

DÉTERMINATION DES TAUX D'ACCUMULATION DES HYDROCARBURES PAR LES MOULES DANS DES CONDITIONS DE POLLUTION CHRONIQUE

par Hassan AWAD

Introduction.

Pendant les dix dernières années, le nombre de publications concernant les effets de la pollution par le pétrole sur la vie marine a particulièrement augmenté. Quelques revues ont déjà été publiées sur ce sujet (Nelson-Smith, 1972 ; N.A.S., 1975 ; Hyland et Schneider, 1976 ; Awad, 1979). La plupart des travaux ont été effectués en laboratoire et il en résulte quelques difficultés d'extrapolation au milieu marin (Michel, 1976). C'est pourquoi, plus récemment, s'est développée une tendance au contrôle direct *in-situ* des effets du pétrole sur les moules. Ces organismes constituent des matériaux de choix pour l'étude des pollutions marines et notamment pour l'accumulation des micropolluants (métaux lourds, pesticides, hydrocarbures).

Le choix des moules s'explique pour les raisons suivantes :

- leur distribution mondiale et leur disponibilité, même dans l'eau contaminée par le pétrole ;
- la vaste information scientifique sur leur biologie et leur physiologie ;
- leur résistance, qui leur permet de supporter longtemps les expériences entreprises au laboratoire ;
- leur taille propice aux travaux en laboratoire et à la dissection de leurs différents organes ;
- leur aptitude à accumuler les hydrocarbures de l'eau, soit en milieu naturel, soit au laboratoire ;
- leur lente métabolisation des hydrocarbures.

Les moules se nourrissent de particules en suspension dans l'eau (le plus souvent du plancton). On a calculé qu'elles filtrent 60 litres d'eau en 24 heures. Ce mode de nutrition permet à ces organismes d'accumuler sans discrimination aussi bien les particules alimentaires que celles minérales, de même taille. C'est donc pour cette raison que les moules sont très représentatives de la pollution. Quelques travaux ont déjà été effectués au sujet de l'accumulation et de l'épuration des hydrocarbures soit au laboratoire, soit dans le milieu marin, après un accident pétrolier. Il a été montré que lorsque les mollusques se trouvent dans des eaux contaminées par le pétrole, ils accumulent rapidement les hydrocarbures dans leurs tissus avec un facteur de concentration très élevé. Par exemple, Michel (1976) a montré qu'après un accident pétrolier, la teneur en hydrocarbures dans les moules s'était élevée d'environ 30 fois par rapport à la teneur normale et ce, après 3 jours seulement. Cependant des travaux récents ont montré que la plupart des hydrocarbures accumulés par l'organisme pendant une période d'exposition à concentration élevée de pétrole, s'éliminent rapidement quand les organismes sont placés en zone non contaminée ou lorsque le milieu ambiant est redevenu normal.

En ce qui concerne la nature des opérations d'accumulation et d'épuration des hydrocarbures effectuées par les mollusques et leur sensibilité au pétrole, nous pouvons tirer des résultats des travaux expérimentaux publiés, les généralisations suivantes :

il a été dit que les organismes marins accumulent les hydrocarbures aromatiques en quantité plus importante que les hydrocarbures paraffiniques (Anderson, 1973 ; Lee, 1976). Cela est sans doute vérifié si l'on fait des essais d'accumulation d'hydrocarbures isolés, mais, mises en présence d'un produit pétrolier complexe, les moules accumulent sans discrimination paraffines et aromatiques ;

quand les organismes marins sont exposés à l'eau propre, ils éliminent de façon rapide environ 90 % des hydrocarbures totaux accumulés ; Michel et Grizel (1978), ont montré que la vitesse d'élimination des hydrocarbures dépend de la situation géographique et de la topographie du littoral ;

la vitesse d'élimination des hydrocarbures aromatiques est plus lente que celles des paraffines.

