

This article was downloaded by:

On: 18 January 2011

Access details: *Access Details: Free Access*

Publisher *Taylor & Francis*

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



International Journal of Environmental Analytical Chemistry

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t713640455>

Evolution des Hydrocarbures et de l'Activité Bactérienne dans des Sédiments Marins Contaminés par un Déversement de Pétrole Brut et Traité

G. Bodennec^a; J. P. Desmarquest^b; B. Jensen^c; R. Kantin^d

^a Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer-Centre de Brest, Brest Cedex, France ^b

Institut Français du Pétrole, Rueil Malmaison, France ^c Department of Environmental Engineering,

Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark ^d Centre de Documentation, de Recherche et

d'Expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux, Brest Cedex, France

To cite this Article Bodennec, G. , Desmarquest, J. P. , Jensen, B. and Kantin, R.(1987) 'Evolution des Hydrocarbures et de l'Activité Bactérienne dans des Sédiments Marins Contaminés par un Déversement de Pétrole Brut et Traité', International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 29: 3, 153 — 178

To link to this Article: DOI: 10.1080/03067318708079834

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/03067318708079834>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.

Evolution des Hydrocarbures et de l'Activité Bactérienne dans des Sédiments Marins Contaminés par un Déversement de Pétrole Brut et Traité

G. BODENNEC

Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer—Centre de Brest, BP 337, 29273 Brest Cedex, France

J. P. DESMARQUEST

Institut Français du Pétrole, BP 311, 92506 Rueil Malmaison, France

B. JENSEN

Technical University of Denmark—Department of Environmental Engineering, DK 2800 Lyngby, Denmark

and

R. KANTIN

Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux, Cedre, BP 308, 29274 Brest Cedex, France

(Received June 6, 1986; in final form October 10, 1986)

The fate of an experimental oil pollution of intertidal sediments in a sheltered beach of North Brittany (France) has been investigated over a 16-month period. Chemical treatments were applied to two of the three contaminated plots by pre-mixing oil respectively with dispersant and biodegrading agents. The physico-chemical and bacteriological characteristics of the polluted areas were followed with the purpose of

identifying the limiting parameters for oil microbial degradation and the effect of treatments. The concentration of hydrocarbons in the oiled sediments did not change significantly during the experimental period. Spectrofluorimetric and chromatographic data showed that the main evolution of oil concerns the degradation of *n*-alkanes and the removal of light aromatics. Biodegradation of hydrocarbons occurred at a measurable rate only during the warm seasons (average temperature $18 \pm 2^\circ\text{C}$) causing after sixteen months the disappearance of more than 80% of the *n*-alkanes fraction independently of the pollution sediment level and the chemical treatment of the experimental plots. However the biodegradation of *n*-alkanes proceeded during the first months, at different rates, inversely depending on oil content in the collected samples.

The main limiting factor is dissolved oxygen according to the fact that spilled oil was located at 3–5 cm depth in a poorly oxygenated zone characterized by low redox potential. Nutrients were not a limiting factor probably due to domestic and agricultural inputs in this area. A marked bacterial growth was observed two weeks after the oil spill with a relative increase in hydrocarbon degrading bacteria with respect to total heterotrophs. Degradation rates, based on C^{14} *n*-hexadecane experiments, seem to follow the same way than specific bacterial counts (plate technique). Specific bacteria are always high at the end of our 16 months' field experimentation.

In the laboratory as well as in the field experiments, the same behaviour of untreated and chemically treated oil was observed in partially anaerobic sediment.

KEY WORDS: Biodegradation, oil pollution, field experiments, chemical and microbial studies, dispersant, biodegradation enhancement.

Dans le but de mieux cerner les facteurs limitant le processus de biodégradation du pétrole dans les sédiments marins, du pétrole brut (BAL 110) a été épandu avec et sans produits de traitement à 3 cm de profondeur dans le sable d'une plage abritée de Nord-Bretagne (France). Un suivi chimique et bactériologique a été effectué pendant 16 mois (de mai 1984 à septembre 1985) parallèlement à des expérimentations complémentaires en laboratoire.

Les résultats de l'expérimentation "in situ" ont mis en évidence que l'oxygène dissous et la température de l'eau interstitielle sont les principaux facteurs conditionnant la biodégradation des hydrocarbures de cette zone peu oxygénée. Par contre, les sels nutritifs azotés sont encore en quantités appréciables et influencent vraisemblablement peu la vitesse de biodégradation. Leur origine est probablement à relier avec des apports d'origine domestique ou agricole.

On observe, pour les parcelles contaminées, une adaptation progressive des bactéries à leur environnement pollué. Les fractions hydrocarbonées les plus légères disparaissent en quelques semaines. Quant aux fractions métabolisables, qui entrent pour environ 10% dans la composition du pétrole brut utilisé, elles sont biodégradées essentiellement pendant les deux saisons chaudes ayant suivi l'épandage du pétrole dans le sédiment; l'essentiel du pétrole restant donc, après 16 mois de suivi, incorporé dans les sédiments.

Les deux produits de traitement testés (un dispersant et un accélérateur de dégradation) ne provoquent pas d'augmentation significative du taux de biodégradation de la fraction métabolisable du pétrole constituée essentiellement par les *n*-alcanes. Ces similitudes de comportement entre le pétrole traité et le pétrole non traité ont également été vérifiées à partir des expérimentations de laboratoire: les teneurs en *n*-alcanes dans les bacs contaminés restent voisines, après un suivi de 80 jours. Par contre, en favorisant l'incorporation du pétrole dans le sable, le dispersant et l'agent biodégradant ralentissent légèrement le relargage et la dissolution des fractions pétrolières. Cette dissolution s'effectue en quelques semaines et se limite aux alcanes linéaires légers et aromatiques à 1 et 2 noyaux.

MOTS CLES: Biodégradation, pollution pétrolière, sédiment marin, suivi chimique et microbiologique, produits de traitement.

INTRODUCTION

Les pollutions pétrolières représentent une des principales sources de contamination organique du milieu marin. En général, une fraction importante du pétrole répandu est éliminée en mer par les processus physiques d'évaporation et de dispersion dans la colonne d'eau. Cependant, dans le cas d'un déversement à proximité des côtes, une proportion notable de pétrole brut ou traité en mer peut atteindre le littoral et s'incorporer au sédiment. Les hydrocarbures piégés en profondeur, dans la colonne sédimentaire, vont s'éliminer principalement par biodégradation, processus qui peut se révéler très lent et entraîner la persistance de la pollution pendant plusieurs années. Le potentiel d'auto-épuration du milieu marin dépend de nombreux facteurs tels que l'importance du déversement, la nature du pétrole, les caractéristiques géomorphologiques et sédimentaires du site, la présence d'une microflore adaptée à dégrader les hydrocarbures et les facteurs d'environnement, notamment la température et la teneur en nutriments et oxygène dissous. Une meilleure connaissance des paramètres régulant l'activité bactérienne permettrait d'agir sur les facteurs favorisant le biodégradation des hydrocarbures en milieu naturel. Les nombreuses études réalisées notamment après les récents accidents pétroliers: Amoco Cadiz,¹ Ixtoc,² Tanio³ ont montré que la vitesse de dégradation de la fraction métabolisable d'un pétrole dépendait fortement des caractéristiques physico-chimiques du biotope. Il apparaît donc nécessaire, pour être en mesure de choisir la technique de restauration la mieux adaptée à un site donné,

d'identifier les facteurs limitants de la dégradation pétrolière pour un certain nombre de sites représentatifs potentiellement vulnérables.

