

ETUDE COMPARATIVE DES METHODES D'ANALYSES DE LA CONTAMINATION PETROLIERE DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN

I. — ETUDE FLUOROMETRIQUE

par Hassan AWAD

Summary

Although the determination of hydrocarbons in the marine environment based usually on the same analytical steps, organic solvents extraction, column chromatography purification, and means for hydrocarbons detection and identification, the variations in the equipments and solvent systems included in the different established techniques hinder to obtain a global idea about the oil contamination state all over the seas. Many authors and conferences declared the necessity of carrying out a comparative study on the efficiencies of the various published analytical techniques in this field.

According to the facilities available in our laboratory, 25 applications of 16 published techniques were applied on a fixed weight of unique sample of sediments, mussels, fishes, shrimps and green algae. All the details and precautions stated in every separate procedure were followed. The final hydrocarbonic extracts were examined spectrofluorometrically at λ_e 300 nm, λ_e 370 nm and λ_e 395 nm.

The application of different techniques showed considerable variations in the characters of the fluorescence of the produced hydrocarbonic extracts. This indicate that there are great variations in the composition and concentrations of the constituents.

Introduction.

L'utilisation du pétrole comme source principale d'énergie s'est accrue d'une manière considérable, parallèlement au développement rapide de la révolution industrielle, depuis le début du XIX^e siècle.

De nombreuses estimations ont été réalisées au sujet de la consommation mondiale du pétrole et de ses apports dans les océans (ZOBELL, 1964; BLUMER, 1969; MIT SCOP, 1970; USCG, 1973, et NAS, 1975). Ainsi, BLUMER a estimé que la consommation mondiale du pétrole était de $1,8 \times 10^9$ t/an et que la quantité de pétrole arrivant à la mer était supérieure à un million de tonnes par an. NAS retient une production de 2,396 milliards et, en prenant en considération toutes les possibilités d'apport de pétrole dans les océans (transports, accidents de pétroliers, raffineries côtières, déchets industriels, productions côtières de pétrole, fuites naturelles...), estime à 6,113 millions de tonnes de pétrole introduits dans l'écosystème.

Quelle que soit l'estimation, il est évident que la quantité introduite annuellement est considérable.

Cette augmentation de la pollution pétrolière, parallèle à la croissance de la consommation des produits pétroliers, n'a été prise en considération qu'au moment où le congrès des U.S.A. en 1922 a demandé une conférence internationale dans le but d'empêcher la pollution des océans par le pétrole, d'après HARDY (1975). A partir de ce moment, les scientifiques se sont penchés sur le problème, après avoir noté les dommages de la pollution par le pétrole sur la biomasse et envisagé les conséquences possibles pour l'homme lui-même.

Depuis cette date, la nécessité de contrôler l'accumulation des produits pétroliers dans le milieu marin a suscité de multiples recherches. Plusieurs techniques ont été établies pour doser qualitativement et quantitativement les hydrocarbures présents dans l'eau, les sédiments, les algues et les organismes marins. De plus, on a commencé à étudier les effets de la contamination pétrolière sur la production des ressources marines et sur la santé humaine.

Il est bien connu que le pétrole est d'origine fossile avec une composition toujours complexe et variable selon sa provenance. Il a été montré que les hydrocarbures en étaient les constituants principaux ; leur pourcentage dépasse normalement 75 % (POSTHUMA, 1975). Les hydrocarbures représentent une grande gamme de poids moléculaires et de points d'ébullition. Le nombre d'atomes de carbone varie de C_1 à C_{60} . Dans quelques cas, on a pu noter des composés ayant jusqu'à 78 atomes de carbone, avec des poids moléculaires supérieurs à 900 (POSTHUMA, 1975 ; LUDWIG, 1965, et DENEKAS *et al.*, 1951).

Il est essentiel de savoir que le pétrole brut peut contenir des dizaines de milliers de composés dont l'importance relative dépend de l'origine du pétrole et de son histoire thermique (SMITH, 1968).

Tous les pétroles bruts contiennent trois classes générales d'hydrocarbures : les alcanes, les cycloalcanes, les aromatiques.

On n'y trouve pas d'alcènes ; cependant, ceux-ci existent dans les différents produits raffinés en plus des trois classes précédentes.

Les organismes marins fabriquent leurs propres hydrocarbures, soit par synthèse directe, soit par assimilation des composés précurseurs hydrocarboniques contenus dans leur nourriture ; comme exemple, on peut citer la transformation du phytol en pristane (BLUMER, 1967). Les hydrocarbures biogéniques dans les organismes marins appartiennent aux mêmes familles que celles qui existent dans le pétrole fossile avec comme principaux constituants les alcènes (BLUMER *et al.*, 1972 ; FARRINGTON, 1973, et NAS, 1975).

En résumé, on peut conclure que les hydrocarbures présents dans les océans peuvent être d'origine fossile (accidents, déballastage, rejets telluriques) ou d'origine biogénique récente. Chaque catégorie se compose de quelques milliers ou dizaines de milliers de composés individuels. Elle montre de grandes variations de composition malgré la similitude de ses composés.

La grande variété d'hydrocarbures dans l'environnement marin a empêché d'appréhender le problème de la contamination par le pétrole globalement jusqu'à ce jour. Depuis le début des essais sur ce sujet, on n'a résolu le problème que partiellement malgré tous les progrès faits dans l'appareillage scientifique.

Toutes les techniques concernant les analyses des hydrocarbures dans l'environnement marin doivent comprendre les étapes suivantes :

extraction des matières organiques qui contiennent les fractions d'hydrocarbures en utilisant un ou plusieurs solvants organiques ;

séparation des hydrocarbures de l'extrait organique ; habituellement, cette étape se fait par purification de l'extrait par passage sur une colonne contenant un ou deux adsorbants ;

détermination globale ou partielle des hydrocarbures purifiés en utilisant différentes techniques : spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet ou l'infrarouge, fluorimétrie, résonance magnétique nucléaire, spectromètre de masse, chromatographie (gaz/liquide, liquide/liquide ou liquide/solide). Parfois le couplage de plusieurs techniques permet une étude plus détaillée.

Il est évident que l'on ne peut purifier puis analyser que les seuls hydrocarbures préalablement extraits. La manière selon laquelle cette étape sera conduite conditionne déjà le résultat final. Il est donc important, lors de cette étape, d'extraire la totalité des hydrocarbures contenus dans l'échantillon.

FARRINGTON (1973) et NAS (1975) ont déclaré, parmi d'autres, qu'il était nécessaire de comparer l'efficacité des divers procédés d'extraction publiés et utilisés couramment dans les laboratoires spécialisés dans ce domaine. Les techniques concernant l'étude de la contamination par le pétrole étant devenues de plus en plus nombreuses, il est donc difficile de choisir une méthode plutôt qu'une autre.

C'est pourquoi nous avons décidé de faire cette étude comparative en utilisant des techniques d'analyse très différentes. Les résultats qui font l'objet de cet article ont été obtenus par spectrofluorométrie. Une autre comparaison basée sur l'analyse par chromatographie en phase gazeuse est en cours de publication (*Science et Pêche*, n° 291).

Prélèvements et préparation des échantillons.