Les prélèvements réguliers en estuaire de Loire pendant un cycle annuel complet nous ont montré la pauvreté biologique de toute la partie située entre la raffinerie de Donges et le port de St-Nazaire. Ce phénomène a deux causes principales : d'abord, les variations de salinité de forte amplitude ne sont pas propices aux espèces biologiques, ensuite la contamination notable de cette zone contribue vraisemblablement à cet appauvrissement. Il était donc intéressant d'essayer de relier les données acquises pour l'ensemble de l'estuaire à une meilleure connaissance des pollutions pétrolières dans cette zone particulière. A cet effet, nous avons profité de la période d'étiage pendant laquelle les salinités restent suffisantes pour implanter des moules dans 10 stations témoins afin d'évaluer par le biais de l'accumulation l'importance et la nature des pollutions pétrolières.

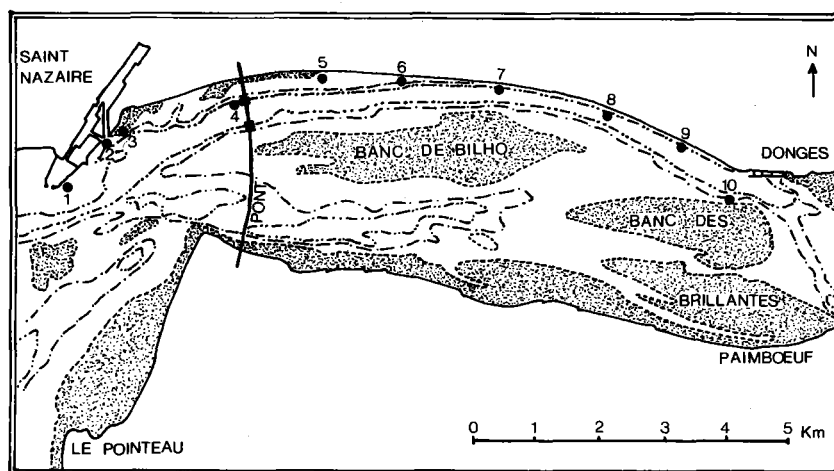


Fig. 1. — Stations choisies dans l'estuaire de la Loire pour transplanter les moules provenant de Pen-Bé.

1. Mode opératoire.

Des moules de culture prélevées à Pen-Bé au sud de l'estuaire de la Vilaine ont été immergées le 30 octobre 1977 dans les dix stations repérées sur la carte (fig. 1). Elles y étaient disposées par 5 kg dans des poches d'élevage en polyéthylène de dimension $50 \times 50 \times 10$ cm avec des mailles de 1 cm. Les prélèvements ont été faits après six semaines d'immersion. Il n'a pas été possible de poursuivre l'expérience au-delà, à cause des premières pluies importantes et des mortalités qui en ont résulté.

2. Méthode d'analyse.

Les moules sont décoquillées, égouttées, homogénéisées et lyophilisées. Les lipides contenant les hydrocarbures sont extraits à partir de 1 g de lyophilisat dans un soxhlet, avec 300 ml d'un mélange de n-pentane/acétone (2/1) à reflux pendant 24 h. Une ampoule contenant 0,5 mg de tétratriacontane ($n-C_{34}$) dans 1 ml de n-hexane est ajoutée au lyophilisat au début de l'opération d'extraction, comme étalon interne. On laisse refroidir la solution. Puis, après filtration sur laine de verre, les solvants sont évaporés à sec, sous vide dans un évaporateur rotatif, à 45 °C. Les hydrocarbures sont ensuite isolés par chromatographie sur colonne de

« Florisil » selon la technique décrite par Michel (Alzieu *et al.*, 1976). Le diamètre de la colonne est de 1,4 cm. L'adsorbant est activé pendant 2 h à 150 °C et désactivé par un ajout de 5 % d'eau. On introduit successivement dans la colonne : 10 ml de pentane, 5 g de Florisil, l'extrait sec repris par 10 ml de pentane et à nouveau 5 g de Florisil. L'élution est ensuite réalisée par 60 ml du mélange pentane/benzène (95/5). Les hydrocarbures élués sont évaporés à sec, puis redissous dans 0,5 ml de sulfure de carbone. 3 µl de cette solution sont injectés dans un chromatographe (5710 A Hewlett Packard) muni d'une colonne d'acier inoxydable de 2 m × $\frac{1}{8}$, garnie de gaz chrom. Q 80/100, imprégné de SE 30 (Gomme méthyle silicone) à 3%. La température est programmée de 120 à 280 °C à la vitesse de 8 °C/mn. Le chromatographe est relié à un intégrateur (3380 A Hewlett Packard). Le gaz vecteur est l'hélium. Son débit est de 25 ml/mn. La figure 2 représente un schéma simplifié de la technique de dosages des HCT décrite ci-dessus.