Pour mieux cerner l'influence des paramètres d'environnement, il est nécessaire d'opérer dans un écosystème contrôlé défini sur une portion de site suffisamment importante pour être représentative du milieu naturel. On sait que l'introduction massive d'une source de carbone dans le biotope marin conduit à une exaltation de l'activité microbienne impliquée spécifiquement dans la transformation des constituants carbonés. La limitation du processus d'auto-épuration est principalement attribuée à un déficit en oxygène, azote et phosphore dans le milieu.⁴⁻⁷ Ces considérations ont entraîné le développement de nombreux produits utilisés comme "engrais" pour accélérer la dégradation du pétrole. Ces produits sont essentiellement constitués de substance azotées et/ou phosphorées sous forme liposoluble pour éviter leur trop rapide dispersion dans l'eau de mer. Par ailleurs, l'action des micro-organismes nécessite un contact hydrocarbures/micro-organismes rendu possible par une mise en émulsion des produits pétroliers dans la phase aqueuse. La relation entre la taille des gouttelettes d'huile et le taux de croissance des bactéries a fait l'objet de nombreuses études théoriques et expérimentales.⁷⁻⁹ Une diminution de la tension interfaciale (pétrole/eau) favorise la pseudo-solubilisation des hydrocarbures au cours de la croissance des micro-organismes qui excrètent des biopolymères à propriétés émulsifiantes et surfactantes. Cette "mise en condition" préalable et nécessaire du pétrole avant tout processus de biodégradation a conduit au développement de nombreux agents tensioactifs et accélérateurs de dégradation, destinés à rendre le pétrole davantage disponible à l'attaque bactérienne. L'efficacité de ces produits, mis au point par les compagnies pétrolières, a été testée dans différentes zones marines y compris dans l'Océan Antarctique.^{10,11} Toutefois, l'utilisation des produits de traitement est controversée en raison des effets toxiques qu'ils induisent sur la faune et la flore marines.

Le but principal de cette étude est de mieux connaître les conditions de biodégradabilité "in situ" d'un pétrole brut léger (BAL 110) dans les sédiments marins, d'évaluer l'influence de deux produits de traitement—un dispersant et un accélérateur de dégradation—sur l'évolution à court et moyen terme du pétrole piégé dans les sédiments, et de connaître leurs effets sur la flore

bactérienne. L'étude a été réalisée à partir d'observations de terrain sur une période de 16 mois et d'expérimentations en laboratoire dans des conditions contrôlées.

MATERIEL ET METHODE

Expérimentation sur le terrain

L'expérimentation a été menée en zone intertidale, au milieu d'une vaste étendue de sable fin, dans l'anse de Kernic à Plouescat (Nord-Bretagne, France). Quatre parcelles de 3×3 m, espacées chacune de 5 m, (Figure 1), ont été délimitées par relevés topographiques dans la zone de balancement des marées. Elles seront respectivement désignées par les lettres T (parcelle témoin), B (parcelle contaminée uniquement par le pétrole BAL 110), BA (parcelle contaminée par du BAL 110 traité à l'accélérateur de dégradation), BD (parcelle contaminée par du BAL 110 traité au dispersant). Au niveau du site expérimental, la plage est constituée d'une couche d'une dizaine de centimètres de sable fin à moyen (médiane 0.28 mm avec $Q_{25}=0.22$ mm et $Q_{75}=0.40$ mm) sur un support de sable grossier. Le pétrole répandu est un "Brut Arabian Light" étêté par distillation sous vide à 110°C (densité 0.858, viscosité 60 cSt à 20°C). Les

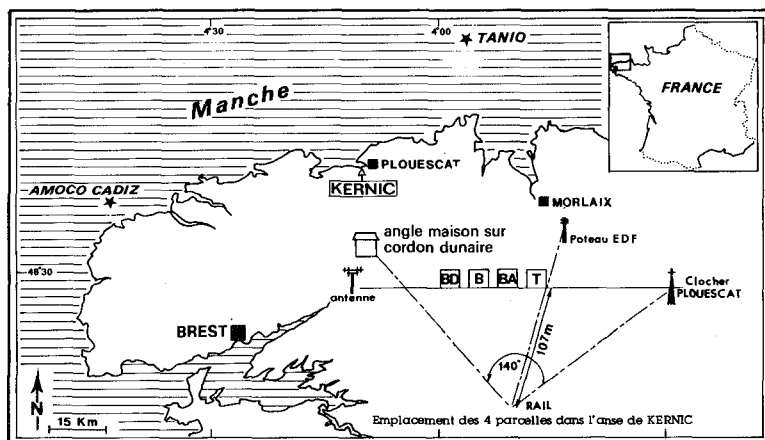


Figure 1 Localisation du site d'expérimentation et de l'implantation des parcelles.

produits de traitement sont pré-mélangés au pétrole à la concentration de 6%. Le dispersant est constitué par un mélange de tensio-actifs non-ioniques du type éthers de polyéthylène-glycols dans l'isopropanol. C'est un dispersant concentré dit de troisième génération. L'accélérateur de biodégradation (additif) est destiné à alimenter les micro-organismes en éléments nutritifs essentiels (C, N, P). Il est formé d'urée comme source d'azote directement assimilable par les bactéries, de N-alkyl propylène polyamines, de lauryl-éther phosphates et d'acide oléique. L'expérimentation a débuté au printemps (30 mai 1984). Après l'enlèvement de la couche superficielle du sédiment sur environ 3 cm et un hersage des parcelles, les produits ont été épandus par arrosage au taux de 290 g.m^{-2} sur la parcelle B (BAL 110), de 280 g.m^{-2} sur la parcelle BD (BAL + 6% de dispersant) et 420 g.m^{-2} sur la parcelle BA (BAL 110 + 6% d'accélérateur de biodégradation). Chaque parcelle a été ensuite ratissée pour faciliter l'incorporation des produits puis recouverte de sable avant le retour de la marée afin de minimiser l'entraînement physique des produits répandus. Au cours de l'expérimentation, des prélèvements simultanés d'eau interstitielle et de sédiment au niveau de la zone polluée ont été effectués entre mai 1984 et septembre 1985 pour suivre l'évolution des caractéristiques physico-chimiques et microbiologiques du milieu parallèlement à celle des hydrocarbures piégés dans les sédiments.

Expérimentations en laboratoire

Elles ont été réalisées sur une période de 80 jours dans quatre bacs en PVC de dimensions $30 \times 60 \times 40$ cm remplis sur une épaisseur de 8 cm de sable prélevé à proximité du site expérimental de Kernic. Les bacs sont alimentés en eau de mer au moyen d'une électrovanne munie d'un dispositif d'horlogerie réglé sur quatre remplissages et vidanges par jour pour simuler l'effet de la marée. Après percolation à travers le sable, l'eau est filtrée sur des copeaux de polyuréthane pour retenir les hydrocarbures avant son évacuation à l'égout.

Dans chaque bac, 225 g de pétrole brut (BAL 110) ou traité sont répartis de façon homogène dans le sable par malaxage sur 3 cm de profondeur. L'échantillonnage de sédiment est réalisé par carottage à l'aide d'un tube de verre incorporant toute la couche de sable.

