

TRAITEMENT BIOLOGIQUE DE NAPPES D'HYDROCARBURES EN MER  
ET INFLUENCE DE FACTEURS ABIOTIQUES.

S. TAGGER<sup>1</sup>, A. BIANCHI<sup>2</sup>, M. JULLIARD<sup>3</sup>, J. LE PETIT<sup>1</sup> et B. ROUX.<sup>2</sup>

1. Laboratoire de Microbiologie, Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Jérôme. Université Aix-Marseille III. Rue H. Poincaré, 13 397 Marseille Cedex 13.
2. Laboratoire d'Ecologie et Biochimie Microbiennes du Milieu Marin. C.N.R.S. ER 223, Université de Provence, 3 Place Victor Hugo, 13 331 Marseille Cedex 3.
3. Laboratoire de Chimie Organique A, Faculté des Sciences et Techniques de Saint-Jérôme. Université Aix-Marseille III, Rue H. Poincaré, 13 397 Marseille Cedex 13.

SUMMARY

BIOLOGICAL TREATMENT OF HYDROCARBONS  
IN SEA WATER AND ABIOTIC FACTORS INFLUENCE

The supply of hydrocarbons oxidizing marine bacteria to petroleum polluted sea water has not resulted in an increase in the hydrocarbons degradation potential of this water. All the allochtone species have disappeared from the dominant microflora seven days after the treatment while the autochtone bacteria show a capacity for adaptation to the petroleum products which needs about four days of petroleum-contact to appear. This confirms the advantage of a fast proliferation of these bacteria in oil slides which could be provoked by supply of immediately assimilable nitrogenous and phosphorised mineral compounds. The degradation potential of polluted water must be raised to its maximum as fast as possible after an oil spillage in order not to let the aromatic petroleum compounds become oxidized and polymerised under the influence of abiotic factors such as sunlight. These factors bring about, in fact, a very important decrease in the biodegradability of the petroleum products.

INTRODUCTION

La lenteur qui caractérise la biodégradation des produits pétroliers en mer est due, d'une part à des facteurs tels que la température ou les taux très faibles en azote et phosphore qui limitent la prolifération bactérienne (Le Petit et Barthélémy, 1968) et d'autre part, à la période de latence correspondant à la phase d'adaptation des communautés bactériennes autochtones à l'oxydation des hydrocarbures, les systèmes enzymatiques permettant cette oxydation étant généralement de type inductible (Le Petit et al., 1975).

Le but de ce travail était de suivre l'évolution du potentiel de dégradation d'une eau de mer polluée par des hydrocarbures, avec ou sans ensemencement de la nappe par une culture bactérienne mixte déjà adaptée à l'oxydation des hydrocarbures. L'évolution du potentiel de dégradation a été comparée à la dynamique des communautés bactériennes autochtones et allochtones ainsi qu'à l'évolution chimique des produits pétroliers.

MATERIEL ET METHODES

Zone expérimentale.

L'expérience a été réalisée de Janvier à Octobre 1980, sur l'île des Embiez (Var), dans des bassins de 20 m<sup>3</sup> environ, implantés dans une étendue d'eau de mer reliée par un chenal à la lagune du Brusq, elle-même largement ouverte sur la mer libre.

Trois bassins ont été ainsi utilisés dans les conditions suivantes :

- Bassin 1 : Référence de l'activité microbienne de l'eau de mer non polluée ;
- Bassin 2 : Apport de 5 litres de pétrole brut Arabian Light, étêté à 110°C ;
- Bassin 3 : Apport de 5 litres du même pétrole et de 90 g, poids humide, de cellules

bactériennes d'une culture mixte originaire du milieu littoral méditerranéen pollué par les hydrocarbures et adaptée à l'Arabian Light.

Dénombrement des peuplements bactériens.

Les dénombrements, dans les trois bassins, ont été effectués uniquement par numération indirecte, les essais de numération directe par microscopie à épifluorescence n'ayant pu être poursuivis, la présence de pétrole gênant l'observation.

Pour la microflore totale le milieu peptoné gélosé de Oppenheimer et Zobell 2216 E (1952) a été utilisé.

Pour la microflore apte à dégrader le pétrole, la numération a été effectuée par la méthode du M.P.N. en milieu minéral à base d'eau de mer additionné d'Arabian Light comme seule source de carbone (Le Petit et al., 1977).

Structure des communautés bactériennes.