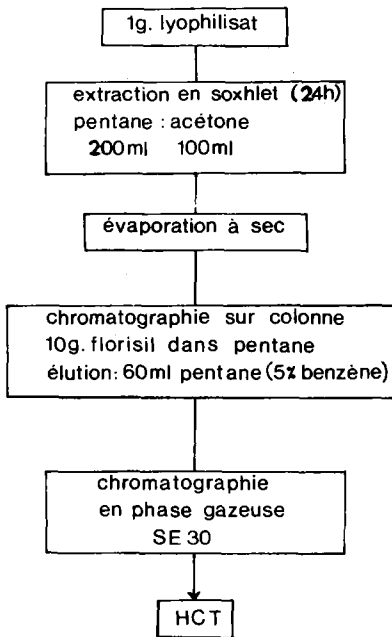


Fig. 2. — Analyse des hydrocarbures totaux (HCT) dans les moules et les algues.

Une partie de l'extrait purifié d'hydrocarbures a fait l'objet d'une analyse détaillée avec partition par chromatographie sur couche mince avant analyse par chromatographie en phase gazeuse. On utilise une plaque de silice sur aluminium, F 254, de 20 × 20 cm (E. Merck A-G). Cette plaque est activée pendant 15 mn à 220 °C et après refroidissement, est prédéveloppée avec du cyclohexane. Puis, l'extrait d'hydrocarbures étant repris par 0,2 ml de cyclohexane, on en dépose 100 µl sur la plaque qui est alors développée à nouveau avec ce même solvant. L'examen sous lumière ultraviolette permet alors de déterminer 4 zones distinctes (fig. 3 et 4). La silice est grattée dans chacune de ces zones et on réextrait par le benzène les fractions hydrocarbonées correspondantes. Puis, après évaporation à sec à 45°, sous atmosphère d'azote et reprise par le sulfure de carbone, on procède à la chromatographie en phase gazeuse pour chaque extrait

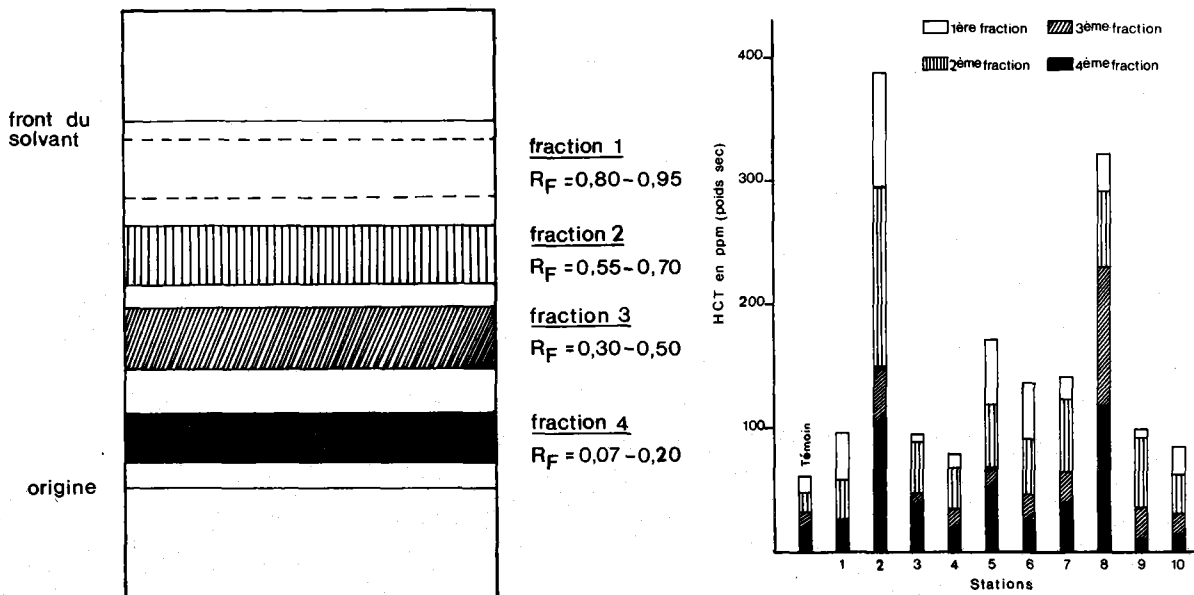


Fig. 3. et 4. — A gauche, séparation des 4 fractions d'hydrocarbures par chromatographie sur couche mince; à droite, hydrocarbures totaux (HCT) récupérés des 4 fractions de la couche mince.