Méthodologie analytique

Les paramètres: température, pH, Eh ont été mesurés avec une sonde Ponselle type PVRIT-CE. Le potentiel redox, défini par le couple Pt-Ag/AgCl est exprimé en mV par rapport à l'électrode normale à hydrogène (correction de 188 mV à 20°C). Les teneurs en éléments nutritifs (*N*, *P*) ont été déterminées par une chaîne automatique Technicon-Autoanalyseur II.

Les hydrocarbures totaux sont extraits à partir des sédiments humides par agitation mécanique (VIRTIS) en présence d'hexane (3 extractions successives). Ils sont dosés par spectrofluorimétrie UV (Turner 110) et caractérisés par chromatographie en phase gazeuse (appareil Carlo Erba 4160) après fractionnement de l'extrait par chromatographie liquide.² Les teneurs en hydrocarbures totaux sont exprimées en g.kg^{-1} (sédiment sec) par rapport à la courbe d'étalonnage du pétrole BAL 110 dans les conditions λ excitation 310 nm et λ émission 360 nm. Les spectres de fluorescence à défilement synchrone des longueurs d'onde d'excitation et d'émission ($\Delta\lambda = 25$ nm) sont enregistrés sur un appareil Perkin Elmer 3000 à la concentration de 10 mg.l^{-1} dans l'hexane.¹²

Le dénombrement de la microflore totale (MT) a été déterminé¹³ par la technique d'étalement sur milieu gélosé à partir de 1 ml de sédiment humide dilué dans 9 ml d'eau de mer stérile. Le domaine acceptable de comptage des colonies est compris entre 20 et 40 colonies par boîte de Pétri. Pour la microflore apte à dégrader les hydrocarbures (MS), la même technique de numération a été utilisée en remplaçant la source de carbone par du BAL 110. Les bactéries adaptées ont aussi été estimées par la technique du nombre le plus probable (NPP) décrite par Man.¹⁴ Une étude comparative des deux méthodologies, appliquée au site de Kernic,¹⁵ montre que la technique sur gélose conduit à des résultats numériquement plus élevés que la technique NPP. L'étude qualitative (sur les microflores totale et spécifique) a été effectuée selon la technique des galeries "API 20 B". Au total, 70 souches ont été identifiées et décrites par 27 caractères biochimiques. Ces résultats ont été traités en taxonomie numérique en utilisant le coefficient de similitude de Sokal et Michener¹⁶ et l'agrégation selon la variance. Pour chaque échantillon, l'indice de régularité fonctionnelle de Trousselier et Legendre¹⁷ a été calculé. Les mesures d'activité dans le sédiment ont été déter-

minées pour les trois parcelles polluées à partir de la vitesse de minéralisation du $C^{14}n$ -hexadécane sur compteur à scintillation (Betamatic, Kontron) selon la méthode de Humitake Seki.¹⁸

Les analyses chimiques et microbiologiques ont porté sur des échantillons d'eau interstitielle et de sédiment prélevés au niveau de la couche sédimentaire polluée. L'échantillonnage a été effectué toutes les semaines pendant le premier mois puis une à deux fois par mois par la suite sauf pendant la saison hivernale, correspondant aux périodes: t_7 , t_{13} , t_{21} , t_{28} , t_{44} , t_{58} , t_{83} , t_{147} , t_{281} , t_{398} , t_{484} (exprimées en jours après l'épandage).

RESULTATS ET DISCUSSION

Suivi des paramètres d'environnement

Les caractéristiques: température de l'eau interstitielle, teneur en nutriments, pH, potentiel redox ont été mesurées au cours de l'expérimentation (Tableau I). La *température* de l'eau au niveau de la zone polluée (profondeur 5 cm) est voisine de $18 \pm 3^\circ\text{C}$ pendant la période estivale et de $10 \pm 3^\circ\text{C}$ le reste de l'année. Les teneurs en *nitrates* dans l'eau interstitielle prélevée sur les trois parcelles polluées restent voisines de celles de la parcelle témoin sauf pendant la période estivale où des valeurs dix fois supérieures ($0.4 \pm 0.2 \text{ mg N/l}$) sont mesurées dans le témoin. Les teneurs en *azote total* sont comprises entre 1 et 7 mg N/l. Compte tenu des faibles teneurs en nitrates et nitrites notées au cours de l'expérimentation, les formes azotées majoritaires doivent correspondre à l'azote ammoniacal et aux produits organiques azotés vraisemblablement liés à des apports d'origine agricole et domestique sur le site expérimental. Les mesures effectuées¹⁹ sur le dernier prélèvement (16 mois après l'épandage) montrent que l'azote ammoniacal est majoritaire sur la parcelle témoin ($\text{N-NH}_4/\text{N-orga} = 1.42 \pm 0.1$) et minoritaire sur les trois parcelles polluées ($\text{N-NH}_4/\text{N-orga} = 0.11 \pm 0.2$). Ce déficit en azote ammoniacal sur les parcelles polluées peut être attribué à l'activité bactérienne. D'une façon générale, on observe un déficit de 10 à 20% en azote total sur les parcelles polluées par rapport au témoin. La teneur élevée à $t=7$ jours, notée sur la parcelle BA (4.46 mg N/l) pourrait être attribuée à l'accélérateur de biodégradation contenant de l'urée et un N-alkyl propylène polyamine

Tableau I Evolution des paramètres physico-chimiques au cours de l'expérimentation.

Date prélèvement	Temps (jours)	Température sable à-5 cm (°C)	Parcelle témoin		Parcelle B (pétrole)		Parcelle BA (pétrole + additif)		Parcelle BD (pétrole + dispersant)	
			NO ₃ (mg N/L)	N total (mg N/L)	NO ₃ (mg N/L)	N total (mg N/L)	NO ₃ (mg N/L)	N total (mg N/L)	NO ₃ (mg N/L)	N total (mg N/L)
06/06/84	7	16.5	<0.04	2.33	0.04	2.96	2.06	4.46	<0.04	4.46
12/06/84	13	16.5	<0.04	1.82	0.04	2.89	<0.04	2.50	<0.04	3.33
27/06/84	28	20	0.57	2.98	<0.04	0.89	<0.04	1.14	<0.04	1.51
13/07/84	44	17.8	—	—	0.07	1.24	0.06	1.67	<0.04	1.17
27/07/84	58	21.2	0.10	1.10	0.06	1.41	0.10	1.41	0.06	0.93
21/08/84	83	18.4	0.51	6.96	<0.04	2.81	<0.04	7.35	0.07	3.04
24/10/84	147	12.2	0.04	2.16	<0.04	4.02	<0.04	3.42	<0.04	5.02
07/03/85	281	8	0.02	2.19	0.07	1.69	0.07	1.76	<0.04	1.01
02/07/85	398	22	0.34	1.05	0.07	1.24	0.07	1.16	0.02	—
26/09/85	484	16.5	0.07	2.14	0.07	1.36	0.07	1.48	<0.07	2.03

(teneur en azote 14.8%). Quant aux *phosphates*, une expérimentation préliminaire réalisée en 1982 sur le même site avait montré que ce paramètre présentait peu de variations au cours d'un cycle annuel.²⁰ Le *pH* de l'eau interstitielle a une valeur moyenne de 7.8 ± 0.2 sans montrer de variations significatives au cours de l'expérimentation entre les parcelles polluées. Il ne constitue donc pas ici un paramètre influençant la biodégradation. Par contre, la teneur en *oxygène* dans les sédiments semble apparaître comme le facteur limitant principal de la biodégradation des hydrocarbures piégés dans les sédiments. En effet, même pendant la période où le sable n'est pas immergé, l'oxygène ne diffuse dans le sédiment de sable fin que sur une faible profondeur. Quelle que soit la parcelle considérée, le potentiel redox, à la profondeur de 5 cm, se situe autour de 240 ± 40 mV. Cette valeur relativement constante montre que le déficit en oxygène apparaît essentiellement lié à l'activité du biotope et non à la présence d'hydrocarbures.

