



HAL
open science

Etude sur l'écotoxicologie des hydrocarbures aromatiques légers en milieu dulçaquicole

El-Madani Belkhadir

► **To cite this version:**

El-Madani Belkhadir. Etude sur l'écotoxicologie des hydrocarbures aromatiques légers en milieu dulçaquicole. Ecologie, Environnement. Université Paul Verlaine - Metz, 1979. Français. NNT : 1979METZ010S . tel-01775616

HAL Id: tel-01775616

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775616v1>

Submitted on 24 Apr 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

~~E/MZ~~
~~79/4~~
3e ex.

THÈSE

présentée à l'Université de METZ
en vue de l'obtention du

DOCTORAT D'ÉTAT ES-SCIENCES

par

El-Madani BELKHADIR

Maître de Conférences à l'Ecole Mohammadia
d'Ingénieurs - RABAT - Maroc

ÉTUDE SUR L'ÉCOTOXICOLOGIE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES LÉGERS EN MILIEU DULÇAQUICOLE

soutenue le 7 juin 1979 devant la commission d'examen

Examineurs de la Thèse :



MM. J.M. JOUANY
J.M. BLOCH
C. BOUDENE
A. EL MASLOUT
J.S. OLIVEIRA
J.C. PIHAN

Président

Examineurs

A ma femme et à mes enfants

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19790255
Cote	S/M ₃ 79/10
Loc	Maïasinh

Cette étude a été réalisée grâce à une bourse de l'Organisation Mondiale de la Santé, que ses responsables trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Je suis très reconnaissant à Monsieur le Professeur Dr. H. KETTANI Directeur de l'Ecole Mohammadia d'Ingénieurs RABAT pour m'avoir permis de m'absenter de mon travail la durée qu'a nécessitée l'accomplissement de cette étude.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur J. M. JOUANY, pour avoir bien voulu diriger ce travail, et de m'avoir fait bénéficier de ses précieux conseils.

Je remercie bien sincèrement la Direction de l'Institut Européen d'Ecologie et l'U. E. R. d'Ecologie de Metz pour m'avoir permis d'accomplir cette recherche dans leur établissement et laboratoires, me faisant ainsi bénéficier de leurs potentiels techniques et humains.

J'exprime ma vive reconnaissance à Monsieur le Professeur J. C. PIHAN, pour l'attention toute particulière et l'intérêt qu'il a portés à l'aboutissement de cette étude.

Qu'il me soit permis de remercier Messieurs les Professeurs J. M. BLOCH et C. BOUDENE d'avoir bien voulu examiner ce travail et de m'avoir fait part de leurs critiques constructives.

Je voudrais remercier Messieurs les Professeurs A. EL MASLOUT et J. S. OLIVEIRA de l'Ecole Mohammadia d'Ingénieurs, pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens à remercier sincèrement

Madame M. A. DOLLAR ; Mademoiselle D. NO et Monsieur M. RIBETTE, pour leurs collaborations techniques.

L'Institut de Recherches Hydrologiques de Nancy pour les dosages d'ATP.

Et la Raffinerie de Lorraine pour les échantillons d'essence qu'ils m'ont fournis.

Enfin j'adresse mes remerciements chaleureux à tous mes amis et collègues aussi bien ceux du Maroc que ceux de Metz pour la sympathie et les encouragements qu'ils m'ont témoignés.

Ce travail fait partie d'un contrat de recherche subventionné à 50% par la Commission Environnement de la Communauté Economique Européenne.

. Contrat n°212-77-1 ENVF comprenant :

- I. *Etude d'écosystèmes aquatiques d'eau douce*
- II. *Ecotoxicologie dont l'étude de l'action des hydrocarbures sur les constituants d'une chaîne alimentaire d'eau douce.*

Nous remercions Monsieur BOURDEAU et le Docteur LEX de la Direction Générale de la Commission pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu manifester à cette recherche.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I - IMPACT DES HYDROCARBURES SUR L'ENVIRONNEMENT	5
I. 1. <u>Généralités</u>	7
I. 1. 1. Définitions	7
I. 1. 2. Propriétés physiques des hydrocarbures	8
I. 1. 3. Composition chimique des pétroles et de certains produits dérivés	11
I. 1. 3. 1. Le pétrole brut	11
I. 1. 3. 2. Les produits pétroliers	12
I. 1. 3. 3. Variations de la composition des produits pétroliers	15
I. 1. 3. 4. Autres produits entrant dans la composition des dérivés pétroliers	17
I. 2. <u>Ecotoxicologie des Hydrocarbures</u>	19
I. 2. 1. Cheminement des hydrocarbures dans l'environnement	19
I. 2. 1. 1. Utilisation des hydrocarbures ; évaluation de la production et des rejets	19
I. 2. 1. 2. Répartition des rejets	20
I. 2. 1. 3. Autres sources de pollution par les hydrocarbures	27
I. 2. 1. 4. Pouvoir dispersif des hydrocarbures	29
I. 2. 2. Dégradation des produits pétroliers	34
I. 2. 2. 1. Dégradation abiotique	34
I. 2. 2. 2. Biodégradation des hydrocarbures	37

I. 2. 3. Impact des produits pétroliers sur l'environnement	40
I. 2. 3. 1. Notions générales	40
I. 2. 3. 2. Etude de la pollution des eaux par les hydrocarbures	42
I. 2. 3. 3. Action des hydrocarbures sur le sol	49
I. 2. 3. 4. La pollution de l'air par les produits pétroliers	52
I. 2. 3. 5. Ecotoxicologie des hydrocarbures aromatiques légers, cas du benzène et du toluène. Action sur les mammifères	53
I. 2. 4. Conclusion	63
 CHAPITRE II - MATERIELS ET METHODES	 68
II. 1. <u>Techniques analytiques</u>	68
II. 1. 1. Dosage des hydrocarbures	68
II. 1. 1. 1. Dosage des hydrocarbures dans les milieux de culture et d'élevage	70
II. 1. 1. 2. Dosage des hydrocarbures dans les milieux biologiques	72
II. 1. 2. Dosage des phénols	72
II. 1. 2. 1. Dosage des phénols totaux	73
II. 1. 2. 2. Caractérisation des phénols	73
II. 1. 3. Dosage des ions nitrites et nitrates	75
II. 1. 4. Dosage de l'azote organique	75
II. 2. <u>Matériel Biologique</u>	76
II. 2. 1. Les algues	77
II. 2. 1. 1. Mode de culture	78
II. 2. 1. 2. Paramètres permettant l'évaluation de la croissance algale	80
II. 2. 2. Les consommateurs primaires	86
II. 2. 2. 1. Conditions d'élevage	87
II. 2. 2. 2. Paramètres d'étude d'une population de daphnies	88

II. 2. 3. Les consommateurs secondaires	90
II. 2. 3. 1. Conditions d'élevage	90
II. 2. 3. 2. Paramètre d'étude	90
CHAPITRE III - EVOLUTION ABIOTIQUE DE LA CONCENTRATION DES HYDROCARBURES DANS L'EAU	91
III. 1. <u>Généralités</u>	91
III. 2. <u>Paramètres Influençant l'Evolution de la Concentration d'un Hydrocarbure dans l'Eau</u>	93
III. 3. <u>Evolution de la Concentration du benzène et du toluène dans l'eau en système ouvert</u>	94
III. 3. 1. Influence de la température et de la concentration initiale	94
III. 3. 2. Influence de la surface d'échange et du volume du milieu sur la vitesse d'évaporation des hydrocarbures	97
III. 3. 3. Influence de l'agitation sur l'évaporation du benzène	100
III. 3. 4. Effet de l'aération sur l'évaporation du benzène	102
III. 4. <u>Système Fermé</u>	103
III. 5. <u>Solubilité du benzène et du toluène dans l'eau</u>	105
III. 6. <u>Echange de polluants entre l'Air et l'Eau</u>	108
III. 7. <u>Conclusion</u>	110
CHAPITRE IV - ACTION DU BENZENE ET DU TOLUENE SUR LES CHLORELLES	112
IV. 1. <u>Action du Benzène et du Toluène sur les Chlorelles en Système Ouvert</u>	112
IV. 1. 1. Résultats	112
IV. 1. 2. Modélisation de l'action des hydrocarbures légers sur les chlorelles	115

IV. 2. <u>Influence du Benzène et du Toluène sur les Chlorelles cultivées en Système Fermé</u>	127
IV. 2. 1. Modification du milieu de culture	127
IV. 2. 2. Toxicité directe	128
IV. 2. 3. Influence du benzène sur le métabolisme de l'azote	130
IV. 2. 3. 1. Dosage des ions nitrates, nitrites et ammonium	130
IV. 2. 3. 2. Dosage de l'azote organique et des pigments chlorophylliens	132
IV. 2. 4. Recherche d'une corrélation entre biomasse et concentration de toxique	134
IV. 2. 5. Devenir du benzène et du toluène au contact des chlorelles	134
IV. 3. <u>Action des Homologues Supérieurs du Benzène sur les Chlorelles</u>	136
IV. 4. <u>Conclusion</u>	138
CHAPITRE V - EFFETS DU BENZENE ET DU TOLUENE SUR LES CONSOMMATEURS I	139
V. 1. <u>Test de Toxicité de Courte Durée du Benzène et du Toluène sur la Daphnie, sans Apport de Nourriture</u>	139
V. 1. 1. Système ouvert	139
V. 1. 2. Système fermé	140
V. 2. <u>Tests de Toxicité de Durée Relativement Longue du Benzène et du Toluène sur les Daphnies, avec Apport de Nourriture</u>	141
V. 2. 1. Test en système ouvert	141
V. 2. 2. Test en système fermé	143
V. 2. 2. 1. Aspect qualitatif de l'action du benzène et du toluène sur les daphnies	143
V. 2. 2. 2. Aspect quantitatif de la toxicité du benzène et du toluène sur les daphnies	144

V. 2. 2. 3. Effets chroniques d'une intoxication au benzène	152
V. 3. <u>Devenir des Hydrocarbures au Contact des Daphnies</u>	155
V. 4. <u>Conclusion</u>	158
CHAPITRE VI - EFFETS DU BENZENE ET DU TOLUENE SUR LES CONSOMMATEURS II	160
VI. 1. <u>Effets du Benzène et du Toluène sur l'Able</u>	160
VI. 1. 1. Système ouvert	160
VI. 1. 2. Système fermé	162
VI. 2. <u>Devenir du Benzène et du Toluène au Contact de l'Able</u>	166
VI. 2. 1. Concentration et élimination du benzène et du toluène par l'able	166
VI. 2. 1. 1. Imprégnation de l'able par les hydrocarbures	166
VI. 2. 1. 2. Elimination des hydrocarbures par le poisson	169
VI. 2. 1. 3. Conclusion	171
VI. 3. <u>Effets des Xylènes et de l'Ethylbenzène sur l'Able</u>	175
VI. 3. 1. Toxicité	175
VI. 3. 2. Imprégnation	175
VI. 3. 3. Elimination	176
VI. 3. 4. Conclusion	176
VI. 4. <u>Comparaison de la Sensibilité de l'Able à Celle d'un Poisson "de Référence" le Brachydiano rerio</u>	177
VI. 4. 1. Sensibilité	177
VI. 4. 2. Capacités de concentration et d'élimination	178
VI. 5. <u>Conclusion</u>	179

CHAPITRE VII - LES DECOMPOSEURS	180
VII. 1. <u>Recherche et Identification des Microroganismes Dégradant le Benzène et le Toluène dans les Milieux d'Elevage du Poisson et des Daphnies</u>	180
VII. 1. 1. Identification des bactéries	180
VII. 1. 2. Cinétique de dégradation du benzène et et du toluène par la souche M	184
VII. 2. <u>Toxicité des Métabolites</u>	189
VII. 2. 1. Le phénol	189
VII. 2. 1. 1. Effets du phénol sur les chlorelles	189
VII. 2. 1. 2. Effets du phénol sur les daphnies	189
VII. 2. 1. 3. Effets des phénols sur l'able	193
VII. 2. 2. Les nitrites	194
VII. 2. 2. 1. Effets des nitrites sur les algues	194
VII. 2. 2. 2. Effets sur les daphnies	194
VII. 3. <u>Conclusion</u>	194
CHAPITRE VIII - ASSOCIATIONS D'ESPECES OU DE TOXIQUES	196
VIII. 1. <u>Associaitons d'Espèces</u>	196
VIII. 1. 1. Associations trophiques	196
VIII. 1. 1. 1. Associations Chlorelles - Daphnies	197
VIII. 1. 1. 2. Associations Daphnies - Poissons	199
VIII. 1. 1. 3. Les autres associations	199
VIII. 1. 2. Associations symbiotiques	201
VIII. 1. 2. 1. Associations Bactéries - Algues	201
VIII. 1. 2. 2. Associations Bactéries - Daphnies	202
VIII. 2. <u>Associations de Toxiques</u>	204
VIII. 3. <u>Conclusion</u>	208
CONCLUSION	210
BIBLIOGRAPHIE	232

INTRODUCTION

La dégradation de l'environnement a pu atteindre selon les endroits et les moments un état critique : Vallée de la Meuse, 1930 ; Donora, 1948 ; Londres, 1952 ; Minamata, 1956 ; Seveso 1976, en sont des exemples tristement célèbres.

Des variations de plus en plus importantes dans la composition de la biosphère sont notées un peu partout dans le monde, ces variations ayant très souvent pour origine l'activité de l'homme :

. 300 substances nouvelles seraient créées et mises sur le marché mondial chaque année, un certain nombre d'entre elles étant susceptibles d'entrer dans l'atmosphère et en modifier la structure qualitative.

. Le souci de produire toujours davantage et plus vite modifie la cinétique des cycles biogéochimiques des éléments, d'où une variation de la composition quantitative de l'environnement.

La pollution que l'on peut définir comme une altération structurale de la biosphère, se manifeste, quelle que soit son origine, à plus ou moins long terme par une modification de la vie et de l'écologie du milieu récepteur. Cette dernière se traduit tantôt par une diminution ou au contraire un accroissement de la biomasse au niveau de chaque espèce animale ou végétale vivant dans le milieu pollué, tantôt par des modifications des rapports d'abondance-dominance des différentes espèces entre elles.

Le constat de cette dégradation de l'environnement et le souci de protection de la NATURE et de l'HOMME ont poussé les responsables de la Santé Publique des pays industrialisés à fixer des normes dont le

but est de minimiser les risques engendrés par l'utilisation des substances nouvelles (exemple : programme TOSCA aux ETATS - UNIS d'AMERIQUE et loi du 12 juillet 1977 en FRANCE).

Les toxicologues et hygiénistes semblent tous d'accord sur le principe de l'évaluation des risques encourus par la mise en circulation de substances nouvelles, afin de prendre des mesures de protection adéquates vis-à-vis de celles qui présentent un danger réel ou potentiel.

L'eau, considérée à juste titre comme source de vie et véhicule de nuisance, tient une part importante dans l'évaluation de ces risques par des tests de toxicité et de bioaccumulation sur des espèces de la faune et de la flore aquatiques.

Notons que bon nombre de ces tests ne sont pas normalisés et ceux qui le sont ne peuvent être appliqués aisément pour les substances présentant des singularités (volatiles ou insolubles).

Au cours de ce travail, nous avons fait une approche écotoxicologique des hydrocarbures légers. Cette étude est motivée par l'importance de la pollution par les produits pétroliers d'une part, et par le souci de normalisation d'essai de toxicité des substances volatiles d'autre part.

Certes, l'étude d'impact des produits pétroliers sur l'environnement a suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. On note environ 400 à 500 publications techniques par an sur ce thème. Si dans l'ensemble, ces travaux s'accordent sur le fait que ce sont les fractions légères et plus particulièrement les aromatiques monocycliques qui sont les plus toxiques, les résultats obtenus sont en général difficiles à comparer. Cela est dû au fait que le plus souvent les auteurs cherchent à montrer que telle fraction pétrolière est plus ou moins toxique que telle autre vis-à-vis d'une ou de plusieurs espèces d'organismes vivants, mais la diversité des produits

pétroliers, des organismes vivants et des protocoles adoptés pour les études de toxicité de ces produits, en est la cause. Par exemple, la multiplicité des modes opératoires conduit à des évolutions variées de la composition et de la concentration dans le milieu des produits utilisés, de sorte que la dose de toxique qui agit sur un organisme donné est souvent rapportée à des valeurs fictives ou présumées.

Au cours de nos essais, nous avons choisi d'étudier le devenir des aromatiques légers (benzène et toluène en particulier) au contact de trois espèces d'organismes vivants, aquatiques, susceptibles de constituer une chaîne alimentaire à trois niveaux.

- . Au premier niveau (producteur), une algue Chlorella vulgaris
- . Au deuxième niveau (consommateur I), un crustacé Daphnia magna
- . Au troisième niveau (consommateur II), un poisson Leucaspis delineatus

Après avoir cherché à dégager les paramètres essentiels qui influencent la toxicité de ces produits, nous avons établi un protocole expérimental où la concentration agissante du toxique sur les espèces manipulées est connue. Le mode expérimental étant fixé, l'étude de l'action des aromatiques monocycliques sur chaque espèce prise séparément, puis sur des espèces associées, a été entreprise.

Compte tenu du rôle des décomposeurs dans les biosphère, une souche bactérienne, cohabitant normalement avec le poisson utilisé, a été sélectionnée.

Un certain nombre de métabolites, du benzène et du toluène rencontrés dans quelques milieux expérimentaux, ont également été testés, ainsi que quelques associations d'hydrocarbures ou de leurs métabolites avec d'autres polluants comme les détergents, les métaux lourds, les oxydes d'azote et le chlore, pour leur toxicité vis à vis de chaque espèce

En conséquence, nous avons envisagé les thèmes suivants :

Analyse bibliographique des études d'impact du pétrole et ses dérivés sur l'environnement.

- . Matériels et méthodes employés pour réaliser cette étude.
- . Action et devenir des aromatiques légers au contact des espèces séparées puis des espèces associées.
- . Influence d'autres polluants sur la toxicité des hydrocarbures.
- . Propositions de méthode d'étude de la toxicité des produits volatiles.

CHAPITRE I

IMPACT DES HYDROCARBURES SUR L'ENVIRONNEMENT

L'impact sur l'environnement des hydrocarbures n'est qu'un cas particulier des perturbations que font subir à l'environnement les différentes activités humaines.

Les accidents spectaculaires comme ceux du Böhlen, du Torrey Canyon, de l'Amoco Cadiz et de Bravo, ou bien le simple fait qu'il n'y ait guère de plage ou de rivage qui ne soient souillés de résidus asphaltiques ont fait prendre conscience de l'acuité de ce problème.

Par ailleurs, les combustions sont maintenant généralisées à la surface de la terre et les hydrocarbures, source énergétique fondamentale sont donc présents partout. Cette classe de produits, représente peut être même, sous cet angle, un cas exceptionnel.

Le nombre de publications techniques sur le devenir des hydrocarbures dans l'environnement et leur effet sur les organismes vivants est très important. On compte un minimum de 400 à 500 articles spécialisés par an.

Dans ce chapitre, nous allons essayer de faire une synthèse succincte des travaux dont nous avons eu connaissance et considérerons les points suivants :

- . Les hydrocarbures et leurs propriétés physico-chimiques
- . Le pétrole et ses dérivés
- . Bilan matière des entrées-sorties et devenir des hydrocarbures dans l'environnement

- . **Impact des hydrocarbures sur l'environnement :**
 - action au niveau du sol
 - action en milieu aquatique
 - action sur l'atmosphère
- . **Conclusion sur l'étude bibliographique**

I. 1. GENERALITES

I. 1. 1. Définitions

Ethymologiquement, le mot hydrocarbure désigne tout composé résultant de la combinaison de carbone tétravalent et d'atomes d'hydrogène à la valence un, à l'exclusion de tout autre élément. Selon l'enchaînement des atomes de carbone dans ces combinaisons, les hydrocarbures peuvent se classer en plusieurs familles différentes.

I. 1. 1. 1. Les hydrocarbures aliphatiques saturés (synonymes : alcanes, paraffiniques)

Ce sont des combinaisons de formule générale $C_n H_{2n+2}$; ils proviennent presque exclusivement du pétrole. Les quatre premiers : le méthane, l'éthane, le propane, et le butane sont des gaz, les suivants, du pentane, à l'hexadécane sont des liquides, et au delà du C_{16} se sont des solides à la température ambiante. Ils sont le plus souvent utilisés sous forme de mélange avec d'autres hydrocarbures, insaturés et aromatiques.

I. 1. 1. 2. Les hydrocarbures aliphatiques insaturés (synonyme : oléfines)

Ce sont des combinaisons qui renferment une ou plusieurs liaisons multiples (double ou triple) entre un ou plusieurs couples d'atomes de carbone adjacents. La formule générale de ces composés est de la forme $C_n H_{2(n-p)}$, n et p sont deux nombres entiers tels que $n \geq 2$ et $0 \leq p < n$. On les retrouve rarement dans le pétrole brut, ils constituent l'essentiel des hydrocarbures d'origine biogénique ; ils sont des sous-produits obtenus lors des opérations de craking du pétrole, ils sont utilisés en pétrochimie pour la synthèse de résines et de polymères.

I. 1. 1. 3. Les hydrocarbures cycliques (ou naphténiques)

Ce sont des composés renfermant au moins un cycle carboné, saturé ou non, la formule générale est $C_n H_{2(n-p)}$. Les cycloparaffines peuvent constituer une part importante des pétroles bruts.

I. 1. 1. 4. Les hydrocarbures aromatiques

Ce sont des combinaisons, de formule générale $C_n H_{2(n-p)-6}$ qui renferment au moins un noyau benzénique. Ils constituent une part importante des pétroles bruts. Certains catalyseurs de "reforming" favorisent la formation des formes benzéniques connues pour leurs propriétés indétonantes dans les chambres à combustion des moteurs.

Les carburants pour voitures automobiles, essence et "super", contiennent jusqu'à 53 % d'aromatiques légers tels que, benzène, toluène et xylènes. D'autre part, les deux premiers de la série des aromatiques : le benzène et le toluène, sont à la base de nombreuses applications industrielles.

I. 1. 2. Propriétés physiques des hydrocarbures

En général, dans chaque classe d'hydrocarbures, les propriétés physico-chimiques évoluent de manière uniforme avec la masse molaire ainsi par exemple :

- . La température d'ébullition augmente avec la masse molaire pour les composés de la série des n-alcane.
- . La tension de vapeur, par contre, diminue le long de la même série.
- . En général, la solubilité dans l'eau des composés de la même famille diminue quand la masse molaire augmente.

Sur le tableau n° I, nous avons rassemblé quelques-unes des propriétés physiques des principaux hydrocarbures légers. On note que, la solubilité dans l'eau pour les hydrocarbures ayant le même nombre de carbone, par exemple C_6 , augmente dans le sens : paraffine < isoparaffine < oléfine = cycloparaffine < cyclo-oléfine < cyclooléfine < aromatique.

Hydrocarbure	Formule chimique	Température d'ébullition (°C)	Tension de vapeur à 20°C (mm Hg)	Densité 20/4	Solubilité dans l'eau (mg / l)
<u>Paraffines</u>					
pentane	C ₅ H ₁₂	36	450	0.626	38.5
méthyl-2 butane	C ₅ H ₁₂	28	600	0.620	47.8
diméthyl-2, 2 propane	C ₅ H ₁₂	9.5	gaz	0.590	33.2
hexane	C ₆ H ₁₄	69	126	0.659	9.5
diméthyl-2, 3 butane	C ₆ H ₁₄	50	275	0.649	18.4
heptane	C ₇ H ₁₆	98.5	36.4	0.684	2.93
octane	C ₈ H ₁₈	125.6	10.5	0.703	0.66
triméthyl-2, 2, 4 pentane	C ₈ H ₁₈	99.2	40	0.692	2.44
dodécane	C ₁₂ H ₂₆	216.3	1	0.749	0.0037
tétradécane	C ₁₄ H ₃₀	253.5	1	0.763	0.0022
<u>Oléfines</u>					
pentène 1	C ₅ H ₁₀	30.1	550	0.641	148
hexène 1	C ₆ H ₁₂	63.7	145	0.673	50
octène 1	C ₈ H ₁₆	121.6	15	0.715	2.7
<u>Cycloparaffines</u>					
cyclopentane	C ₅ H ₁₀	49.2	260	0.715	156
méthylcyclopentane	C ₆ H ₁₂	71.8	110	0.749	42
cyclohexane	C ₆ H ₁₂	80.8	80	0.779	55
<u>Cyclo-oléfines</u>					
cyclohexène	C ₆ H ₁₀	83.3		0.810	213
cyclohexadiène	C ₆ H ₈				700
<u>Aromatiques</u>					
benzène	C ₆ H ₆	80.1	78	0.880	1780
toluène	C ₇ H ₈	110.6	22.4	0.867	515
o-xylène	C ₈ H ₁₀	144.5	5	0.880	175

Tableau n° I . Principales propriétés de quelques représentants des grandes familles d'hydrocarbures (PERRY R. H., 1973 ; WHUITIER P., 1972 ; Mc AULIFFE C. D., 1966 ; SUTTON C. et CALDER J. A., 1974)

1. 1. 3. Composition chimique des pétroles et de certains produits dérivés

1. 1. 3. 1. Le pétrole brut

C'est un mélange complexe, constitué en général essentiellement d'hydrocarbures pour 80 à 90 % mais certains bruts n'en contiennent que 50 %, le reste étant constitué par des composés organiques du soufre, de l'oxygène et de l'azote. Le pétrole brut peut contenir en outre certaines combinaisons organo-métalliques du vanadium, du nickel, ... (WUITHIER P. 1972).

Les bruts sont classés généralement selon leur composition relative en chaque classe d'hydrocarbures (SAURAT A. H. 1976) :

- . Paraffiniques : prédominance des alcanes, c'est le cas des bruts en provenance de PENNSYLVANIE et de LIBYE.

- . Naphténiques : la plus grande fraction est constituée par des hydrocarbures cycliques, c'est le cas du pétrole en provenance du VENEZUELA.

- . Aromatiques : ils contiennent une quantité importante de composés aromatiques, tels que les bruts de BORNEO.

- . Sulfureux : dans lesquels, on rencontre des sulfures d'hydrogène et des mercaptans (pétrole du MOYEN-ORIENT).

Le tableau n° II, donne à titre d'exemple, les compositions de deux bruts d'origines différentes d'après KORTE F. et BOEDEFELD E. (1978).

		Brut du Koweït	Brut de Louisiane
Paraffines	%	34	56.3
Naphtènes	%	22.7	18.6
Aromatiques	%	21.9	16.5
Substances polaires	%	17.9	8.4
Composés non hydrosolubles	%	3.5	0.2
TOTAL		100	100
Densité		0.8686	0.8524
Soufre	% en poids	2.44	0.25
Azote	% en poids	0.14	0.069
Nickel	en ppm	7.7	2.2
Vanadium	en ppm	28	1.9

Tableau n° II : Composition de deux pétroles bruts de provenance différente

I. 1. 3. 2. Les produits pétroliers

La composition exacte d'un produit pétrolier est souvent mal déterminée et dépend, de plus, de l'origine du brut et du traitement qu'il a subi ; on trouve ainsi, rarement, deux produits identiques.