La microflore dominante est déterminée en isolant, strictement au hasard, 20 souches par échantillon (Bianchi M., 1980). Celles-ci, une fois purifiées et décrites par 82 caractères morphologiques, physiologiques et enzymologiques (Bensoussan et al., 1979) sont regroupées par un programme de classification automatique selon le principe adansonien de comparaison en utilisant le coefficient de Jaccard comme coefficient de similitude et l'agrégation selon la variance (Delabre et al., 1973).

Potentiel de dégradation des hydrocarbures ( $PD_5$ ).

Il est déterminé par le pourcentage d'hydrocarbure consommé par la microflore d'échantillons d'eau incubés pendant 5 jours à 30°C sur table à agitation après enrichissement préalable en azote et phosphore selon le protocole déjà décrit par Tagger et al. (1979). L'hydrocarbure résiduel est dosé en infra-rouge (2960  $cm^{-1}$ ) après extraction au  $CCl_4$ .

## RESULTATS

Dénombrement des peuplements bactériens.

Les 130 valeurs obtenues ont été représentées par le logarithme du nombre moyen de cellules bactériennes hétérotrophes aérobies (X) et des cellules aptes à dégrader le pétrole (Y) dans chaque bassin (Fig. 1).

L'apport de pétrole seul provoque une prolifération cellulaire, l'addition de cellules bactériennes étant bien évidente dans le bassin 3. Le rapport Y/X du nombre de cellules aptes à dégrader l'Arabian Light au nombre total de cellules augmente du bassin 1 vers le bassin 3.

En effet, dans les trois bassins le nombre initial de bactéries varie entre  $1,9 \cdot 10^3$  et  $7,6 \cdot 10^3/ml$ . Dans le bassin 2 la concentration bactérienne demeure voisine de celle du bassin 1 pendant plus d'une semaine après le déversement du pétrole ; à partir du quinzième jour l'écart se creuse entre les deux bassins pour atteindre deux puissances de 10 le troisième mois alors que l'adaptation au pétrole, traduite par une augmentation du rapport Y/X % se manifeste en 4 jours environ dans le bassin 2.

Dans le bassin 3 le nombre de cellules viables passe, dès le premier jour, de  $1,9 \cdot 10^3$  à  $2,2 \cdot 10^6$  grâce à l'apport de cellules bactériennes. Le maximum est obtenu avec  $5 \cdot 10^6$  cellules/ml trois mois après l'épandage.

Il est intéressant de noter qu'au début de l'expérience le pourcentage de bactéries aptes à dégrader le pétrole est faible, comme si les cellules apportées n'avaient pas été préalablement adaptées à cet hydrocarbure.

Structure des communautés bactériennes.

La structure moyenne des communautés, exprimée par la figure 2, montre une prépondérance des bâtonnets Gram - fermentatifs et des Pseudomonades, mais pas de caractéristique particulière dans le bassin 3 traité par la culture bactérienne mixte si ce n'est un pourcentage de coques plus élevé que dans les autres bassins.

La présence du pétrole favorise essentiellement les Pseudomonades alors qu'elle a plutôt tendance à limiter le développement des bâtonnets Gram - fermentatifs.

Dans le bassin 1 la structure reste à peu près constante avec quelques phénotypes toujours présents de bâtonnets Gram - fermentatifs et de Pseudomonades (Tableau 1). Dans le bassin 2 certains phénotypes disparaissent de la microflore dominante avec l'apport

du pétrole, d'autres, en particulier des Pseudomonades, deviennent plus importants.

Dans le bassin 3 les apports initiaux modifient totalement la structure avec apparition de phénotypes non représentés dans les autres bassins. Cette structure est très passagère, toutes les souches allochtones étant éliminées de la microflore dominante en moins d'une semaine. Un rétablissement de la diversité spécifique est observé un mois après le traitement.

Potentiel de dégradation des hydrocarbures dans les eaux (PD<sub>5</sub>).

Le PD<sub>5</sub> (Tableau 2) varie peu au cours du temps et de façon non significative. L'analyse en RMN du proton du pétrole résiduel dans les fioles d'expérience après les 5 jours d'incubation montre que les protons sont, en moyenne (Fig.3), en concentration de plus en plus faible lorsqu'on passe du bassin 1 au bassin 3 et que le rapport H-CH<sub>3</sub>/H-CH<sub>2</sub> est accru dans le même sens ce qui est l'indice d'une meilleure dégradation des chaînes aliphatiques.

Evolution du pétrole dans les bassins.