Suivi de la décontamination pétrolière dans les sédiments

Hydrocarbures totaux Les teneurs en hydrocarbures totaux dans la couche sub-superficielle polluée font apparaître une forte hétérogénéité dans la répartition horizontale du pétrole pour une même parcelle. Le coefficient de variation moyen des mesures effectuées au cours du premier mois d'expérimentation est de 70% pour 27 prélèvements. Aussi, les teneurs moyennes en hydrocarbures totaux enregistrées sur chaque parcelle ne permettent-elles pas d'observer des variations significatives au cours de l'expérimentation (Tableau II). Cette hétérogénéité dans la répartition horizontale des hydrocarbures résulte plus vraisemblablement d'un phénomène de coalescence des gouttelettes d'huile se produisant à l'arrivée de l'eau dans les pores du sédiment que de la méthode d'épandage. Les hydrocarbures sont concentrés sur une couche d'épaisseur moyenne de 2 cm située vers 4 cm de profondeur. On n'observe pas de percolation de pétrole (teneur moyenne sur la parcelle B à 6–8 cm: 41 ± 27 ppm). Ce fait a été également vérifié pour les expérimentations en laboratoire dans les mêmes conditions qu'à Kernic (sable fin saturé en eau). Si on admet que le pétrole est concentré sur une épaisseur de 2 cm, la quantité appliquée correspond à une teneur initiale moyenne, exprimée en g/kg de sable sec, respectivement égale à 6.41 sur la

Tableau II Evolution des teneurs moyennes en hydrocarbures dans les sédiments.

Dates des prélèvements	Temps (jours)	Concentration en hydrocarbures totaux (g/kg de sable sec)			
		Parcelle témoin	Parcelle B (pétrole brut)	Parcelle BA (pétrole + accélérateur)	Parcelle BD (pétrole + dispersant)
6 juin 1984	7	0.0055	2.16	0.155	3.72
12 juin 1984	13	0.025	4.60	8.96	7.0
20 juin 1984	21	0.018	8.25	13.33	4.20
27 juin 1984	28	—	5.25	11.10	7.70
13 juillet 1984	44	0.008	9.40	7.45	7.80
27 juillet 1984	58	0.027	22.35	30.45	21.40
21 août 1984	83	0.023	7.93	17.86	13.60
24 octobre 1984	147	0.059	5.75	7.18	4.64
7 mars 1985	281	0.016	4.47	9.60	5.20
2 juillet 1985	398	0.010	5.27	15.80	4.22
26 septembre 1985	484	0.017	7.11	12.16	8.47

parcelle B (BAL), 9.32 sur la parcelle BA (BAL+accélérateur) et 6.20 sur la parcelle BD (BAL+dispersant). Après un mois d'expérimentation, les valeurs moyennes suivantes sont notées: 5.07 g/kg pour B, 8.38 g/kg pour BA et 5.66 g/kg pour BD ce qui correspond à un déficit voisin de 10% pour les deux parcelles polluées avec du pétrole traité et de 20% pour la parcelle B (BAL). La part de l'entraînement physique des hydrocarbures au cours du balancement des marées est appréciable même dans l'épuration des sédiments pollués en profondeur. La diminution de l'importance de ce processus en présence d'agents dispersants et dégradants pourrait être attribuée à une meilleure pénétration et rétention des hydrocarbures dans la colonne sédimentaire.

Hydrocarbures saturés Alors que les mesures globales ne montraient pas une décontamination significative des sédiments, l'analyse chromatographique révèle une modification profonde au cours du temps dans la composition chimique du pétrole. La Figure 2A représente l'évolution du profil chromatographique des hydrocarbures saturés et aromatiques au cours de l'expérimentation dans les sédiments de la parcelle BA. Par rapport aux chromatogrammes du pétrole initialement répandu, on observe la disparition progressive des constituants légers et la persistance de certaines familles d'hydrocarbures. Après une période d'un an, les modifications les plus importantes apparaissent dans la fraction saturée avec la prédominance des structures isoprenoïdes et cycliques sur les structures linéaires et l'apparition d'un massif de composés non résolus (UCM). Au terme du suivi (16 mois) émergent de ce massif principalement des isoprenoïdes particulièrement résistants tels que le pristane, le phytane et les homologues plus condensés. L'évolution des alcanes a été suivie sur les trois parcelles expérimentales à partir des rapports nC_{17}/Pr , nC_{18}/Ph , IP^{21} et du taux de dégradation du *n*-hexadécane par rapport au pristane²² pour évaluer l'importance de la biodégradation des structures linéaires par rapport aux structures isoprenoïdes beaucoup plus résistantes. Les résultats regroupés dans le Tableau III mettent en évidence une évolution parallèle des alcanes sur les trois parcelles expérimentales. Ainsi, pour la parcelle B (pétrole seul), on enregistre une décroissance des rapports nC_{17}/Pr et nC_{18}/Ph selon une courbe hyperbolique et une augmentation quasi-linéaire de l'indice de prédominance *IP* en fonction du temps,

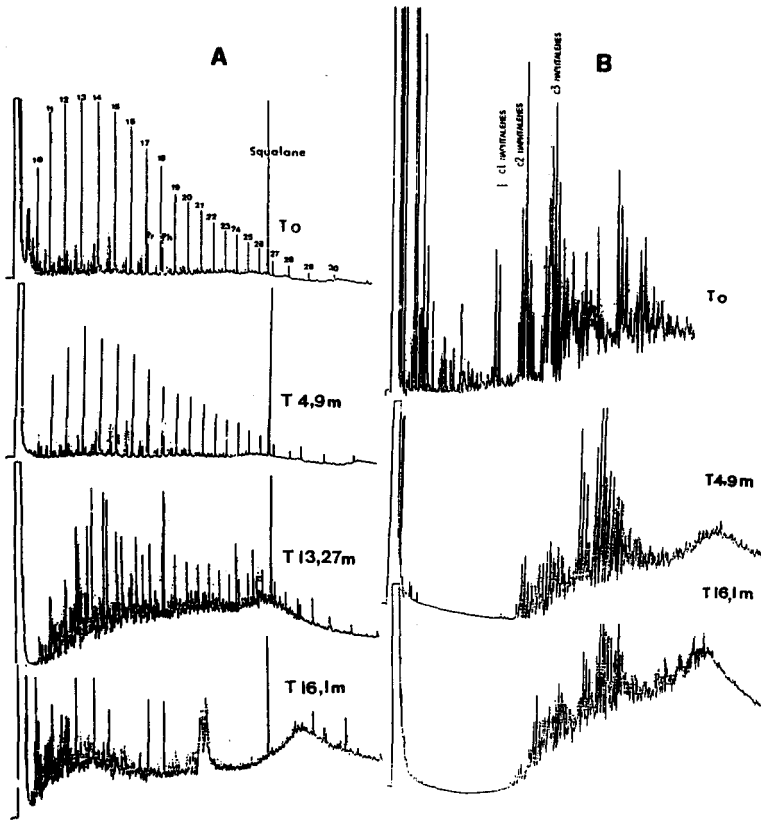


Figure 2 Evolution au cours de l'expérimentation des profils chromatographiques des hydrocarbures saturés (A) et aromatiques (B).