L'ensemble des spécifications relatives à un produit ne le caractérise que d'une manière imprécise. Sur les tableaux n° III et III bis, nous avons porté les spécifications officielles des essences automobiles et des fuel-oils pour la FRANCE (SAURAT A. H. , 1976).

Il est donc commun de trouver des produits destinés aux mêmes usages donc obéissant aux mêmes spécifications, mais qui diffèrent par leur composition. Sur le tableau n° IV, nous avons reporté les compositions de trois essences spéciales obéissant aux mêmes normes, mais d'origines différentes.

Caractéristique	Essence Ordinaire	Supercarburant
<u>couleur</u>	jaune pâle	coloration telle qu'il puisse être à première vue différencié de l'essence et du carburant pour aéronefs
<u>masse volumique à 15°C</u>	0. 765 kg/l maximum	0. 770 kg/l maximum
<u>distillation à 70°C</u>	10 % minimum	10 % minimum
à 140°C	50 % minimum	50 % minimum
à 195°C	95 % minimum	95 % minimum
écart entre les points 5% et 90% point final	supérieur à 60°C 205°C maximum	supérieur à 60°C 205°C maximum
<u>pression de vapeur à 37. 8°C</u>	0. 8 bar max. du 1-X au 31-III 0. 65 bar max. du 1-IV au 30-IX	0. 8 bar max. du 1-X au 31-III 0. 65 bar max. du 1-IV au 30-IX
<u>teneur en soufre</u>	0. 17 % en masse	0. 17 % en masse
<u>teneur en gommes</u>	8mg/100 ml maximum	10 mg/100 ml maximum
<u>indice d'octane aux pompes de distribution</u>	89 min. ; 92 max.	97 min. ; 99 max.
<u>teneur en plomb</u>	la quantité de plomb métal doit être inférieure ou égale à 0. 64 g/l	
<u>additifs</u>	le carburant ne peut être additionné de faibles quantités de produits destinés à améliorer la qualité qu'avec l'agrément du Ministère de l'Industrie (Direction des carburants).	

Tableau n°III : Spécifications officielles des essences automobiles en FRANCE .

Caractéristiques	Fuel-oil domestique	Fuel-oil léger	Fuel-oils lourds	
			n°1	n°2
couleur	rouge	noire		
viscosité maxi. à 20°C, cSt	9.5			
viscosité à 50°C, cSt		6 à 15	15 à 110	110 à 380
teneur en Soufre (% masse max.)	0.7	2	2	4
% distillé à 250°C inférieur à	65	65	65	65
% distillé à 350°C inférieur à	85	85	85	85
point d'éclair (°C min.)	55	70	70	70
teneur en eau (% masse max.)	0.1	0.15	0.75	1.5
teneur en sédiments (% masse max.)		0.15	0.25	0.25
point d'écoulement (°C max.)	6 (hiver) 3 (été)	0		

Tableau n° III bis Spécifications officielles des fuel-oils en FRANCE

Groupe de composés	Koweit	Nigeria	Qatar
n - paraffines	36.3	15.7	40.3
isoparaffines	38.2	39.8	35.0
naphènes	20.3	39.5	18.2
aromatiques	5.2	5	6.5
Total	100	100	100

Tableau n° IV : Composition de trois essences spéciales (40-120°C issues de 3 bruts différents.

I. 1. 3. 3. Variations de la composition des produits pétroliers

La composition d'un produit pétrolier peut varier au cours du temps si les conditions de stockage ou d'utilisation le permettent. En général, il y a évaporation des fractions légères et oxydation des fractions insaturées.

Sur le tableau n° V, nous avons porté les compositions des hydrocarbures :

- . contenus dans une essence pour voiture automobile,
- . dans la phase vapeur en équilibre avec cette essence,
- . et dans les gaz d'échappement d'une voiture utilisant cette essence.

Composé	Gaz d'échappement	Essence	Vapeur d'essence
éthane	0.6	-	0.1
éthylène	7.6	-	-
acétylène	5.4	-	-
propane	-	0.1	1.8
propylène	3.4	-	-
méthylacétylène	0.8	-	-
isobutane	0.9	0.5	6.6
butane	2.7	2.2	19.8
butènes	3.7	0.4	1.8
isopentane	5.8	8.0	29.0
pentane	3.0	4.2	10.6
pentènes	2.0	2.5	6.2
méthylpentanes	4.7	8.9	8.9
hexane	1.7	3.8	2.5
méthyl-cyclopentane	1.8	3.6	2.1
benzène	3.0	2.4	1.1
diméthyl-2, 3 pentane	1.7	3.3	1.2
méthyl-3 hexane	1.1	2.4	0.8
triméthyl-2, 2, 4, pentane	2.0	3.5	1.1
hèptane	1.2	2.5	0.6
méthyl-cyclohexane	0.7	1.1	0.2
diméthyl hexanes	0.7	1.7	0.3
toluène	8.8	9.7	2.1
iso-octane	1.2	3.6	0.5
octane	1.6	1.3	0.5
m & p-xylènes	9.1	9.9	1.2
o-xylene	3.4	3.6	0.4
nonane	0.7	0.6	-
tetraméthyl-2, 2, 3, 3 hexane	-	-	-
propylbenzène	0.4	0.3	-
éthyltoluène	6.6	6.5	0.5
triméthylbenzènes	6.0	5.2	0.4
diméthyl-éthylbenzène	0.7	2.7	0.1
butylbenzène	2.1	1.7	-
Composés à plus de 10 atomes de carbone/molécule	2.2	2.2	-

Tableau n° V : Composition des hydrocarbures contenus dans une essence automobile, dans sa vapeur fraîche, et dans les gaz d'échappement d'un moteur utilisant cette essence (d'après MAYRSOHN H. et coll. 1975)

La variation de la composition des hydrocarbures au cours de leurs utilisations a été signalée par de nombreux auteurs. KORTE F. et BOEDEFELD E. (1978) signalent que la concentration des huiles de lubrification, de coupe ou de trempe en composés aromatiques polycycliques passe de 0.6 ppm dans l'huile fraîche à plus de 20 ppm après usage.

DAYHOFF M. O. (1971) a démontré qu'il est thermodynamiquement possible dans certaines conditions de combustion de favoriser la synthèse de composés aromatiques polycycliques à partir de n'importe quel autre hydrocarbure.

Dans le cas de déversement de produits pétroliers dans la nature, les modifications de leurs compositions par évaporation des fractions légères, sont très importantes, les pertes par évaporation au cours de 4 jours qui suivent le déversement peuvent correspondre à une distillation du produit à 350°C.

II. 3. 4. Autres produits entrant dans la composition des dérivés pétroliers.

Une part importante des produits pétroliers (95 %) est utilisée sous forme de mélange d'hydrocarbures ; parfois et selon l'usage des additifs très divers sont incorporés dans ces mélanges afin d'améliorer la qualité du produit. Le tableau n° VI, rassemble les additifs usuels de l'essence automobile.

Fonction de l'additif	l'additif	concentration
Anti-explosion	Plomb tetra-éthyle ou tetra-méthyle	0.5 g/l
Anti-givre	Isopropanol Dipropène glycol Amines d'esters phosphorique	1 à 3 % 0.1 % 0.01 %
Anti-oxydants	Phénols, phénylène diamine	10 à 100 ppm
Inhibiteurs de corrosion	Amines et amides d'acides gras	10 à 20 ppm
Colorants	Composés azo-	0.5 à 3 ppm
Pièges à plomb	Dibromure d'éthyle	0.23 g/l

Tableau n° VI : Additifs usuels des carburants pour voitures automobiles (d'après KORTE F. et coll. 1978).

I. 2. ECOTOXICOLOGIE DES HYDROCARBURES

I. 2. 1. Cheminement des hydrocarbures dans l'environnement

Dans ce paragraphe, nous tenterons de faire un "bilan matière" tenant compte des entrées et sorties du pétrole dans l'écosystème.

I. 2. 1. 1. Utilisation des hydrocarbures ; évaluation de la production et des rejets

Malgré la crise énergétique et malgré son coût de plus en plus élevé, le pétrole constitue aujourd'hui encore la principale source d'énergie exploitée par l'homme, et les besoins énergétiques mondiaux sont couverts à 60 % par les produits pétroliers. Ainsi la consommation de pétrole progresse chaque année de 5 à 6 %.

En 1974, la consommation mondiale de pétrole était de 2862 millions de tonnes, KORTE F. et BOEDEFELD E. (1978). La majeure partie de cette quantité (88.4 %) a été utilisée comme source source d'énergie soit directement pour le chauffage, soit après transformation en énergies mécaniques ou électriques.

9.2 % de la production mondiale de 1974 ont été ou transformés par l'industrie chimique, ou immobilisés dans les équipements industriels (graisses de lubrification fixées sur des machines) ou de génie civil (bitumes dans le revêtement des routes). Le reste, 2.4 % de la production mondiale de pétrole de 1974, soit 69 millions de tonnes, constituent les rejets dans l'environnement. Notons que cette quantité rejetée dans l'environnement représente plus de 1.5 fois la consommation annuelle de l'ensemble des pays du continent Africain.

Le schéma de la figure n° 1 représente le cheminement du pétrole brut depuis la production jusqu'à l'utilisation. Les rejets au niveau de chaque étape de l'exploitation du pétrole ou de ses dérivés, sont également représentés sur cette figure.

1. 2. 1. 2. Répartition des rejets

1. 2. 1. 2. 1. Pertes au niveau de la production et du transport

La répartition géographique des gisements de pétrole est très différente de la répartition géographique de la consommation des produits pétroliers. Le pétrole brut est parfois transporté à des milliers de kilomètres du gisement pour des opérations de raffinage.; ainsi la provenance du pétrole brut traité en FRANCE pour l'année 1976 se répartit comme suit (tableau n° VII) :

Provenance	Quantité 1000 tonnes
Europe	3 600
Moyen Orient	96 900
Vénézuela	800
Afrique	18 400
U. R. S. S.	1 800
Indonésie	100
TOTAL	121 600

Tableau n° VII : Source d'approvisionnement de la FRANCE en pétrole (1976)

Production et Transports du Brut (1.2) Raffinage et Distributions des Produits Finis (16.4) Usage de Produits Destinés à la Combustion (5.3) Autres Usages (26) (19)

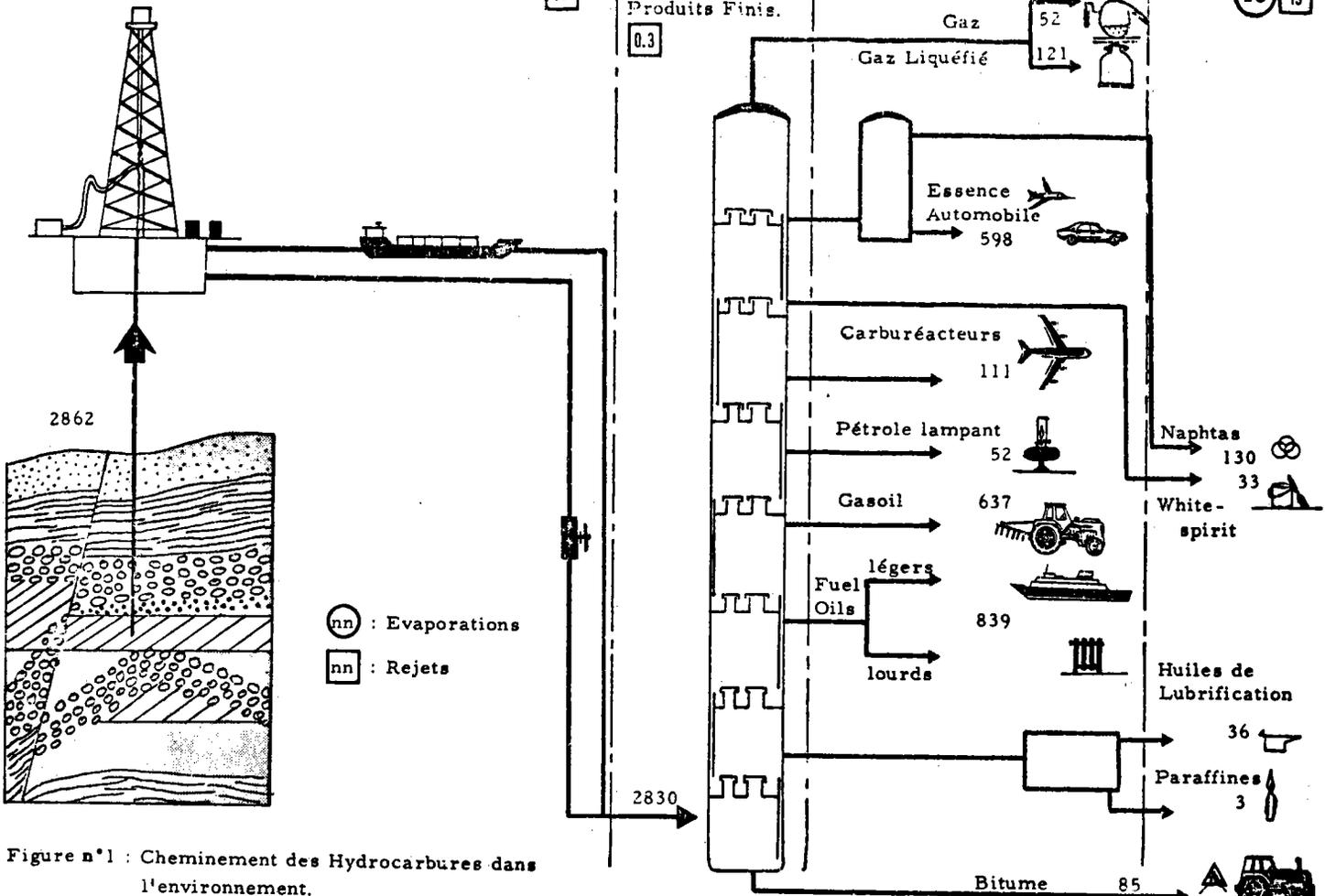


Figure n°1 : Cheminement des Hydrocarbures dans l'environnement.

Le transport de grandes quantités de pétrole sur de longues distances se fait souvent avec des pertes ; aussi en milieu marin, on note :

. Les pertes par accidents : des collisions de pétroliers (Amoco Cadiz, Torrey Canyon), des accidents d'exploitation offshore (Ekofisk) et des ruptures d'oléoducs sont spectaculaires et peuvent avoir localement des conséquences graves, cependant, leur contribution aux rejets annuels d'hydrocarbures dans l'environnement est faible. La moyenne annuelle des rejets accidentels est d'environ 200 000 T selon LE LOURD P. (1976), mais peut atteindre 1 000 000 de tonnes (EHRHARDT M. et BLUMER M. 1972).

. Les pertes volontaires : elles sont plus importantes et ont pour origine : les opérations de déballastages de pétroliers, les déversements dans les ports, et aux terminaux pétroliers, les rejets des eaux de gisements en mer pour les exploitations offshore. Ces pertes représentent 1.5 à 2 millions de tonnes par an.

Au niveau du sol, les pertes liées à la production "inshore" sont estimées à 1.6 millions de tonnes pour 1974 pour KORTE F. et BOEDEFELD E. (1978).

I. 2. 1. 2. 2. Pertes au niveau du raffinage

Arrivé à la raffinerie, le pétrole brut subit des transformations pour donner, selon les besoins, plusieurs produits pétroliers : la classification de ces produits peut être présentée en fonction du poids moléculaire des hydrocarbures entrant dans leur composition (tableau n° VIII).

Nomenclature	Nombre d'atomes de carbone	Intervalle température d'ébullition	Utilisations	% de la Consommation globale
Gaz	0 à 2	Gaz	Gaz industriel, pétrochimie	1.9
Gaz liquifiés	2 à 4	Gaz	Propane et butane commerciaux pour usage domestique et industriel	4.4
Essence auto	4 à 10	50 à 200°C	Carburant pour moteurs automobiles	22
Essences spéciales (naphtas)	4 à 10	" " "	Industrie chimique	4.5
White spirit	" " "	" " "	Solvant	1.1
Carburéacteur	10 à 14	55 à 240°C	Avions à réaction, turbines à gaz	4
Kérosène	" " "	" " "	Eclairage, chauffage	1.9
Gas oil	14 à 20	250 à 400°C	Carburant pour moteurs diesels rapides	22.3
Fuel oil léger	16 à 25	300 à 400°C	Moteurs diesels lents et chauffage domestique	29.4
Fuel oils lourds	16	400°C	Installations industrielles	
Huiles graissage			Lubrification	1.26
Paraffine			Protection aliments et isolation électrique	0.1

Tableau n° VIII : Les produits de raffinage du pétrole et leur utilisation

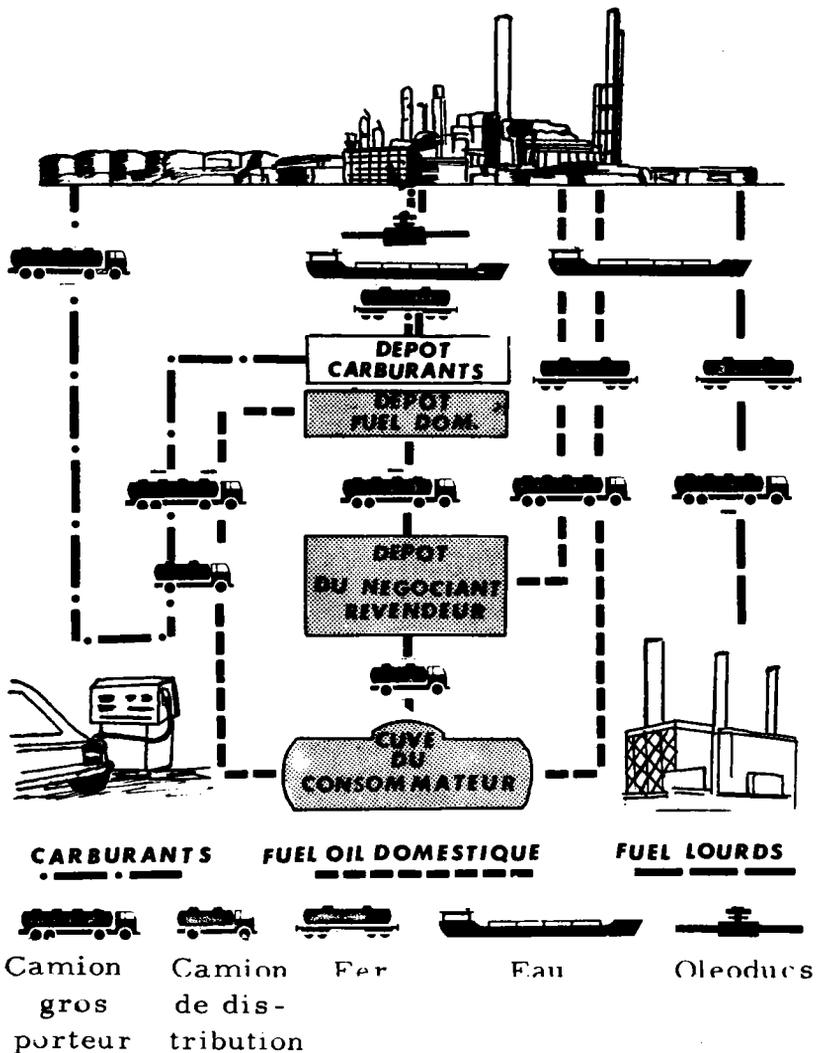


Figure n° 2 : Schéma des principaux circuits de distribution des carburants, du fuel domestique et des fuels lourds (d'après le Cent. Fran Int Petrol)

Les opérations de raffinage de pétrole s'accompagnent d'une perte de: 8.4 millions de tonnes par an dont 8.1 millions de tonnes sous forme d'évaporation.

Dans un rapport du National Environmental Research Center (1973), il est signalé qu'en 1969, 262 raffineries aux U. S. A. traitaient globalement 12 700 000 barils de pétrole par jour. Le tableau n° IX, montre la répartition des émissions de polluants à partir de ces raffineries.

Polluant	Emission 1000 T/an
SO _x	2200
NO _x	61
Hydrocarbures	2300
Particules	550
CO	2420

Tableau n° IX : Principaux polluants émis dans l'atmosphère par l'industrie du raffinage des pétroles.

Alors que dans un rapport du CONCAWE daté de mars 1977, il est signalé que la perte de pétrole dans les effluents liquides des raffineries d'Europe occidentale, est passé de 153 g par tonne de brut traité en 1969 à 42 g/tonne en 1973.

I 2 1 2 3. Pertes au niveau de la distribution des produits finis

Les produits raffinés sont transportés jusqu'à leur utilisation suivant le circuit de distribution représenté sur la figure n° 2.

La distribution des produits raffinés s'accompagne d'une perte de 8.3 millions de tonnes par an, essentiellement sous forme d'évaporation.

I. 2. 1 2. 4. Pertes au niveau de la consommation

Les pertes d'hydrocarbures au niveau de la consommation sont variables. Ainsi, pour les produits destinés à la combustion, on estime à 41 millions de tonnes les pertes par évaporation avant usage et 24 millions de tonnes en cours de combustion sous forme d'imbrûlés. Alors que sur les produits non destinés à la combustion, tels que solvants et huiles de lubrification, les pertes s'élèvent à 26 millions de tonnes sous forme d'évaporation et 19 millions de tonnes d'huiles d'usages sont rejetées dans l'environnement. Notons que EHRHARDT M. et BLUMER M (1972) ont estimé que chaque année, 2 millions de tonnes d'huiles de lubrification usées sont irrécupérables et donc rejetées dans l'environnement, et cela pour le seul territoire des ETATS-UNIS d'Amérique.

Dans le tableau n° X, nous avons reporté les estimations des émissions d'hydrocarbures légers sur la totalité du territoire des ETATS-UNIS, en 1968, par les moyens de transport.

Sources	Quantité en millions de tonnes
Véhicules à moteurs	
à essence	15.2
à gas oil	0.4
avions	0.3
chemins de fer	0.3
navires	0.1
divers	0.3

Tableau n° X : Estimations des émissions des hydrocarbures légers sur la totalité du territoire des ETATS-UNIS pendant 1968 à partir des moyens de transport (in CHOVIN P. et ROUSSEL A. 1973).

I. 2. 1. 3. Autres sources de pollution par les hydrocarbures

I. 2. 1. 3. 1. Suintements sous-marins

Il est fort probable que la pollution par les hydrocarbures soit antérieure à l'apparition de l'homme sur la terre, (LANDES K. K. 1973). La pollution de la mer morte par les asphaltes et les hydrocarbures est connue depuis le début de notre histoire, puisque des émanations de pétrole et de gaz observées aujourd'hui encore dans cette zone ont déjà été décrites par les Romains. La partie d'eau polluée était appelée "mare asphalticum", BENTOR Y. K. et VROMAN A. (1960).

A nos jours, de nombreux sites pollués par la nature sont

connus (les côtes ; de LOUISIANE, du GOLFE PERSIQUE, et de TRINIDAD) et il y en aura sans doute d'autres à découvrir MICHEL P. (1976).

L'importance de cette source de pollution demeure cependant négligeable devant les rejets liés à l'activité humaine. La pollution d'origine naturelle, dans l'un des sites les plus connus, celui de SANTA-BARBARA, n'est estimée qu'à quelques 400 litres de pétrole par jour.

Le suintement des gisements de pétrole est exploité par les prospecteurs. La présence d'hydrocarbures dans les eaux souterraines est un indice très utile pour la détection d'un gisement plus ou moins proche. Les aromatiques légers doués d'une grande hydrosolubilité peuvent être révélateurs. Ainsi ZARELLA W. M. et coll. (1963) ont détecté un gisement de pétrole par la présence à 8000 m de 10.7 ppm de benzène dissous dans l'eau souterraine.

1. 2. 1. 3. 2. Les hydrocarbures d'origine biogénique

La synthèse des hydrocarbures par des organismes vivants, et notamment par des plantes, a été signalée par de nombreux auteurs. DOVODA A. M. (1977) a montré que les pommes contiennent des hydrocarbures aliphatiques, et a trouvé les valeurs suivantes : 142.4, 6.9 et 0.2 $\mu\text{g/ml}$ respectivement dans la peau, dans la chair et dans les graines.

BLUMER M. et YOUNGBLOOD W. (1973) ont montré qu'une part importante des hydrocarbures présents dans les milieux marins provient des algues benthiques et phytoplanctoniques. Certaines algues peuvent contenir jusqu'à 2000 ppm d'hydrocarbures aliphatiques par rapport à leur poids de matière sèche. En général, les algues jeunes et les tissus en croissance rapide contiennent plus d'hydrocarbures que les individus âgés.

WHITMORE F. C. (1944) a démontré que la quantité d'hydrocarbures contenue dans la production mondiale de varech, si elle n'était pas consommée dans le cycle de carbone, serait de 6×10^7 barils par an (1 baril = 159 litres).

Pour MICHEL P. (1976), les paraffines normales sont plus abondantes dans les tissus végétatifs que dans les tissus reproductifs, avec une prédominance du n-pentadécane dans les algues brunes, et du n-heptadécane dans les algues rouges. Dans les algues vertes, on note la présence de plusieurs isomères en C_{17} avec une ou deux doubles liaisons, et parfois trois.

La distinction entre hydrocarbure d'origine fossile et hydrocarbure d'origine biogénique est possible en tenant compte du fait que le nombre d'hydrocarbures synthétisés par les organismes vivants est très restreint.

I. 2. 1. 4. Pouvoir dispersif des hydrocarbures

I. 2. 1. 4. 1. L'étalement

Après déversement au niveau de l'eau, les produits pétroliers forment une mince pellicule en surface, et l'étalement de cette dernière et sa superficie peuvent être prévus selon JEFFERY P. G. (1973) et WILLIAMS G. N. et coll. (1975).

D'après ces derniers auteurs, l'étalement des produits pétroliers à la surface de l'eau obéit aux relations suivantes :

. L'étalement :

$$R = K_i (\Delta g V t^2)^{1/4}$$

R : rayon de la tache d'huile

K_i : coefficient sans dimension, il a pour valeur moyenne 1.14

Δ : $(\rho_e - \rho_h) \rho_e$ ρ_e et ρ_h (masses volumiques de l'eau et de l'huile)

g : accélération de la pesanteur

V : volume initial de pétrole déversé

t : temps

. Quand l'épaisseur du film d'huile "devient égale à la couche visqueuse dans l'eau"

$$R = K_v (\Delta g V t^{2(3/2)} / \nu^{1/2})^{1/6}$$

K : a pour valeur 1.45

ν : viscosité de l'eau

. Régime de tension superficielle "quand l'épaisseur du film d'huile devient inférieure à une valeur critique qui est fonction de la tension superficielle" :

$$R = K_\rho (\sigma^2 t^3 / \rho^2 \nu)^{1/4}$$

K : 2.05

σ : tension superficielle

ρ : masse volumique de l'eau

I. 2. 1. 4. 2. Dispersion des hydrocarbures

L'étalement des hydrocarbures à la surface de l'eau favorise les échanges de matières entre les trois phases en présence (air/hydrocarbures/eau) et contribue à une dispersion rapide des hydrocarbures par évaporation,

solubilisation, émulsification et dégradation.

