du bassin HE (période septembre-octobre) en présence de pétrole Arabian Light (Méthode manométrique de Warburg).

① 30°C

② 15°C.

QO₂ = nombre de μ l d'oxygène consommé par 10 ml d'eau enrichie dans les conditions identiques à celles de la mesure du PD₂ et par heure.

phytoplanctonique, le rôle de l'apport d'engrais sur l'évolution du PD₂ des eaux qui reste très bas dans le bassin H. En effet, les concentrations en oxygène dans le bassin H sont très faibles pendant toute la durée de l'expérience (valeur moyenne = 2.84 ppm) alors que dans le bassin HE cette valeur moyenne est de 6.81 ppm. Cette différence ne peut être due qu'au très fort développement phytoplanctonique qui, par l'intermédiaire de l'assimilation chlorophyllienne, est une source d'oxygène nécessaire à la biodégradation du pétrole et qui compense ainsi suffisamment la déperdition en cet élément due aux températures élevées dans les eaux (fig. 1). L'effet de la température est d'autre part très net sur le temps de latence mis par les eaux pour manifester une augmentation de leur potentiel de dégradation (fig. 3).

Dans le bassin E, le PD₂ est corrélé ($r = 0.58$, $N = 43$, valeur critique = 0.29), sur l'ensemble des 4 séries d'expériences, avec la microflore totale hétérotrophe et non avec la microflore apte à dégrader les hydrocarbures ce qui confirme (Le Petit *et al.*, 1977) qu'une augmentation du nombre total de bactéries dans une eau est toujours bénéfique à la biodégradation des hydrocarbures puisque un pourcentage plus ou moins élevé de ces bactéries est capable de métaboliser ces composés.

Analyse chimique du pétrole résiduel

L'analyse chimique du pétrole résiduel montre, après 3 semaines de séjour dans l'eau, des différences avec le pétrole initial plus ou moins accentuées selon les saisons.

Les n-paraffines en C₁₀, C₁₁ et C₁₂ disparaissent dans les bassins H et HE, quelle que soit la saison, sous l'effet de la seule évaporation ou sous l'effet combiné de l'évaporation et d'une activité microbienne. Dans les périodes "froides" la différence sur les chromatogrammes obtenus en CPV entre les bassins H et HE portent, tout au plus, sur les n-paraffines en C₁₄ mais l'analyse en RMN du proton révèle que l'apport d'engrais correspond aussi à une légère attaque des chaînes longues. En périodes "chaudes" les différences entre les bassins H et HE sont beaucoup plus nettes ; en particulier, la période juin-juillet correspond, pour le bassin HE, à une disparition presque totale des n-paraffines.

L'analyse en RMN du proton permet de constater aussi que tous les types moléculaires sont alors l'objet d'une oxydation surtout en présence d'engrais, résultats confirmés, pour les structures aromatiques, par les chromatogrammes obtenus en CLHP qui montrent des variations dans les rapports de concentrations des composés formés de 2 à 5 cycles aromatiques.

DISCUSSION

La biodégradation des hydrocarbures en mer se réalise avec des vitesses qui sont incompatibles avec les activités économiques de l'homme. La pêche, le tourisme et les richesses ornithologiques sont, entre autres, touchés par les déversements massifs de pétrole. Il s'agit donc d'accélérer la biodégradation afin de limiter leurs effets nocifs. De plus, il est nécessaire d'éviter les modifications chimiques que subissent les produits pétroliers sous l'influence de la lumière solaire et qui les rendent moins biodégradables (Tagger *et al.*, 1983). L'engrais azoté et phosphoré utilisé dans ce travail avait pour but d'accroître la vitesse de dégradation du pétrole en augmentant, par l'intermédiaire des micro-organismes, le potentiel de dégradation des eaux polluées.