indiquant que les *n*-alcane à nombre pair d'atomes de carbone sont éliminés légèrement plus rapidement que ceux à nombre impair comme cela a été noté par ailleurs.⁶ Pendant la période hivernale (entre environ 5 et 10 mois après l'épandage), seules les parcelles traitées subissent une dégradation plus marquée que la parcelle non traitée (voisine de 7% en *n*-alcane). Dans les mois qui suivent, la dégradation des *n*-alcane se développe progressivement et de manière sensiblement parallèle sur les trois parcelles polluées. Cependant, il faut attendre l'été suivant pour observer la disparition

Tableau III Evolution des caractéristiques chromatographiques des alcanes pendant l'expérimentation.

Echantillon Temps (jours)	Parcelle B (pétrole)			Parcelle BA (pétrole + accélérateur)			Parcelle BD (pétrole + dispersant)						
	Contamination échantillon analysé (g/kg)	$\frac{NC17}{Pr}$	$\frac{NC18}{Ph}$ (%)	IP	Contamination échantillon analysé (g/kg)	$\frac{NC17}{Pr}$	$\frac{NC18}{Ph}$ (%)	IP	Contamination échantillon analysé (k/kg)	$\frac{NC17}{Pr}$	$\frac{NC18}{Ph}$ (%)	Bio (%)	IP
0		6.1	3.3										
7	2.16	6.0	3.2	1.60.93	0.35	6.1	3.5	0	1.77	6.1	3.1	0	0.93
28	3.60	5.4	3.2	11.50.94	7.90	5.7	3.1	6.50.95	5.50	4.3	2.9	29.50.93	29.50.93
44	5.90	4.1	3.1	32.80.93	2.50	5.0	2.9	18	6.40	4.3	2.9	29.50.93	29.50.93
83	11.20	3.9	2.9	36.10.94	17.80	4.6	2.5	24.60.94	13.60	4.3	3.3	29.51.09	29.51.09
147	5.75	4.2	2.3	31.11.16	7.18	4.7	2.5	22.90.94	4.64	4.3	2.3	29.50.94	29.50.94
281	2.10	3.7	1.5	39.31.06	3.50	3.0	1.7	52.80.96	5.20	3.1	1.9	49.20.90	49.20.90
398	5.27	0.56	0.2	91 nm	15.80	1.23	0.58	80	3.35	<0.1	<0.02	>98 nm	>98 nm
484	7.11	<0.2	<0.1	>97 nm	12.16	<0.1	<0.1	>98 nm	8.47	0.68	0.35	89	1.30

nm: non mesurable.

quasi-complète des alcanes linéaires en particulier nC_{17} et nC_{18} . Les alcanes isoprénoïdes tels que pristane et phytane deviennent progressivement majoritaires sur le chromatogramme en gardant une valeur Pr/Ph égale à 0.68 ± 0.10 . On note, en particulier, sur la parcelle B, que la teneur en alcanes linéaires (nC_{12} à nC_{29}) dans l'extrait organique diminue de 71.4 mg/g à 20.2 mg/g au cours de l'expérimentation soit une perte de 72%. Les mêmes constatations ont été observées sur les autres parcelles polluées. Toutefois, la disparition des alcanes linéaires apparaît plus marquée en présence de dispersant que d'agent de dégradation. La même observation a été effectuée à partir des expérimentations de laboratoire, dans les quatre bacs: après 80 jours, à 20°C, la teneur en n -alcanes (C_{12} à C_{29}) dans le sédiment est de 48.8 mg/g d'extrait organique pour le bac ayant reçu le pétrole non traité, de 48.1 mg/g dans le bac ayant reçu le pétrole en prémélange avec l'accélérateur de dégradation, et 31.6 mg/g pour le bac ayant reçu le pétrole en prémélange avec le dispersant. On retrouve donc, dans les bacs, l'effet plus marqué du traitement au dispersant et une similitude de comportement entre le pétrole traité à l'accélérateur de dégradation et le pétrole non traité.

On peut donc noter trois périodes distinctes dans l'évolution du processus de dégradation des n -alcanes, (i) une période de quelques semaines (période estivale) où le taux de dégradation sur les trois parcelles se stabilise autour de 30%, (ii) la dégradation est ensuite peu importante pendant une partie de l'automne, l'hiver et le printemps (température $< 15^\circ\text{C}$), (iii) l'été suivant, on constate en quelques semaines une reprise de la dégradation sur les trois parcelles expérimentales, les concentrations en n -alcanes devenant très faibles en fin d'expérimentation, au bout de 16 mois.

Hydrocarbures aromatiques La Figure 2B montre l'évolution des profils chromatographiques de la fraction aromatique contenue dans les échantillons prélevés sur la parcelle BA à $t=0$, $t=147$ jours (4.9 mois) et en fin d'expérimentation ($t=16$ mois). Par rapport au chromatogramme du produit initial, on note sur l'échantillon à $t=4.9$ mois la disparition des dérivés méthylés du benzène et du naphthalène (C1N, C2N) et l'apparition d'une enveloppe (UCM) de composés non résolus, vraisemblablement attribuable aux fractions oxydées. La fraction des hydrocarbures à 3 et 4 cycles (phénanthrène, fluoranthène...) semble peu affectée par les processus de

vieillessement du pétrole. En ce qui concerne les teneurs globales en hydrocarbures aromatiques isolés par chromatographie liquide sur colonne, on constate que le rapport des hydrocarbures saturés sur les hydrocarbures aromatiques augmente au cours de l'expérimentation (Tableau IV). Cette observation s'explique par une disparition plus rapide des hydrocarbures aromatiques, principalement par solubilisation des composés les plus légers, alors que la disparition des *n*-alcane qui ne représentent qu'une faible proportion (9%) du pétrole total s'effectue principalement par biodégradation, c'est-à-dire beaucoup plus lentement.

Des résultats complémentaires sont apportés par l'analyse par spectrofluorescence UV à défilement synchrone des longueurs d'onde d'excitation et d'émission qui permet de différencier les hydrocarbures aromatiques d'après le nombre de noyaux condensés. Le spectre obtenu montre une succession de pics avec des maxima à 280 nm (1 noyau), 310 nm (2 noyaux), 350–390 nm (3–4 noyaux) et 410–480 nm (5 noyaux). L'évolution sur 5 mois des spectres de fluorescence d'échantillons prélevés dans la parcelle B montre que la diminution de l'ensemble de la fraction aromatique affecte principalement les hydrocarbures à 2 noyaux. Elle peut être estimée par le rapport des intensités de fluorescence à 310 nm (2 noyaux) et à 360 nm (I310/I360). Ce rapport passe de la valeur initiale 0.84 à 0.23 pour $t = 16.1$ mois dans le cas de la parcelle B (Tableau IV) alors que le rapport aromatiques à 5 noyaux/aromatiques à 3–4 noyaux (I405/I360) est peu influencé par les processus de vieillissement (valeur moyenne 0.49 ± 0.1). La disparition des aromatiques à 2 noyaux doit être attribuée principalement ici au processus de solubilisation en raison de leur résistance à la biodégradation.⁶

SUIVI BACTERIOLOGIQUE

L'évolution des peuplements bactériens a été suivie sur les quatre parcelles expérimentales sur le plan qualitatif et quantitatif dans des échantillons d'eau interstitielle et de sédiments prélevés au niveau de la couche polluée. Un paramètre important pour interpréter ce suivi et corréler les résultats d'ordre microbiologique avec le taux de biodégradation du pétrole est le rapport MT/MS de la microflore totale (MT) sur la microflore spécifique (MS) apte à dégrader les

Tableau IV Evolution relative de la fraction aromatique des hydrocarbures.