Selon WILLIAMS G. N. et Coll. (1975), YANG W. C. et WANG H. (1977), les dispersions obéissent à une loi exponentielle du type :

$$\frac{dc}{dt} = (K_e + K_d + K_b)C$$

où

C : concentration

K_e : coefficient d'évaporation

K_d : coefficient de dissolution

K_b : coefficient de biodégradation

En général K_b est négligeable devant les deux autres constantes, de sorte que l'intégration de l'équation précédente donne :

$$C = C_o \exp (-K_e - K_d)t$$

Les valeurs des constantes K_e et K_d sont données dans le tableau n° XI.

Hydrocarbures	K_e	K_d	K_d/K_e
Paraffine $C_6 - C_{12}$	$0.8 e^{0.2W}$	0.1	1/60
Cycloparaffine $C_6 - C_{12}$		0.5	1/12
Mono-aromatique et diaromatique $C_6 - C_{12}$		1	1/60

Tableau n° XI Valeurs des constantes de dissolution et d'évaporation de quelques hydrocarbures

Sur la figure n° 3, nous avons représenté schématiquement les principaux phénomènes concernant les hydrocarbures émis dans l'environnement. Etant des composés volatils, ils ont tendance à s'évaporer puis à se disperser ; cette dispersion accompagnée de transformations chimiques telles que des phénomènes d'oxydation fait que, malgré des émissions importantes, les concentrations de l'air en hydrocarbures demeurent après tout, très faibles. Sur le tableau n° XII sont portées les concentrations de quelques hydrocarbures dans l'atmosphère d'après SAWICKI E. (1977).

Composé	concentration $\mu\text{g}/\text{m}^3$	Site
Eau	10^7	
n-heptane	140	Zurich
toluène	140	Los Angeles
isopentane	130	Los Angeles
n-pentane	100	Los Angeles
diméthyl-2, 3 butane	50	Los Angeles
benzène	50	Los Angeles
n-hexane	43	Los Angeles
éthylbenzène	38	Zurich
méthyl-3 pentane	30	Los Angeles
éthyl-1-méthyl-3 benzène	28	Zurich
éthylbenzène	25	Los Angeles
éthyl-1, méthyl-4, benzène	18	Zurich
n-octane	16	Zurich
méthyl-2, heptane	16	Zurich
isopropyl benzène	15	Los Angeles
méthyl-2, butène 2	12	Los Angeles
butylbenzène	11	Los Angeles
triméthyl-2, 4, benzène	11	Paris, Zurich
propyl benzène	10	Los Angeles
n-dodécane	9	Zurich
n-décane	8	Paris
xylène	6	Paris
tétraméthylbenzène	8	Paris
anthracène	0.02	Los Angeles
PCB	2.10^{-4}	

Tableau n° XII : Concentration de quelques hydrocarbures dans l'atmosphère
(les concentrations de l'eau et du PCB sont données à titre
indicatif).

✈ PHOTO OXYDATIONS ✈

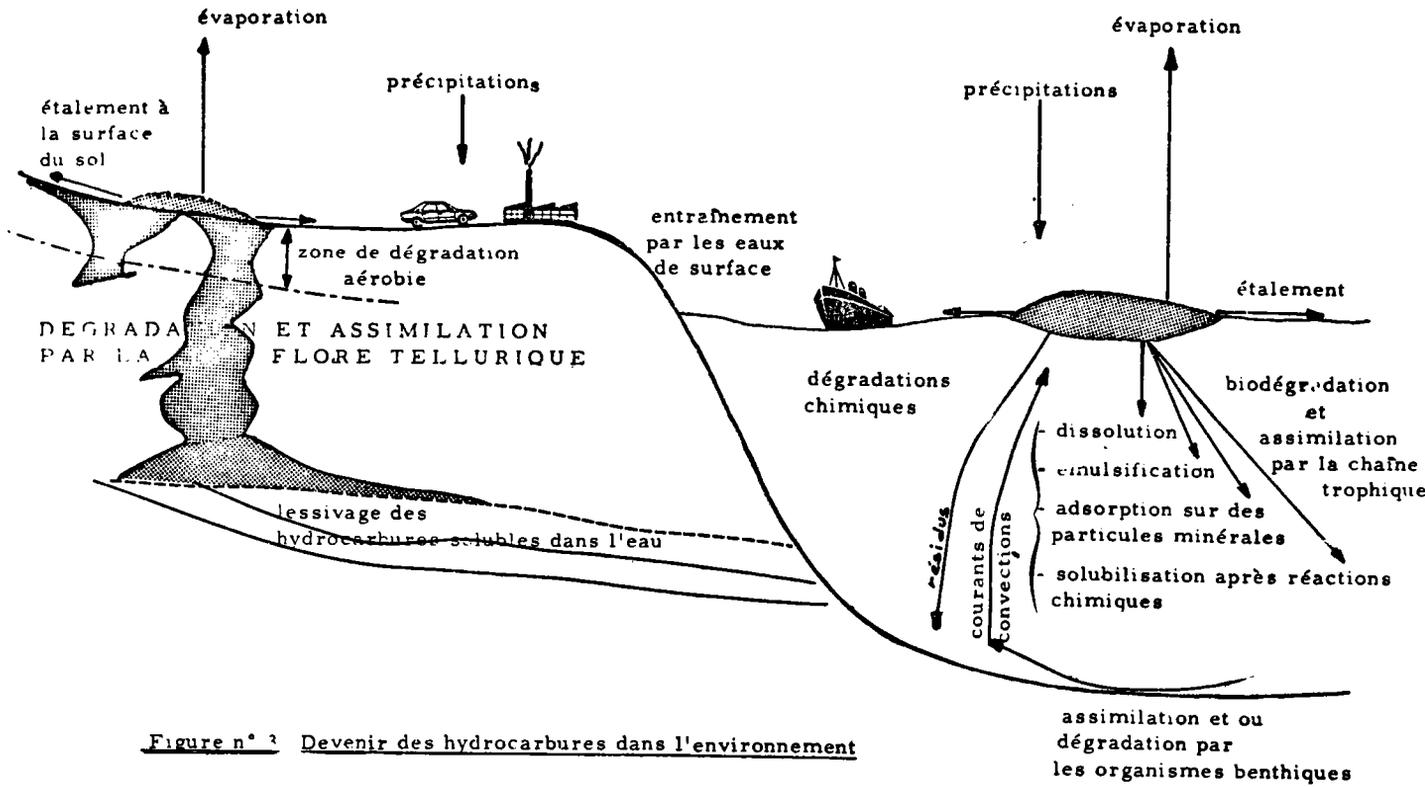


Figure n° 3 Devenir des hydrocarbures dans l'environnement

I. 2. 2. Dégradation des produits pétroliers

I. 2. 2. 1. Dégradation abiotique :

Ces dégradations sont de deux sortes :

I. 2. 2. 1. 1. Dégradation en cours d'usage

Les combustions complètes ou partielles donnent lieu à des produits d'oxydation directe CO_2 , H_2O , CO , et à la production des composés d'oxydations par déshydrogénation partielle tels que des oléfines dans les gaz d'échappement de voitures et des composés aromatiques, polycycliques dans les huiles usagées de coupe et de trempé.

I. 2. 2. 1. 2. Dégradation des produits émis dans l'environnement

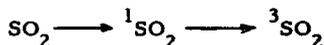
L'oxydation des produits pétroliers dans l'atmosphère fait intervenir en général la présence d'autres polluants de l'air, comme par exemple les oxydes de soufre SO_x , les oxydes d'azote NO_x et l'ozone.

Les interactions entre polluants atmosphériques ont également suscité l'intérêt de nombreux auteurs, notamment :

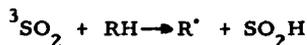
ALTSHULLER A. P. (1969), CADLE R. D. et ALLEN E. R. (1970),
FOX D. L. et coll. (1975), GLASSON W. A. (1975), HIROSE H. et coll. (1975), KOPCZYNSKI S. L. et coll. (1975), OBRIEN R. J. et coll. (1975),
PITTS J. N. et coll. (1975), YEUNG C. K. K. et PHILLIPS C. R. (1975),
CALVERT J. G. (1976), PATE C. T. et coll. (1976), ROBERTS P. T. et
FRIEDLANDER S. K. (1976)

En présence du dioxyde de soufre

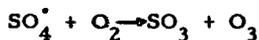
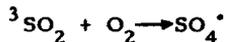
On admet généralement que l'absorption de l'énergie d'un photon fait passer la molécule de SO_2 à un état singulet, lequel peut évoluer vers un état triplet, CHOVIN P. (1975).



La réaction de ${}^3\text{SO}_2$ avec un hydrocarbure peut s'accompagner de la formation d'un radical libre, lequel peut évoluer selon diverses modalités selon sa structure :

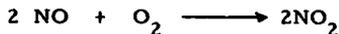
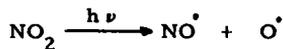


On peut aussi avoir :

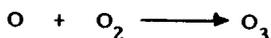


En présence d'oxyde d'azote

Sous l'action de radiations solaires, le dioxyde d'azote peut subir une photolyse



l'oxygène formé au cours de la première réaction peut réagir soit avec un hydrocarbure, soit avec une autre molécule d'oxygène, ce qui donne:



Exemple : PITTS J. N. et coll. (1975), notent au cours d'une exposition à des photons lumineux d'une même longueur d'onde de 0.5 ppm de propène de 0.45 ppm de NO et de 0.05 ppm de NO₂, l'apparition de formaldéhyde, d'acétaldéhyde, de nitrate de peroxyacétyle et d'ozone. Les mécanismes réactionnels invoqués dans cette dégradation des hydrocarbures sont représentés sur le tableau n° XIII.

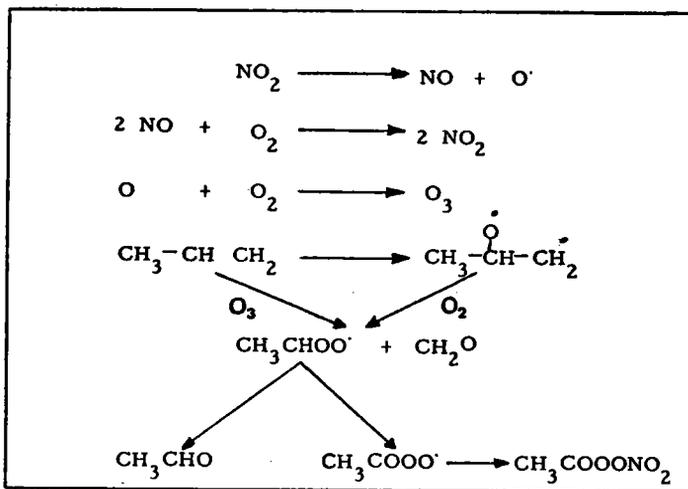


Tableau n° XIII : Mécanismes de dégradation abiotique des hydrocarbures (exemple du smog oxydant)

La cinétique de ces dégradations varie avec les composés et avec les conditions atmosphériques, mais les oléfines sont les plus réactives.

Dans le tableau n° XIV nous avons noté les temps de 1/2 vie, de divers hydrocarbures dans l'atmosphère, d'après ALTSHULLER A. P. (1969).

Composé	Temps de 1/2 vie
Méthane	Très grand
Ethane	Quelques jours
Acétylène	Quelques jours
Butane	1 à 2 jours
Ethylène	6 à 8 Heures
Propylène	2 à 3 Heures
Isobutène	1 heures
Oléfine avec double liaison interne	Moins d'une heure
Alkyl-benzène	1 jour
Dialkyl-benzène	1/2 jour
Trialkyl-benzène	moins de 1/2 jour

Tableau n° XIV : Temps de 1/2 vie de quelques hydrocarbures dans l'atmosphère

I. 2. 2. 2. Biodégradation des hydrocarbures

L'existence de microorganismes capables de dégrader les hydrocarbures a été signalée dès le début du siècle, et l'on pense actuellement que tout hydrocarbure est susceptible d'être métabolisé par des microorganismes appropriés.

I. 2. 2. 2. 1. Métabolisme des alcanes :

Les alcanes sont très facilement biodégradables, l'attaque se fait sur le méthyle terminal et conduit à la formation d'acide, en passant classiquement par les fonctions alcool et aldéhyde. L'étape suivante est

encore une oxydation qui peut passer par la formation du diacide obtenu par l'attaque de l'autre bout de la chaîne (SENEZ J. C. 1956 ; DAVIS J. B. 1967 ; SIMON P. et MEUNIER R. 1970 ; CAGLAR M. A. et coll. 1971 ; GATELLIER C. 1971). Sur le tableau n° XV, nous avons rassemblé les étapes de l'oxydation microbienne des alcanes.

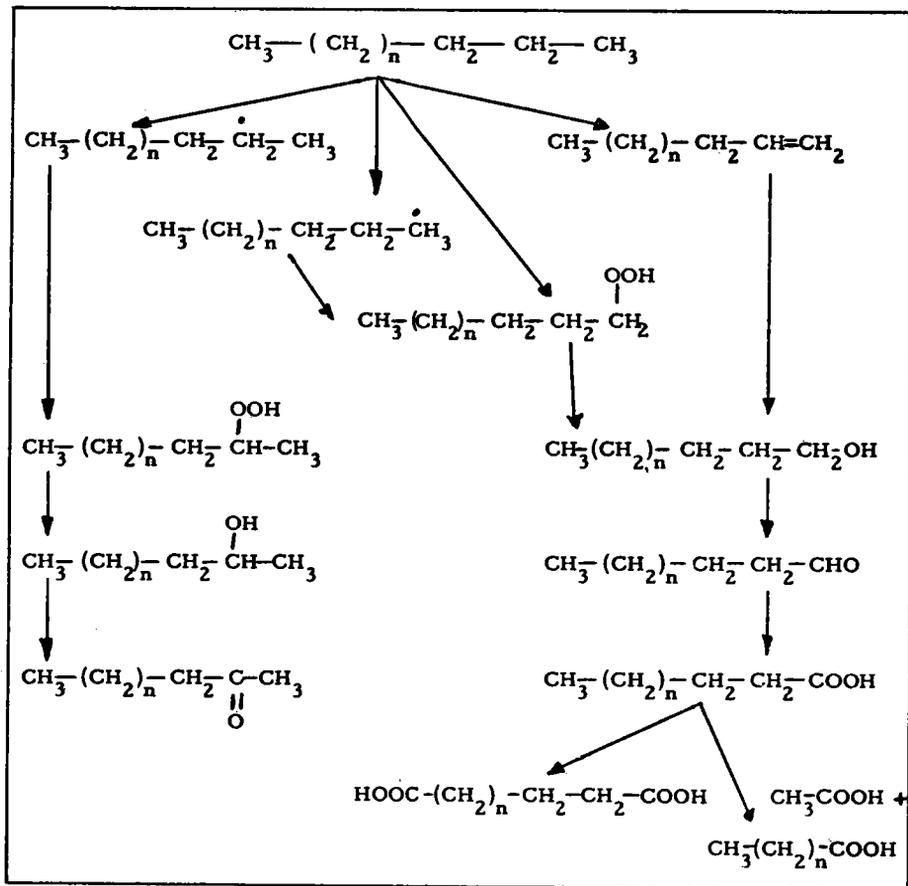
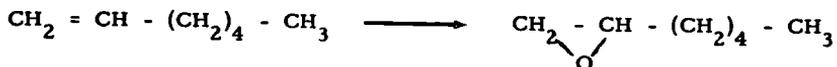


Tableau n° XV : Dégradation microbienne des alcanes

Selon DAVIS J. B. (1967), le rapport $\frac{\text{CO}_2 \text{ formé}}{\text{O}_2 \text{ consommé}} = 0.65$ montre une dégradation presque complète des alcanes.

I. 2. 2. 2. Métabolisme des oléfines

VAN DER LINDEN A. C. et THIJSSSE G. J. E. (1965), signalent l'époxydation des oléfines à double liaison terminale.



I. 2. 2. 2. 3. Métabolisme des cyclanes

L'attaque se fait par dihydroxylation, l'oxydation continuant par l'ouverture du cycle. Ces hydrocarbures ne sont assimilables que par un petit nombre d'espèces (DAVIS J. B. 1961 ; ODIER E. 1976).

I. 2. 2. 2. 4. Métabolisme des composés aromatiques

La biodégradation des composés aromatiques est en général plus lente que celle des composés aliphatiques, (GIBSON D. T. et coll. 1967).

En général, il y a formation d'un époxyde suivi de l'ouverture du cycle qui passe par la formation de phénols, et conduit à la formation de diacides tels que l'acide muconique ou des dérivés de l'aldéhyde hydroxymuconique.

I. 2. 2. 2. 5. Cinétique de la biodégradation des hydrocarbures

La vitesse d'assimilation dans l'environnement d'un

produit pétrolier est influencée par sa composition, par la présence de matière organique dans le milieu, par la température, par la nature du microorganisme, .

En général, les n-paraffines sont plus rapidement métabolisés que les représentants des autres classes d'hydrocarbures. Par contre la présence de fractions légères dans un produit pétrolier semble inhiber sa biodégradabilité ATLAS R. M. et BARTHA R. (1972).

I. 2. 3. Impact des produits pétroliers sur l'environnement

I. 2. 3. 1. Notions générales

Nous avons vu, dans les paragraphes précédents, que la pollution par les hydrocarbures n'épargne aucun milieu récepteur, les points d'impact pouvant être l'air, l'eau ou le sol, et ces trois milieux pouvant être contaminés simultanément ou consécutivement par la même source. Mais quel que soit le point d'impact des produits pétroliers, leurs effets dépendent de leur composition.

La dispersion d'un produit pétrolier lourd et visqueux se fait très difficilement, l'évaporation et l'étalement en surface sont lents, l'action locale est persistante. L'absorption et l'élimination d'un tel produit n'est pas rapide. Des effets chroniques peuvent alors apparaître.

Par contre, un produit léger et fluide sera rapidement dispersé dans la nature. Cependant, la prédominance de composés volatils, donc de petites molécules, facilite leur pénétration dans les cellules vivantes et des effets locaux aigus sont alors à craindre. La diminution de la toxicité des produits pétroliers due à l'évaporation des fractions légères a déjà été

mentionnée par de nombreux auteurs : ATLAS R. M. et BARTHA R. (1972) ; ANDERSON J. W. et coll. (1974) ; BARNETT et KONTOGIANNIS J. E. (1975) ; TEMPELTON W. L. et coll. (1975) ; TATEM H. E. (1978) ; LEE W. Y. et coll. (1978).

La toxicité des hydrocarbures est croissante le long de la série : paraffines, naphthènes, et oléfines, puis aromatiques (CRAFTS A. S. et coll. , 1948 ; HAVIS J. R. , 1950 ; LEONARD O. A. et HARRIS V. C. 1952). La toxicité des molécules à 6 atomes de carbone augmente le long de la série : hexane, hexène, cyclohexane, cyclohexène, puis benzène (CURRIER H. B. et PEOPLES S. A. , 1954). CURRIER H. B. (1951), et KAUSS P. B. et HUTCHINSON T. C. (1975) montrent un accroissement de la toxicité le long de la série : benzène, toluène, xylènes. En général, plus la molécule d'hydrocarbure est petite, plus elle est toxique selon VAN OVER BEEK I. et BLONDEAU R. (1954).

L'intervalle des températures d'ébullition d'un produit pétrolier influence sa toxicité ; les grosses molécules difficilement volatiles peuvent être trop grosses pour pénétrer dans les cellules et les molécules à basse température d'ébullition peuvent s'évaporer avant d'avoir un effet. L'essence qui bout dans l'intervalle 150 - 275°C paraît la plus toxique.

Un produit pétrolier aéré, qui a ainsi perdu son contenu d'hydrocarbures légers, est moins toxique que le produit frais. C'est ainsi que selon BAKER J. M. (1969 & 1970) un fuel frais est plus toxique que son résidu obtenu après évaporation de la fraction légère.

Les produits du raffinage de pétrole, tels que le fuel oil n° 2 et les essences sont plus toxiques que le brut, sans doute parce qu'ils sont plus riches en fraction légère ou parce qu'ils peuvent contenir des oléfines (CARR R. S. et REISH D. J. 1976).

La viscosité d'une huile influence également sa toxicité ; une huile très fluide s'étale plus facilement à la surface d'une plante et la pénètre beaucoup plus facilement qu'une huile visqueuse.

VAN OVER BEEK J. et BLONDEAU R. (1954) trouvent que la toxicité d'une huile purifiée augmente lorsqu'elle est exposée à la lumière, et pensent que cela est dû à la formation d'acides. JOHNSON C. M. et HOSKINS W. M. (1952) avaient effectivement montré que le stockage rendait une huile plus toxique par formation d'acides. Dans ce contexte CAIRNS J. et SCHEIER A. (1962) signalent que les acides naphténiques sont toxiques pour plusieurs espèces d'animaux aquatiques telles que Lepomis macrochirus et Physa heterostropha et BAKER J. M. (1969) rapporte qu'une concentration de 10 % en acide naphténique est toxique pour la végétation des marais salants.

Mais en plus des acides, la formation de peroxyde dans les pétroles exposés à la lumière a été reconnue depuis longtemps comme la raison d'une augmentation de leur toxicité (CRAFTS A. S. et REIBER H. G. 1948).

I. 2. 3. 2. Etude de la pollution des eaux par les hydrocarbures

I. 2. 3. 2. 1. Effets sur le milieu

Le déversement de produits pétroliers dans l'eau se manifeste tout d'abord par la formation d'une nappe "d'huile" à la surface.

La formation de ce film d'hydrocarbures à la surface de l'eau fait écran aux échanges gazeux entre l'air et l'eau, ce qui limite sinon empêche l'oxygénation du milieu avec toutes les conséquences que cela comporte, à savoir : asphyxie d'organismes aérobies, prolifération de flore anaérobie, production de mauvaises odeurs. L'un des effets les plus spectaculaires de la nappe d'hydrocarbures à la surface de l'eau est sans doute la mort

des oiseaux marins ; ces derniers en se posant à la surface de la nappe, engluent leurs plumes qui s'agglomèrent et ne jouent plus leur rôle de matelas d'air indispensable à l'isolation thermique et à la flottabilité (GATELLIER C. R. 1971).

I. 2. 3. 2. 2. Effets sur la flore

Les essences légères ont été utilisées pour lutter contre le développement des mauvaises herbes dans les canaux d'irrigation. SHAW J. M. et TIMMONS F. L. (1949) ont montré que les aromatiques légers sont très puissants dans ce procédé et HAVIS J. R. (1950) montre que l'efficacité d'une essence est accrue par l'augmentation de sa concentration en aromatiques légers. BRUNS V. F. et coll. (1955) ont estimé qu'une essence à base de composés aromatiques (85 % d'aromatiques) dont l'intervalle d'ébullition est compris entre 117 et 216°C est la plus efficace pour contrôler le développement des herbes aquatiques.

LACAZE J. C. et coll. (1976) montrent que la phytotoxicité d'un produit brut en provenance du KOWEIT sur une algue microscopique Phaeodactylum tricornerum croît en fonction du temps d'exposition à la lumière.

Pour HELLEBUST J. A. et coll. (1975), l'inhibition de la croissance et de la photosynthèse apparaissent minimales quand les algues poussent dans des conditions optimales de température et de lumière. L'effet toxique diminue dans les cultures ouvertes, quand l'évaporation est permise. Le pétrole brut induit une réduction de la chlorophylle des macrophytes et une décroissance significative de la biomasse.

D'un autre côté, la stimulation de la croissance des algues par des produits pétroliers a également été signalée par un certain nombre d'auteurs. Ainsi, STEELE R. L. (1976) note une stimulation de Fucus edentatus

par la présence dans le milieu de culture de fuel oil n° 2 et de carburéacteur à des concentrations ~~de~~ 200 ppb. KAUSS P. B. et HUTCHINSON T. C. (1975) ont signalé une stimulation de la croissance de Chlorella vulgaris par la fraction soluble de nombreux fuels et huiles moteur.

I. 2. 3. 2. 3. Action des hydrocarbures sur la faune aquatique

Nous avons déjà rappelé que la formation d'une couche d'hydrocarbures sur la surface de l'eau fait écran aux échanges gazeux entre l'air et l'eau, entraînant ainsi la mort de certaines espèces par asphyxie. BARNETT C. J. et coll. (1975) montrent qu'une couche de brut de 1.5 mm d'épaisseur à la surface de l'eau entraîne la mort de tous les Copépodes Tigriopus californicus exposés, en 3 jours. L'oxygénation du milieu retarde la mortalité totale de 2 à 3 jours.

Il y a action concomitante de barrière à oxygène et de la présence de substances toxiques dans le brut. Certaines huiles ne provoquent aucune mort en milieu aéré, entraînant l'asphyxie des animaux d'essai quand l'aération artificielle est arrêtée.

LAUGHLIN R. B. et NEFF J. M. (1976) ont constaté une augmentation du taux de respiration d'une limule (Limulus polyphemus) en présence de fuel oil n° 2 dans toutes les conditions de température et de salinité.

ALBERS P. H. (1976) signale une inhibition de l'éclosion des oeufs de Colvert (Anas platyrhynchos) lorsqu'ils sont badigeonnés par une quantité à 5 l de fuel oil n° 2.

La toxicité des produits pétroliers sur les crustacés est plus importante en période de mue, MECKLENBURG T. A. et coll. (1976) ont montré que les animaux sont plus sensibles pendant les phases de mue que

pendant les périodes d'intermues. Les chances de survie pour les animaux qui muent dans un milieu contaminé par les hydrocarbures diminuent lorsqu'on augmente la concentration de ceux-ci.

Une huile fraiche produit une paralysie de représentants du zooplancton au cours des 24 heures suivant le début d'intoxification. Alors que la même huile laissée une nuit dans un flacon ouvert à l'air libre, ne produit plus de paralysie, LEE R. F. (1975).

BARNETT C. J. et CONTAGIANNIS J. E. (1975) montrent que le benzène est plus toxique que l'essence, celle-ci plus toxique que le gas oil, pour le Copépode Tigriopus californicus ; la létalité du benzène et de l'essence est observée dans les deux premiers jours de l'exposition. L'évaporation du toxique du milieu expérimental est responsable de la détoxification du milieu.

Selon Mc KEON B. A. et MARCH G. L. (1978), les hydrocarbures et les associations hydrocarbures-dispersants endommagent les branchies des poissons. Ils provoquent un gonflement des lamelles, ce qui accroît la distance de diffusion entre le sang et l'eau, donc une mauvaise circulation à ce niveau, d'où une altération du régime respiratoire provoquant parfois la mort du poisson par asphyxie.