Toutes les analyses biologiques et chimiques démontrent que l'apport d'engrais détermine une biodégradation plus accentuée du pétrole. De plus, quelle que soit la saison d'expérience, le pétrole résiduel traité ne "colle" plus aux doigts comme il le fait encore après 3 semaines de séjour dans les bassins lorsqu'il n'a pas été traité. L'apport d'engrais a effectivement eu un certain nombre d'effets attendus sur la microflore hétérotrophe et la microflore capable de dégrader les hydrocarbures qui sont toujours plus importantes dans les bassins HE ayant reçu pétrole + engrais. L'engrais agit également par l'intermédiaire du phytoplancton dont le développement peut être très important dans les bassins traités, surtout en période chaude, avec évidemment une diminution de la diversité des espèces qui reste cependant toujours très modérée. Ce développement phytoplanctonique constitue un facteur favorable au développement microbien, car il représente une source de matières organiques assimilables, et au maintien d'une teneur en oxygène dissous compatible avec la biodégradation du pétrole.

La résultante de l'évolution de ces facteurs est l'augmentation du potentiel de dégradation des eaux qui se traduit par la modification de la composition chimique du pétrole résiduel. L'accélération de la biodégradation par l'engrais a été relativement plus faible en novembre-décembre mais il faut tenir compte du facteur important que représente la température des eaux dont l'influence sur la biodégradation a été précisée. Or cet effet doit se manifester avec n'importe quel processus d'enrichissement des eaux.

Enfin, il est certain que cet engrais, immédiatement assimilable par les micro-organismes, doit être apporté dans le milieu marin de façon lente et continue afin de ne pas provoquer

les phénomènes d'inhibition signalés par Le Petit et N'Guyen (1976). Son utilisation nécessite donc celle d'un piège moléculaire ou d'un système mécanique permettant une diffusion contrôlée.

Ce travail a été effectué avec l'aide financière du CNEXO (Contrat n° 81/2445).

ANONYME, 1966. Determination of photosynthetic pigments (Report of SCOR-UNESCO Working Group 17). *UNESCO Monogr. Oceanogr. Methodol. 1. Determination of photosynthetic pigments in sea water.* 9-18.

ATLAS R., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons : an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45, 1, 180-209.

CREITZ G.I. and RICHARDS F.A., 1955. The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis. 3 - A note on the use of "Millipore" membrane filters in the estimation of plankton pigments. *J. Mar. Res.* 14,3, 211-216.

LE PETIT J. et N'GUYEN M.-H., 1976. Besoins en phosphore des bactéries métabolisant les hydrocarbures en mer. *Can. J. Microbiol.* 22, 9, 1364-1373.

LE PETIT J., N'GUYEN M.-H. et TAGGER S., 1977. Quelques données sur l'écologie d'une zone marine littorale recevant les rejets d'une raffinerie de pétrole. *Environ. Pollut.* 13, 41-56.

MARGALEF R. and RYTHER J.H., 1960. Pigment composition and productivity as related to succession in experimental populations of phytoplankton. *Biol. Bull.* 119, 326-327.

MARTIN Y., 1980. Communautés bactériennes hétérotrophes associées à des cultures continues de phytoplancton marin naturel. *Vie Marine. Hors série* n°1, 1-81.

PETRAKIS L., JEWELL D.M. and BENUSA W.F., 1980. An overview of practices in petroleum industry laboratories with emphasis on biodegradation. In : *Petroleum in the Marine Environment*. PETRAKIS L. and WEISS F.T. Ed. *Advances in Chemistry Series* 185, American Chemical Society, Washington, D.C. : 23-53.

RICHARDS F.A. and THOMPSON T.G., 1952. The estimation and characterization of plankton populations by analysis. 2 - A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigment. *J. Mar. Res.* 11, 156-172.

TAGGER S., BIANCHI A., JULLIARD M., LE PETIT J. et ROUX B., 1983. Effect of microbial seeding of crude oil in seawater in a model system. *Mar. Biol.* 78, 13-20.

UMBREIT W.W., BURRIS R.H. and STAUFFER U.F., 1964. Manometric techniques. 4 th Ed., Burgess Publ.Co, Minneapolis (Minnesota).