Temps (jours)	Parcelle B (pétrole)		Parcelle BA (pétrole + additif)		Parcelle BD (pétrole + dispersant)	
	Hydrocarbures saturés ^a		Hydrocarbures saturés		Hydrocarbures saturés	
	I 310 ^b	I 360	I 310	I 360	I 310	I 360
0	1.17	0.84				
7	1.50	ND ^c	1.66	ND ^c	ND	ND
13	1.51	ND	1.62	ND	1.54	ND
21	1.62	ND	ND	ND	1.56	ND
28	1.64	0.37	1.68	0.47	1.67	0.42
44	2.07	ND	1.71	ND	1.77	ND
58	1.73	0.31	ND	0.61	1.57	0.35
83	1.67	ND	1.82	ND	1.89	ND
147	ND	0.33	1.94	0.30	1.85	0.46
484	2.52	0.23				

^aHydrocarbures saturés/hydrocarbures aromatiques: rapport des fractions hydrocarbures saturés et aromatiques déterminés par gravimétrie après séparation par chromatographie liquide sur colonne.

^bI 310/I 360: rapport des intensités de fluorescence à 310 nm et à 360 nm.

^cND: Non déterminé.

hydrocarbures. Ce rapport visualise l'évolution des deux microflores au cours de l'expérimentation. Une valeur élevée de ce rapport correspond à des peuplements peu adaptés à utiliser le pétrole comme source de carbone et d'énergie; par contre, une valeur proche de 1 caractérise l'existence d'une flore adaptée.

Etude quantitative

Pendant les deux premières semaines de l'expérimentation, les populations bactériennes totales et spécifiques du sédiment des trois parcelles contaminées décroissent par rapport au témoin, vraisemblablement par suite de la toxicité induite par les fortes teneurs en pétrole. A partir de la troisième semaine, le nombre de bactéries augmente dans les parcelles contaminées; une évolution similaire mais de moindre importance est observée dans la parcelle témoin, non polluée, ce qui conduit à penser qu'il s'agit, au moins en partie, d'un phénomène saisonnier, lié à l'activité du biotope. A la fin de la troisième semaine, on observe un "bloom" bactérien (bactéries totales et spécifiques). Dans les parcelles contaminées les quantités de bactéries hétérotrophes dépassent 20 millions d'unités (par gramme de sédiment sec) le 21^{ème} jour, alors que les quantités de départ étaient de l'ordre de 300 000 bactéries/g de sédiment. Dans la parcelle traitée à l'accélérateur de biodégradation, les concentrations bactériennes atteignent 50 millions de cellules/gramme de sédiment. Cette poussée de la microflore est plus intense dans les parcelles polluées que dans la parcelle témoin, avec cependant un léger décalage pour la parcelle traitée au dispersant puisque l'on observe le maximum de bactéries au 28^{ème} jour au lieu du 21^{ème} pour les parcelles témoin et BA. Dans l'eau interstitielle, la microflore totale fluctue entre 10^4 et 10^6 unités au cours des trois premiers prélèvements (t_0 , t_7 et t_{13}).

L'activité bactérienne reste importante pendant les trois mois d'été. Du 3^{ème} au 16^{ème} mois, les valeurs observées mettent en évidence des teneurs en microflores totale et spécifique relativement élevées, avec une légère diminution lors des mois d'automne et d'hiver, que ce soit dans le sédiment ou l'eau interstitielle. Les rapports MT/MS de la parcelle témoin sont, en général, supérieurs à ceux des autres parcelles en raison de l'absence d'hydrocarbures susceptibles de déclencher une poussée de bactéries adaptées. Le Tableau V rassemble les valeurs de ce rapport mesuré dans l'eau

Tableau V Evolution du rapport microflores totale/spécifique (MT/MS) dans les sédiments et l'eau interstitielle sur les parcelles expérimentales.

Date prélèvement	Temps (jours)	Témoin		B (BAL)		BA (BAL + accélérateur)		BD (BAL + dispersant)	
		Sédiment	Eau	Sédiment	Eau	Sédiment	Eau	Sédiment	Eau
30/05/84	0	24.3	30	24.3	30	24.3	30	24.3	30
06/06/84	7	62.5	17.8	9	5.9	4.7	3.6	92.3	342
12/06/84	13	28.8	65.7	13.3	75.5	5.5	40	52.7	227
20/06/84	21	1,256	—	68.7	—	146	—	479	—
27/06/84	28	5.5	5.5	3	520	95.4	32	7.8	3.6
13/07/84	44	6.8	16.7	0.9	1.88	2.2	1.1	2.7	1.04
27/07/84	58	1.9	5.8	0.07	0.08	1.3	0.6	0.8	0.3
21/08/84	83	5.4	2.6	0.13	4.3	1.1	2.2	0.13	18.1
24/10/84	147	1.2	9.1	5.25	2.5	1.1	2.1	5.86	0.28
07/03/85	281	1.7	2.1	2	0.2	1.7	2.1	2.36	0.94
02/07/85	398	1	0.4	0.06	0.85	1.6	0.5	0.01	0.52
26/09/85	484	34	1.5	0.3	0.38	0.7	0.16	0.80	0.16

interstitielle et les sédiments au cours de l'expérimentation. Dans la parcelle B (pétrole seul), le rapport MT/MS atteint des valeurs inférieures à 1 à partir du 21^{ème} jour aussi bien dans le sédiment que dans l'eau interstitielle. Dans le cas des parcelles BA et BD, on ne note pas de différences notables dans l'évolution du rapport MT/MS due à la présence d'accélérateur de biodégradable ou de dispersant à l'exception du premier mois où la présence de dispersant semble inhiber le développement de bactéries spécifiques. A partir de ce moment, les variations de ce rapport reflètent assez bien les variations saisonnières avec des valeurs plus fortes en hiver (sédiment et eau interstitielle).

Etude qualitative

Des analyses numériques ont été effectuées sur la parcelle T (pour la microflore totale), sur la parcelle BA (pour les microflores totale et spécifique) et sur une parcelle contaminée en 1982 (microflore totale). L'identification de souches de la parcelle témoin indique la présence d'une communauté bactérienne moyennement diversifiée (indice de régularité fonctionnelle de 0.40). Le dendrogramme réalisé à partir de la microflore totale isolée de la parcelle BA est caractéristique d'une flore moyennement diversifiée avec un indice de régularité fonctionnelle de 0.43 (8 des 15 souches sont regroupées au coefficient de similitude de 80%). Le milieu "microflore spécifique" permet la culture d'une flore nettement moins diversifiée (indice de régularité fonctionnelle de 0.23) avec 10 des 13 groupes bactériens rattachés au coefficient de similitude 93%. La parcelle BA voit donc sa microflore évoluer vers la composition bactérienne de la parcelle contaminée 2 ans plus tôt.