selon le mode opératoire déjà décrit. Les figures 5 à 8 correspondent aux chromatogrammes en phase gazeuse obtenus à partir des moules prélevés dans les 10 stations témoins. Pour identifier la nature des

hydrocarbures dans chaque fraction, nous nous sommes basés sur les techniques suivantes :

étalonnage externe réalisé en utilisant un mélange d'hydrocarbures représentant des hydrocarbures biogènes, des n-alcanes et des hydrocarbures aromatiques polycycliques ;

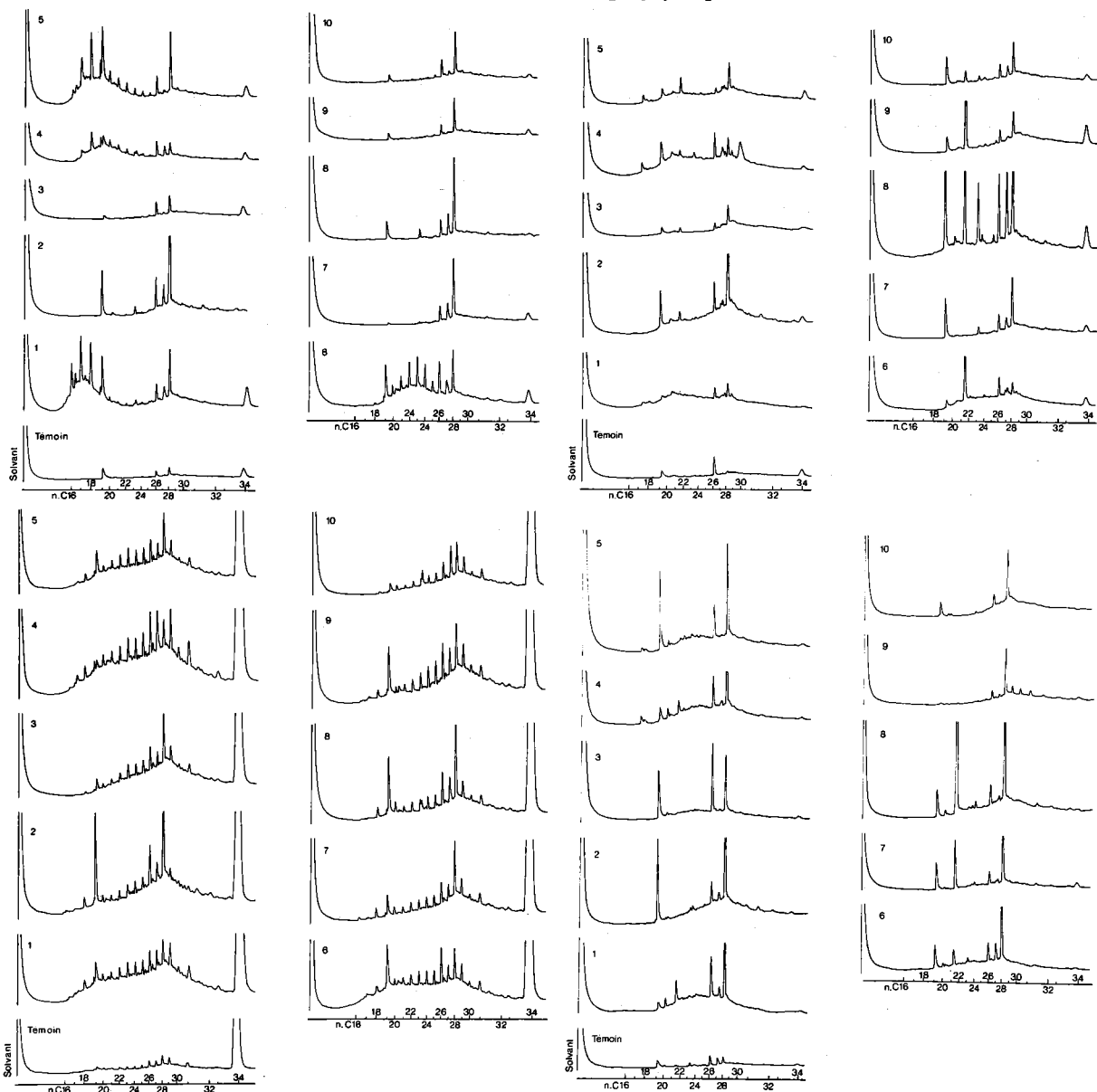


Fig. 5 (en haut, à gauche), fig. 6 (en bas, à gauche), fig. 7 (en haut, à droite) et fig. 8 (en bas, à droite). — Chromatogrammes en phase gazeuse des hydrocarbures récupérés dans les 1^{re}, 2^e, 3^e et 4^e fractions de la couche mince.

étalonnage interne : un composé paraffinique (n-C₃₄) a été ajouté aux échantillons dès le départ de l'opération d'extraction afin de suivre plus précisément les n-alcanes, hydrocarbures nous intéressant plus spécialement.

Nous avons également tenu compte des résultats obtenus par Ehrhardt (1972) en travaillant sur l'accumulation des hydrocarbures par les huîtres dans la baie de Galveston. En effet, cet auteur a utilisé

une technique de séparation des diverses familles des hydrocarbures sensiblement identiques (identification des HC par chromatographie gazeuse, spectrographe de masse).

3. Résultats et discussion.

Les résultats des dosages d'hydrocarbures dans chaque fraction isolée sur la couche mince sont représentés sur les figures 4 à 8. L'identification des 4 fractions récupérées de la couche mince nous a donné les résultats suivants :

la première fraction comprend les hydrocarbures biogéniques et peu de n-alcanes ;

la seconde fraction est formée essentiellement des n-alcanes. On y récupère 99 % de n-C₃₄, étalon interne paraffinique (fig. 6) ;

la troisième fraction comprend les alcènes, les mono-aromatiques et les naphthènes ;

les aromatiques polycycliques constituent la quatrième fraction.

a) Importance d'accumulation des diverses fractions d'hydrocarbures par les moules.

En examinant les figures 4 et 9, on peut constater nettement l'augmentation générale des HCT pour tous les échantillons après séjour dans la zone étudiée. Cette augmentation est variable ; dans les stations 3, 4, 9 et 10, les teneurs en HCT obtenues représentent des augmentations entre 25 et 60 % de la teneur