Mais pour HAWKES J. W. (1976), la présence de 100 ppb d'hydrocarbures dans l'eau produit en 5 jours une lésion des branchies des poissons exposés qui se manifeste par la perte de 1 à 3 couches de cellules de surface.

Les animaux qui vivent en profondeur sont moins atteints que ceux qui vivent en surface.

Pour EISLER R. (1975), la prise de nourriture des Drupa granulata sur Mytilus variabilis est abaissée quand les moules ont été exposées

au pétrole. Les moules retiennent le goût du pétrole pendant plusieurs semaines. La prédation diminue également quand les pourpres seuls ont été exposés aux produits pétroliers. Il est possible que le pétrole interfère avec l'efficacité de l'appareil qui perce les valves ou la musculature radulaire, ou les deux à la fois. Il est aussi possible que le pétrole inhibe la production d'enzymes digestives. En tout cas, l'effet de la prédation semble être cumulatif quand les deux espèces ont été exposés initialement et il est probable que les deux phénomènes agissent conjointement. La fécondité est aussi affectée quand l'une ou l'autre espèce a été exposée.

Pour RICE S. D. et coll. (1975), la sensibilité des oeufs du saumon rose à 25 ppm de pétrole brut varie en fonction de leurs stades de développement :

- . Au fur et à mesure qu'ils se développent, les alevins deviennent de plus en plus sensibles,

- . Les fraies sont plus sensibles à l'huile en eau de mer qu'en eau douce,

- . La toxicité aiguë et les effets sur la croissance changent à mesure que le saumon se développe ; la plus grande sensibilité est obtenue à l'émergence,

Les effets sublétaux, même s'ils sont physiologiquement réversibles peuvent réduire la survie des jeunes saumons quand ils émergent et entrent en mer.

Pour GARDNER G. R. (1975), des concentrations de 20 ppm et plus de motor-oil induisent des lésions du système vasculaire de coquilles Saint-Jacques et des huîtres. Ces lésions sont observées sur le coeur, les pseudo-branchies, les branchies, les reins (en 60 jours). La CL_{50} 96 heures chez ces espèces est de 1700 ppm.

Cet auteur constate par ailleurs que les huiles usées entraînent des lésions dans le coeur de coquilles Saint-Jacques, alors que les bruts n'en provoquent pas.

I. 2. 3. 2. 4. Bioaccumulation, élimination et métabolisme des hydrocarbures par la faune aquatique

Bioaccumulation

Il ressort, des études faites à ce sujet, que tous les animaux exposés aux produits pétroliers ont la faculté de stocker les hydrocarbures dans leurs tissus :

. Mollusques ANDERSON R. D. (1975), EISLER R. (1975), LEE R. F. (1975), ZITKO V. (1975), BOEHM P. D. et QUINN J. G. (1976), NEFF J. M. et coll. (1976), STANKEN D. M. (1976).

. Crustacés : EISLER R. (1975), LEE R. F. (1975), TATEM H. E. (1976), NEFF J. M. et coll. (1976).

. Poissons : OGATA M. et MIYAKE Y. (1975, 1976, 1979), SMITH P. V. (1954), MACKIE P. R. et coll. (1972), ACKMAN R. G. et NOBLE D. (1973).

Les concentrations dans des représentants de chaque groupe varient dans une très large gamme de valeurs à la fois avec l'espèce animale et avec la composition de l'hydrocarbure, (tableau n° XVI)

Organismes vivants	Concentration d'hydrocarbures en $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche
Mollusques	1 à 900
Crustacés	0.4 à 40
Poissons	0.3 à 300

Tableau n° XVI Concentrations usuelles d'hydrocarbures dans les organismes vivants exposés à ces polluants.

En général, les composés retenus sont ceux qui ont un point d'ébullition élevé et une très faible solubilité dans l'eau. Ainsi TATEM H. E. (1976) montre que la rétention des naphthalènes par une crevette, Palaemonetes pugio, augmente au long de la série : naphthalène, méthyl-naphthalène et diméthyl-naphthalène.

Dans le tableau n° XVII, nous avons rassemblé les quantités d'hydrocarbures retrouvées dans divers organismes vivants, exposés au Fuel oil n° 2, valeurs tirées de KORTE F. et BOEDFELD E. (1976);

Organisme vivant	Concentration
<u>Algue</u> : Enteromorpha	429
<u>Plante</u> : Spartina	15
<u>Mollusque</u> : Modiolus	218
Mya	26
Pecten	7
<u>Foisson</u> : Fundulus	75
Anguilla	85
<u>Oiseau</u> : Mouette argentée	535

Tableau n° XVII : Concentration des hydrocarbures du Fuel oil n° 2 dans les organismes vivants en $\mu\text{g/g}$ de matière fraîche

Elimination et métabolisme

Tous les animaux cités dans la littérature ont la faculté d'éliminer les hydrocarbures qu'ils ont concentrés dès que la source de contamination est supprimée, ou lorsque les animaux sont replacés dans un milieu sain. La rapidité de l'élimination dépend de la composition chimique

du produit pétrolier.

LEE R. F. (1975) note que l'octadécane est plus rapidement éliminé que les aromatiques tels que le naphthalène, le benzopyrène.

ANDERSON R. D. (1975), note que l'élimination totale des hydrocarbures accumulés dans les huîtres (Crassostrea virginica) a lieu en moins de 52 jours. Aucune modification biologique n'a été observée.

Pour LEE R. F (1975) toujours, l'élimination des hydrocarbures est plus rapide lorsque ceux-ci ont été ingérés directement que sous la forme adsorbée aux algues. L'élimination se fait sans changement des molécules absorbées. Cependant cet auteur a signalé des possibilités de métabolisme des hydrocarbures par de nombreuses espèces de zooplancton. Les étapes de ce métabolisme seraient analogues à celles observées chez les mammifères.

NEFF J. M. et coll. (1976) montrent que l'élimination de 50 % des hydrocarbures accumulés par quatre représentants de la faune marine a lieu en 24 heures.

L'importance des facteurs physiques est non négligeable car la rétention et l'élimination des hydrocarbures par les organismes vivants est un phénomène qui semble dépendre de la température (FUCIK K. W. et NEFF J. M. 1976), la rétention étant plus grande à basse température.

1. 2. 3. 3. Action des hydrocarbures sur le sol

La pollution des sols par les hydrocarbures se caractérise par la persistance de leurs effets. JONES I. G. (1977) rapporte que les effets de la contamination d'un sol par du kérosène sont visibles sept années après le déversement du carburant. Selon cet auteur, la pollution d'un sol par les hydrocarbures se traduit par une diminution de sa perméabilité, d'où une réduction des échanges gazeux avec l'atmosphère et par suite un ralentissement de la

vitesse de biodégradabilité. Notons que tous les sols et sédiments contiennent des microorganismes capables de biodégrader les hydrocarbures, le seul facteur limitant à ce phénomène étant la quantité d'oxygène disponible.

Mc CAULEY R. N. (1966) a noté une diminution de la DBO_5 dans les sédiments d'une zone contaminée par les hydrocarbures.

La persistance des produits pétroliers dans le sol constitue donc une source de pollution chronique des eaux souterraines.

Action sur la flore terrestre

Tout déversement d'hydrocarbures sur le sol a un effet nocif pour la végétation. Les espèces végétales n'ont pas toutes le même potentiel de survie et de récupération après une telle intoxication.

Les mousses et les lichens sont très sensibles.

HUTCHINSON T. C. et FREEDMAN W. (1975) remarquent trois ans après un déversement d'hydrocarbures dans la tundra canadienne que les mousses et les lichens n'ont pas réapparu. Par ailleurs, ces auteurs notent que la pollution par les hydrocarbures est particulièrement dévastatrice dans les zones froides. En effet, par une défoliation des espèces végétales sensibles, il en résulte une diminution de la photosynthèse et une réduction des réserves nutritives qui rendent la plante vulnérable à la rigueur de l'hiver Canadien.

Pour BAKER J. M. (1970), les effets d'une pollution par les hydrocarbures sur les plantes varient selon la nature et la quantité de l'huile mise en cause, des conditions météorologiques, de la saison et de la plante considérée (son espèce et son âge). Les effets observés sont :

- accumulation des huiles par les végétaux
- jaunissement et mort de feuilles imprégnées d'huiles
- diminution des jeunes plantes dans chaque espèce

**réduction du nombre d'espèces annuelles
diverses susceptibilités et vitesses de récupération d'espèces
vivaces.**

Le gasoil, le kérosène, le fuel oil et d'autres huiles ont été pendant longtemps, et sont encore utilisés, comme herbicides, fongicides ou pesticides. De nombreuses publications sont apparues concernant les effets de ces substances sur les "mauvaises" herbes aussi bien que sur les plantes de culture.

Après pénétration dans la plante, l'hydrocarbure chemine dans le système vasculaire et l'espace intercellulaire. Les parois cellulaires sont endommagées conduisant ainsi à une déperdition du contenu cellulaire. L'hydrocarbure réduit aussi le taux de transpiration probablement par le blocage des stomates et des espaces intercellulaires. La réduction de la photosynthèse observée peut avoir une explication analogue, quoiqu'une autre explication reste plausible à savoir la rupture de la membrane du chloroplaste.

Les effets sur la respiration des plantes sont variables. En général, on constate une augmentation du taux respiratoire probablement dû à un endommagement des mitochondries résultant d'un effet découplant au niveau de la chaîne de transporteurs d'électrons

A nouveau, le facteur physique intervient, la phytotoxicité d'un mélange d'huile est plus grande quand celle-ci est appliquée en plein jour lorsque les stomates des plantes sont ouverts. La phytotoxicité est maximum par temps chaud et ensoleillé, BAKER I. M. (1970).

Les déversements qui ont lieu l'hiver sont moins sévères pour les végétations que les déversements estivaux, ceci est dû à l'absence de feuilles en pleine activité de croissance pendant la période de déversement. Les plantes caduques survivent mieux.

I. 2. 3. 4. La pollution de l'air par les produits pétroliers

Les effets de la pollution de l'air par les hydrocarbures sont localisés dans les zones urbaines et industrielles. La principale source de nuisance semble être les gaz d'échappement de voitures. Et les effets des hydrocarbures semblent souvent liés aux produits de réactions qu'ils peuvent donner avec d'autres polluants.

Ils sont à l'origine de réactions photochimiques dans l'atmosphère, amplificateurs ou promoteurs du smog oxydant. Comme nous l'avons vu, la présence d'autres polluants comme les oxydes de soufre ou les oxydes d'azote accélère la dégradation des hydrocarbures donnant lieu à la formation d'aldéhydes, de cétones, de nitrate de peroxyacétyle et d'ozone. Ces produits sont impliqués dans les phénomènes irritatifs.

Les gaz d'échappement de voiture sont les grands suspects dans la différence relative constatée entre la fréquence de cancers du poumon dans les populations urbaines et rurales, SEVERS R. K. (1975).

La concentration de quelques hydrocarbures dans l'atmosphère a été donnée (tableau n° XII, page 32). Ces concentrations sont parfois dépassées près des sources d'émissions. SICE J. (1966), a démontré l'activité cancérigène des alcanes et des alcools à nombre impair d'atomes de carbone sur le rat lorsqu'ils sont associés au diméthyl-7, 12 benzanthracène. Pour HORTON A. W. et coll. (1976) : les alcanes de C_{12} à C_{28} qui sont présents dans l'environnement sont cocancérigènes. Les composés oléfiniques présents dans l'air peuvent donner des oxydes d'oléfines. Ainsi on trouve dans l'environnement l'oxyde de styrène, l'oxyde d'éthylène, l'oxyde de propylène, l'oxyde d'heptène ; certains de ces composés sont mutagènes et cancérigènes, WATABE T. et YAMADA N. (1975).

BOYLAN D. B. et TRIPP B. W. (1971), et ZITKO V. (1970 et 1975),
KAUSS P. B. et HUTCHINSON T. C. (1975).

Des études géochimiques des hydrocarbures dans les eaux souterraines en contact des gisements de pétrole ont montré une prédominance d'aromatiques légers, Mc AULIFFE C. D. (1969), ZARELLA W. M. et coll. (1963). Ces auteurs signalent par ailleurs la présence de 10 ppm de benzène dans une masse se trouvant à 8 km d'un gisement souterrain de pétrole.

Les aromatiques légers étant :

- . d'un usage courant,
- . les plus lents à se dégrader, donc présentent un potentiel de rémanence dans l'environnement,
- les plus toxiques, (tableau n° XVIII)

Composés	Concentrations Maximales Tolérables (ppm)	Effets reconnus
<u>n-alcanes :</u> C ₃ à C ₅ C ₆ à C ₈	1 000 500	Composés généralement inertes biochimiquement, et physiologiquement; ce sont de simple "asphyxiants"
<u>oléfines :</u> éthylène propylène	1 000 1 000	Des concentrations inférieures à 500 ppm sont en général nocives pour les plantes
<u>Aromatiques :</u> benzène toluène xylènes éthylbenzène styrène	10 200 200 100 100	Poisons du système nerveux, vapeurs irritantes pour les membranes muqueuses. (des anomalies hématoLOGIQUES liées à l'intoxication chronique par le benzène, ont été signalées)

Tableau n° XVIII Concentrations maximales tolérables de quelques hydrocarbures (in BOS R. et coll. 1977).

L'étude bibliographique de l'impact du pétrole et de ses produits dérivés, nous a montré que :

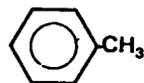
· dans tous les cas de pollution par des produits pétroliers, les hydrocarbures aromatiques monocycliques sont impliqués dans les effets toxiques aigus.

· En général, la toxicité aiguë est d'autant plus élevée que la part des aromatiques légers entrant dans leur composition est importante; ZITKO V. (1970).

Dans cette recherche, nous nous sommes particulièrement intéressés à une étude écotoxicologique des deux premiers homologues de la série des hydrocarbures aromatiques monocycliques, à savoir, le benzène et le toluène.

1. 2. 3. 5. 1. Rappel de propriétés physicochimiques du benzène et du toluène

Le benzène et le toluène sont les deux premiers composés de la série des hydrocarbures aromatiques monocycliques : leurs formules chimiques respectives sont : C_6H_6 et C_7H_8 ou encore



Le benzène est nettement plus volatil et plus soluble dans l'eau que le toluène ; ceci est en rapport avec la masse molaire, phénomène général déjà signalé (tableau n°1) .

Ce sont des liquides inflammables, caractérisés par une odeur aromatique très forte. Ils constituent une part importante des essences de voitures, où leurs gammes de concentrations moyennes sont comprises entre 2 et 5% pour le benzène et entre 10 et 12% pour le toluène, KORTE F. et BOEDEFELD E (1978), GOLDSTEIN B. D. (1977) et WALKER P. (1976).

La concentration de benzène dans l'essence peut toutefois atteindre 16 % en volume dans des cas particuliers (RUNION H. A. 1975). Pour améliorer l'indice d'octane des essences, les raffineurs favorisent en effet parfois la synthèse des aromatiques légers. WALKER P. (1976), rapporte que plus de la moitié de la production de toluène des ETATS - UNIS de 1971 a été incorporée dans les essences.

D'un autre côté, le benzène et le toluène sont d'excellents solvants et sont souvent utilisés pour cette propriété.

GOLDSTEIN B. D. (1971), dit du benzène que c'est un composé d'usage tellement courant qu'il est rare de trouver des individus qui n'auraient jamais inhalé ses vapeurs.

L'industrie chimique aussi se sert de ces deux composés comme matière première pour de nombreuses synthèses ; le tableau n° XIX montre quelques utilisations industrielles du benzène et du toluène.

Ces deux hydrocarbures seraient produits en quantité équivalente. Aussi, en 1975, les ETATS - UNIS d'Amérique ont produit 4.5 millions de tonnes de benzène (GOLDSTEIN B. D. 1977) et 4.5 millions de tonnes de toluène (WALKER P. 1976).

Pour la même année, la production du benzène dans les pays de l'O C D E était de 10 000 000 de tonnes.

La pollution par ces composés au niveau de leur production paraît très faible et la plus grande source d'émission de ces composés dans l'environnement se situe au niveau de leur utilisation (DESOILLE H. et coll. 1978).

Aussi WALKER P. (1976) rapporte que la principale source

de pollution par le toluène est liée à l'utilisation de l'essence. L'émission de toluène, dans ces conditions, représente 1.7 millions de tonnes par an. Les déversements de divers produits pétroliers dans l'Océan, constituent un apport annuel de 70 à 80 000 tonnes de toluène dans l'environnement. Quant à la production du coke, elle constitue une autre source de pollution par les aromatiques légers, les émissions de toluène à partir de cette source représentant 15 000 tonnes par an.

1. 2. 3. 5. 2. Action du benzène et du toluène sur l'homme et les mammifères

. Intoxications aiguës

Le benzène et le toluène, comme tous les hydrocarbures, sont plus liposolubles qu'hydrosolubles ; aussi, les organes riches en lipides (glandes surrénales, moelle osseuse, cerveau), constituent leurs premières cibles.

Compte tenu de leur pouvoir solvant, ils peuvent agir par contact avec les tissus mous, entraînant la destruction de l'organe par la solubilisation des lipides.

Leur action aiguë se manifeste d'entrée par une perturbation du système nerveux central. On note en général, une stimulation accompagnée d'une excitation de l'animal puis immobilisation suivie parfois de mort.

Dans le cas du benzène, LEONG K. J. (1977), signale que parfois, il y a mort subite de l'animal exposé par fibrillation ventriculaire, le mécanisme évoqué ici est une libération soudaine des hormones adrénales (épinéphrine et norepinéphrine) dans le flux sanguin rendant le myocarde sensible à l'action du benzène ; il s'agit en somme d'un effet comparable à la syncope adrénalino-chloroformique.

Action toxique manifestée à long terme

Les actions du benzène et du toluène diffèrent lors des intoxications chroniques.

Il est établi que le benzène induit à long terme des anomalies dans la formule sanguine des individus qui ont été intoxiqués par ce composé (SNYDER R. 1974 ; LEONG B. K. J. 1977 ; DESOILLE H. et coll. 1978).

Une sensibilisation accrue aux maladies infectueuses lors d'une intoxication par le benzène avait déjà été signalée dès le début du siècle par WHITE W. C. et GAMMON A. M. (1914). Cette sensibilisation semble être la conséquence d'une réduction du nombre de leucocytes présents dans le sang SNYDER R. (1974).

Dans le cas du toluène, bien que des effets identiques à ceux du benzène aient été signalés jusqu'aux années 60, il semble qu'ils aient été dûs à l'utilisation de produits non purifiés et qui contenaient du benzène. On peut rappeler un problème du même ordre avec le cyclohexane.

En effet, des essais utilisant du toluène pur, n'ont pas montré de modifications de la composition sanguine (WALKER P. 1976).

Métabolisme du benzène et du toluène

a) - élimination en nature et devenir

En général, après imprégnation d'un organisme vivant, deux voies principales se partagent l'élimination de 80 à 90 % de la dose perçue :

- élimination du composé sous forme de vapeur dans l'air expiré,
- élimination du toxique sous forme de métabolites libres ou conjugués dans les urines

Aussi l'élimination du benzène se fait principalement par deux voies : l'air expiré et l'urine , RUSCH G. M. et coll. (1977).

Dans l'air expiré, on trouve principalement du benzène inchangé, mais on peut trouver du dioxyde de carbone, provenant du catabolisme du benzène ; PARKE D. V. et WILLIAMS R. T. (1953).

Dans l'urine, on trouve les métabolites du benzène à l'état libre ou conjugué.

La plus grande volatilité du benzène, comparée à celle du toluène, explique qu'il soit plus facilement éliminé que le toluène par les poumons sous forme de vapeur dans l'air expiré (tableau n° XX).

Composé	Quantité éliminée sous forme de vapeur dans l'air expiré	Quantité éliminée sous forme de métabolites dans les urines
benzène	43 à 56 %	28 à 33.5 %
toluène	20 %	80 %

Tableau n° XX : Importance relative des voies d'éliminations du benzène et du toluène par l'homme et les mammifères

b)- transformations dans les organismes

La présence d'un radical méthyle sur le noyau aromatique dans le toluène, susceptible d'être le siège d'un autre mécanisme de transformation, fait la différence structurale entre les deux composés et leur confère des voies métaboliques différentes aussi bien chez l'homme que chez le mammifère

Métabolisme du benzène

Indépendamment de la voie d'administration du benzène, l'homme et l'animal le métabolisent selon des voies comparables (tableau n° XXI).

- par l'animal

PARKE D. V. et WILLIAMS R. T. (1953) ont administré au lapin du benzène marqué au ^{14}C et ont noté que 80 à 90 % de la dose administrée par voie orale est éliminée en 3 jours.

- 44.5 % de benzène sont éliminés dans l'air expiré (43 % sous forme de benzène, et 1.5 % à l'état de dioxyde de carbone $^{14}\text{CO}_2$).

- 34.5 % de benzène sont éliminés dans les urines sous forme de métabolites (phénol : 23.5 % ; quinol (hydroquinone) 4.8 % ; catéchol 2.2 % ; hydroxyquinol 0.3 % ; acide transmuconique 1.3 % ; acide phenyl-mercapturique 0.5 % . La quantité de benzène restant dans l'organisme après 3 jours représente de 5 à 10 % de la dose administrée.

- par l'homme

Les études de métabolisme de benzène par l'homme se traduisent par des mesures des quantités de benzène éliminées dans l'air et des quantités de phénol dans les urines.

TEISINGER I. et coll. (1952), ont noté pour une exposition à 100 ppm de benzène pendant 5 heures, que :

- 46 % du benzène inhalé sont retenus par l'organisme.
- 26 % du benzène retenu sont éliminés, inchangés dans l'air expiré,
- 61 % sont éliminés dans l'urine sous forme de phénol,
- 6.3 % sous forme de catéchol, et
- 2.4 % sous forme d'hydroquinone

ELIMINATION PAR VOIE AERIENNE

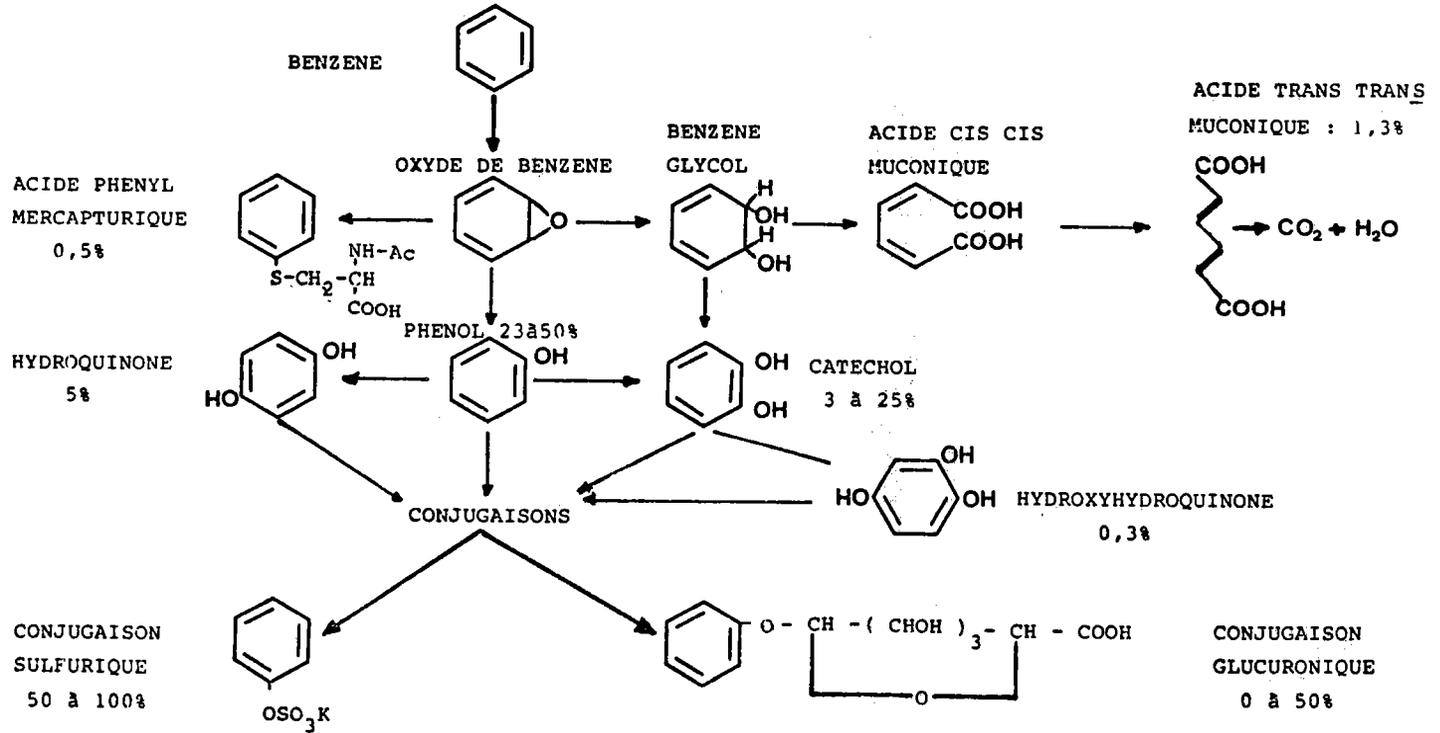


Tableau n°XXI : Métabolisme du benzène par les mammifères

Métabolisme du toluène

Le toluène étant un composé moins volatil que le benzène, son élimination par voie aérienne est nettement plus faible que celle du benzène.

De la dose reçue par l'organisme d'un mammifère, 20 % sont éliminés sous forme de vapeur par voie respiratoire. Environ 80 % sont éliminés par voie urinaire sous forme d'acide hippurique essentiellement.

L'ortho- et le para-crésols, autres métabolites du toluène, comptent pour 0.4 à 1.1 % de la dose administrée et sont également éliminés dans les urines (tableau n° XXII).

I. 2. 4. Conclusion

Malgré l'émission importante de produits pétroliers dans l'environnement, leurs dispersion et dégradations, tant abiotique que biologiques semblent éliminer une grande partie sinon la totalité de la nocivité directe de ces polluants.

Les risques toxiques sont plus à craindre localement dans les zones atteintes par un déversement massif d'hydrocarbures. Les effets de ces polluants semblent surtout aigus et observables tant que demeure la source de pollution.

Les effets d'un déversement massif d'hydrocarbures sont plus persistants dans le sol que dans l'eau, et plus persistants dans l'eau que dans l'atmosphère. D'autre part, dans une eau stagnante, les effets de la pollution par les produits pétroliers sont plus marqués que dans des eaux mouvementées.

Les fractions légères et plus particulièrement les composés aromatiques monocycliques, sont reconnus comme les plus toxiques.