Le résultat global (Fig.3), obtenu avec le pétrole extrait de l'eau des bassins 2 et 3, montre une légère différence dans la disparition des protons aromatiques et cyclaniques qui est plus forte dans le bassin 3, et des protons liés aux CH<sub>2</sub> et CH<sub>3</sub> dont la disparition est plus forte dans le bassin 2. Par contre le rapport H-CH<sub>3</sub>/H-CH<sub>2</sub> est plus élevé dans le bassin 3 ce qui indique, malgré tout, une meilleure oxydation des chaînes droites.

La biodégradation dans les bassins a donc été peu importante pendant la durée de l'expérience mais le pétrole a subi, pendant ce temps, l'action de phénomènes tels que la photo-oxydation ou l'auto-oxydation. Pour connaître l'influence de ces facteurs abiotiques, du pétrole stérile formant un film dans des fioles de 2 litres à faces parallèles contenant de l'eau de mer stérile, a été exposé dans un des bassins, les fioles étant immergées dans l'eau jusqu'au niveau du film d'hydrocarbures. Après six mois d'exposition le pétrole, grâce à sa consistance devenue pâteuse, a été séparé de l'eau sans usage de solvant et séché sous vide.

Pendant la durée de l'expérience le pH de l'eau des fioles exposées s'est abaissé de 3,5 unités. L'extrait éthéré de cette eau montre une absorption dans le proche ultraviolet, indice de la présence de composés aromatiques, et la présence de fonctions acides caractérisées aux environs de 1700 cm<sup>-1</sup>. Enfin le produit pétrolier, semi-solide, montre en RMN du proton une composition voisine de l'Arabian Light initial sauf pour les protons aromatiques dont la concentration a diminué fortement. Le pétrole a donc subi des oxydations et une polymérisation concernant essentiellement les composés aromatiques, ce qui est en accord avec les observations signalées par Van der Linden (1978).

Le PD<sub>5</sub> de l'eau du bassin 1 mesuré avec ce pétrole déjà évolué est égal à la moitié de celui observé avec l'Arabian Light initial. Lors de son séjour de six mois en eau de mer le pétrole a donc évolué de manière abiotique vers une forme plus difficilement biodégradable.

## DISCUSSION

Le traitement d'une nappe de pétrole par une culture bactérienne mixte adaptée aux hydrocarbures n'a pas permis d'observer dans l'oxydation du substrat une évolution différente par rapport à une nappe témoin non traitée.

La lenteur de la biodégradation est accentuée par le fait que les composés aromatiques subissent des oxydations et des polymérisations sous l'influence de facteurs abiotiques. Il paraît donc nécessaire de faciliter la biodégradation dans les délais les plus brefs après un déversement.

Le traitement biologique, dont l'utilisation avait déjà été envisagée, sous une autre forme expérimentale, par Miget (1973) et Atlas et Bartha (1973) s'est avéré inefficace du fait de la dynamique de la microflore mixte apportée. Les espèces bactériennes allochtones n'ont pu, au sein de l'écosystème, se maintenir dans la microflore dominante dont elles ont été éliminées dans les sept jours suivant le traitement. Ces bactéries, préalablement sélectionnées d'un biotope marin pollué par des produits pétroliers et adaptées à l'hydrocarbure expérimental, n'ont pas été compétitives par rapport aux espèces autochtones. En moins d'une semaine celles-ci ont pu proliférer sur hydrocarbures dans la limite des concentrations en facteurs limitants, plus rapidement que les espèces allochtones.

assurant ainsi leur dominance au sein de la microflore hétérotrophe. Ces possibilités permettant une biodégradation des hydrocarbures se révèlent dans l'oxydation de toutes les fractions pétrolières dans la nappe non traitée et l'obtention de valeurs de  $PD_5$  très proches dans les eaux des bassins 2 et 3. La division cellulaire étant limitée par les concentrations en azote et phosphore dans les conditions naturelles, l'apport d'une microflore adaptée aux hydrocarbures ne s'avère pas utile. La microflore autochtone peut s'adapter à l'apport de produits pétroliers ; il conviendrait donc de favoriser son développement en apportant à l'écosystème pollué des sels nutritifs immédiatement assimilables. Ces apports pourraient être, soit successifs et contrôlés, soit permanents et progressifs en utilisant des diffuseurs lents de façon à éviter une diffusion excessive dans les masses d'eau.