Les échantillons utilisés pour ces essais ont tous été prélevés dans l'estuaire de la Loire au printemps 1977. Il s'agit de sédiments, d'algues vertes (*Enteromorpha compressa*), de moules (*Mytilus edulis*), de crevettes grises (*Crangon crangon*) et de poissons (*Callionymus lyra* L.). Pour chaque espèce, un échantillon unique a été homogénéisé avant d'être utilisé avec chaque méthode décrite. Les moules ont été préalablement écoquillées et les poissons étêtés et éviscérés.

Techniques analytiques.

Pour cette étude comparative, nous avons sélectionné les techniques d'extraction et de purification d'échantillon décrites ci-après. Dans chaque cas, le poids d'échantillon utilisé correspondait à 10 g de matériel humide. Les solvants étaient redistillés. Les produits chimiques étaient de pureté analytique. La verrerie était lavée avec un détergent, rincée à l'eau distillée puis avec le solvant utilisé dans chaque méthode.

ALZIEU (Cl.), MICHEL (P.) et THIBAUD (Y.), 1976 — MICHEL (P.), 1976.

L'extraction des lipides dans les moules est réalisée en laissant l'échantillon humide tremper dans 25 ml d'acétone, 100 ml de pentane et 20 g de sulfate de sodium anhydre, pendant une nuit. L'ensemble est filtré et rincé plusieurs fois avec du pentane (100 ml au total). L'ensemble des fractions liquides est alors évaporé à sec.

Dans une colonne de 14 mm de diamètre, on verse successivement 10 ml de pentane, 5 g de florisol à 5 % d'eau, l'extrait lipidique en solution dans 10 ml de pentane et 5 g de florisol. L'élution est effectuée avec 40 ml de pentane.

BLUMER (M.), SOUZA (G.) et SASS (J.), 1970.

L'échantillon humide est extrait par le méthanol au soxhlet pendant 20 h, avec trois périodes de 5 h d'interruption de chauffage dans le solvant (35 h au total). Le méthanol dans le ballon récepteur est changé une fois. L'extrait combiné est centrifugé pour éliminer les matières solides qui sont lavées avec 3×40 ml de pentane et centrifugées, après agitation énergique. Les hydrocarbures de la solution méthanolique (libre de matières solides) sont extraits par 4×50 ml de pentane dans une ampoule à décanter. L'ensemble des fractions liquides est lavé avec de l'eau distillée, séché sur Na_2SO_4 anhydre et évaporé jusqu'à dessiccation. Le résidu sec est repris dans un volume minimum de n-pentane et purifié sur une colonne contenant deux parties d'alumine (activée à 120° C, puis désactivée par 5 % d'eau). Les hydrocarbures sont élués par du n-pentane (quatre fois le volume de la colonne). Cette technique a été appliquée aux sédiments et aux moules.

BLAYLOCK (J.W.), BEAN (R.M.) et WILDUNG (E.), 1974.

L'échantillon de sédiments est extrait dans un soxhlet avec 500 ml de mélange méthanol/benzène (1 : 1) pendant 16 h. L'extrait est évaporé à sec. Pour éliminer les sels, l'extrait sec est dissous dans le benzène et filtré sur de la laine de verre, le benzène est à nouveau évaporé. L'extrait sec repris dans 10 ml de pentane est purifié dans une colonne (30×1 cm) contenant 10 g d'alumine (activée à 400° C pour 16 h) sur 10 g de silice (activée à 150° C pour 16 h). Les hydrocarbures sont élués par 70 ml de pentane, puis par 100 ml de benzène.

BURNS (K.A.) et TEAL (J.M.), 1973.

L'échantillon humide est traité avec du méthanol pendant 48 h dans un soxhlet. Les hydrocarbures sont ensuite extraits de la solution méthanolique par du n-pentane. Le solvant séché

sur Na_2SO_4 anhydre est évaporé. L'extrait est purifié sur colonne contenant un volume d'alumine sur un volume de silice (activées à 250°C pendant 1 h, puis désactivées en ajoutant 5 % d'eau). L'élution est effectuée par du n-pentane (trois fois le volume de la colonne). Cette technique a été appliquée sur des moules, des poissons, des crevettes et des algues.

CLARK (R.C.) et BLUMER (M.), 1967.

L'échantillon d'algues humides est extrait dans un soxhlet avec un mélange de méthanol/benzène (1 : 1) pendant 20 h. Ensuite, le solvant est renouvelé et le reflux se poursuit pendant encore 30 h (le volume total de solvant est de 300 ml). Les hydrocarbures sont extraits par partition avec le pentane, puis le solvant est évaporé. L'extrait repris dans un volume minimum de pentane est purifié dans une colonne de 25 mm de diamètre contenant 100 g de silice, activée à 200°C et désactivée par 5 % d'eau. L'élution des hydrocarbures est réalisée avec 250 ml de n-pentane.

FARRINGTON (J.W.) *et al.*, 1972 et 1973.

L'extraction des lipides dans l'échantillon humide de poissons est réalisée dans un soxhlet avec un mélange de méthanol et de benzène (1 : 1) pendant 40 h, le solvant est alors renouvelé et l'extraction poursuivie pendant encore 24 h (FARRINGTON, 1972). L'extrait est évaporé et les lipides saponifiés par reflux deux heures, avec de la potasse 0,5 N dans un mélange méthanol (95 %)/benzène (4 : 1). L'insaponifiable est isolé par partage avec du pentane, puis le pentane est évaporé jusqu'à 1 ml. L'extrait est introduit dans une colonne contenant une part de silice sous une part d'alumine (désactivées par 5 % d'eau). L'élution est effectuée avec trois volumes de mélange de pentane/benzène (95 : 5) (FARRINGTON, 1973).

GIAM (C.S.), CHAN (H.S.) et NEFF (G.S.), 1976.

L'échantillon humide est saponifié par reflux avec 5 g de potasse dans 50 ml de méthanol, pendant 2 h. L'échantillon saponifié est traité avec 100 ml de solution de chlorure de sodium à 5 % et 3×50 ml d'hexane pour isoler l'insaponifiable.

La solution est lavée avec de l'eau salée et concentrée jusqu'à 5 ml. L'extrait est ensuite purifié dans une colonne ($1,1 \times 22$ cm) contenant 10 g de silice sous une couche de 1 g de Na_2SO_4 anhydre.

L'élution des hydrocarbures est effectuée avec 25 ml d'hexane suivi de 50 ml de benzène.

Ce procédé a été appliqué sur les moules, poissons et crevettes.

GREFFARD (J.) et MEURY (J.), 1967.

L'échantillon des sédiments humides est placé à l'étuve à 20°C jusqu'à dessiccation, puis trituré au mortier. L'échantillon sec est chargé dans une petite colonne (10×1 cm). L'extraction des hydrocarbures est réalisée au moyen d'éther de pétrole purifié par passage sur colonne d'alumine. Le sédiment est épuisé par des volumes de 5 ml environ jusqu'à disparition de la fluorescence (l'opération est effectuée avec 120 ml d'éther de pétrole au total).

HEROS (M.), 1972.