ELIMINATION PAR VOIE AERIEENNE

20 %

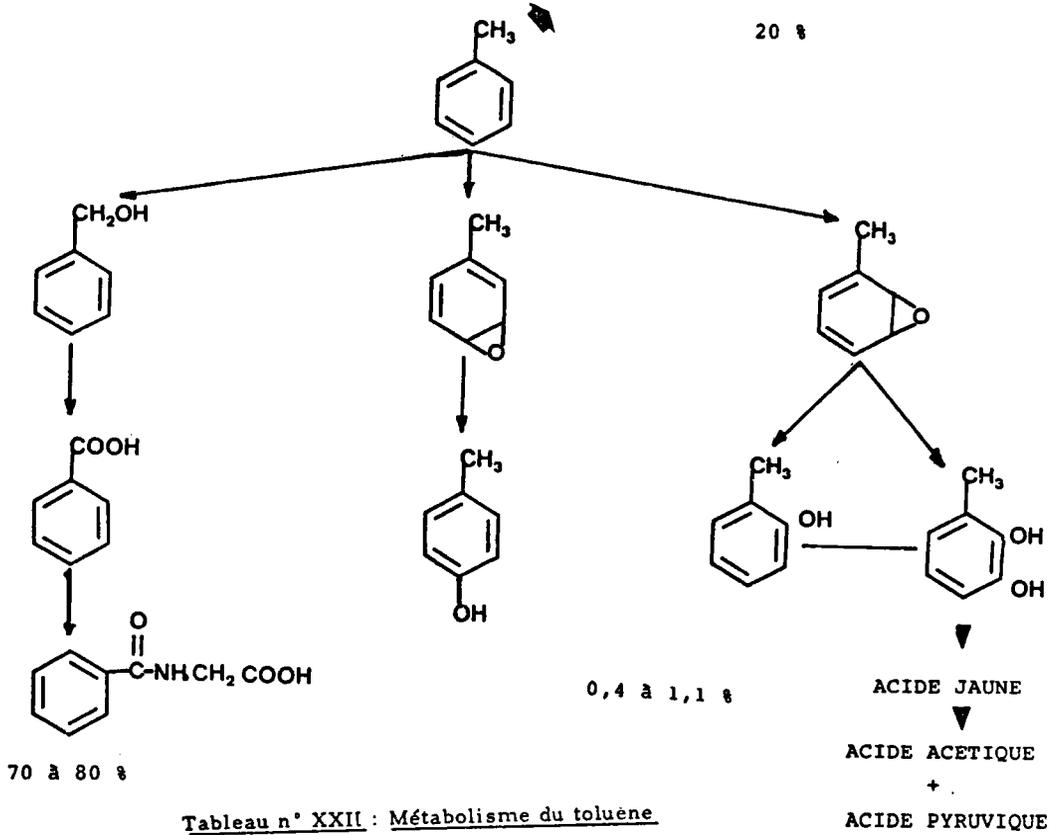


Tableau n° XXII : Métabolisme du toluène

Des composés aromatiques présents dans les produits pétroliers, ou dans leurs produits de combustions, ont un pouvoir cancérogène prouvé chez l'animal.

L'étude des hydrocarbures en toxicologie expérimentale sur les organismes vivants aquatiques a été entreprise par de nombreux auteurs dont nous avons résumé les principaux thèmes dans le tableau n° XXIII).

En général, ces résultats sont difficilement comparables pour plusieurs raisons :

1. Les produits utilisés ne sont pas les mêmes,
2. les espèces animales ou végétales utilisées ne sont pas les mêmes,
3. les conditions expérimentales ne sont pas les mêmes. Les flacons destinés aux tests biologiques : tubes à essais, fioles coniques, cristallisoirs, ne sont pas standardisés et leur forme varie d'un auteur à l'autre. Les conditions expérimentales, température, agitation, aération, varient d'un auteur à l'autre.

Pratiquement, dans tous les tests de toxicité des hydrocarbures sur les organismes aquatiques, la concentration réelle du toxique dans le milieu semble ignorée. En effet, de nombreux auteurs ont tenté de faire ces tests de toxicité des hydrocarbures en général, et des aromatiques légers en particulier ; les résultats obtenus sont imprécis parce qu'ils se rapportent souvent à une concentration en hydrocarbures présumée et dont on ne sait de quelle manière elle évolue. En effet, les milieux de culture sont mis dans des flacons qui permettent l'évaporation et sont le plus souvent agités à la main. La surface d'échange n'est pas fixée, donc l'évaporation n'est pas uniforme, ce qui rend les résultats peu reproductibles. La dose à laquelle sont exposés les organismes n'est alors forcément pas connue.

Organismes	Hydrocarbures	Auteurs	Année
<u>Algues</u>			
Chlorella vulgaris	Huit produits pétroliers et aromatiques monocycliques	Kauss P. B. et Coll.	1975
Dunaliella tertiolecta Skeletonema costatum Cricosphaera carterae Amphidinium carterae	Aromatiques légers	Dunstan W. M. et Coll.	1975
Scenedesmus quadricauda Euglena gracilis	Huiles de lubrification et gasoil	Denington V. N. et Coll.	1975
Phaeodactylum tricornutum	Pétrole brut du Koweit	Lacaze J. L. et Coll.	1976
<u>Crustacés</u>			
Lucifer faxoni	Fuel oil n°2	Lee W. Y. et Coll	1978
Penaeus aztecus	Mélange d'hydrocarbures	Neff J. M. et Coll	1976
Palaemonetes pugio	Aromatiques légers	Tatem H. E. et Coll	1978
Neopanope texana	Pétrole brut	Katz L. M.	1973
Tigriopus californicus	Benzène, Essence, et huile	Barnett C. J. et Coll	1973-75
<u>Mollusques</u>			
Rungia cuneata	Mélange d'aromatiques	Neff J. M. et Coll	1976
Menidia beryllina	Pétrole brut et dérivés	Anderson J. W. et Coll	1974
<u>Poissons</u>			
Fundulus similus	Mélange d'aromatiques	Neff J. M. et Coll	1976
Cyprinodon variegatus	Pétrole brut et dérivés	Anderson J. W. et Coll	1974

Tableau n°XXIII : Quelques travaux récents sur la toxicité des hydrocarbures aromatiques vis à vis d'organismes aquatiques

C'est ainsi que la gamme des concentrations létales 50 % des produits pétroliers vis-à-vis d'organismes vivants, s'étale de 100 µg/l à plusieurs grammes par litre, alors qu'on admet généralement que toutes les espèces d'une même famille ont la même sensibilité vis-à-vis d'un hydrocarbure donné.

Une étude de l'évolution de la concentration du toxique dans le milieu expérimental est nécessaire pour permettre d'évaluer les risques toxiques avec plus de précision.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

II. 1. TECHNIQUES ANALYTIQUES

Comme en toxicologie classique, la chimie analytique tient une part importante dans les études écotoxicologiques.

Dans cette étude, nous avons été amené à doser :

- des hydrocarbures tels que : benzène, toluène, xylènes, éthylbenzène et fractions solubles des essences automobiles,
- des phénols,
- de l'azote sous diverses formes, nitrite, nitrate, ammonium et dans des dérivés organiques,
- des chlorophylles,
- de l'ATP.

II. 1. 1. Dosage des hydrocarbures

La revue bibliographique des méthodes de dosage des hydrocarbures dans les eaux et dans les milieux biologiques, nous a montré qu'en général celui-ci est précédé de leur extraction dans des solvants appropriés. La détermination quantitative dans l'extrait est alors effectuée soit :

- d'une manière globale par gravimétrie ou par spectrophotométrie : infra rouge, ultra violet, etc. . . (CHAMBON P. et CHAMBON R. 1970 ; OUDIN J. L. 1972 ; ANDERSON J. W. et coll. 1974 ; BURWOOD R. et SPEERS G. C. 1974 ; MESTERS R. et coll. 1975 ; ZITKO V 1975 ; NEFF J. M. 1976 ; SDIKA A. et CABRIDENC R 1976 ; TATEM H. E. 1978).

- d'une manière sélective par chromatographie liquide ou en phase vapeur (EHRHARDT M. et BLUMER M. , 1972 ; DUNSTAN W. M. et coll. , 1975 ; FARRINGTON J. W. et MEDEIROS G. C. , 1975; MILES D. H. et coll. , 1975 ; BOEHM P. D. et QUINN J. G. , 1976 ; LEE W. Y. et coll. , 1978).

En général, le dosage après extraction ne donne pas de résultats satisfaisants pour les substances volatiles telles que les aromatiques monocycliques ; parce que :

- a) - L'extraction n'est jamais complète.
- b) - Elle est entachée de pertes par les coévaporations avec le solvant au cours des opérations de concentrations.

Pour doser les composés volatils d'autres méthodes ont été développées telles que :

a) - L'entraînement par un gaz inerte suivi de piégeage par des adsorbants ou absorbants appropriés à basse température, et enfin désorption ou désorbition dans une colonne de chromatographie (SAUNDERS R. A. et coll. , 1975).

b) - ou encore, la méthode de Head Space qui consiste à analyser la phase vapeur en équilibre avec le milieu à examiner dans une enceinte de volume réduit.

Au cours de ce travail, nous avons adapté pour le dosage des hydrocarbures légers par chromatographie en phase gazeuse, la méthode du Head Space (HS) dont le principe a déjà été adopté pour diverses applications par de nombreux auteurs (Mc AULIFFE C. , 1971 ; WITHEY R. J. et MARTIN L. 1974 ; HACHENBERG H. et SCHMIDT A. P. , 1977 ; OGATA M. et MIYAKE Y. , 1979).

Le matériel que nous avons utilisé pour le Head Space est l'ensemble Mininert valves, 14 ml Screw Cap vial, références n° 10 140 et 13 043 de Pierce Eurochimie B. V. P. O. Box 1151, Rotterdam, HOLLANDE, préconisé par WITHEY R. J. et MARTIN L. (1974)

II. 1. 1. 1. Dosage des hydrocarbures dans les milieux de culture et d'élevage

Dans le flacon du Head Space, on introduit successivement :

- 0.5 g de sulfate de sodium,
- 0.2 ml d'une solution aqueuse d'un hydrocarbure différent de celui qu'on veut doser et qui sert d'étalon interne,
- 1 ml du milieu à doser.

Le flacon est obturé à l'aide d'une valve Mininert, dans la position fermée, puis il est placé dans un bain-marie thermostaté, maintenu à 40°C.

Les dosages chromatographiques sont effectués au moins une heure plus tard.

Le prélèvement des vapeurs à analyser est effectué à travers la valve Mininert dans la position ouverte, à l'aide de seringues gas tight "Hamilton" type 1 750 LT et 1 001 LT.

Les volumes de vapeur injectés dans le chromatographe, sont en général de 0.5 ml.

Les analyses sont toujours effectuées sur des séries comportant un minimum de 18 flacons du Head Space.

Chaque série d'analyse comporte obligatoirement une gamme étalon et 3 flacons par solution inconnue à doser.

Conditions d'analyses chromatographiques

Les analyses sont effectuées sur des chromatographes, modèles IGC 112 et IGC 16, fabriqués par Intersmat, équipés de détecteurs à

à ionisation de flamme.

- le dosage des hydrocarbures isolés est effectué sur le modèle IGC 112 ; les conditions opératoires pour le benzène et le toluène sont

Colonne : en verre, diamètre 1/4 de pouce, longueur 1.8 m, garnissage : 10 % DC 200 sur chromosorb, 80/100 mesh.

Température : injecteur 105 °C, four 95 °C et détecteur 140 °C

Débits : gaz vecteur (azote) = 40 ml/mn ; hydrogène 100 ml/mn et air 300 ml/min.

Pour l'analyse des xylènes et de l'éthyl-benzène, toutes les températures ont été élevées de 20 °C pour réduire la durée des analyses et améliorer la sensibilité.

- le dosage des mélanges d'hydrocarbures tels que l'essence auto est effectué sur le modèle IGC 16, les conditions opératoires sont alors :

Colonne : acier Inox, diamètre 1/8 de pouce, longueur 3 m, garnissage 15 % TCEP + 15 % PEG 400 sur chromosorb P NAW 80/100 mesh.

Température : injecteur 120 °C, four (en programmation de température : température initiale 55 °C maintenue pendant 10 minutes, température finale 140 °C maintenue pendant 20 minutes, vitesse de montée de température 10 °C/min), détecteur 170 °C.

Débits de gaz : azote 40 ml/min, hydrogène 100 ml/min, air 300 ml/min.

II. 1. 1. 2. Dosage des hydrocarbures dans les milieux biologiques

Le principe de dosage est le même que pour les milieux de culture et d'élevage, c'est à dire par l'application de la méthode du Head Space.

Dans un flacon HS préalablement taré, on introduit une certaine quantité de matière fraîche à doser : algues, daphnies, ou morceau de poisson. Après avoir déterminé le poids de matière biologique introduit dans le flacon, on ajoute environ 1 g de perchlorate de magnésium et 0.05 ml d'une solution aqueuse d'un hydrocarbure qui joue le rôle d'étalon interne (celui qui n'est pas dosé dans la circonstance, exemple : dualité benzène-toluène).

La gamme étalon est dans ce cas effectuée de la manière suivante :

Dans des flacons du Head Space, on introduit :

- 1 g de perchlorate de magnésium,
- des quantités variables de solutions aqueuses d'hydrocarbures, à doser de manière à couvrir le poids et la concentration de la matière biologique,
- 0.05 ml de la solution aqueuse d'étalon interne.

Les flacons sont ensuite refermés par des valves Mininert et maintenus pendant 2 heures dans une étuve à 80°C puis une demie-heure à 40°C dans un bain thermostaté.

Le prélèvement de vapeur et le dosage chromatographique sont effectués comme précédemment.

II. 1. 2. Dosage des phénols

Les phénols, métabolites reconnus du benzène ont été recherchés systématiquement dans les milieux contaminés par cet hydrocarbure.

II. 1. 2. 1. Dosage des phénols totaux

Le dosage des phénols totaux (exprimés en mg/l de monophénol) a été effectué sur Autoanalyseur Technicon par la méthode à l'Amino-4 antipyrine, dont le principe consiste en :

Une codistillation des phénols en milieu acide phosphorique et leur révélation dans le condensat par l'Amino-4 antipyrine en présence d'un tampon alcalin contenant du ferricyanure de potassium ; en présence de phénols, le complexe rouge obtenu est photométré à 505 nm.

Cette méthode est plus sensible avec les monophénols qu'avec les diphénols ; en présence de leur mélange, les résultats sont toujours obtenus par défaut comme le signalent JACQUEMAIN R. et coll. (1975).

II. 1. 2. 2. Caractérisation des phénols

La détermination qualitative des phénols produits dans le milieu est faite par chromatographies sur couche mince dans les conditions suivantes :

- Extraction des phénols des milieux de culture

Les milieux biologiques sont d'abord filtrés sur membrane filtrante millipore 0.45 μ m. Le filtrat est ensuite acidifié à pH 3 par l'acide phosphorique dilué puis additionné de chlorure de sodium à raison de 50 g/l. Les extractions sont assurées soit par l'éther diisopropylique, soit par le chlorure de méthylène.

La solution organique séparée, puis séchée sur du sulfate de sodium anhydre, est ensuite filtrée, puis évaporée à sec dans un rotavapor Buchi à 35°C et sous un vide assuré par une trompe à eau.

Le résidu sec est repris dans 1 ml d'acétate de méthyle puis analysé par chromatographie.

- Dosage chromatographique

En chromatographie sur couche mince, nous avons utilisé les feuilles d'aluminium pour CCM couvertes de gel de silice 60 de chez Merck. Le solvant de migration choisi est un mélange préconisé par RANDERATH K. (1971), à savoir, benzène/méthanol/acide acétique dans les proportions 45/8/3.

Les révélations sont effectuées soit par la benzidine diazotée soit par la paranitraline diazotée.

II. 1. 3. Dosage des ions nitrites et nitrates.

Le dosage des ions nitrites et nitrates est effectué sur les milieux filtrés sur membrane filtrante millipore 0.45 μ m HAWP 02500 avec l'autoanalyseur Technicon.

Le dosage des ions nitrites est effectué de la manière suivante : en milieu acide, les ions nitrites donnent avec le sulfanilamide un composé diazoté, qui par copulation avec la N1 naphtyl-éthylène diamine, donne une coloration rouge dont on mesure l'intensité par colorométrie à la longueur d'onde de 550 nm

Les nitrates sont réduits en nitrites, par le sulfate d'hydrazine en présence de sulfate de cuivre, dosés de la même manière que précédemment.

La quantité de nitrate dans le milieu est donnée par la différence entre les dosages des nitrites avant et après réduction des nitrates.

II. 1. 4. Dosage de l'azote organique

Le dosage de l'azote organique est effectué sur les milieux de culture totaux. L'azote organique est transformé en sel d'ammonium par minéralisation selon la méthode de Kjeldahl décrite dans Standard Methods (1971).

L'ammoniac est dosé par l'autoanalyseur technicon selon la réaction de Berthelot ; les sels d'ammonium donnent avec le phénol en milieu sodique et en présence d'hypochlorite de sodium une coloration bleue qu'on mesure par photométrie

II 1 5 Dosage de la chlorophylle. voir page 83

II 1 6 Dosage de l'ATP, voir page 84

II. 2. MATERIEL BIOLOGIQUE

Nous avons retenu pour nos essais quatre espèces d'organismes vivants, trois d'entre elles existant au laboratoire et ayant déjà été proposées par l'Institut Européen d'Ecologie (1976), et étant susceptibles de former une chaîne alimentaire à trois niveaux. Ces espèces sont :

- Chlorella vulgaris B. , souche 211/11b Cambridge : algues chlorophycées, unicellulaires, elles constituent le niveau producteur.
- Daphnia magna St. , souche IRCHA ; ces crustacés cladocères constituent le niveau consommateur primaire.
- Leucaspius delineatus Heck., un poisson cyprinidé, appelé able de Heckel ; il constitue le niveau consommateur secondaire.

La quatrième espèce choisie est un autre consommateur secondaire : le Brachydanio rerio Hamilton Buchanan, cyprinidé appelé parfois le poisson zèbre. Ce poisson est adopté par l'Association Française de Normalisation (AFNOR) pour les essais de toxicité aiguë (norme T 90 303).

Nous l'avons utilisé comme référence pour situer la sensibilité de l'able aux hydrocarbures, mais si pour la plupart de nos tests nous avons utilisé l'able, c'est en raison de sa facilité d'obtention et de son meilleur prix dans la région.

Les trois espèces retenues obéissent à des critères que nous nous sommes fixés, à savoir :

- obtention rapide et aisée en tout temps de quantités suffisantes et homogènes de chaque espèce.
- tolérance mutuelle des individus d'une même espèce (absence de cannibalisme).

- quantification possible des réponses vis-à-vis des toxiques.
- constitution possible d'une chaîne alimentaire expérimentale à 3 niveaux (le poisson peut se nourrir de daphnies et celles-ci peuvent se nourrir de chlorelles).

D'autre part, ces espèces sont particulièrement intéressantes parce que toutes les trois ont déjà servi dans des tests de toxicité des produits pétroliers : Chlorella vulgaris par KAUSS P. B. et HUTCHINSON T. C. (1975) ; Daphnia magna par DOWDEN B. F. (1965) ; ROTHSCHHEIN J. (1970) ; Leucaspius delineatus par ROTHSCHHEIN J. (1970).

II. 2. 1. Les algues

Au niveau des producteurs, nous avons utilisé l'algue Chlorella vulgaris B., souche 211/11b du Centre de culture d'algues et de protozoaires de CAMBRIDGE. C'est un organisme eucaryote, unicellulaire, solitaire, non flagellé, de forme sphérique, dont le diamètre est compris entre 2 et 10 μm .

Cette forme est particulièrement intéressante, car elle rend plus simple l'observation précise de l'évolution des cultures d'algues par un compteur de particules.

La reproduction, n'est pas sexuée ; elle se fait de façon végétative, par la libération de 2, 4, 8 ou 16 autospores, à partir d'une cellule mère (BAYEN M., 1975).

Cette algue a aussi l'avantage d'être bien connue, puisqu'elle a fait l'objet de nombreuses études tant du point de vue biochimique que physiologique (PEARSALL W. H. et LOOSE L. 1937 ; STEEMAN NIELSEN E. et coll. 1962 ; KESSLER E. et coll. 1963 ; BAYEN M. 1975 ; PRATT R. 1943).

Chlorella vulgaris a également été utilisée dans les tests de toxicité de composés chimiques variés par de nombreux auteurs, et en particulier par KAUSS P. B. et HUTCHINSON T. C. (1975) qui ont étudié sa croissance en présence de produits pétroliers.

II. 2. 1. 1. Mode de culture

Le milieu de culture choisi est le milieu LEFEVRE-CZARDA modifié par l'incorporation d'oligo-éléments tel que celui utilisé par LEPAILLEUR H. et coll. (1973) et par FERARD J. F. et MUGEL M. (1978) et dont la composition est donnée dans le tableau n° XXIV.

Composés	Concentration (mg/l)	Composés	Concentration (mg/l)
Ca (NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	40	Cu SO ₄ , 5H ₂ O	0.0015
K NO ₃	100	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.03
Mg SO ₄ , 7H ₂ O	30	Zn SO ₄ , 7H ₂ O	0.03
K ₂ HPO ₄	40	Co Cl ₂ , 6H ₂ O	0.03
Citrate de fer	0.8125	Mn (NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	0.03
Sulfate de fer	0.3125	C ₆ H ₈ O ₇ , H ₂ O	0.03
Perchlorure de fer	0.3125	H ₃ BO ₃	0.03

Tableau n° XXIV : Composition du milieu de culture des algues

Le déroulement des essais se fait dans des pièces thermostatées, la température étant maintenue à $20^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$; les cultures sont éclairées par des tubes fluorescents GROLUX (Sylviana Lifeline) F 40 T 12/GRO. L'intensité de l'éclairage incident à la base des flacons de culture varie de 1 200 à 1 600 Lux.

Une photopériode jour-nuit de 16/8 a été adoptée pour tous les essais (à l'exception de ceux au cours desquels l'influence de la lumière sur la toxicité des hydrocarbures vis-à-vis des algues a été étudiée). Cette photopériode est intéressante parce qu'elle représente un intermédiaire entre :

- la photopériode 20/4 qui permet une croissance rapide des algues, mais un mauvais synchronisme : les algues des différentes cultures ne se divisent pas au même moment ; les histogrammes des tailles des cellules diffèrent d'une culture à l'autre, ce qui rend moins aisée l'exploitation des résultats.

- la photopériode 12/12 où le synchronisme des cultures est bon mais la croissance algale est plus lente, ce qui allonge la durée des expériences.

Les cultures d'algues sont faites de manière axénique. La verrerie et les milieux de culture sont stérilisés au préalable à l'autoclave pendant 30 minutes à 2.5 Bars.

L'inoculum est fait à partir d'une culture témoin en phase de croissance rapide, celle-ci étant suffisamment dense pour donner une concentration initiale de 1 à 2×10^6 cellules /ml.

L'entretien de la souche est assuré par des repiquages fréquents, afin d'avoir toujours disponible, au laboratoire, des cultures témoins en phase de croissance rapide (âge : 5 à 6 jours).

L'influence de la richesse de l'inoculum a également été étudiée, ce qui nous a permis d'adopter pour la plupart de nos essais la concentration initiale de $1 \text{ à } 2 \times 10^6$ cellules/ml. C'est celle qui donne la meilleure réponse vis-à-vis des produits pétroliers dans un délai de temps suffisamment court (4 à 5 jours).

Les produits pétroliers sont ajoutés soit directement, soit sous forme d'une solution aqueuse saturée. Mais dans tous les cas, ils sont ajoutés en dernier lieu, afin d'éviter leur évaporation au moment de l'inoculation.

Les cultures subissent une agitation continue sur un agitateur mécanique (NBS modèle G 10) réglé à 150 oscillations par minute.

Deux modes de culture ont été retenus :

1 - Culture en fioles coniques erlenmeyers de 125 ml, bouchées à l'aide de coton cardé ; cela permet les échanges gazeux entre le milieu de culture et le milieu extérieur, donc permet l'évaporation des substances volatiles et simule ainsi l'action des toxiques dans l'environnement.

2 - Culture en fioles coniques erlenmeyers de 125 ml ou 300 ml à col rodé, bouchées à l'émeri ; celles-ci constituent des systèmes fermés aux échanges de matière entre le milieu de culture et l'environnement, ce qui permet de mieux apprécier l'action des toxiques volatils.

II. 2. 1. 2. Paramètres permettant l'évaluation de la croissance algale

L'examen des variables extensives, couramment utilisées pour apprécier la croissance algale, à savoir :

- nombre de cellules,
- volume total des cellules,
- poids de matière sèche,

- dosage de pigments chlorophylliens, et
- opacimétrie

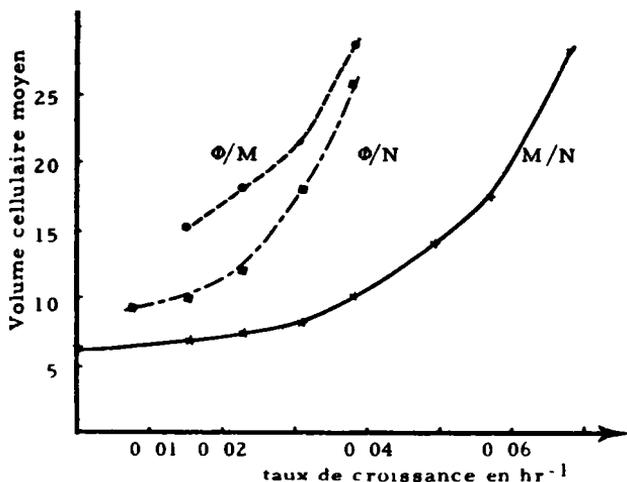
montre que les corrélations de ces variables, deux à deux, présentent des fluctuations qui dépendent de l'âge et du mode de culture. La meilleure corrélation qu'on peut obtenir est celle qui lie le volume total des cellules au poids de matière sèche dans des volumes égaux de la même culture.

Ce résultat est général pour tous les microorganismes. Aussi, par exemple, pour les taux de croissance élevés, on constate en général un accroissement de la masse moyenne des microorganismes dû à une synthèse de "machinerie" cellulaire avant la reproduction, (WILLIAMS F. M. 1971). Pour les algues, ceci se traduit par une grande production de chlorophylle qui constitue une partie importante de cette "machinerie".

Les graphiques de la figure n° 4 représentent les covariations du taux de chlorophylle, du poids de matière sèche et du nombre de cellules, en fonction du temps pour Chlorella pyrenoidosa Chick de la collection de l'université de Indiana (WILLIAMS F. M. 1971).

Figure n° 4 :

Covariation de la teneur en chlorophylles (Φ), de la biomasse (M) et du nombre de cellules (N).



Au cours de cette étude, les effets d'une substance toxique sont appréciés par les différences entre cultures intoxiquées et cultures témoins effectuées simultanément dans les mêmes conditions.

L'évolution des cultures témoins et intoxiquées est suivie :

- systématiquement par la numération des cellules à l'aide d'un compteur de particules "Coulter" et par l'exploitation de l'histogramme de taille des cellules qui permet de visualiser le synchronisme des cultures, et de calculer le volume total des cellules par unité de volume du milieu de culture. Le calcul du volume total de cellules n'est nécessaire qu'en cas de non synchronisme.