### RESUME

Le traitement d'une nappe de pétrole brut par l'apport massif de bactéries d'origine marine sélectionnées pour leur aptitude à dégrader les hydrocarbures n'a pas permis d'accroître de façon sensible le potentiel de biodégradation de ces eaux. Toutes les espèces allochtones ont disparu de la microflore dominante sept jours après le traitement alors que les bactéries autochtones démontrent un pouvoir d'adaptation aux produits pétroliers qui se manifeste après environ quatre jours de contact avec le pétrole. Une étude de l'évolution d'une nappe de pétrole brut en conditions abiotiques montre que les composés aromatiques subissent, sous l'effet de la lumière solaire, des phénomènes de photo-oxydation et de polymérisation. Ces processus déterminent une très forte diminution de la biodégradabilité des produits pétroliers.

Lors des marées noires il paraît donc nécessaire de favoriser la prolifération rapide des bactéries autochtones capables de développer les équipements enzymatiques permettant la dégradation des hydrocarbures.

### MOTS CLES

Hydrocarbures - Milieu marin - Traitement bactériologique - Photo-oxydation - Polymérisation.

\* Ce travail a été effectué avec l'aide financière du CNEOX.

	PHENONS	CCQUES			SPORULES		BATONNETS Gram + ASPORULES				BATONNETS Gram - FERMENTATIFS								PSEUDOMONADES								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
BASSIN 1	Jours 00	2			1		2	1			5	8								4	3						
	01	5						1			2	8								3	3						
	02	1							2		2	6	3	3							2	6					
	08	1			1		2				1	4	3	3							2	3					
	29	1					3					5		2	3						2	3	3				
	56						1	1				5	3	2	2						1		3				
	90	2					1					2	3	2		2					2	1		5	2		
BASSIN 2	Jours 00	4			4		3	1			2	3								2	1			1			
	01	1							3							3				10					1		
	02		1						5							5				10							
	08	1	1		1		2		2		2					3				2				4			
	29	1							2			3				1	2			6			3		2		
	56								4			4				2							10				
	90		1				1					1	5			3								10			
BASSIN 3	Jours 00	1					1				8	5								2	3						
	01				3													10	7						1		
	02	5																		2					10	6	
	08	5	3															3							10	3	
	29	2	2	1	1											3	2			1			5	3			
	56		2						1							3	2						10	3			
	90	2			1				3	3														8			

Tableau 1 : Dynamique des communautés bactériennes dans les trois bassins.  
 Nombre de souches bactériennes constituant chacun des phénons (numérotés de 1 à 26) lors des différentes analyses numériques selon le mode adansonnien.

PD <sub>5</sub> DATES	BASSIN 1	BASSIN 2	BASSIN 3
16.01	52,5	56,2	54,5
6.02	55,5	55,5	57,7
28.02	50,2	58,8	52,7
28.03	49,7	51,8	49,3
29.04	49,0	61,4	54,6
16.07	44,9	49,3	-
1.10	48,0	50,7	49,3
Moyennes	50,0	54,8	53,0

Tableau 2 : Evolution du Potentiel de dégradation (PD<sub>5</sub>) dans les eaux des trois bassins.  
 Bassin 1 : non pollué ;  
 Bassin 2 : 5l pétrole brut ;  
 Bassin 3 : pétrole brut traité par culture bactérienne mixte.