L'échantillon d'algues est desséché à l'étuve à 80°C , puis finement broyé au mortier. Il est saponifié avec de la potasse méthanolique (50 ml d'alcool éthanolique à 95° et 10 pastilles de potasse) à reflux pendant 8 h. On ajoute alors 50 ml d'eau distillée, et après agitation et refroidissement on extrait l'insaponifiable avec 200 ml d'éther de pétrole. Cet extrait est lavé avec 50 ml d'éthanol à 50 %, puis desséché sur Na_2SO_4 anhydre. L'éther de pétrole est évaporé et l'extrait sec est analysé sans purification préalable.

HUNTER (L.), GUARD (H.E.) et DI SALVO (L.H.), 1974.

L'extraction des hydrocarbures est effectuée dans un mortier. L'échantillon de sédiments, plus 10 g de sulfate de magnésium calciné, plus 10 g de sable calciné sont broyés successivement avec 100 ml d'hexane (10×10 ml d'hexane). L'extrait d'hexane est passé dans une colonne (3×15 cm) contenant de la silice activée à 120°C pendant 4 h. L'élution est continuée par l'hexane (1,5 fois le volume de la colonne).

MACKIE (P.R.), WHITTLE (K.I.) et HARDY (R.), 1974.

L'extraction des lipides est issue de la technique de BLIGH et DYER (1959). L'extraction est effectuée par broyage de 10 g de l'échantillon humide avec 10 ml de chloroforme et 20 ml de

méthanol pendant 2 mn, on ajoute 10 ml de chloroforme et on continue le broyage pendant 30 secondes, on dilue avec 10 ml d'eau distillée, on continue le broyage pendant 30 secondes. Après décantation, on retire la partie inférieure qui représente l'extrait chloroformique. On l'évapore à sec. L'extrait repris dans 1 ml de n-pentane est introduit dans une colonne (1 × 35 cm) contenant 10 g de silice (activée à 120° C pendant 2 h, et désactivée par 10 % d'eau).

La purification des hydrocarbures est effectuée par élution avec 100 ml de pentane suivie de 50 ml de mélange benzène/pentane (1 : 3). Ce procédé a été appliqué sur les sédiments et les poissons.

SHAW (D.G.), 1973.

L'extraction est effectuée dans un soxhlet. L'échantillon de sédiments humide est extrait avec 100 ml d'alcool méthanolique pendant 24 h. Les hydrocarbures sont ensuite séparés par partition avec 4 × 25 ml d'hexane. L'extrait d'hexane est filtré sur du Mg SO₄ anhydre évaporé à sec (pas de purification).

STEGEMAN (J.J.) et TEAL (J.M.), 1973.

Les lipides sont extraits en procédant 4 fois au broyage de l'échantillon des moules humides avec du pentane et du Na₂SO₄ anhydre. Au total, on utilise 400 ml de pentane et 30 g de Na₂SO₄. Les extraits de pentane réunis sont évaporés et saponifiés à reflux par la potasse méthanolique à 5 % (50 parts de potasse pour 1 de lipides). L'insaponifiable est isolé par partage dans du n-pentane. L'extrait de pentane est purifié dans une colonne contenant 10 cm³ d'alumine sur 10 cm³ de silice (désactivées par 5 % d'eau). L'élution est effectuée par trois volumes de colonne de pentane suivie d'un volume de mélange benzène/pentane (1 : 9).

VANDERMEULEN (J.M.), KEIZER (P.D.) et AHERN (T.P.), 1976.

L'extraction est réalisée en homogénéisant avec 5 ml d'eau l'échantillon de sédiment, et en l'agitant avec 2 × 50 ml de n-pentane avec un agitateur mécanique, pendant 15 mn chaque fois. Puis les deux volumes de pentane sont réunis et on évapore jusqu'à 0,5 ml. Pour la purification, ces auteurs ont utilisé la méthode de Blumer, 1970.

YOUNGBLOOD (W.W.), BLUMER (M.), GUILLARD (R.L.) et FIORE (F.), 1974.

Après avoir séché l'échantillon d'algues avec un papier filtre, pendant 15 mn, on l'extrait dans un soxhlet avec 350 ml de méthanol jusqu'à ce que le solvant en contact avec l'échantillon devienne incolore. On ajoute 50 ml de benzène et l'opération se continue pendant 1 h.

Les hydrocarbures sont extraits avec 3 × 75 ml de n-pentane, on lave avec l'eau et on sèche sur du Na₂SO₄ anhydre. L'extrait est évaporé à sec puis repris dans 1 ml de pentane, introduit dans une colonne contenant 3 ml d'alumine (désactivée par 5 % d'eau) sur 6 ml de silice (désactivée par 5 % d'eau).

L'élution est effectuée avec 27 ml de n-pentane suivie de benzène à 5 % dans le pentane jusqu'à apparition de la première goutte de pigment brun.

ZITKO (V.), 1970.

Après avoir homogénéisé l'échantillon humide avec du Na₂SO₄ anhydre, l'extraction est effectuée avec 40 ml d'hexane par agitation mécanique pendant 20 mn. L'extrait d'hexane est aspiré à l'aide d'une pipette Pasteur et évaporé à sec ; nous avons appliqué cette technique à des échantillons de moules, de poissons et de crevettes.

Résultats et interprétation.

Les extraits secs obtenus par les différentes techniques décrites ici ont été repris dans 5 ml de n-hexane. Des analyses fluorométriques ont alors été effectuées sur les solutions, à l'aide d'un spectrofluorimètre Turner, modèle 430.

Des essais préliminaires ont été faits sur plusieurs extraits dans l'hexane pour déterminer les longueurs d'onde d'excitation (λ_e) produisant une fluorescence maximale. Ces essais ont permis de sélectionner les trois longueurs d'ondes d'excitation ci-après : λ_e 300 nm, λ_e 370 nm et λ_e 395 nm.