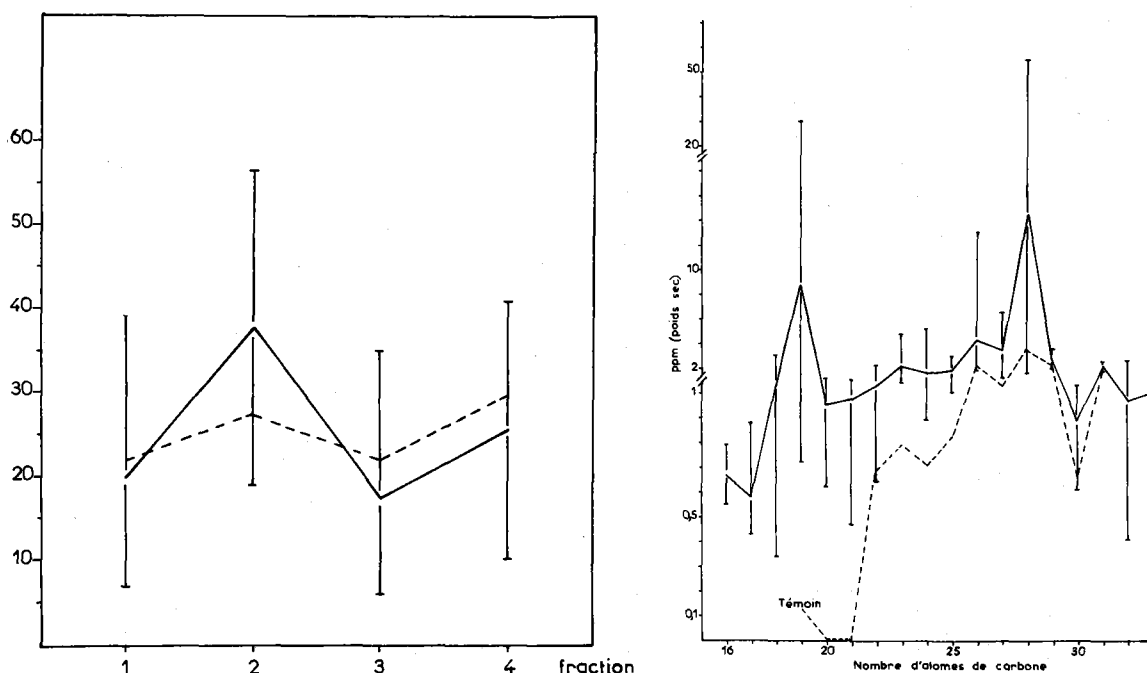


Fig. 9 et 10. — A gauche, variation des pourcentages des HC dans les 4 fractions isolées sur couche mince pour les moules avant (pointillé) et après l'immersion (trait plein). A droite, évolution de la concentration individuelle des n-alcanes.

initiale ; dans les autres stations, ces augmentations sont plus importantes et atteignent un maximum pour les stations 2 et 8 où elles représentent respectivement 600 et 500 % de la teneur initiale. La moyenne arithmétique de toutes les teneurs obtenues après immersion des moules est de 160 ppm. Cette moyenne montre que pour l'ensemble des moules, l'accumulation des hydrocarbures a été importante ; cette valeur représente 163 % d'accroissement de la teneur initiale (61 ppm).

Nous n'avons noté aucune corrélation entre les teneurs en lipides et les teneurs en HCT. Ceci confirme les résultats obtenus dans la première partie de ce travail. Les variations des teneurs en hydrocarbures dans les fractions 1, 3 et 4 sont à peu près du même ordre. Dans la majorité des moules, elles représentent entre 10 et 30 % de la teneur en HCT. L'augmentation relative des n-alcanes (fraction 2) est plus importante.

Dans 8 stations sur 10, on a enregistré une variation de la teneur supérieure à 30 % de la teneur en HCT. Dans les moules témoins, on peut noter que les quantités de HC dans les fractions 1 et 3 représentent 22 % des teneurs en HCT. Dans les fractions 3 et 4, les hydrocarbures représentent respectivement 27 et 30 % des HCT. Après immersion, la proportion relative des hydrocarbures biogènes (fraction 1) n'a pas varié sensiblement; elle a même diminué pour les fractions aromatiques (3 et 4). Par contre, pour les n-alcanes l'augmentation relative est importante (environ 10 %).

b) *Accumulation des n-alcanes.*

Plusieurs chercheurs se sont intéressés aux n-alcanes dans les organismes marins et plus spécialement aux alcanes à nombre de carbones impair qui sont prédominants. Par exemple, dans le phytoplancton, les C₁₅, C₁₇, C₁₉ et C₂₁ sont les plus abondants. Dans les algues *Sargassum sp.*, la prédominance est plus marquée dans l'intervalle C₂₁-C₂₅ (Blumer *et al.*, 1969; Farrington *et al.*, 1972). Whittle *et al.* (1975) ont montré que dans la chair des poissons, les n-alcanes C₂₅-C₃₁ sont prédominants. Par contre, les bactéries semblent contenir des alcanes avec prédominance ou égalité entre pairs et impairs. Les résultats du dosage des n-alcanes (fig. 9 et 10) permettent de tirer les conclusions suivantes :

avant immersion, on trouve dans les moules une série ininterrompue de n-alcanes entre C₁₉ et C₃₁; cette série se trouve augmentée en fin d'essai et l'on a alors une série entre C₁₆ et C₃₃;

individuellement, on note l'accroissement des teneurs pour toute la série. Mais, cette augmentation est particulièrement importante pour nC₁₉ et nC₂₈, à tel point que la somme de ces deux hydrocarbures représente 50 % du total des n-alcanes. Ces résultats nous ont fait penser à l'origine biogène de ces deux composés d'autant plus que l'alcane nC₂₈ est prédominant dans la majorité des échantillons.

Conclusion.