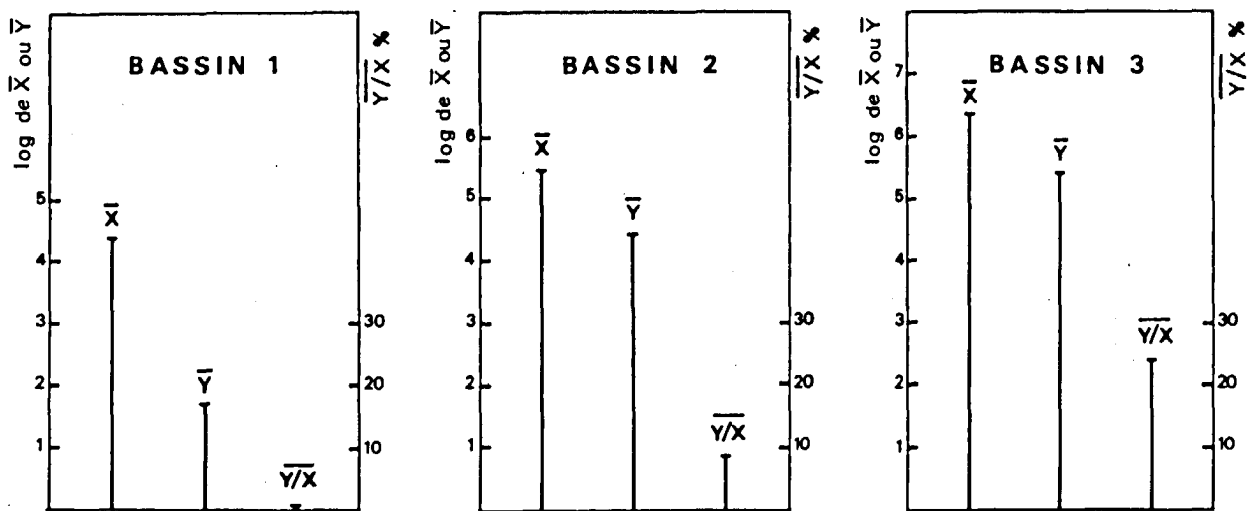


Figure 1 : Nombre moyen de cellules bactériennes hétérotrophes aérobies ( $\bar{X}$ ) et de cellules aptes à dégrader le pétrole ( $\bar{Y}$ ) dans chaque bassin (exprimé en log par ml d'eau); le rapport  $\bar{Y}/\bar{X}$  est exprimé en pourcentage.

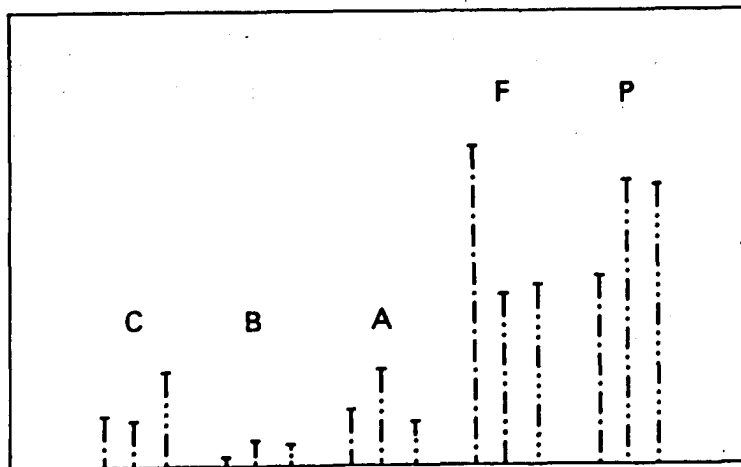
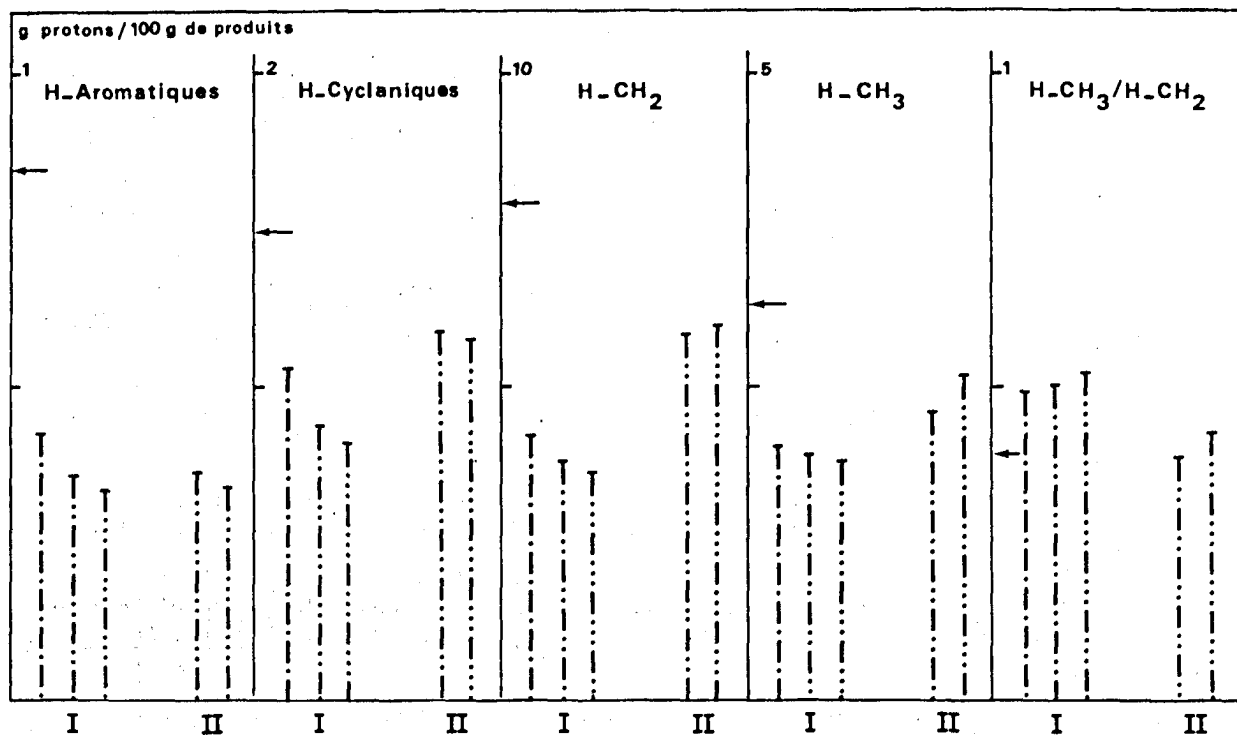