Technique	λ e 300 nm			λ e 370 nm			λ e 395 nm		
	λ (F max)	I (F max)	$\sum I$ 300-550	λ (F max)	I (F max)	$\sum I$ 370-550	λ (F max)	I (F max)	$\sum I$ 395-550
Sédiments									
GREFFARD (1967)	430	10,8	8,1	435	28,0	18,2	440	40,0	23,0
BLUMER (1970)	355	8,0	4,6	408	19,3	12,1	405	8,8	2,9
SHAW (1973)	456	3,4	3,0	468	7,0	4,7	466	8,0	4,5
BLAYLOCK (1974)	435	5,7	4,8	445	51,0	34,7	443	103,4	64,2
HUNTER (1974)	407	10,5	5,9	408	40,0	16,1	440	22,0	12,3
MACKIE (1974)	432	18,3	15,0	445	51,0	30,0	443	108,0	54,6
VANDERMEULEN (1976)	360	3,5	2,2	410	7,3	4,1	404	7,0	2,7
Mytilus edulis									
HEROS (1972)	530	0,4	3,8	530	0,9	3,8	530	0,3	2,3
ZITKO (1970)	—	0,0	0,0	—	0,0	0,0	—	0,0	0,0
BURNS (1973)	347	6,3	24,4	377	3,7	8,3	402	5,7	8,8
STEGEMAN (1973)	350	9,7	46,9	375	4,0	10,4	402	6,5	10,8
BLUMER (1970)	350	7,9	36,2	377	3,6	11,5	402	5,8	9,5
GIAM (1976)	358	7,1	42,6	439	4,1	27,2	440	7,0	25,0
MICHEL (1976)	340	3,8	15,6	375	4,2	8,3	402	6,6	9,5
Callionymus lyra L.									
ZITKO (1970)	380	0,8	11,3	490	2,2	20,0	520	1,6	12,3
BURNS (1973)	340	2,1	12,0	377	3,0	8,8	400	5,0	8,1
FARRINGTON (1972-73)	356	3,0	20,0	377	3,1	11,7	402	5,3	10,0
MACKIE (1974)	345	2,2	19,4	377	3,2	12,7	402	5,4	11,0
GIAM (1976)	362	5,0	41,0	377	3,1	23,0	403	5,1	20,5
Cragon crangon									
ZITKO (1970)	345	1,0	7,8	418	1,1	11,0	405	1,0	8,8
BURNS (1973)	360	2,3	19,2	414	4,1	22,8	405	2,3	10,0
GIAM (1976)	358	3,1	18,3	414	3,6	21,5	405	2,0	11,2
Enteromorpha compressa									
CLARK (1967)	350	6,5	37,0	475	3,0	19,5	403	5,9	17,7
BURNS (1973)	353	3,9	23,8	477	3,5	14,8	403	6,0	15,5
YOUNGBLOOD (1971)	345	4,2	27,7	476	3,3	19,0	403	6,2	18,4

TABL. 1. — Caractéristiques principales des spectres de fluorescence obtenus. λ F max : longueur d'onde à laquelle l'intensité de fluorescence est maximum ; I (F max) : intensité de fluorescence maximum ; $\sum I$: intégrale de fluorescence dans l'intervalle considéré.

Pour déterminer les limites de fluorescence pour les hydrocarbures (les composés aromatiques), nous avons utilisé d'une part un fuel domestique à la concentration de 1 000 ppm dans l'hexane

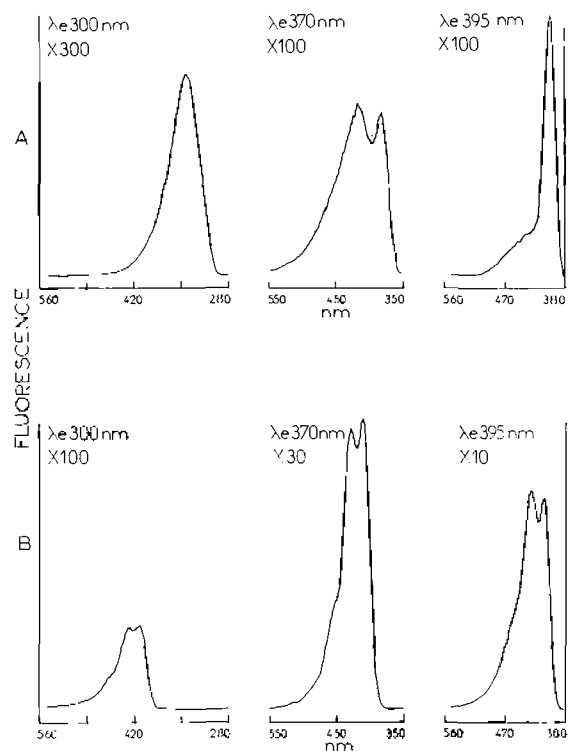


FIG. 1. — Spectres de fluorescence pour : A. fuel domestique, B. étalon aromatique.

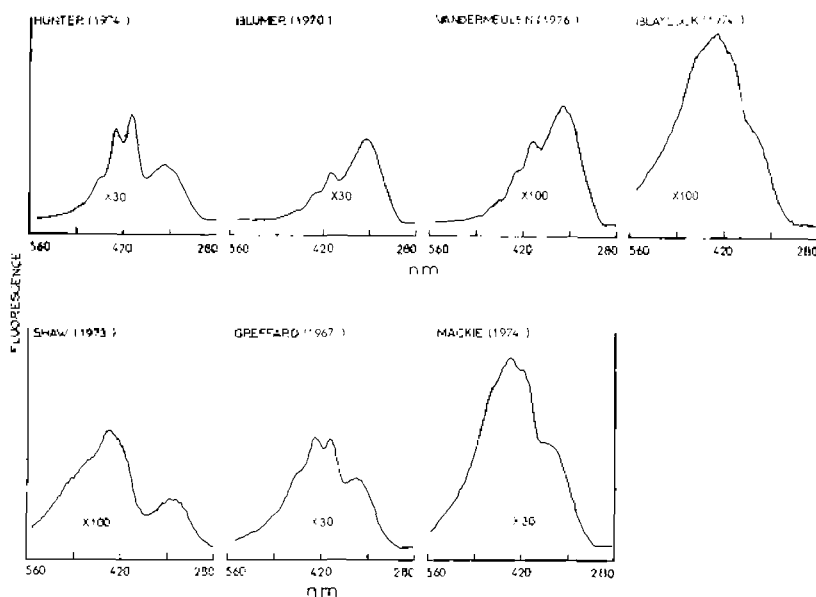


FIG. 2. — Spectres de fluorescence pour les sédiments A λ_e 300 nm.

d'autre part un mélange de 7 composés aromatiques (Naphthalène, Anthracène, Phénanèrene, Pyrène, Chrysène, Benzo-3,4-pyrène et Benzo-[ghi]-perylène) avec une concentration totale de

70 ppm dans l'hexane. Aux longueurs d'onde d'excitation sélectionnées (λ e 300 nm, λ e 370 nm et λ e 395 nm), on a trouvé que la fluorescence était négligeable au-dessus de 550 nm (fig. 1). Pour chaque extrait, on a donc enregistré les spectres d'émission de fluorescence entre la longueur d'onde d'extraction et 550 nm. Ceci successivement pour les trois longueurs d'onde d'excitation

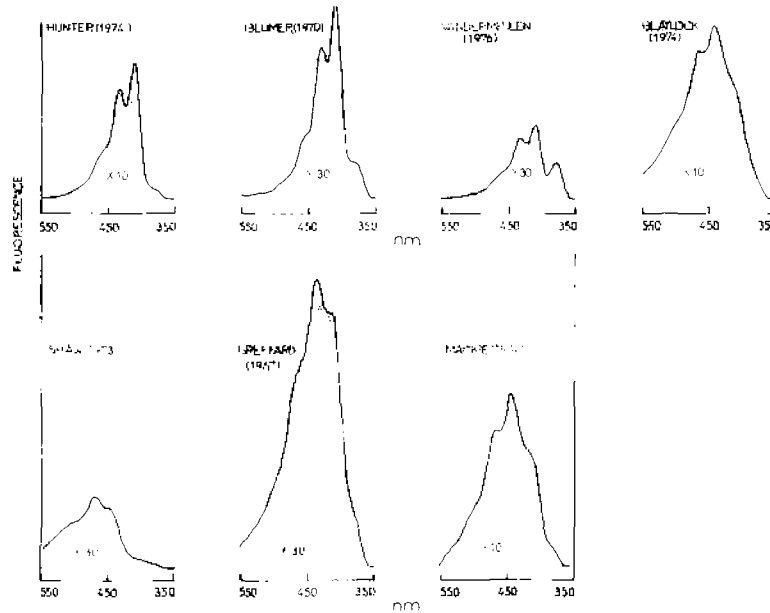


FIG. 3. — Spectres de fluorescence pour les sédiments A λ e 370 nm.