- quand c'est nécessaire, les paramètres suivants ont été également évalués :

- . dosage des pigments chlorophylliens après extraction,
- . évaluation de l'azote nitrique disparu,
- . dosage de l'azote organique synthétisé,
- . mesure de la densité optique des cultures.

II. 2. . 2. 1. Numération des cellules

La détermination du nombre de cellules par unité de volume est faite par le compteur de particules "Coulter", modèle ZB (Coultronics).

Une partie aliquote de la suspension algale (0.05 à 0.2 ml), dont on veut évaluer la concentration, est diluée dans 25 ml d'un électrolyte standard, dépoussiéré, préconisé par Coultronics (Isoton II). Le comptage est effectué sur 0.5 ml de la suspension diluée dans l'électrolyte.

Le réglage de l'appareil est fait de telle sorte que toutes les particules de diamètre supérieur ou égal à 2 μ m, soient prises en compte.

II. 2. 1. 2. 2. Extraction et dosage des pigments chlorophylliens

Chlorella a la réputation d'avoir une paroi cellulaire très résistante, ce qui rend difficile et incomplète l'extraction des pigments chlorophylliens de cette algue, par les solvants couramment utilisés, comme l'acétone 90 % et le méthanol pur (FERARD J. F. et MUGEL M. 1978 ; WILLIAMS F. M. 1971 ; STEEMAN NIELSEN E. 1961).

Nous avons cherché un solvant qui donne une extraction complète et rapide des pigments chlorophylliens. Notre choix s'est porté sur le DMSO (diméthylsulfoxyde) qui donne une extraction complète de la chlorophylle en 30 minutes.

Mode opératoire : 10 ml de la solution algale à doser sont filtrés sur membrane filtrante millipore 0.45 μ m/HAWP 02500. La membrane filtrante est introduite avec les algues dans un tube à essai. On ajoute ensuite du DMSO et le tube est agité pendant 1 minute environ jusqu'à dissolution complète du filtre. Après 30 minutes de repos dans l'obscurité, la densité optique de la solution est mesurée par l'intermédiaire d'un spectrophotomètre

optique Perkin Elmer à double faisceau modèle Coleman 124 D à des lumières de longueur d'onde 665 nm, 645 nm et 750 nm, comme pour les dosages classiques de la chlorophylle. (STANDARD METHODS 1971, RODIER I. 1974).

Nous avons surtout cherché à comparer les cultures traitées aux cultures témoins, effectuées dans les mêmes conditions, sans déterminer la quantité exacte des pigments dans chaque culture.

II. 2. 1. 2. 3. Dosage de l'ATP

Le comptage des algues par le compteur Coulter donne le nombre de particules en suspension dans le milieu analysé sans distinction entre cellules vivantes, cellules mortes, fragments de cellules ou autres particules inertes en suspension dans le milieu.

Il en va de même de la mesure du poids de matière sèche.

La détermination de la biomasse par son activité, tel que le dosage de l'ATP par exemple, est un excellent moyen d'apprécier les effets immédiats d'un toxique.

Principe : l'ATP (ou Adénosine Triphosphate) est une molécule fondamentale dans les activités biologiques :

- elle est synthétisée au cours de la chaîne de réactions d'oxydation des substrats, et son utilisation par la cellule est immédiate.
- elle est absente de toute cellule morte.

Donc son dosage dans un milieu est une mesure de la biomasse et de son activité dans ce milieu, (BAUDIN G. et SANTONI B. 1977).

Le dosage est effectué par voie enzymatique. En présence d'ions magnésium Mg^{++} et d'ATP, la luciférine est oxydée par l'oxygène de l'air sous l'action catalytique de la luciférase. La réaction s'accompagne d'une émission de photons. L'intensité de lumière ainsi produite est proportionnelle à la quantité d'ATP.

Mode opératoire : La mesure de l'ATP comporte deux étapes : l'extraction et la mesure.

a) - Extraction de l'ATP

L'extraction est faite par une solution de DMSO à 90 % dans de l'acide morpholino-propane sulfonique (ou MOPS) 0.1 M, de la manière suivante :

Dans un tube à essai de 50 ml sont introduits :

- 1 ml de la culture d'algues à doser, et 9 ml de la solution DMSO - MOPS.

- après agitation de 30 secondes, et un repos de 2 minutes, on ajoute 40 ml de tampon, DMSO - MOPS.

Les tubes sont placés dans un congélateur, immédiatement après leur préparation.

Les mesures sont effectuées en série après la préparation de tous les échantillons à doser.

b) - Mesure de l'ATP

Une solution de réactifs contenant le complexe Luciférine-Luciférase et les ions Mg^{++} est préparée extemporanément.

La lecture est faite en ajoutant 0.1 ml de la solution de

réactifs à 1 ml de l'extrait placé dans l'appareil de mesure (Luminescence Biometer 760 DUPONTS Instruments).

Nous avons exprimé la quantité d'ATP dans les milieux intoxiqués en pourcentage de la quantité d'ATP présente dans le même volume d'une culture témoin effectuée dans les mêmes conditions.

II. 2. 2. Les consommateurs primaires

L'espèce adoptée à ce niveau est la daphnie (Daphnia magna Str. , souche 1820 fournie par l'IRCHA).

C'est un crustacé qui peut atteindre à l'état adulte la taille de 5 mm. La daphnie vit habituellement dans les eaux stagnantes ou à cours lent des zones tempérées.

C'est un organisme filtreur qui se nourrit de matières en suspension telles que : algues, bactéries, ou détritux de végétaux

Dans les conditions optimales de température et de milieu, l'espérance de vie d'une jeune daphnie est de 45 jours, et la reproduction se fait essentiellement par voie parthénogénétique.

La daphnie peut pondre en une seul fois de 1 à 40 oeufs qui vont séjourner et se développer dans une poche incubatrice dorsale. Au bout de 2 ou 3 jours, les jeunes daphnies vivipares sont évacuées dans le milieu ambiant. Elles commencent à leur tour à se reproduire à partir du 10^{ème} jour de leur vie.

Une des particularités de la daphnie est son système de régulation du taux de l'hémoglobine dans le sang. Ce dernier varie dans les

proportions de 1 à 20. selon la quantité d'oxygène disponible dans le milieu. Elle peut tolérer des milieux où la concentration de l'oxygène dissous peut descendre jusqu'à 15 % de la saturation. FOX H. M. (1957)

II. 2. 2. 1. Conditions d'élevage :

Les élevages sont effectués dans une pièce thermostatée, à $20 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. La photopériode jour/nuit de 16/8 a été choisie pour l'éclairage de cette pièce, l'intensité lumineuse étant maintenue à environ 400 Lux.

Le milieu d'élevage est constitué par un mélange d'eau de source (Volvic, source Clairvic) et du milieu LC + oligo (milieu de culture des algues) dans les proportions 3/5 + 2/5, comme cela a déjà été utilisé par ailleurs (FERARD J. F. et MUGEL M. 1978).

Les daphnies sont nourries par des chlorelles. Un certain nombre d'auteurs : BOURNE N. F. (1959) ; Mc MAHON J. W. et RIGLER F. H. (1963) ont établi que la daphnie a besoin de 0.2 à $0.5 \cdot 10^6$ chlorelles par individu et par heure. Dans nos expériences, la ration alimentaire des daphnies a été portée à 1×10^6 cellules par individu et par heure, afin que la nourriture ne soit pas un facteur limitant.

Les milieux d'élevage sont renouvelés au moins une fois par semaine ; les élevages sont gérés de manière à avoir pour chaque essai de toxicité des lots homogènes de jeunes daphnies.

L'âge des jeunes daphnies utilisées dans nos essais, est sauf pour des études particulières, de 6 à 7 jours. Cette tranche d'âge est particulièrement intéressante car elle se situe avant la première portée et permet, tout en réduisant la durée des expériences de voir l'effet des toxiques sur la reproduction.

II 2 2 2 Paramètres d'étude d'une population de daphnies

II 2 2 2 1 L'immobilité

C'est le critère habituellement pris en considération dans les tests daphnies, normalisés comme la norme AFNOR T 90 301 (1974), il est considéré comme représentatif de la mortalité car, dans de nombreux cas d'intoxications, l'immobilité est irréversible. Sa représentativité du critère de mort est discutable dans le cas d'intoxication par des composés volatils tels que les hydrocarbures légers. En effet des daphnies, même immobilisées pendant un ou deux jours, peuvent récupérer et se remettre à nager normalement si la concentration de toxique n'est pas trop élevée.

Dans nos essais, nous avons surtout tenu compte .

- 1) du taux de reproduction
- 2) de l'évolution du poids des daphnies

II. 2. 2. 2. Evaluation du taux de reproduction

Le taux de reproduction est appliqué aux daphnies qui arrivent à la maturité sexuelle. Il s'exprime par le nombre de petites daphnies produites par daphnie adulte présente et par jour.

Dans la plupart des cas, les petites daphnies produites ont été comptées tous les deux jours et isolées du milieu des adultes. Les daphnies mortes au moment du comptage, ont également été comptées et isolées du milieu.

Dans nos expériences, nous avons rapporté le nombre de petits produits au nombre de daphnies mères vivantes, au moment d'un comptage et à l'issue du comptage précédent, divisé par le nombre de jours séparant les deux comptages, soit .

$$r = \frac{P_t}{\frac{(D_t + D_{t-1})}{2} \times \frac{(t - t-1)}{24}}$$

Où:

- r = taux de reproduction
- P_t = nombre de petits comptés au temps t
- D_t = daphnies mères vivantes au temps t
- D_{t-1} = daphnies mères vivantes au temps $t-1$
- t = moment du comptage actuel (heures)
- $t-1$ = instant du comptage précédent (heures)

II. 2. 2. 2. 3. Evaluation du poids des daphnies

La comparaison des poids de daphnies intoxiquées et témoins élevées dans les mêmes conditions, est un critère qui traduit la prise de nourriture, ou l'état métabolique général.

Les daphnies sont isolées de leur milieu, puis lavées sur un filtre avec du milieu d'élevage puis avec de l'eau déminéralisée, l'élimination de l'eau est assurée par son soutirage rapide à l'aide d'une pompe.

Les daphnies ainsi lavées et séchées, sont comptées et pesées, le poids ainsi mesuré constitue le poids de matière fraîche (c'est sur cette matière que sont effectués les dosages des divers hydrocarbures, car un séchage plus poussé entraînerait leur évaporation).

Pour la détermination du poids de matière sèche, les daphnies lavées et séchées comme précédemment sont mises dans un verre de montre puis placées dans une étuve à la température de 105°C pendant 4 heures. après refroidissement dans un dessiccateur, les daphnies sont comptées et pesées.

II 2 3 Les consommateurs secondaires

Au niveau consommateur secondaire, nous avons choisi un cyprinidé, l'able de Heckel (*Leucaspius delineatus* H). C'est une espèce grégaire qui affectionne les eaux calmes et à cours lents. Elle vit principalement en Europe Centrale et Orientale. Mais on la rencontre également en France, dans les départements du Nord et du Nord-Est. Elle se nourrit d'algues et de zooplanctons. La période des portées se situe au printemps. La taille de ce poisson peut atteindre 5 à 8 cm et sa durée de vie est d'environ 3 ans.

II. 2. 3. 1 Conditions d'élevage

Les ables que nous avons utilisés proviennent d'un étang artificiel de 8.4 hectares, situé à 80 km au nord de Metz, dans une région agricole que l'on suppose indemne de toute pollution. Ils vivent en bandes importantes, servent de poisson fourrage et sont très appréciés comme vif pour la pêche à la truite.

Dès leur arrivée, les poissons sont acclimatés aux conditions du laboratoire : température, eau, nourriture. Les élevages sont réalisés dans une pièce prévue à cet effet, thermostatée à 13°C. Ils sont placés dans des aquariums (50 x 50 x 15), équipés d'oxygénateurs et contenant 25 litres d'eau de ville préalablement brassée et stabilisée à la température de 13°C. Ils sont généralement nourris de daphnies provenant des élevages, ou de daphnies séchées, achetées dans le commerce.

II. 2. 3. 2. Paramètre d'étude

Le seul critère biologique retenu pour l'évaluation des risques toxiques vis à vis de l'able est la mortalité, critère simple, et facile à apprécier.

CHAPITRE III

EVOLUTION ABIOTIQUE DE LA CONCENTRATION DES HYDROCARBURES DANS L'EAU

Il est établi en toxicologie classique, que les paramètres, dose et durée d'action d'un toxique sont déterminants d'un effet biologique donné

Quand la concentration du toxique appliqué à un organisme vivant n'est pas constante mais évolue au cours du temps, les effets biologiques observés sont étroitement liés à la concentration initiale et à la manière dont elle évolue

III. 1 GENERALITES

La thermodynamique nous apprend que les gaz ont tendance à occuper tout le volume qui leur est offert. Ainsi l'émission de tout polluant volatil se poursuit par sa diffusion et sa répartition dans l'environnement

Un hydrocarbure déversé dans l'eau ou sur le sol aura donc tendance à s'évaporer. La vitesse d'évaporation peut être exprimée par une loi de la forme

$$\frac{dC}{dt} = K (p_i - p_{100}) C$$

où

C : concentration de l'hydrocarbure dans le milieu

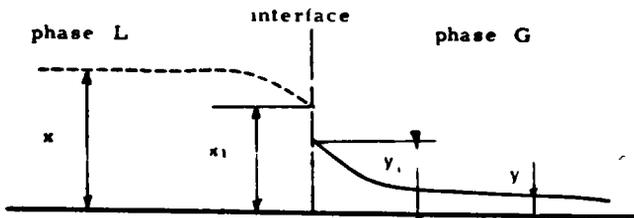
- t le temps
- K coefficient dépendant des conditions expérimentales
- P_{100} pression partielle de l'hydrocarbure dans l'atmosphère à une grande distance du lieu de versement.
- P_1 tension de vapeur de l'hydrocarbure à l'interface liquide-vapeur. la variation de p_1 avec la température est donnée par l'équation de Clausius Clapeyron $d \ln(P) / dT = L/RT^2$

La vitesse d'évaporation peut être exprimée également par une loi plus générale qui décrit le transfert de masse entre deux phases (PERRY R H et CHILTON C H 1973) En effet, quand on introduit un soluté dans l'une des deux phases (L et G) en contact, celui-ci a tendance à se répartir entre ces deux phases; la vitesse de migration du soluté est donnée par la relation

$$\frac{dx}{dt} = K_L (x - x_1) = K_G (y_1 - y)$$

où

- K_L coefficient de transfert dans la phase L
- K_G coefficient de transfert dans la phase G
- x concentration du soluté dans la phase L, loin de l'interface
- x_1 concentration du soluté dans la phase L, à l'interface
- y_1 concentration du soluté dans la phase G, à l'interface
- y concentration du soluté dans la phase G, loin de l'interface
- $\frac{dx}{dt}$ variation de la concentration du soluté dans la phase L au cours du temps.



L'intégration des deux équations précédentes conduit à l'expression suivante :

$$C = C_0 e^{-\lambda t}$$

où :

C : concentration de l'hydrocarbure restant dans le milieu au temps **t**

C₀ : concentration initiale de l'hydrocarbure dans le milieu

λ : une constante dépendant des conditions opératoires telles que agitation, température, aération, surface d'échange.

III. 2. Paramètres influençant l'évolution de la concentration d'un hydrocarbure dans l'eau

Il est établi en génie chimique que les phénomènes d'échange de matière entre deux phases sont influencés par plusieurs paramètres tels que la température, la surface d'échange, la masse des deux phases et les concentrations du soluté.

Dans ce chapitre, nous allons examiner de quelles manières évoluent les concentrations du benzène et du toluène, dans des conditions couvrant largement les conditions expérimentales des tests biologiques faits au cours de cette étude.

Sur le tableau n° XXV, nous avons rassemblé les paramètres influant sur l'évaporation des hydrocarbures, ainsi que les gammes de valeurs dans lesquelles nous avons fait évoluer ces paramètres

Paramètres	gammes de valeurs couvertes dans ces essais.	gammes de valeurs couvertes par les essais de toxicité
<u>Concentration initiale</u> en % de saturation	0 à 100	0.3 à 50
<u>Section d'échange</u> (surface libre du liquide) en cm ²	1.77 à 3050	1.77 à 1770
<u>rapport S.V</u> <u>section d'échange</u> . cm ⁻¹ <u>volume du liquide</u>	0.05 à 3	0.1 à 1.4
<u>agitation</u> nb d'oscillations/minute	0 à 300	0 à 150
<u>température</u> en °C	16 à 24	18 à 20
<u>aération</u> litre d'air/heure	0 à 100	0 à 20

Tableau n°XXV . Paramètres influant sur l'évolution de la concentration d'un hydrocarbure dans l'eau: gammes de valeurs couvertes dans cette étude.

III 3. Evolution de la concentration du benzène et du toluène dans l'eau en système ouvert

III 3 1. Influence de la température et de la concentration initiale

Trois solutions aqueuses de benzène ou de toluène de concentrations respectives 10 , 50 , et 200 ppm, sont introduites dans une série de 18 bechers (de forme cylindrique, de diamètre intérieur 87 mm et de capacité 600 ml), à raison de 200 ml par becher et trois bechers par solution

Les bechers sont ensuite placés dans des enceintes

thermostatées où les températures sont maintenues à 16, 20 et 24°C
L'évolution de la concentration de chaque hydrocarbure dans l'eau est suivie par une série de prélèvements et dosages successifs pendant 72 heures.

L'évolution de la concentration de chaque hydrocarbure est représentée sur le tableau n° XXVI et sur la figure n° 5

Dans tous les cas, on note une diminution de la concentration de l'hydrocarbure dans l'eau, qui est due à son évaporation, et semble suivre une loi exponentielle de la forme

$$C = C_0 e^{-\lambda t}$$

où λ est un facteur qui dépend des conditions opératoires telles que (agitation aération, surface d'échange, volume de liquide, température, ...).

Pour les essais que nous avons effectués, les variations de λ avec la température pour le benzène et le toluène sont reportées sur le tableau n° XXVII

Température	Benzène	Toluène
16°C	0.13 \pm 0.02	0.10 \pm 0.02
20°C	0.16 \pm 0.03	0.13 \pm 0.02
24°C	0.20 \pm 0.01	0.15 \pm 0.02

Tableau n° XXVII Valeurs de λ en (heure)⁻¹ pour le benzène et le toluène à 3 températures différentes

temps (heures)	Benzène (mg/l)			Toluène (mg/l)		
	10	50	200	10	50	200
0	10	50	200	10	50	200
1	9	46	170	9.2	44	190
2	7.5	40	160	8.4	40	175
4	5.6	32	125	6.6	34	140
8	2.8	19.5	60	4.2	20	85
16	1.3	5.5	24	1.5	8.4	40
24	0.3	2	8.5	0.8	3.7	17
48	0.05	0.1	0.4	0.06	0.3	1.2
72	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.5

Tableau n° XXVI : Evolution de la concentration du benzène et du toluène à 16°C dans des flacons ouverts.

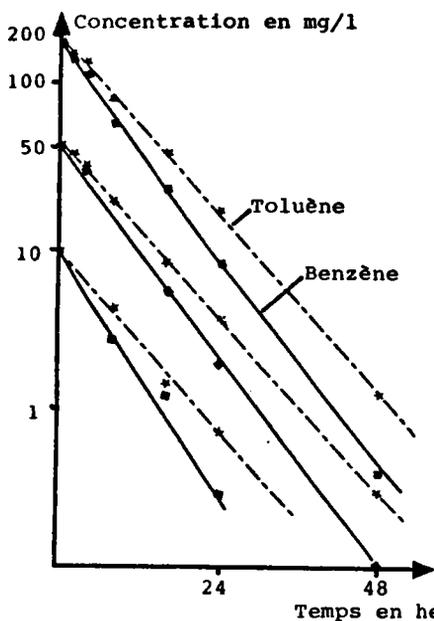


Fig. n° 5a : Evolution de la concentration de benzène (■) et de toluène (●) au cours du temps (évaporation libre).

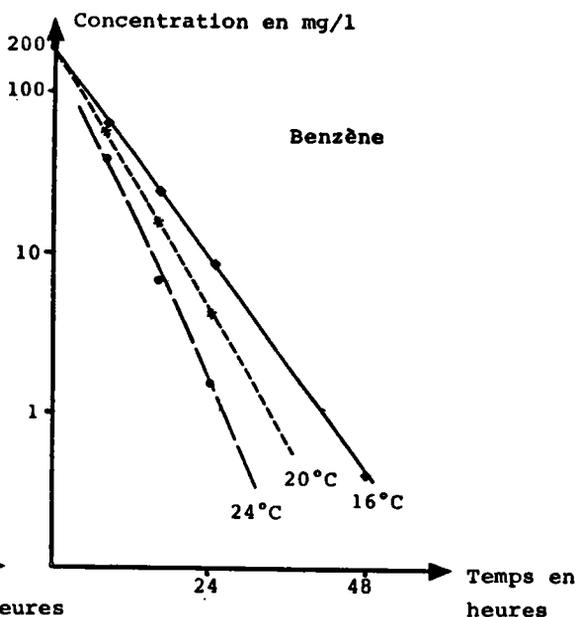


Fig. n° 5b : Evolution de la concentration de benzène dans l'eau au cours du temps en fonction de la température.

III. 3. 2. Influence de la surface d'échange et du volume du milieu sur la vitesse d'évaporation des hydrocarbures

Dans tous les phénomènes de transfert de masse entre deux phases, la vitesse de transfert est proportionnelle à la surface d'échange portée à une certaine puissance x .

Dans ce paragraphe, nous avons étudié l'influence de la taille de la surface libre du liquide sur la vitesse d'évaporation des hydrocarbures en solution,

Mode opératoire : Dans des flacons de laboratoire, de formes et de capacités différentes, nous avons introduit des quantités variables de la même solution aqueuse de benzène à la concentration de 175 ppm, afin d'obtenir plusieurs valeurs du rapport surface libre du liquide/volume du liquide.

L'évolution de la concentration du benzène dans chaque récipient a été déterminée par dosage chromatographique par la méthode du Head Space.

Résultats : Les résultats de ces essais sont groupés dans le tableau n° XXVIII, où E/xh représente la quantité de benzène évaporé au cours de x heures, et elle est exprimée en % de la quantité de benzène mise initialement en jeu.

L'ajustement linéaire de $\text{Log } E$ à $\text{Log}(S/V)$ donne la relation suivante (figure n° 6) :

$$\text{Log } E = - 0.86 + 0.984 \text{ Log } (S/V)$$

E évaporation en une heure de la quantité initialement introduite dans le milieu, exprimée en %.

S/V rapport de la surface libre du liquide et de son volume exprimé en m^{-1} .

S m ² . 10 ⁻⁴	V m ³ . 10 ⁻⁶	$\frac{S}{V}$ m ⁻¹	E/1h %	E/2h %	temps de 1/2 séjour en heures	
3.14	55	6	2.8	8.6	24.3	15.3
1.77	27	6	2.3	4.6	29.6	29.3
1.77	17	10	3.4	5.7	19.9	23.5
3.14	30	10	4.5	17.1	15	7.4
18.9	100	19	6.3	18	10.6	7
3.14	14.5	22	8	37	8.3	3
18.9	80	23	11.4	22	5.7	5.5
1.77	6	29	12	24	5.4	5
60	200	30	15	20	4.2	6.2
18.9	50	38	20	38	3.1	2.9
65	100	65	28.2	44	2.2	2.4
3.14	45	69	29	68.5	2	1.2
1.77	2.5	70	16	51	4	1.9
18.9	25	76	43	70	1.2	1.1
95	100	95	34.3	57.8	1.6	1.6
65	50	130	45.7	94	1.1	0.5
66.5	50	133	54.3	86	0.8	0.7
141	100	141	56	95.4	0.8	0.5
141	50	282	63	99	0.7	0.3

Tableau n° XXVIII : Influence de la surface libre du liquide et du volume de la phase aqueuse sur l'évaporation libre du benzène.

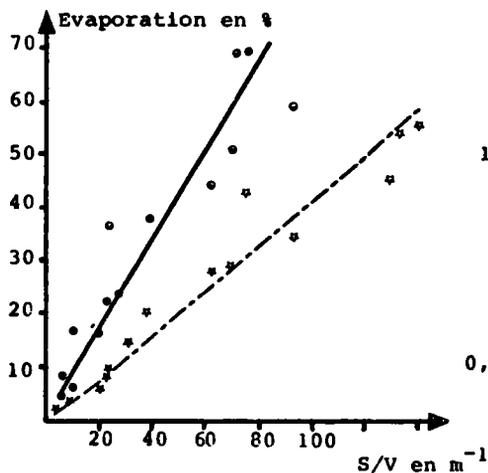


Figure n° 6 : Variations de l'évaporation en fonction du rapport S/V.

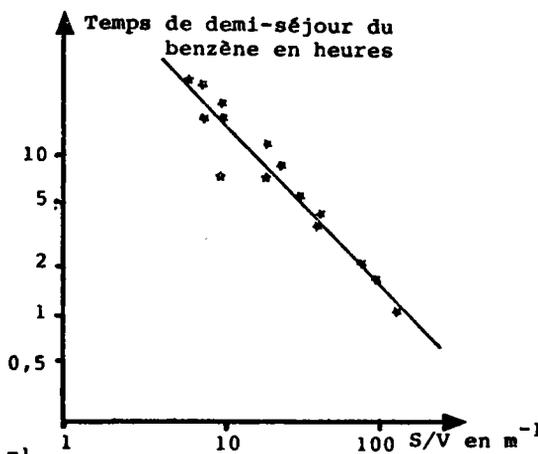


Figure n° 7 : Temps de 1/2 séjour en fonction du rapport S/V.

Evolution du temps de 1/2 séjour du benzène dans l'eau en fonction du rapport (S/V).

Les temps de 1/2 séjour sont calculés d'après les résultats de l'expérience précédente, par la relation suivante :

$$\tau_1 = \frac{0.69}{\text{Log} \left(\frac{100 - E1}{100} \right)}$$

$$\tau_2 = \frac{0.69 \times 2}{\text{Log} \left(\frac{100 - E2}{100} \right)}$$

τ_1 et τ_2 , temps de 1/2 séjour, sont estimés successivement par les évaporations E1 (en 1 heure) et E2 (en 2 heures).

Les résultats obtenus sont reporté sur le tableau n° XXVIII et sur la figure n° 7

L'ajustement linéaire de $\text{Log } \tau$ à $\text{Log} (S/V)$ donne la relation suivante :

$$\text{Log } \tau = 5.19 - 1.09 \text{ Log} (S/V)$$

τ : temps de 1/2 séjour du benzène dans l'eau exprimé en heures .

Remarques :

1) Les évolutions de la concentration mentionnées jusqu'à présent ont été faites à température constante et sans agitation.

2) Les déviations relativement importantes observées au cours de cette 2^{ème} expérience sont dues à des effets de parois. En effet certains essais ont été effectués dans des tubes à essais, où la surface de liquide est surmontée d'un long cylindre en verre qui gêne la diffusion de l'hydrocarbure dans l'atmosphère, et ralentit son évaporation.