Figure 2 : Structure moyenne des communautés bactériennes dominantes dans les 3 bassins. Résultats exprimés en pourcentage moyen de chacun des groupes morpho-physiologiques dans la communauté totale.

C = Coques ; B = Bacilles sporulés ;  
 A = Bâtonnets Gram + asporulés ;  
 F = Bâtonnets Gram - fermentatifs ;  
 P = Pseudomonades.

— · — = Bassin 1 ; - - - = Bassin 2 ; - · - · - = Bassin 3.



**Figure 3 :** Distribution moyenne des protons dans le pétrole résiduel :  
 I : extrait des cultures ayant permis la mesure du  $PD_5$  de l'eau de chaque bassin ;  
 II : dans les bassins 2 et 3  
 exprimée en g de protons pour 100 g de produits.  
 ( — = valeur initiale dans l'Arabian Light)

—•— = Bassin 1 ; —•— = Bassin 2 ; —•— = Bassin 3.

## BIBLIOGRAPHIE

- ATLAS R. M. et BARTHA R., 1973. Effects of some commercial oil herders, dispersants and bacterial inocula on biodegradation of oil in sea-water. in "The microbial degradation of oil pollutants", 283-289, Ahearn and Meyers Ed.
- BENSOUSSAN M., BIANCHI A., BIANCHI M., BOUDABOUS A., LIZZARAGA-PARTIDA M.L., MARTY D. et ROUSSOS S., 1979. Bactériologie des eaux et des sédiments profonds en Atlantique intertropical Est. 1. Distribution et structure des populations bactériennes. in "Géochimie organique des sédiments marins profonds, ORCON III, Mauritanie, Sénégal, Iles du Cap-Vert." 13-25, C.N.R.S. Ed. Paris.
- BIANCHI M., 1980. A polyphasic study of algal-bacterial relationships during an artificial bloom of phytoplankton. in "Microbiology 1980". 372-376, American Soc. for Microbiol. Publish. Washington D.C.
- DELABRE M., BIANCHI A. et VERON M., 1973. Etude critique de méthodes de taxonomie numérique. Application à une classification de bactéries aquicoles. Ann. Microbiol., 124 A, 480-506.
- LE PETIT J. et BARTHELEMY M. H., 1968. Les hydrocarbures en mer : le problème de l'épuration des zones littorales par les microorganismes. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 114: 149-158.
- LE PETIT J., BERTRAND J. C., N'GUYEN M. H. et TAGGER S., 1975. Etude taxonomique et physiologique de bactéries se développant sur hydrocarbures en milieu marin. Ann. Microbiol. 126 A: 367-380.
- 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.
- MIGET R., 1973. Bacterial seeding to enhance biodegradation of oil slicks. in "The microbial degradation of oil pollutants," 291-309, Ahearn and Meyers Ed.
- OPPENHEIMER C. H. et ZOBELL C. E., 1952. The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. J. mar. Res., 11: 10-18.
- TAGGER S., DEVEZE L. et LE PETIT J., 1979. Sur l'épuration biologique d'une zone littorale marine affectée par des rejets d'hydrocarbures. Environ. Pollut., 18: 275-288.
- VAN DER LINDEN A.C., 1978. Degradation of oil in the marine environment. in "Development in biodegradation of hydrocarbons-1", Watkinson R. J. Ed. Applied Science Publishers. L.T.D. London.