de 300, 370 et 395 nm. Les figures 2 à 11 représentent les spectres ainsi obtenus pour les extraits obtenus par les différentes techniques appliquées pour les sédiments, *Mytilus edulis*, *Callionymus*

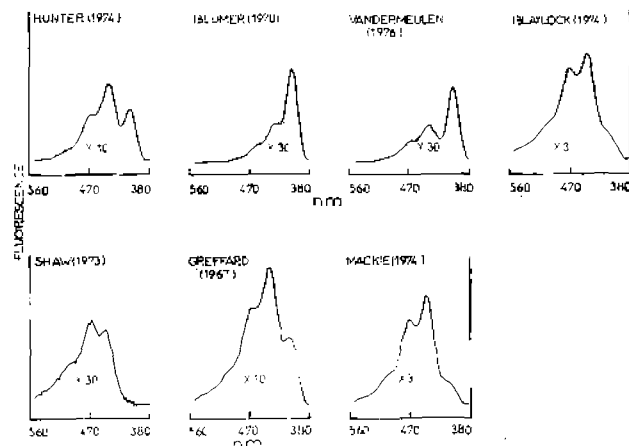


FIG. 4. — Spectres de fluorescence pour les sédiments A λ e 395 nm.

lyra L., *Crangon crangon* et *Enteromorpha compressa*. Nous avons regroupé dans le tableau 1 les valeurs caractéristiques de ces spectres, pour l'ensemble des échantillons. Sédiments (fig. 2, 3 et 4, tabl. 1).

On constate que parmi les trois longueurs d'onde d'excitation, λ e 395 nm est celle pour laquelle on obtient la meilleure intensité de fluorescence.

Les spectres de fluorescence, correspondant aux différentes techniques, varient considérablement tant par la position des pics principaux que par leurs intensités. Seulement deux

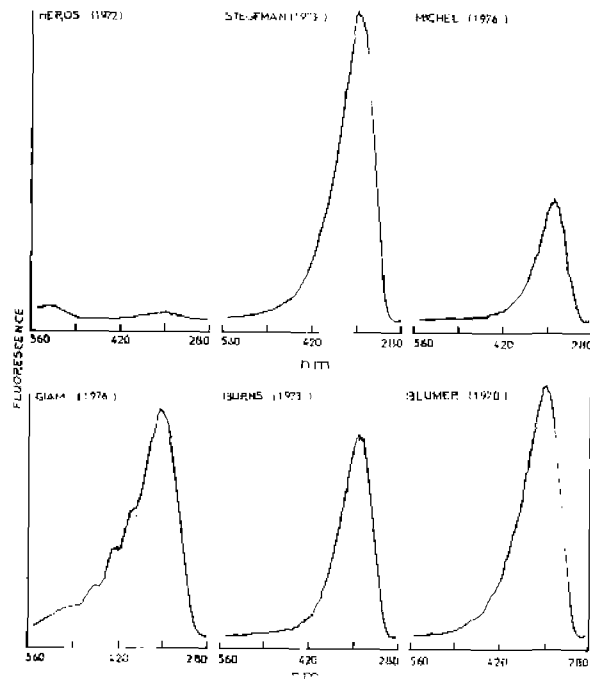


FIG. 5. — Spectres de fluorescence pour les moules (*Mytilus edulis*) A λ e 300 nm.

techniques (MACKIE, 1974, et BLAYLOCK, 1974), donnent des résultats qui semblent à peu près concordants. Par la technique de GREFFARD (1967), on retrouve bien la même allure du spectre,

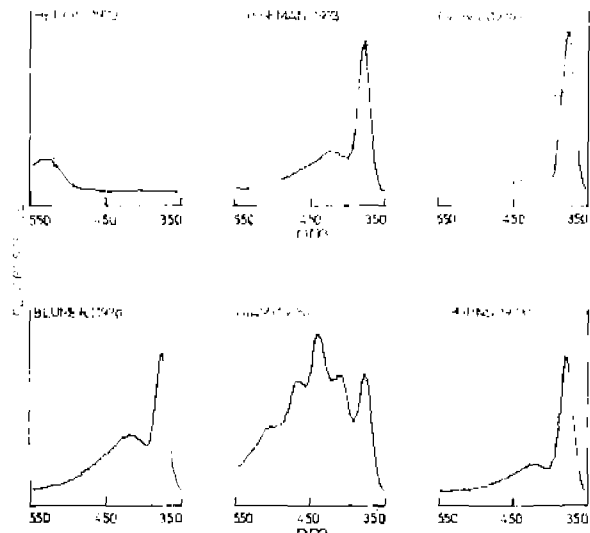


FIG. 6. — Spectres de fluorescence pour les moules (*Mytilus edulis*) A λ e 370 nm.

mais avec une intensité réduite de moitié ; ce qui laisse supposer un rendement d'extraction insuffisant.

Mytilus edulis (fig. 5, 6 et 7, tabl. 1).

Pour les moules, en utilisant les techniques de BURNS (1973), STEGEMAN (1973), BLUMER (1970) et MICHEL (1976), et pour l'ensemble des résultats obtenus, on observe une très bonne

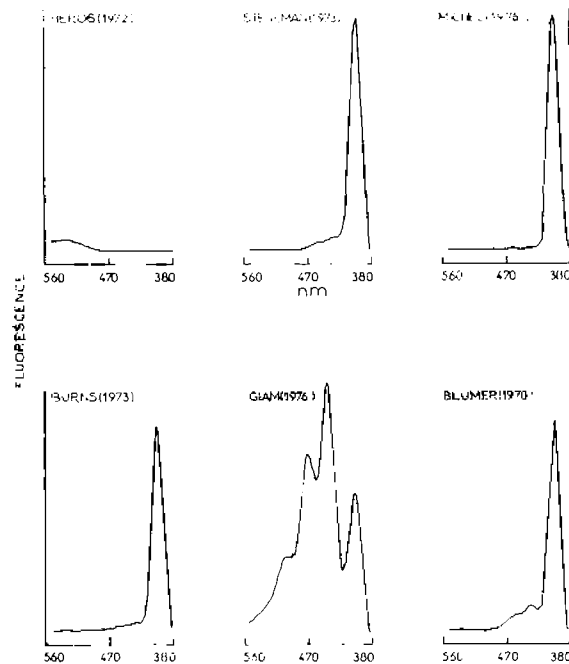


FIG. 7. — Spectres de fluorescence pour les moules (*Mytilus edulis*) A λ_e 395 nm.