3) A surface d'échange égale, l'évolution de la concentration dépend du volume de milieu. Ainsi, à 20°C et pour une surface d'échange de $18,9 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$ Nous avons trouvé, entre évaporation et volume du milieu la relation suivante

$$\text{Log } E = - 2,72 - 0,64 \text{ Log } V$$

soit .
$$E = \frac{0,066}{V^{0,64}}$$

E : quantité d'hydrocarbure évaporé en 2 heures, exprimée en pourcentage de la quantité initiale

V : volume du milieu exprimé en m^3

(corrélation établie pour 10 couples de données avec pour valeur de r^2 0,99)

III 3 3 Influence de l'agitation sur l'évaporation du benzène

Comme nos cultures d'algues sont agitées, nous avons étudié l'influence de l'agitation sur l'évaporation du benzène

Mode opératoire dans des fioles coniques de même forme et de même capacité (300 ml), nous avons introduit dans chacune 100 ml d'une solution aqueuse de benzène à 175 ppm. Ces fioles sont ensuite placées sur une table d'agitation type NBS modèle G 10

L'évaporation du benzène a été suivie par le dosage du benzène restant dans le milieu, en fonction du temps et de la fréquence d'oscillation

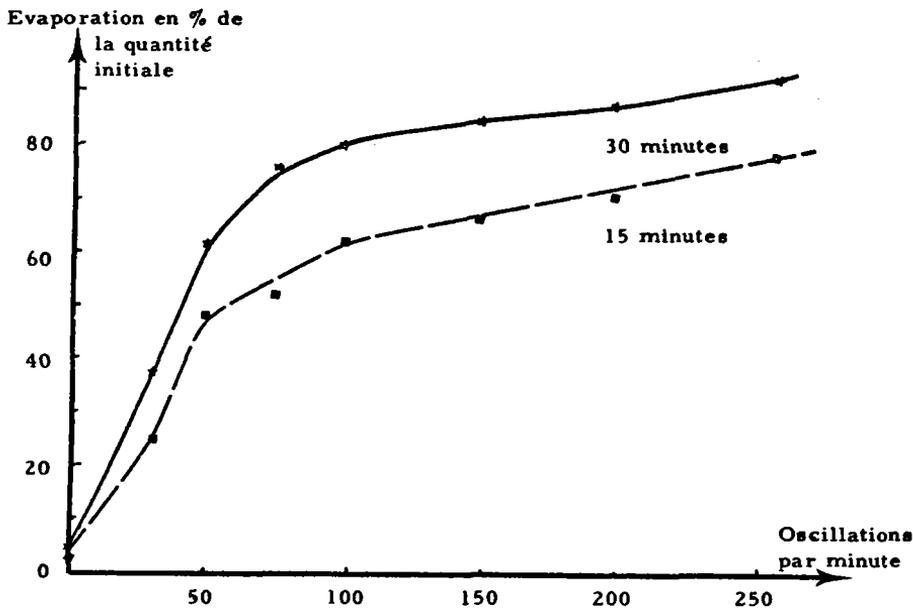


Figure n° 8 : Variations de l'évaporation du benzène en fonction de la fréquence d'agitation

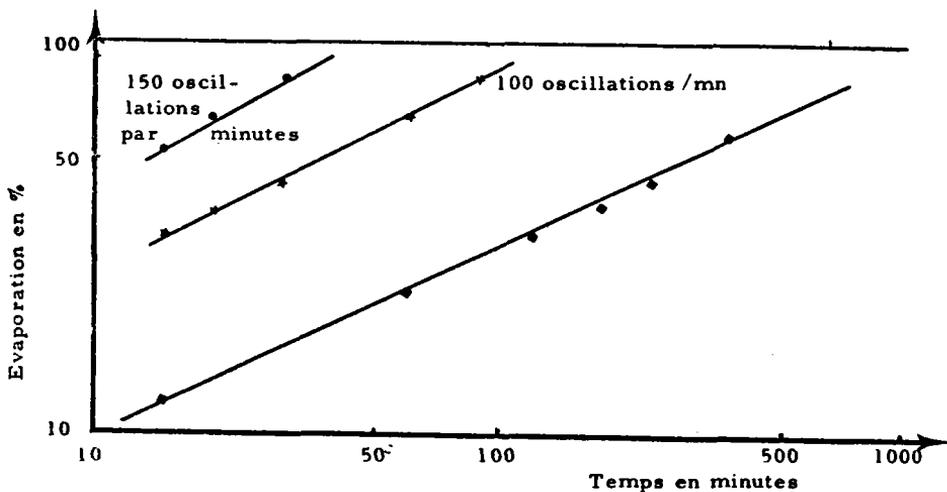


Figure n° 9 : Evaporation du benzène en fonction du temps et de la fréquence de l'agitation.



de l'agitation Les figures n° 8 et n° 9 représentent les variations de l'évaporation en fonction du temps et de la vitesse d'agitation.

III 3 4 Effet de l'aération sur l'évaporation du benzène

L'aération, son mode et son débit, agissent sur la surface d'échange air-eau, et sur la vitesse d'évaporation de l'hydrocarbure.

A titre d'exemple, nous avons examiné l'influence du débit d'air de bullage dans une solution aqueuse de benzène sur le taux d'évaporation de celui-ci

Le tableau n° XXIX, montre l'évolution du taux d'évaporation du benzène en fonction du temps et du débit d'aération. L'évaporation augmente de façon significative avec le débit d'air

temps en mn	10 l/heure	20 l/heure	80 l/heure
0	0	0	0
5	4.5	6	8
10	11	15	18
15	18	26	37
20	24	39	73
25	30	57	73
30	40	80	94
60	80	98	99
99	94	99	-
120	98.5	-	-
240	99.77	-	-

Tableau n° XXIX : Influence de l'aération sur l'évaporation du benzène

III. 4 SYSTEME FERME

Dans le paragraphe précédent, nous avons vu que la concentration d'un hydrocarbure dans l'eau diminue au cours du temps et, en outre, la vitesse de cette diminution dépend de nombreux facteurs tels que température, surface libre de liquide, volume du milieu, forme du contenant, agitation, aération.

Afin de limiter le nombre de paramètres, qui doivent être contrôlés au cours d'essais de toxicité, nous nous sommes proposés d'étudier l'évolution de la concentration des hydrocarbures dans les flacons fermés.

Les essais effectués nous ont montré que la concentration de l'hydrocarbure dans le milieu évolue vers une concentration d'équilibre, qui dépend seulement de la température, de la concentration initiale, et de la fraction : volume occupé par le liquide/volume total offert. On peut remarquer figure n° 10 et n° 11 que pour la gamme de concentration et de fraction de volume occupé que nous aurons à utiliser le plus souvent dans nos tests de toxicité (à savoir $VL/VT \geq 0.3$ et $8 \leq C_0 \leq 20$ ppm), la concentration de l'hydrocarbure dans l'eau à l'équilibre peut être estimée avec une très bonne approximation par les relations

$$CL = C_0 \times \left(0.5 + 0.5 \frac{VL}{VT} \right) \text{ pour le benzène}$$

$$CL = C_0 \times \left(0.55 + 0.45 \frac{VL}{VT} \right) \text{ pour le toluène}$$

où CL représente la concentration du solvant dans la phase liquide, à l'équilibre

Figure n° 10 :
 Concentration
 du benzène
 dans l'eau à
 l'équilibre
 en fonction de
 C_0 et du rapport
 V_L/V_T

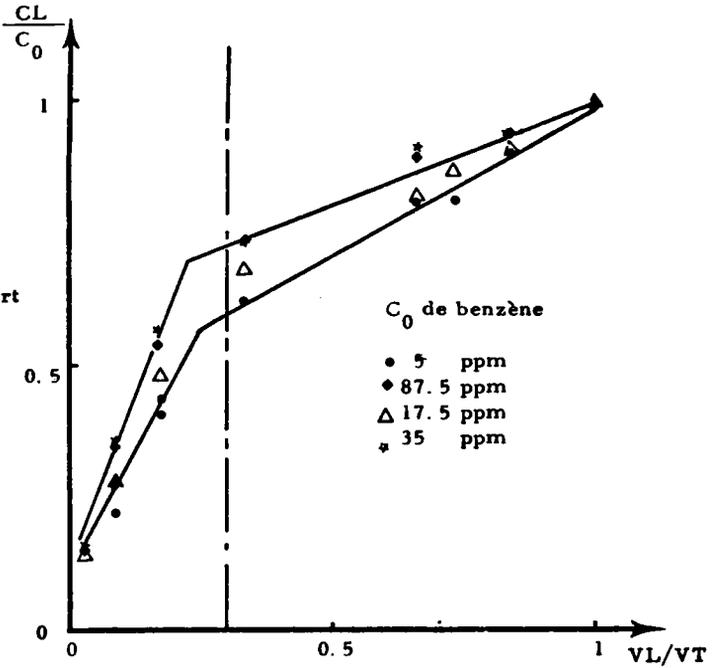
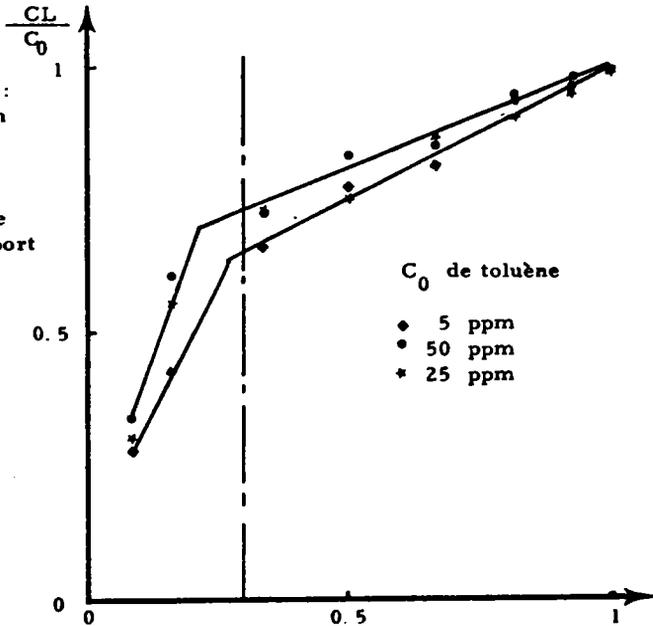


Figure n° 11 :
 Concentration
 du toluène
 dans l'eau à
 l'équilibre
 en fonction de
 C_0 et du rapport
 V_L/V_T



III 5 Solubilité du benzène et du toluène dans l'eau

Comme les hydrocarbures sont souvent utilisés sous forme de mélanges, nous avons recherché les variations de la solubilité du benzène et du toluène, en fonction de leur concentration dans un mélange d'hydrocarbures.

Quand on prend des mélanges binaires de benzène et de toluène de composition variable, et que l'on met ce mélange au contact de l'eau, on constate que les quantités de benzène et de toluène solubilisés varient linéairement avec leur concentration dans le mélange d'hydrocarbures. Le tableau n° XXX et la figure n° 12 montrent que la solubilité du benzène dans l'eau peut être exprimée par la relation suivante

$$B_e = 1750 B_h$$

B_e solubilité du benzène dans l'eau en mg/l

B_h fraction du benzène dans le mélange d'hydrocarbures

De même, la solubilité du toluène peut être exprimée par une relation analogue

$$T_e = 505 T_h$$

où

T_e solubilité du toluène dans l'eau

T_h fraction de toluène dans le mélange d'hydrocarbures

Cette variation linéaire de la solubilité du benzène et du toluène avec leur concentration dans un mélange d'hydrocarbures a été vérifiée par l'intermédiaire d'une essence pour voiture automobile "le super carburant"

Concentration dans le mélange d'hydrocarbures (en volume)		Concentration de benzène dans l'eau en mg/l	Concentration de toluène dans l'eau en mg/l
benzène	toluène		
1	0	1750	0
0	1	0	505
0.8	0.2	1380	105
0.5	0.5	900	250
0.2	0.8	360	410
0.1	0.9	200	455

Tableau n° XXX : Evolution de la solubilité du benzène et du toluène dans l'eau en fonction de leur concentration dans un mélange d'hydrocarbures.

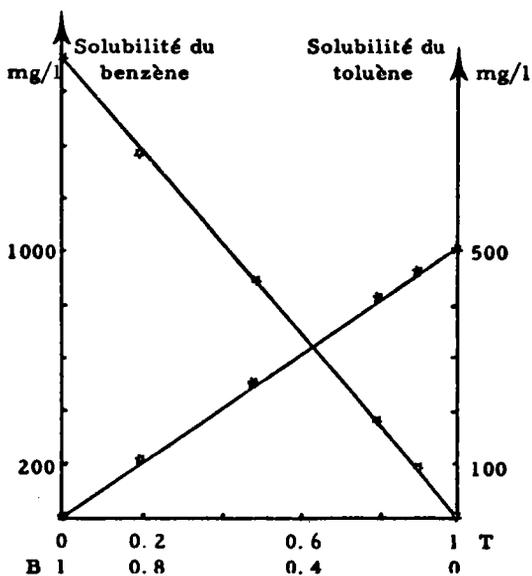


Figure n°12 : Solubilité du benzène dans l'eau - en présence du toluène.

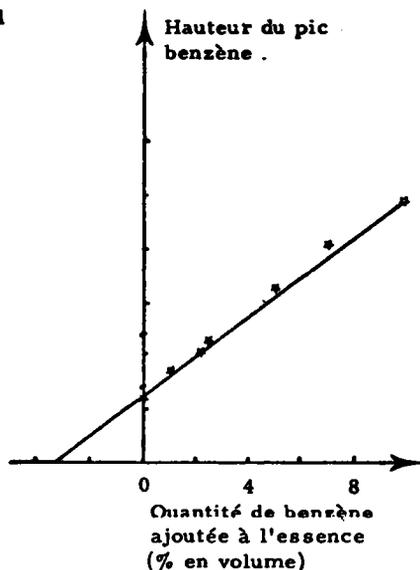


Figure n°12b : Solubilité du benzène dans l'eau, en présence de l'essence

En effet, lorsqu'on ajoute du benzène ou du toluène à de l'essence, on constate après mise en contact du mélange avec de l'eau que la quantité de benzène ou de toluène solubilisés par l'eau croît linéairement avec les concentrations de ces composés dans le mélange. Sur le tableau n° XXXI, nous avons reporté la hauteur du pic du benzène de la fraction soluble dans l'eau de l'essence, en fonction de la quantité de benzène ajoutée à ce carburant.

Quantité de benzène ajoutée exprimée en %	Hauteur du pic benzène dans le chromatogramme
0	2 480
1	3 465
2.3	4 190
2.5	4 410
5	6 514
7.5	8 100
10	9 740

Tableau n° XXXI : Evolution de la solubilité du benzène dans l'eau en fonction des quantités de ce composé ajouté à l'essence.

La représentation graphique de ces valeurs (figure n° 12b) montre qu'il est ainsi possible de déterminer la concentration initiale de benzène dans l'essence. (c'est une application de la méthode des ajouts).

Remarque : Par suite de l'augmentation de la solubilisation des aromatiques monocycliques avec l'accroissement de leur concentration dans un mélange d'hydrocarbures telle que nous venons de le voir, et de l'enrichissement des essences en composés aromatiques du fait de l'évaporation sélective des fractions les plus volatiles tel que cela peut être déduit des travaux de

MAYRSOHN H. et coll. (1975) et de RUNION H. A. (1975), il est permis de penser qu'une augmentation de la toxicité des fractions solubles des produits pétroliers est en partie due à leur enrichissement en composés aromatiques et donc pas seulement à la formation de produits d'oxydation.

III. 6. Echange de polluants entre l'air et l'eau

Dans la première partie de ce chapitre, nous avons vu que les hydrocarbures légers peuvent migrer de l'eau vers l'atmosphère par évaporation. Nous allons montrer dans ce paragraphe que la contamination de l'eau à partir d'une atmosphère polluée, est également possible.

. **Mode opératoire** : Dans un dispositif schématisé par la figure n° 13 et représentant deux fioles coniques à col rodé, l'une contenant 100 ml d'une solution aqueuse de benzène et l'autre 100 ml d'eau distillée, les deux flacons sont isolés de l'extérieur et reliés entre eux par un tube de verre de diamètre 9 mm.

L'évolution des concentrations de benzène dans les phases aqueuses que contiennent les deux fioles tendent à s'égaliser. (tableau n° XXXII et figure n° 14).

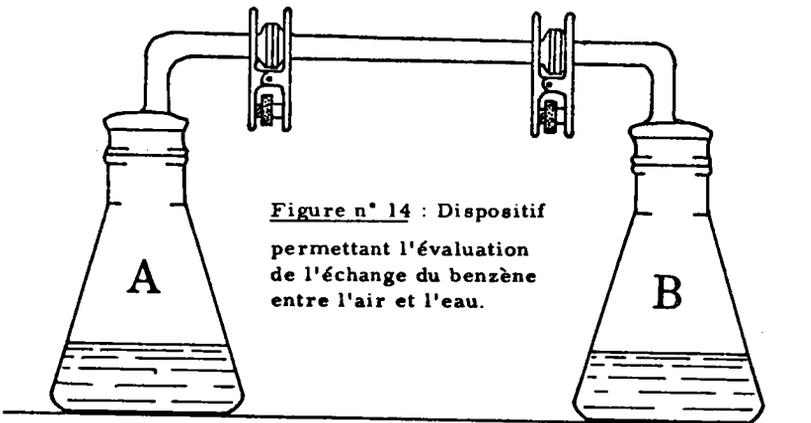


Figure n° 14 : Dispositif permettant l'évaluation de l'échange du benzène entre l'air et l'eau.

temps en heures	Concentration du benzène dans l'eau en mg/l	
	flacon A	flacon B
0	17.5	0
24	11	2.5
48	9.5	4.1
96	7.6	6
120	7.3	6.4

Tableau n° XXXII : Echange de benzène entre l'air et l'eau

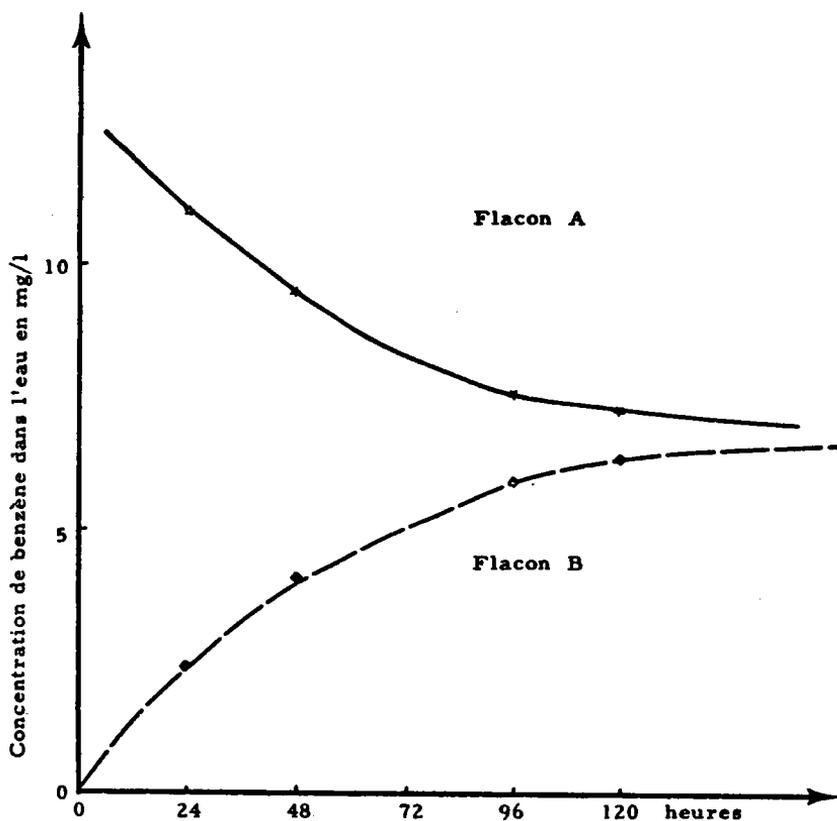


Figure n° 14 : Echange de benzène entre l'air et l'eau

III 7 CONCLUSION

Cette étude sur l'évolution abiotique du benzène et du toluène dans l'eau, nous a montré que :

1° Dans les systèmes ouverts, le temps de séjour du solvant dans le milieu aquatique est très court, et en outre, est très influencé par la variation de nombreux paramètres tels que : température, aération, surface d'échange, etc, ...

2° Dans les systèmes fermés, la concentration de l'hydrocarbure dans l'eau évolue vers une valeur qui, à température constante, dépend de la fraction du volume (du système), occupé par le liquide, et de la concentration initiale (C_0).

Cependant, quand le liquide occupe tout le volume qui lui est offert, la concentration de l'hydrocarbure dans le milieu reste constante et égale à C_0 et ceci, quelle que soit la température.

L'utilisation des flacons fermés, bouchés à l'émeri, permet l'établissement d'une meilleure relation entre effet biologique et concentration de toxique.

L'utilisation dans les tests biologiques de flacons fermés, où le liquide remplit la totalité du volume utile du récipient, semble être un excellent moyen pour les tests de toxicité ; malheureusement, cette méthode ne peut être généralisée, car en l'absence d'atmosphère gazeuse, la quantité d'oxygène disponible dans le milieu est limitée à la quantité d'oxygène dissoute dans le liquide, ce qui est très faible, et réduit d'autant la durée des tests.

Au cours de nos tests de toxicité, nous avons adopté des fioles coniques erlenmeyer, bouchées à l'émeri, de volume utile 300 ml, (volume du milieu 100 ml). Elles permettent à un able de survivre dans ces conditions pendant, en moyenne, 10 jours sans apport extérieur d'oxygène, la

concentration d'hydrocarbure à l'équilibre dans le milieu ayant été déterminé au préalable.

Des tests dans des fioles coniques de capacité 125 ou 500 ml bouchées à l'émeri ont également été utilisées dans ce travail et cela en fonction des besoins. Notamment pour les cultures d'algues, les petits flacons permettent de multiplier le nombre d'essais mais les erlens de grande capacité permettent pour chaque essai d'avoir un volume de milieu suffisant pour contrôler plusieurs paramètres.

Les tests de toxicité conduits en fioles ouvertes ont également été utilisés ; ceux-ci nécessitent le contrôle de nombreux paramètres mais leur intérêt réside dans le fait qu'ils rendent un peu compte des effets des polluants des volatils dans l'environnement.

CHAPITRE IV

ACTION DU BENZENE ET DU TOLUENE SUR
LES CHLORELLES

Dans un premier stade, les cultures d'algues ont été effectuées dans des flacons bouchés à l'aide de coton cardé.

Ce mode de culture, que nous appellerons "culture en système ouvert", est le plus couramment utilisé par ceux qui font des tests de toxicité sur des algues, et cela, quelle que soit l'espèce algale et quels que soient les toxiques examinés.

Cette méthode permet les échanges gazeux entre le milieu et l'atmosphère, et en particulier, elle permet la distillation des toxiques volatils hors du milieu de culture. Nous l'avons néanmoins utilisé, afin d'en dégager les intérêts et les limites, et aussi pour avoir des points de comparaison avec les résultats publiés par d'autres auteurs.

IV. 1. ACTION DU BENZENE ET DU TOLUENE SUR LES CHLORELLES
EN SYSTEME OUVERT.IV. 1. 1. Résultats

Compte tenu de la volatilité de ces composés, leur durée de contact avec les organismes exposés est limitée et par suite, leur action toxique est également limitée dans le temps.

Nous assistons souvent à un phénomène de récupération,

les cellules non atteintes au cours du séjour du toxique dans le milieu pouvant à nouveau se développer et se reproduire normalement.

Ainsi, lorsqu'on soumet des chlorelles à des concentrations croissantes de benzène ou de toluène, on constate les phénomènes suivants (figures n° 15 et n° 16)

1 - Pour de faibles concentrations d'hydrocarbures (benzène < 500 ppm et toluène < 120 ppm), aucune différence entre cultures témoins et intoxiquées n'est observée au delà de 48 heures après la mise en culture.

Cependant, au cours des 24 premières heures, des différences de biomasses atteignant parfois 10 à 20 % ont été notées entre cultures témoins et intoxiquées.

2 - Pour des concentrations moyennes de ces deux hydrocarbures, ($600 \leq$ benzène $\leq 1\ 000$ ppm et $150 \leq$ toluène ≤ 350 ppm).

La biomasse des cultures intoxiquées est plus faible que celle des cultures témoins dans la phase de croissance rapide. L'écart augmente avec la concentration du toxique.

3 - Pour les fortes concentrations de ces toxiques, (benzène $\geq 1\ 300$ ppm et toluène ≥ 400 ppm), aucune récupération n'a été notée, et on constate la mort de la quasi totalité de la population de l'inoculum. Des résultats similaires ont été trouvés par KAUSS P. B. et HUTCHINSON T. C. (1975).

La représentation graphique de l'histogramme de taille des chlorelles dans les cultures témoins et intoxiquées montre en début d'exposition une augmentation du nombre de particules de petites tailles, dans les milieux

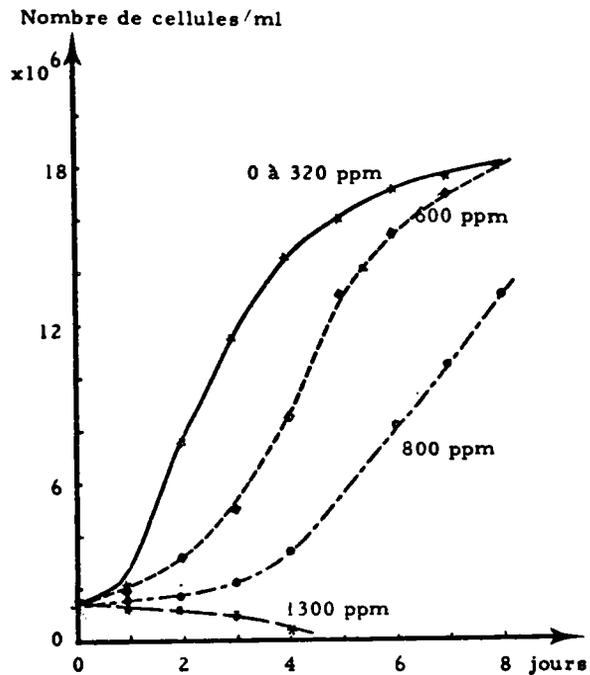


Figure n° 15 Courbes de croissance des algues en présence du benzène

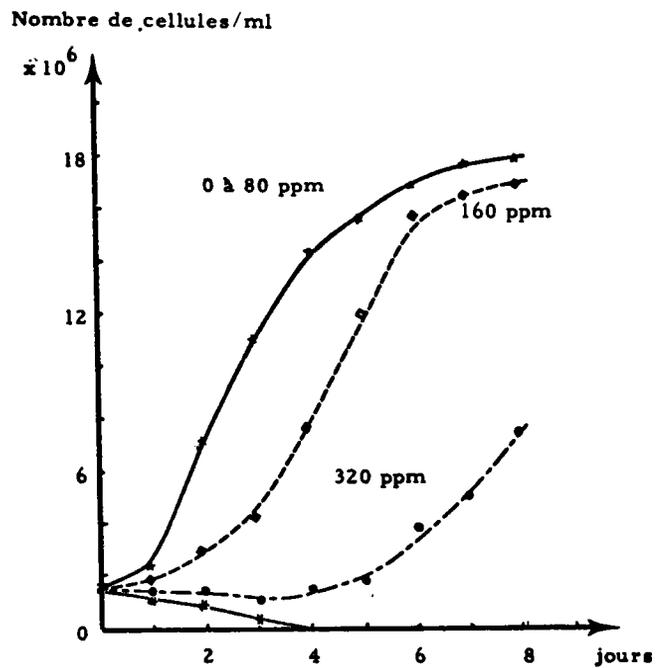


Figure n° 16 : Courbe de croissance des algues en présence du toluène

contenant du benzène ou du toluène (figure n° 17). Le tableau n° XXXIII, montre que le volume moyen des cellules diminue quand la concentration en hydrocarbure augmente

Dans les milieux les plus toxiques (contenant plus de 1 300 ppm de benzène ou plus de 400 ppm de toluène), on constate une augmentation du nombre total de particules comptées en début d'exposition (avec une prédominance de petites cellules), suivie d'une décroissance lente de ce nombre, avec disparition dans l'histogramme de toute particule qui aurait un diamètre supérieur ou égal au diamètre moyen des chlorelles.