L'accélérateur de biodégradation utilisé n'a pas d'effet notable sur le développement des microflores spécifiques (Figure 3). Par contre, le dispersant provoque une légère inhibition du développement des bactéries spécifiques présentes dans le sédiment pendant la saison chaude qui a suivi l'épandage. Par la suite, cet effet inhibiteur disparaît puisque l'évolution de la microflore spécifique des parcelles BA (BAL + accélérateur) et BD (BAL + dispersant) est comparable, peut-être par suite de la perte des produits de traitement. Pour l'eau interstitielle, on a pu observer, principalement en début d'essai, des quantités légèrement plus importantes de bactéries totales et spéci-

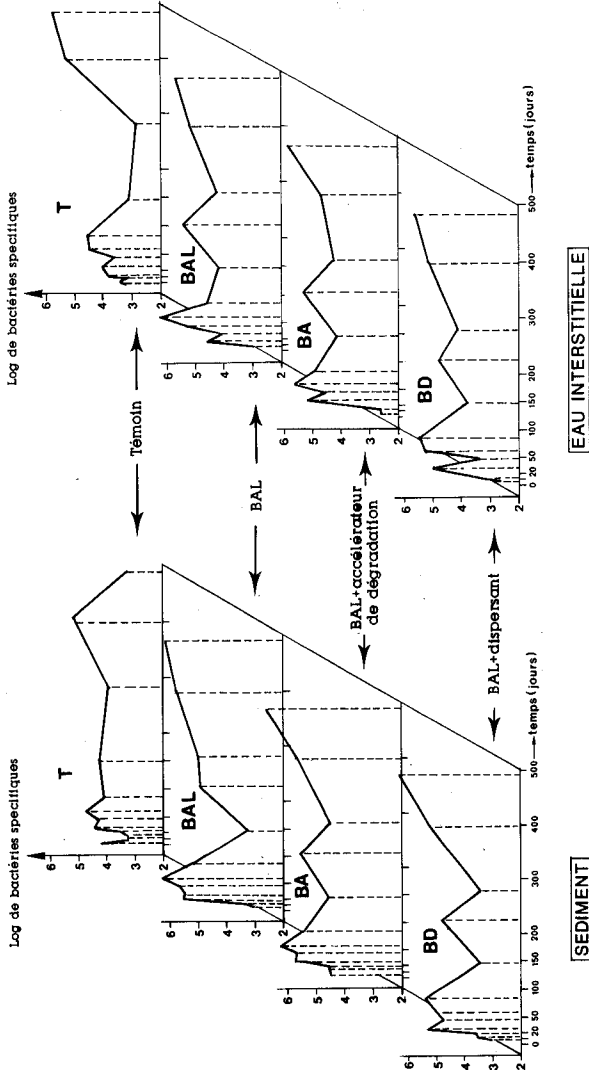


Figure 3 Suivi bactérien (bactéries "spécifiques") dans le sédiment et l'eau interstitielle.

fiques dans les parcelles traitées, les produits de traitement utilisés se trouvant vraisemblablement en plus grande abondance dans l'eau interstitielle (diffusion de leur fraction soluble). Ce phénomène ayant été observé aussi bien dans la parcelle traitée au dispersant que dans celle traitée à l'accélérateur de dégradation, il est possible que cette légère augmentation des bactéries dans l'eau interstitielle soit en partie due à la solubilisation des produits de traitement qui contiennent des composés plus faciles à dégrader que les hydrocarbures.

Vitesse de minéralisation

Les Figures 4, A et B, visualisent, d'une part, l'évolution du nombre de bactéries et l'évolution concomitante des quantités d'hydrocarbures dégradés dans les tests d'activité spécifique et, d'autre part, l'évolution des vitesses de dégradation de l'hexadécane par les bactéries prélevées sur les différentes parcelles pendant les trois premiers mois de l'expérimentation. Durant cette période, les taux de dégradation plafonnent aux alentours de 3 mg d'hexadécane/kg de sédiment/jour.

Les vitesses de minéralisation, calculées pour les trois parcelles soumises au pétrole, ont rapidement augmenté durant le premier mois, puis sont restées constantes pendant les deuxième et troisième mois de l'expérimentation, mois pendant lesquels ces mesures d'activité ont été effectuées (Tableau VI). On remarque, en outre, que la parcelle présentant les vitesses de minéralisation les plus élevées est celle qui a été traitée avec l'accélérateur de biodégradation: l'activité spécifique y est deux fois plus élevée que dans la parcelle polluée non traitée. Cependant, ces valeurs diminuent lors du deuxième et troisième mois de l'expérimentation. Quant à la parcelle traitée au dispersant, l'activité spécifique y est à peu près comparable à celle de la parcelle non traitée.

Il est donc difficile d'établir avec certitude un lien entre taux de dégradation et présence de bactéries adaptées. L'observation de la Figure 4A semble indiquer que la vitesse de dégradation augmente avec le nombre de bactéries adaptées. Il existe un facteur d'environ 10^2 dans le nombre de bactéries spécifiques entre les parcelles contenues et témoin (Figure 4B). Il faut cependant retenir, d'une part, que la vitesse de dégradation est exprimée en *n*-hexadécane, considéré comme représentatif de la fraction biodégradable, et,

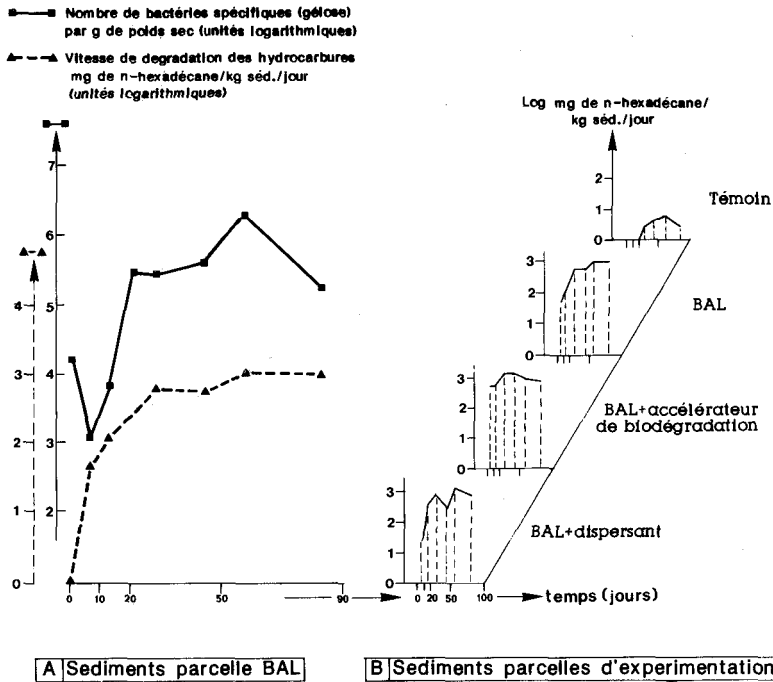


Figure 4A Evolution du nombre de bactéries et des quantités d'hydrocarbures dégradés.

Figure 4B Evolution des vitesses de dégradation des hydrocarbures (exprimées en *n*-hexadécane) dans les parcelles d'expérimentation.