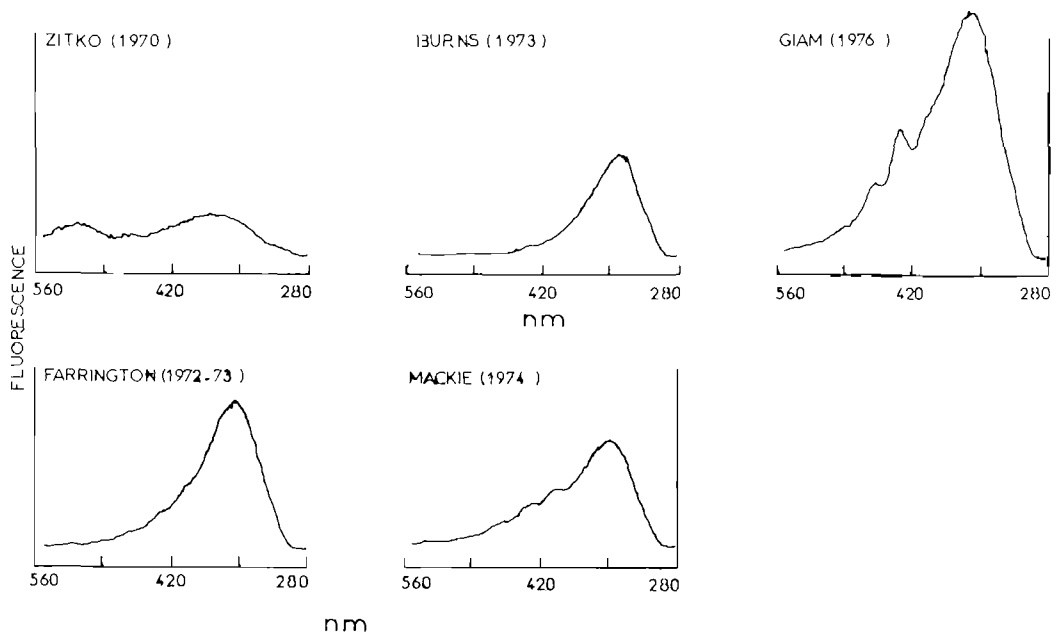


FIG. 8. — Spectres de fluorescence pour les poissons (*Callionymus lyra* L.) A λ_e 300 nm.

corrélation, quelle que soit la longueur d'onde d'excitation choisie. On observe aussi certaines caractéristiques identiques par la technique de GIAN (1976). Dans ce cas, on note cependant un

déplacement de certains maximums de fluorescence qui peuvent conduire à remettre en cause la technique de purification d'échantillon.

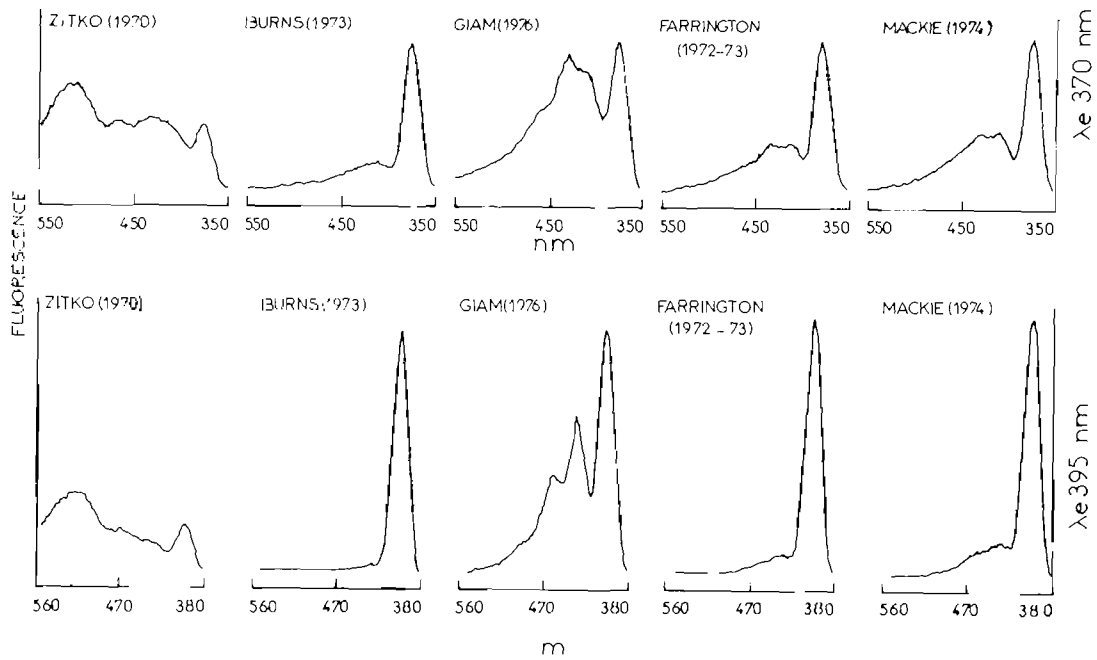


FIG. 9. — Spectres de fluorescence pour les poissons (*Callionymus lyra* L.) A λ_e 370 nm et 395 nm.

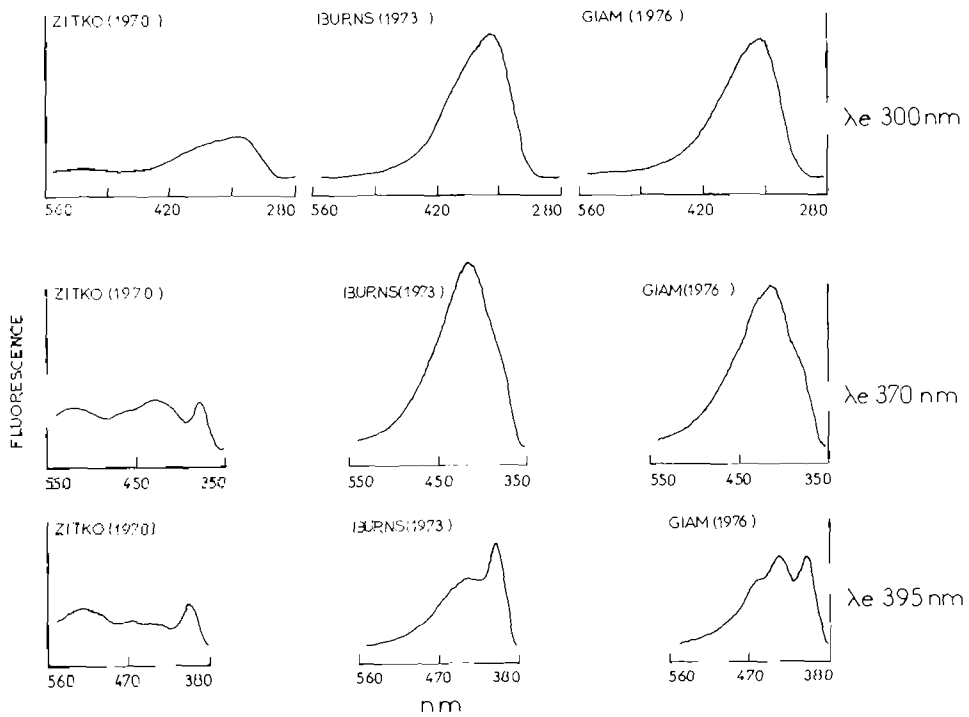


FIG. 10. — Spectres de fluorescence pour les crevettes (*Crangon crangon*) A λ_e 300 nm, λ_e 370 nm, λ_e 395 nm.