On peut retirer de cette expérience plusieurs informations :

d'abord, il existe dans cette partie de l'estuaire un fond de contamination chronique qui nivelle les résultats obtenus pour la plupart des échantillons;

deux points névralgiques ont été mis en évidence (2 et 8, fig. 1) situés à la sortie des chantiers de St-Nazaire et en aval de la raffinerie de Donges. Mais leur influence est très localisée et on ne la retrouve pas dans les stations adjacentes;

la proportion élevée de n-alcanes jointe au fait que ces constituants du pétrole se dégradent rapidement, nous incite à penser que la majeure partie des hydrocarbures présents dans l'estuaire sont issus de pollution récente et donc géographiquement proche.

Notons que cette expérience situe cette partie amont de l'estuaire de Loire à un niveau de contamination élevé (160 ppm) par rapport à la partie aval dont nous avons obtenu le résultat qui correspond à 48 ppm (résultats non publiés).

Enfin, si cette étude confirme l'aptitude des moules à accumuler les hydrocarbures en quantité appréciable, il semble toutefois qu'un équilibre entre cinétique d'accumulation et cinétique d'épuration fasse que même en zone de pollution chronique, on arrive rapidement à une limite dans les teneurs observées, limite très inférieure à ce qui a pu être mesuré dans certains cas de pollution accidentelle.

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.
- ANDERSON (J.W.), 1973. — Uptake and depuration of specific hydrocarbons from fuel oil by the bivalves *Rangia cuneata* and *Crassostrea virginica*. — In background papers prepared by the National

- Academy of Sciences. Ocean Affairs Board, Workshop on inputs, fates and effects of petroleum in the mar. Environ., Airlie, Virginia, 21-25 May: 609-708.
- AWAD (H.), 1977 (1979). — Études comparatives des méthodes d'analyses de la contamination pétrolière dans l'environnement marin. I. Étude fluorométrique. — *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.*, **41** (4): 375-388.
- BLUMER (M.), ROBERTSON (J.C.), GORDON (J.E.) et SASS (J.), 1969. — Phytol derived C₁₉ di- and triolefinic hydrocarbons in marine zooplankton and fishes. — *Biochem.*, **8**: 4067-4074.
- EHRHARDT (M.), 1972. — Petroleum hydrocarbons in oysters from Galveston Bay. — *Environ. Pollut.*, **3** (4): 257-271.
- FARRINGTON (J.W.), GIAM (C.S.), HARVEY (G.R.), PARKER (P.) et TEAL (J.), 1972. — Analytical techniques for selected organic compounds; marine pollution monitoring: strategy for a national program. — Goldberg édit. N.O.A.A., U.S. Dept. of commerce, Wash., D.C.: 152-176.
- HYLAND (J.L.) et SCHNEIDER (E.D.), 1976. — Petroleum hydrocarbons and their effects on marine organisms, populations, communities, and ecosystems. — AIBS: Proceedings of symposium on sources, effects and sinks of hydrocarbons in the aquatic environment, Wash., D.C.: 446-506.
- LEE (R.F.), 1976. — Monitoring of petroleum hydrocarbons. — *Manual of Methods in Aquatic Environment Research*, Part 2. Guidelines for the use of biological accumulation in marine pollution monitoring, Portmann (J.E.), édit., F.A.O., Fisheries Technical Paper n° 150: 38-47.
- 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.
- MICHEL (P.) et GRIZEL (H.), 1978. — « Amoco-Cadiz »: État actuel de la contamination des huîtres. — *Cons. Int. Explor. Mer, Com. Qual. Envir. mar. E.*, **49**: 10 p.
- National Academy of Science (N.A.S.), 1975. — Petroleum in marine environment. Workshop on inputs, fates and effects of petroleum in marine environment. May 21-25, 1973, Airlie House, Airlie, Virginia.
- NELSON-SMITH (A.) édit., 1972. — Oil pollution and marine ecology. — Plenum Press, N.Y.: 260 p.
- WHITTLE (J.K.), MACKIE (P.R.), HARDY (R.) et Mc INTYRE (A.D.), 1975. — The alkanes of marine organisms from the U.K. and surroundings waters. — Proceedings of I.C.E.S. Workshop on petroleum hydrocarbons in marine environment, Aberdeen, Sept. 9-12, : 72-78.
-