Tableau VI Activité spécifique, en mg *n*-hexadécane/kg de sédiment/jour.

Jours après l'épandage	Activités spécifiques			
	Parcelle T	Parcelle B	Parcelle BA	Parcelle BD
0	0.19	0.19	0.19	0.19
7	0.33	46	493	31
13	0.62	122	570	349
21	—	—	—	—
28	2.67	616	1,284	869
44	4.1	551	1,276	306
58	6.29	1,005	825	1,322
83	2.78	956	689	730

d'autre part, que la numération des bactéries adaptées à biodégrader les hydrocarbures est sujette à une assez grande variabilité, due à des aspects d'échantillonnage et de méthodologie. Malgré tout, la microflore spécifique est toujours proportionnellement importante en fin d'expérimentation (16 mois après l'épandage de pétrole), alors que les taux de dégradation (fraction *n*-alcanes) avoisinent 90%.

CONCLUSION

Le suivi chimique et bactériologique de la dégradation d'un pétrole brut et traité incorporé dans le sable d'une plage abritée a permis de mettre en évidence ou de confirmer les points suivants:

- La dégradation des hydrocarbures dans un sédiment peu oxygéné est un phénomène lent, essentiellement conditionné par la température de l'eau interstitielle. Il a fallu attendre environ 16 mois pour observer la biodégradation complète des alcanes linéaires.
- L'adjonction de produit de traitement au pétrole brut (dispersant ou agent biodégradant) ne provoque pas une accélération de la dégradation du pétrole dans le sable: une grande partie de la source azotée est vraisemblablement perdue au cours des premières marées; toutefois, de légères différences sont constatées en début d'expérimentation, mais à son terme, au bout de 16 mois, ces différences disparaissent. Ces similitudes de comportement entre le pétrole traité et le pétrole non traité ont également été vérifiées à partir des expérimentations de laboratoire: les teneurs en *n*-alcanes dans les bacs contaminés sont voisines, 80 jours après l'épandage. Par contre, en favorisant l'incorporation du pétrole dans le sable, le dispersant et l'agent biodégradant ralentissent légèrement le relargage et la dissolution des fractions pétrolières. Cette dissolution s'effectue en quelques semaines et se limite aux alcanes linéaires légers et aromatiques à 1 ou 2 noyaux.
- Le traitement chimique du pétrole sur une plage de sable abritée ne favorise donc pas son élimination. En provoquant l'incorporation du pétrole dans le sable, l'addition de produit de traitement rendra plus difficile son élimination mécanique par des engins de récupération.

Remerciements

Nous exprimons toute notre reconnaissance à D. Prieur et Ph. Fera du Laboratoire de Zoologie de l'Université de Bretagne Occidentale à Brest pour leur active participation à la conception de l'étude et à l'interprétation des données bactériologiques. Une partie des analyses bactériologiques et chimiques a été réalisée au Laboratoire Municipal de Brest par C. Guichaoua et J. Dussauze qui ont également pris part à la discussion des résultats. Nos remerciements vont également à H. Goragner pour la mise au point de l'expérimentation en laboratoire.

Cette étude a pu être réalisée grâce à un support financier de la Mission des Etudes et de la Recherche du Ministère Français de l'Environnement, dans le cadre d'un contrat passé avec le CEDRE (Centre de Documentation, de Recherches et d'Expérimentations sur les Pollutions Accidentelles des Eaux).

References

1. P. D. Boehm and D. L. Fiest. In: Proceedings of the International Symposium on the *Amoco Cadiz*, fates and effects of the oil spill, Brest (France Nov. 19–22, 1979 ed. CNEXO Paris 1981, pp. 159–174.
2. R. M. Atlas, G. Roubal, A. Bronner and J. Haines. In: Proceedings of a Symposium on preliminary results from the September 1979, *Researcher/Pierce Ixtoc I Cruise*. Key Biscayne (USA) June 9–10, 1980 ed. NOAA 1980, pp. 411–435.
3. S. Berne and G. Bodennec, *Ambio* **13**, 109 (1984).
4. R. M. Atlas, *Microbiol. Rev.* **1**, 180 (1981).
5. E. Azoulay, M. Colin, J. Dubreuil, H. Dou, G. Mille and G. Giusti, *Mar. Environ. Res.* **9**, 19 (1983).
6. P. Fusey and J. Oudot, *Mar. Pollut. Bull.* **15**, 136 (1984).
7. G. Gassman and W. Gunkel. In: *Proceedings of the 1983 Oil Spill Conference* (American Petroleum Institute, Washington, D.C., 1983), pp. 479–483.
8. M. Demaison, J. P. Desmarquest, C. Piekarski and S. Piekarski, *Revue IFP*, **39**(5), 603 (1984).
9. J. Ducreux, F. Berthou and G. Bodennec, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **24**, 85 (1986).
10. B. Tramier and A. Sirvins. In: *Proceedings of the 1983 Oil Spill Conference* (American Petroleum Institute, Washington, D.C., 1983), pp. 115–119.
11. R. D. E. Bronchart, J. Cadron, A. Chaliier and A. A. Gillot. In: *Proceedings of the 1985 Oil Spill Conference* (American Petroleum Institute, Washington, DC., 1985), pp. 453–462.
12. S. C. Wakeham, *Environ. Sci. Technol.* **11**, 272 (1977).
13. G. Boucher, S. Chamroux and C. Riaux, *Mar. Environ. Res.* **12**, 1 (1984).
14. J. C. Man, *European J. Appl. Microbiol.* **1**, 67 (1975).
15. B. Jensen, G. Bodennec and J. P. Desmarquest. In: *Proceedings of the 20th European Marine Biology Symposium* (Hirtshals, Denmark, 1985), Sept. 9–13.
16. P. R. Sokal and C. D. Michener, *Univ. Kansas Sci. Bull.* **38**, 1409 (1958).

17. M. Trousselier and P. Legendre, *Microb. Ecol.* **7**, 283 (1981).
18. Humitake Seki, *Appl. Environ. Microbiol.* **31**, 439 (1976).
19. A. Aminot and R. Kerouel (communication personnelle). A. Aminot. Dosage de l'azote ammoniacal in "Manuel des Analyses Chimiques en Milieu Marin", ed. CNEXO, Paris, 1983, pp. 107-117.
20. J. P. Desmarquest, Caractérisation des paramètres limitant la biodégradation des hydrocarbures dans les sédiments. Rapport MECV-CEDRE no. R.84.896, avril 1984, p. 39.
21. L'indice de prédominance des alcanes linéaires à nombre impair de carbone sur ceux à nombre pair a été calculé par

$$IP = \frac{2(nC_{23} + nC_{25} + nC_{27} + nC_{29})}{nC_{22} + 2nC_{24} + 2nC_{26} + 2nC_{28} + nC_{30}}$$

22. Le taux de biodégradation des alcanes linéaires est défini par l'expression Bio (%) = $100[(nC_{17}/Pr)_i - (nC_{17}/Pr)_t] / (nC_{17}/Pr)_i$ calculée à partir des valeurs mesurées sur l'échantillon initial (*i*) et sur les prélèvements effectués au cours de l'expérimentation (*t*).
23. J. Croquette and C. Gatellier. In Proceedings of the International Symposium on the *Amoco Cadiz*, fates and effects of the oil spill (Brest, France, Nov. 19-22, 1979) ed. CNEXO Paris 1981, pp. 821-836.