Par la méthode de HEROS (1972), on obtient des intensités de fluorescence très faibles avec un pic à 530 nm qui n'existe pas avec les autres techniques.

Enfin, par la méthode de ZITKO (1970), aucun signal de fluorescence n'a été obtenu.

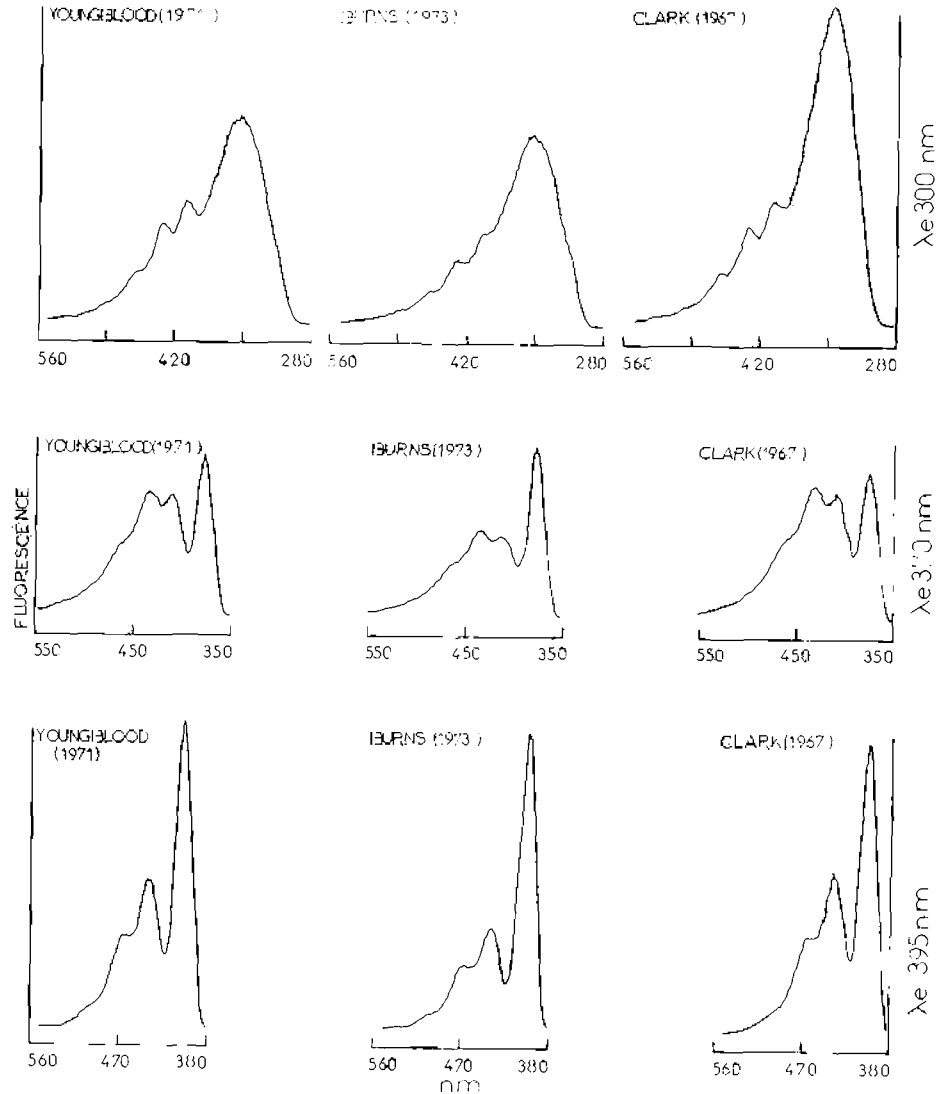


Fig. 11. — Spectres de fluorescence pour les algues (*Enteromorpha compressa*) A λ_e 300 nm, λ_e 370 nm, λ_e 395 nm.

Callionymus lyra L. (fig. 8 et 9, tabl. 1).

On note pour cette espèce une bonne corrélation sur l'ensemble des résultats obtenus par les techniques de BURNS (1973), FARRINGTON (1972-1973) et MACKIE (1974). Ces résultats sont très différents pour les deux autres techniques essayées.

Crangon crangon (fig. 10, tabl. 1).

Dans les extraits obtenus, par l'application des trois techniques ZITKO (1970), BURNS (1973) et GIAM (1976), λ_e 370 nm est la λ_e maximum qui donne l' I_F la plus élevée, avec des proportions d'intensité de fluorescence très variable : 1 : 1 ; 4 : 1 ; 3 : 6, obtenus vers 418, 414 et 414 nm respectivement.

Dans le spectre issu de la technique de ΖΙΤΚΟ (1970), on note deux pics de fluorescence identiques avec I_F égale 418 et 470 nm pour λ_e 370 nm.

Enteromorpha compressa (fig. 11, tabl. 1).

C'est le seul cas où l'on peut remarquer que pour l'ensemble des résultats obtenus la corrélation est satisfaisante pour toutes les techniques testées.

Conclusions.

Cette étude a donc permis de comparer les résultats obtenus par 16 techniques différentes d'extraction et de purification d'échantillons, pour l'analyse des hydrocarbures dans le milieu marin. Globalement, si l'on a pu trouver quelques analogies dans les résultats obtenus par certaines de ces techniques, jamais on n'a pu obtenir la concordance attendue, sauf en ce qui concerne les trois techniques appliquées aux algues.

Les variations constatées dépendent du mélange de solvants utilisés pour l'extraction, de la technique utilisée et de la méthode de purification.

Le mélange de solvants influe très certainement sur la proportion relative des divers composés extraits, ainsi que sur les rendements d'extraction.

La technique d'extraction (soxhlet, macération...) influe de façon très nette sur le rendement d'extraction.

Enfin, les techniques de purification, même basées sur les mêmes principes (chromatographie liquide/solide sur silice et alumine pour la plupart), diffèrent par maints aspects (poids et activation des adsorbants, diamètre de colonne, volume et nature de l'éluant). Il s'ensuit un rendement d'élution variable selon la nature des hydrocarbures, ainsi qu'une élimination plus ou moins complète des interférences dues aux composés autres que les hydrocarbures.

Le but de cette étude n'était pas de montrer que l'une des techniques utilisées est préférable aux autres, mais seulement de mettre l'accent sur l'impossibilité de comparer les résultats publiés par les divers laboratoires dans le monde, dans l'état actuel des techniques utilisées. Il est évident que certaines différences constatées entre les degrés de contaminations pétrolières de régions variées peuvent tenir davantage aux variations des techniques analytiques qu'à un état de fait réel. De telles données ne sont actuellement significatives que si elles émanent du même laboratoire ou de quelques laboratoires appliquant les mêmes techniques et ayant pris soin de vérifier au moyen d'intercalibrations la validité de leurs résultats.

Nous croyons qu'il est tout à fait indispensable qu'à terme une technique unique soit normalisée. Bien des essais restent cependant à faire avant qu'on puisse arriver à cette fin.

Manuscrit déposé le 8 février 1978.

BIBLIOGRAPHIE

- ALZIEU (Cl.), MICHEL (P.) et THIBAUD (Y.), 1976. — Présence de micropolluants dans les mollusques littoraux. — *Science et Pêche, Bull. Inst. Pêches marit.*, n° 264 : 1-18.
- BLUMER (M.), 1967. — Hydrocarbons in digestive tract and liver of a basking skark. — *Science*, **156** : 390-391.
- BLUMER (M.), ROBERTSON (J.C.), GORDON (J.E.) et SASS (J.), 1969. — Phytol derived C_{19} di-and triolefinic hydrocarbons in marine zooplankton and fishes. — *Biochem.*, **8** : 4067-4074.
- BLUMER (M.), SOUZA (G.) et SASS (J.), 1971. — Hydrocarbon pollution of edible shellfish by an oil spill. — *Mar. Biol.*, **5** (3) : 195-202.
- BLUMER (M.), BLOKKER (P.C.), COWELL (E.B.) et DUCKWORTH (D.E.), 1972. — Petroleum. *In* guide of marine pollution, by GOLDBERG (E.D.). New York, GORDON et BREACH, Science Publishers, Edit. : 19-40.
- BLAYLOCK (J.W.), BEAN (R.M.) et WILDUNG (R.E.), 1974. — Determination of extractable organic material and analysis of hydrocarbon type in lake and coastal sediments. — *Mar. Poll. Monitoring*, "Petroleum", NBS special publication n° 409 : 217-219.

- BLICH (E.G.) et DYER (W.J.), 1959. — A rapid method of total lipid extraction and purification. — *Can. J. Biochem. Physiol.* **37** : 911-917.
- BURNS (K.A.) et TEAL (J.M.), 1973. — Hydrocarbons in the pelagic Sargassum community. — *Deep - Sea Res.*, **20** : 207-211.
- CLARK (R.C.) et BLUMER (M.), 1967. — Distribution of n-paraffins in marine organisms and sediments. — *Limnol. Oceanogr.*, **12** : 79-87.
- DENEKAS (M.O.), COULSON (F.T.), MOORE (J.W.) et DODD (C.G.), 1951. — Material adsorbed at crude petroleum/water interfaces. Isolation and analysis of normal paraffins of high molecular weight. — *Ind. Eng. Chem.*, **43** : 1165-1169.
- FARRINGTON (J.W.), GIAM (C.S.), HARVEY (G.R.), PARKER (P.) et TEAL (J.), 1972. — Analytical techniques for selected organic compounds. — *Mar. Poll. monitoring: Strategy for a national program*, by GOLDBERG (E.D.); Ed. NOAA, U.S. Dept. of Commerce, Washington, D.C. : 152-176.
- (1973). — Analytical techniques for the determination of petroleum contamination in marine organisms. — *Techn. rep. WHOI - 73 - 57* : 1-24.
- FARRINGTON (J.W.), TEAL (J.M.), QUINN (J.G.), WADE (T.) et BURNS (K.), 1973. — Intercalibration of analyses of recently biosynthesized hydrocarbons and petroleum hydrocarbons in marine lipids. — *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **10** (3) : 129-136.
- GIAM (C.S.), CHAN (H.S.) et NEFF (G.S.), 1976. — Distribution of n-paraffins in selected marine organisms. — *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **16** (1) : 37-43.
- GREFFARD (J.) et MEURY (J.), 1967. — Note sur la pollution en rade de Toulon par les hydrocarbures cancérigènes. — *Cahiers océanogr.*, **19** : 457-468.
- HARDY (R.), MACKIE (P.R.) et WHITTLE (K.J.), 1975. — Hydrocarbons and petroleum in the marine ecosystem. A review. — *Cons. int. Explor. Mer: workshop: Petroleum Hydrocarbon in the Marine Environment*, A 2 : 1-10.
- HEROS (M.), 1972. — Dosage des hydrocarbures polycondensés, cancérigènes ou non, dans les milieux biologiques: pollution des milieux vitaux par les hydrocarbures polybenzéniques du type benzo-3,4 pyrène. — *In MALLET (L.)*, Ed. Librairie Maloine, Paris : 12-20.
- HUNTER (L.), GUARD (H.E.) et DISALVO (H.), 1974. — Determination of hydrocarbons in marine organisms by thin layer chromatography. — *Marine Pollution Monitoring "Petroleum"*, NBS special publication n° 409 : 213-216.
- LUDWIG (F.J.), 1965. — Analysis of microcrystalline wax by gas - liquid chromatography. — *Anal. chem.*, **37** : 1732-1737.
- MACKIE (P.R.), WHITTLE (K.J.) et HARDY (R.), 1974. — Hydrocarbons in the marine environment; I. N-alkanes in the Firth Clyde. — *Estuar. and Coast. Mari. Science*, **2** : 359-374.
- MICHEL (P.), 1976. — Cinétique d'épuration *in-situ* de moules contaminées par un gas-oil. — *Science et Pêche*, *Bull. Inst. Pêches marit.*, n° 259 : 1-7.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, Wash., 1975. — Petroleum in the Marine Environment. — Workshop on input, fate and the effects of petroleum in the marine environment, May 21-25, 1973, Airlie House, Airlie, Virginia.
- POSTHUMA (J.), 1975. — The composition of petroleum. — *Cons. int. Explor. Mer: workshop: Petroleum Hydrocarbons in the Marine Environment*, A 1 : 1-17.
- SHAW (D.G.), 1973. — Lipides in shallow bottom sediments. — *Environ. Sci. Technol.*, **7** (8) : 740-742.
- SMITH (H.M.), 1968. — Qualitative and quantitative aspects of crude oil composition. — U.S. Dept. of Interior; *Bureau of Mines Bulletin*, **642**.
- STEGEMAN (J.J.) et TEAL (J.M.), 1973. — Accumulation, release and retention of petroleum hydrocarbons by oyster, *Crassostrea virginica*. — *Mar. Biol.*, **22** : 37-44.
- STUDY OF CRITICAL ENVIRONMENTAL PROBLEMS, 1970. — Man's Impact on the Global Environment. — Cambridge (Mass.) MIT Press, Edit.
- U.S. COAST GUARD, 1973. — Draft environmental impact statement of the proposed 1972 outer continental shelf oil and gas general lease sale. — Offshore Louisiana U.S. Dept. of the Interior Wash., D.C.
- VANDERMEULEN (J.H.), KIEZER (P.D.) et AHERN (T.P.), 1976. — Cons. Int. Explor. Mer, Fisheries Improvement Committee, C.M./E : **51** : 1-6.
- YOUNGBLOOD (W.W.), BLUMER (M.), GUILLARD (R.L.) et FIORE (F.), 1971. — Saturated and unsaturated hydrocarbons in marine benthic algae. — *Mar. Biol.*, **8** : 190-201.
- ZITKO (V.), 1970. — Determination of residual fuel oil contamination of aquatic animals. — *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, nov.-dec. : 559-564.
- ZOBELL (C.E.), 1964. — The occurrence, effects and fates of oil pollution in the sea. — Proceedings of the International Conference on the water Pollution Research, London, 1962. — Londres, PERGAMON Press, Edit. : 85-118.