Le compteur Coulter, utilisé pour la numération des chlorelles est un appareil connu pour donner le nombre de particules par unité de volume de suspension, ainsi que la répartition de tailles de celles-ci, sans distinction entre cellules vivantes et particules non vivantes en suspension.

L'augmentation du nombre de " cellules " de petites tailles jointe à d'autres phénomènes observés sur les cultures intoxiquées, tels que la décoloration progressive de la culture, la diminution de la concentration de chlorophylle, et d'ATP permet de penser, que dans ce mode d'intoxication, l'action principale du benzène et du toluène est liée à leur qualité de solvant et se manifeste par une lyse de la membrane cellulaire des chlorelles. Notons que la lyse des membranes cellulaires par les hydrocarbures a déjà été signalée par VAN OVERBEEK J. et BLONDEAU R. (1954).

IV. 1. 2. Modélisation de l'action des hydrocarbures légers sur les chlorelles - culture en système ouvert.

L'analogie qu'il y a entre les courbes de croissance des chlorelles en présence de benzène et de toluène et les courbes de croissance des chlorelles pour diverses tailles de l'inoculum (figure n° 18), nous a conduit à rechercher une corrélation entre ces deux phénomènes.

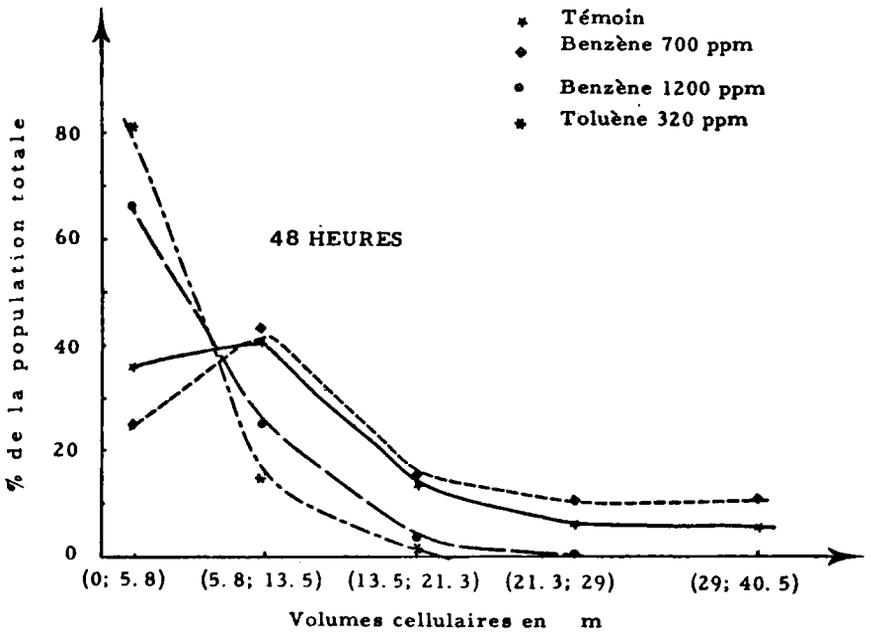
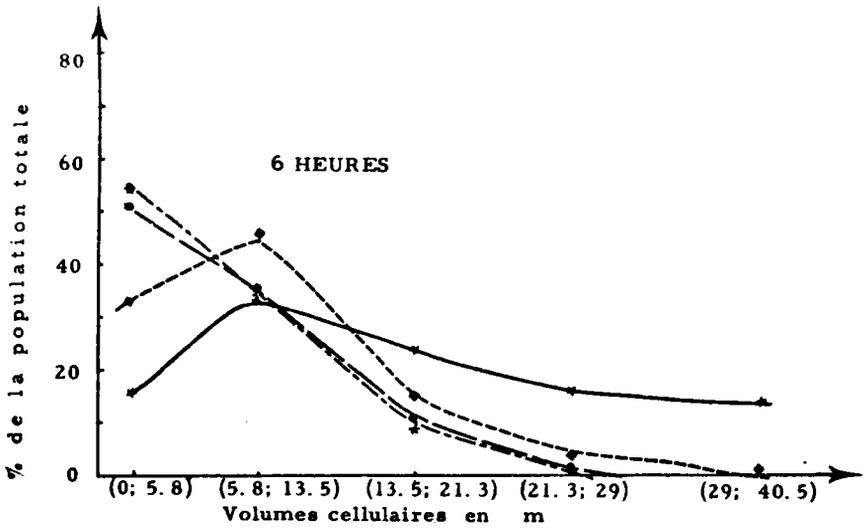


Figure n° 17 : Histogrammes de tailles des chlorelles en présence du benzène et du toluène.

Toxicité	Concentrations (mg/l)	6 heures			24 heures			48 heures			7 jours
		Nb	\bar{V}	V_t	Nb	\bar{V}	V_t	Nb	\bar{V}	V_t	\bar{V}
témoin	0	1.5	16.3	24.5	2.75	12.7	34.9	8.2	10.4	85.1	17.1
Benzène	175	1.7	15.7	26.7	2.50	11.7	29.2	8.0	10.8	86.2	16.6
	350	1.55	17.1	26.5	3.0	11.7	35.2	7.6	11.0	83.6	17.0
	700	1.55	9.7	15.0	1.7	13.3	22.5	1.75	12.3	21.6	15.5
	1200	1.25	7.8	9.8	0.9	6.7	6.0	0.7	6.1	4.2	13.2
Toluène	60	1.5	15.9	23.9	3.2	13.2	42.3	7.5	11.0	82.1	17.2
	150	1.6	13.9	22.2	2.4	12.4	29.8	4.3	12.0	51.6	17.0
	350	1.4	7.6	9.8	1.0	6.4	6.4	0.8	5.2	4.2	11.4

Tableau n° XXXIII : influence du benzène et du toluène sur la croissance des chlorelles en système ouvert.

légendes : Nb représente le nombre de millions de cellules par ml de culture

\bar{V} représente le volume moyen des chlorelles dans la culture, en μm^3

V_t représente le volume cellulaire total par unité de volume de culture, en $\mu\text{l/l}$

Temps (h)	Millions de cellules par ml			
	1.6	1	0.8	0.3
0	1.6	1	0.8	0.3
24	2.2	2.1	1.7	0.4
48	4.8	4.2	3.7	0.6
72	11	11.2	9.8	1.5
96	14	13	14.2	5.4
120	16	15.4	15.8	10
168	17.5	18	17.7	16.5

Tableau n° XXXIII b : Evolution de la croissance des chlorelles en fonction de la taille de l'inoculum.

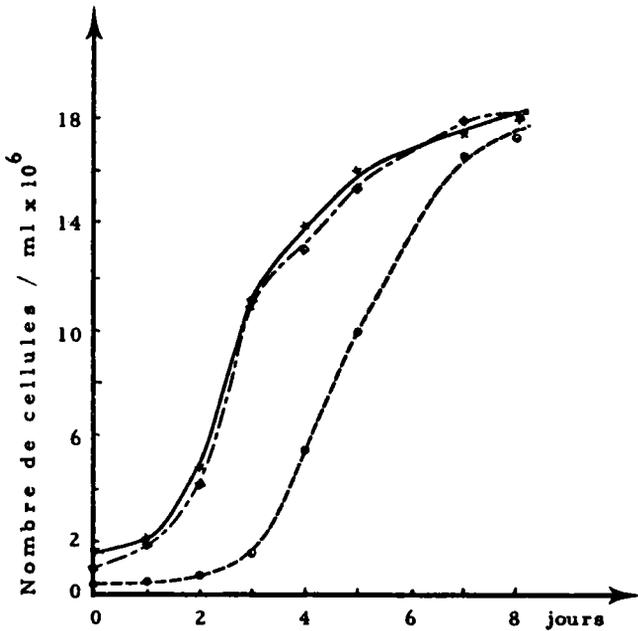


Figure n° 18 Influence de la taille de l'inoculum sur la croissance des chlorelles.

L'idée directrice est celle-ci :

L'action du benzène et du toluène étant limitée dans le temps, les cellules non touchées se comportent comme un inoculum de taille réduite pour la culture.

Pour réaliser un modèle mathématique de l'action des aromatiques légers sur les chlorelles, nous sommes partis des considérations suivantes :

- un effet biologique B est la sommation des produits de chaque concentration successive (C) par l'increment de temps dt, qui lui correspond, affecté d'un facteur K (KREUTZER W. A. 1963 & 1965).

$$B = K \int_0^t C dt$$

- tout agent toxique, quel qu'il soit, entraîne une diminution exponentielle du nombre des cellules vivantes suivant la relation :

$$\frac{N}{N_0} = e^{-KD}$$

où

N/N_0 est la fraction de la population qui survit à la dose D et où K est une constante dépendant de l'agent létal, des conditions de son application, des caractères du milieu et de la sensibilité de la population (DAVIS R J et coll. 1956, Mc LAREN A. D. et coll. 1962).

- dans les 24 heures qui suivent l'ensemencement, on a une croissance lente de la population algale (phase de latence).

Au cours de cette période, l'accroissement de la population algale peut être considéré comme une fonction linéaire du temps et peut être

exprimé par la relation

$$\Delta N = k N_0 t$$

où

ΔN accroissement de la population algale pendant le temps t exprimé en heures.

k constante = 9.015 h^{-1} pour *Chlorella vulgaris* cultivée dans les conditions mentionnées plus haut.

N_0 : nombre de cellules par unité de volume de culture au temps $t_0 = 0$

- la concentration du toxique dans le milieu contenu dans un flacon ouvert et agité, évolue au cours du temps selon la relation :

$$C = C_0 e^{-\lambda t}$$

avec

C_0 : concentration au début de l'essai

- la durée d'action du toxique est inférieure à 24 heures

- dans ce travail, nous avons considéré que, à tout moment le nombre de cellules dN tuées par le toxique est proportionnel à la concentration du toxique C , au nombre de cellules dans le milieu N et l'incrément de temps qui lui correspond dt soit :

$$dN = K C N dt$$

où en remplaçant chaque terme par sa valeur, on obtient :

$$dN = K C_0 \exp(-\lambda t) \times (1 + kt) N_0 dt$$

et le nombre de cellules N_t tuées pendant un temps t quelconque est donné par l'intégration de la relation précédente, soit :

$$N_t = K C_0 N_0 \int_0^t (1 + kt) e^{-\lambda t} dt$$

ou encore:

$$N_t = - \frac{K C_0 N_0}{\lambda^2} \left[(k \lambda t + k + \lambda) e^{-\lambda t} \right]_0^t$$

$$N_t = K C_0 N_0 \left[\frac{k + \lambda}{\lambda^2} - \frac{k \lambda t + k + \lambda}{\lambda^2} e^{-\lambda t} \right]$$

qu'on peut écrire sous la forme .

$$N_t = K C_0 N_0 f(t)$$

où :

$$f(t) = \frac{k + \lambda}{\lambda^2} - \frac{k + \lambda + k \lambda t}{\lambda^2} e^{-\lambda t}$$

Le nombre de cellules viables N_v (ou non atteintes par le toxique) est égal au nombre de cellules N présentes au temps t dans le milieu de culture diminué du nombre de cellules tuées par le toxique:

$$N_v = N - Nt = (1 + kt) N_o - K C_o N_o f(t)$$

soit

$$N_v = N_o (1 + kt - K C_o f(t))$$

Si, pendant toute la durée d'action du toxique, N_v reste toujours supérieur à zéro, la culture reprend.

Si, au contraire, N_v devient négatif ou nul, cela veut dire que toutes les cellules présentes dans le milieu ont été atteintes, la récupération est quasiment nulle.

La prédiction d'une reprise de la culture peut être déterminée par le calcul de N_v minimum; ceci est obtenu par la dérivation de N_v par rapport au temps:

$$\begin{aligned} \frac{d N_v}{d t} &= k N_o - K C_o N_o f'(t) \\ &= k N_o - K C_o N_o (1 + kt) e^{-\lambda t} \end{aligned}$$

Pour déterminer la valeur que prend la constante K , il suffit de déterminer expérimentalement la concentration létale (CL 100 %), concentration au dessus de laquelle aucune reprise de la culture n'est possible. Cela veut dire que pour cette concentration N_v minimum est égal à zéro.

K est obtenu par la résolution du système d'équation suivante :

$$\left\{ \begin{array}{l} (1 + kt) e^{-\lambda t} = \frac{k}{K CL} \\ 1 + kt = K CL f(t) \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} \frac{d N_v}{d t} = 0 \\ N_v = 0 \end{array}$$

La combinaison de ces deux équations permet d'abord d'obtenir le temps au bout duquel N_v atteint son minimum et ce, par la relation :

$$(1 + kt)^2 e^{-\lambda t} - k f(t) = 0$$

Dans les conditions expérimentales adoptées dans cette étude, nous avons trouvé pour λ les valeurs suivantes :

$$\lambda = 0.31 \text{ h}^{-1} \quad \text{pour le benzène}$$

$$\lambda = 0.28 \text{ h}^{-1} \quad \text{pour le toluène}$$

Ce qui donne les temps au bout desquels le nombre de cellules viables dans le milieu est minimum soit :

$$t_B \text{ min} = 10.72 \text{ avec } f(t) = 3.24 \quad \text{pour le benzène}$$

et

$$t_T \text{ min} = 11.58 \text{ avec } f(t) = 3.59 \quad \text{pour le toluène}$$

sachant que dans ces conditions :

$$CL_B = 1300 \text{ ppm}$$

et

$$CL_T = 400 \text{ ppm}$$

On obtient les valeurs suivantes pour K :

$$K = 276 \text{ pour le benzène}$$

et

$$K = 817 \text{ pour le toluène}$$

Sur le tableau n° XXXIV, nous avons porté quelques valeurs N_v/N_0 , calculées par ce modèle en fonction de la concentration du benzène ou du toluène.

C [benzène] mg/l	N_v / N_o	C [toluène] mg/l	N_v / N_o	Observations
0	1.161	0	1.174	pas de différence notable avec les cultures témoins au delà de 48 h
1	1.160	1	1.171	
10	1.152	10	1.144	
100	1.071	100	0.880	
200	0.982	120	0.872	
300	0.892	150	0.734	
500	0.624	200	0.567	période de latence croissant avec la concentration du toxique
700	0.535	250	0.440	
800	0.445	300	0.294	
1000	0.267	320	0.235	
1200	0.087	400	0.001	
1400		450		pas de reprise

Tableau n° XXXIV : Quelques valeurs du rapport N_v / N_o calculées pour des concentrations variables du benzène et du toluène.

Concentration de benzène mg/l	6 HEURES		24 HEURES	
	biomasse mesurée	biomasse calculée	biomasse mesurée	biomasse calculée
0	100	100	100	100
175	82.9	87.5	86.8	88
350	78.5	75	77.8	76
700	70.3	50.1	72.2	52
1200	17	14.5	14	17.6

Tableau n° XXXV : Comparaison des biomasses mesurées à l'aide de concentrations d'ATP, et calculées par le modèle exposé (les biomasses sont exprimées en % en attribuant la valeur 100 au témoin).

Le calcul qui vient d'être effectué permet de dire si une culture intoxiquée est susceptible de récupérer ou non. En effet, si $N_v \leq 0$, il n'y aura pas de récupération.

Quand N_v est > 0 , le modèle permet de dire que la culture est susceptible de reprendre, et qu'au mieux, la croissance sera celle d'une culture témoin dont la taille de l'inoculum est N_v . Car la reproduction de N_v chlorelles viables dans le milieu toxique est ralentie par l'action des traces de toxiques encore présents dans le milieu.

Le tableau n° XXXV, montre qu'il y a une bonne corrélation entre N_v calculé par le modèle et la biomasse mesurée sous forme d'ATP.

Les concentrations létales 100 % du benzène et du toluène, dans d'autres conditions expérimentales, ont pu être calculées par ce modèle et confirmées par l'expérience, (tableau n° XXXVI et figure n° 19).

Toxique	heure	heure ⁻¹	Concentration Létale 100 %		Mode de culture
			mesurée	calculée	
Benzène	2.23	0.31	1300	1300	Erlen meyer 300
	1.72	0.40	1650	1645	Erlen meyer 500
	2.86	0.24	1200	1033	Erlen meyer 125
	0.24	2.85	10000	9950	Fermenteur aéré
Toluène	2.46	0.28	400	400	Erlen meyer 300
	1.86	0.37	480	515	Erlen meyer 500
	2.76	0.25	350	360	Erlen meyer 125

Tableau n° XXXVI : Comparaison des CL_{100} (du benzène et du toluène)

calculées par le modèle et estimées par l'expérience.

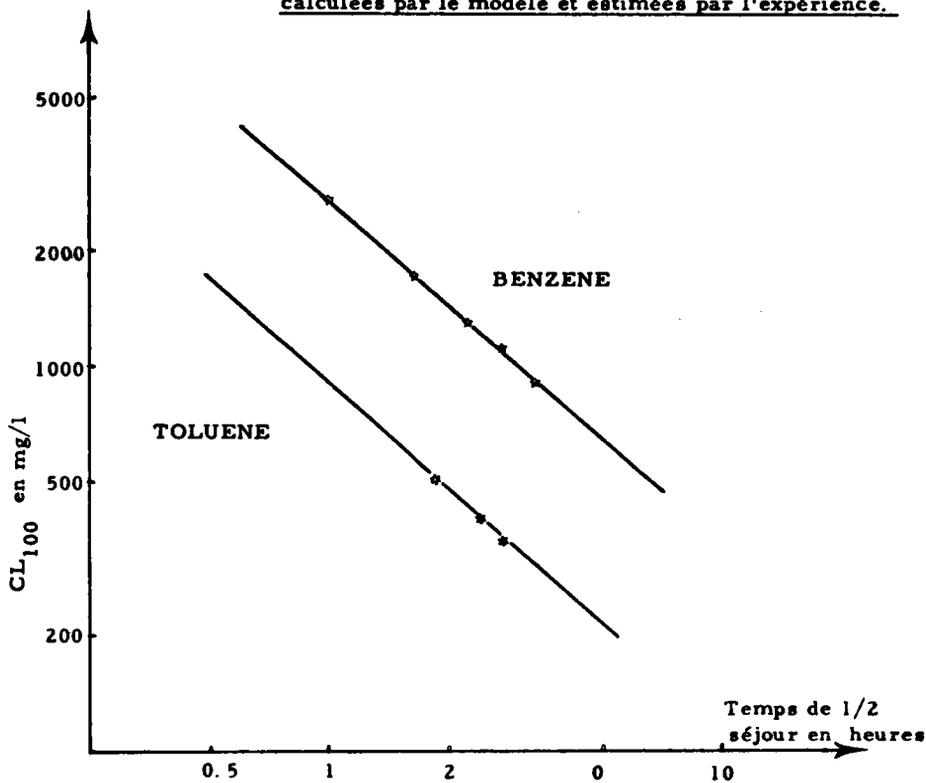


Figure n° 19 : Comparaison des CL_{100} calculées et mesurées

IV. 2. INFLUENCE DU BENZENE ET DU TOLUENE SUR LES CHLORELLES CULTUREES EN SYSTEME FERME

IV. 2. 1. Modification du milieu de culture

L'utilisation des flacons bouchés permet de travailler à concentration constante et bien déterminée du toxique dans le milieu, ce qui permet d'apprécier les effets maximums de la substance sur les organismes exposés, dans la gamme de concentrations même faibles mais parfaitement contrôlées.

La méthode de culture en système fermé permet de déceler des effets à des concentrations faibles de toxique, c'est à dire des concentrations susceptibles d'être rencontrées dans le milieu naturel.

Les premiers essais nous ont montré que la croissance des algues dans des flacons bouchés est très faible. La production maximale est d'environ 2 millions de cellules par ml de milieu, alors que pour les cultures en système ouvert, la production algale peut atteindre des concentrations de 15 à 20 millions de cellules par ml.

Cette limitation de la croissance provient du fait que le milieu est carencé en carbone, et que les bouchons en verre qui suppriment les échanges de gaz entre l'atmosphère et le milieu de culture empêchent ce dernier de fixer le gaz carbonique atmosphérique.

Pour pallier cet inconvénient, nous avons incorporé dans le milieu de culture Lefèvre Czarda, du bicarbonate de sodium.

Des tests préliminaires nous ont montré qu'avec l'adjonction de 1g/l de bicarbonate de sodium au milieu Lefèvre Czarda, nous obtenons

une croissance rapide des algues dès l'ensemencement (diminution du temps de latence), et un accroissement de la population, suffisant pour pouvoir apprécier les effets toxiques des substances volatiles.

IV. 2 2 Toxicité directe

Dans ce mode de culture, le toxique ne peut distiller hors du milieu, son action est plus persistante que dans le cas précédent et les seuils de toxicité observés sont nettement plus bas. L'action du benzène et du toluène est sensible dès les concentrations de 10 à 20 ppm d'hydrocarbure dans le milieu.

Le tracé des courbes de croissance de Chlorella vulgaris en flacons fermés, en présence et en l'absence d'hydrocarbure, (figure n° 20) montre :

- Action inhibitrice : pour des concentrations comprises entre 15 et 80 ppm pour le benzène, et entre 10 et 60 ppm pour le toluène ; il y a ralentissement de la croissance algale.

- Action algicide Au delà de 350 ppm de benzène, et de 150 ppm de toluène, on observe le phénomène de désintégration des cellules et de décoloration des cultures, comme cela a été décrit pour les cultures en système ouvert (pour des concentrations bien plus élevées)

- Action algistatique : Dans la gamme de concentration intermédiaire, c'est à dire comprise entre 100 et 300 ppm pour le benzène, et entre 80 et 150 ppm pour le toluène, on constate une inhibition totale de la croissance. Le nombre total de cellules reste sensiblement constant, et égal au nombre initial, pendant toute la durée d'exposition (5 à 10 jours).

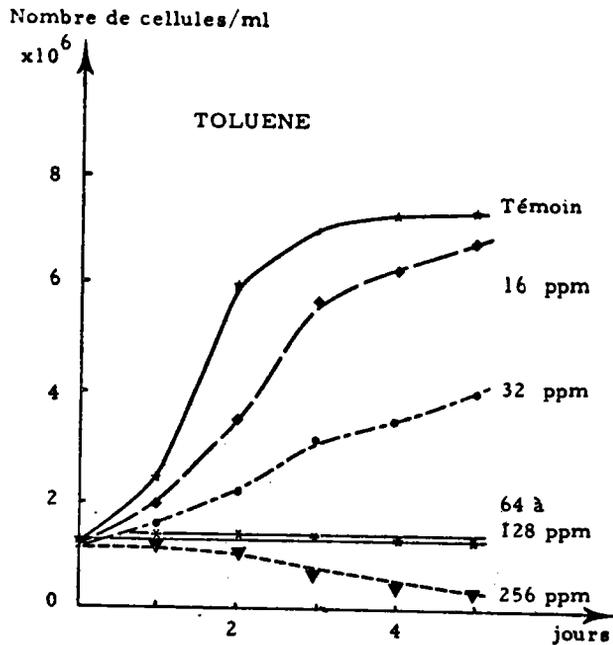
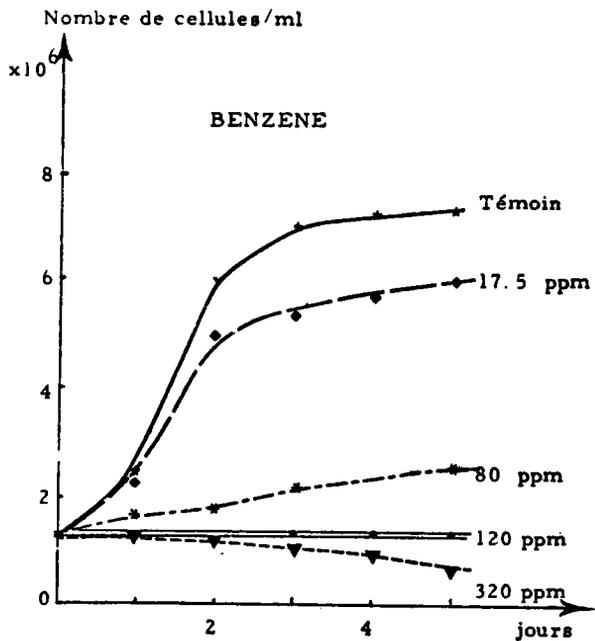


Figure n° 20 : Courbes de croissance des Chlorelles en présence du benzène et du toluène en flacons fermés.

IV. 2. 3. Influence du benzène sur le métabolisme de l'azote

Les cultures intoxiquées par le benzène s'écartent de la corrélation établie entre densité optique mesurée à 665 nm, et le nombre de cellules mesuré au compteur Coulter, (figure n° 21).

L'absorption de lumière par les suspensions algales intoxiquées au benzène est nettement plus grande que celle qu'aurait donné une suspension de chlorelles témoins de mêmes concentrations cellulaires.

Cette singularité du benzène n'a pas été observée pour le toluène.

Pour confirmer ce phénomène, nous avons tenté de faire un bilan azote dans les cultures témoins et intoxiquées par ces deux solvants. C'est ainsi que nous avons fait les dosages suivants :

- dans les filtrats des milieux de culture, nous avons recherché et dosé l'azote sous forme d'ions NO_3^- , NO_2^- , et NH_4^+
- sur les algues retenues par le filtre, nous avons fait une extraction et un dosage des pigments chlorophylliens.
- sur le milieu global, nous avons dosé l'azote organique.

IV. 2. 3. 1. Dosage des ions nitrates, nitrites et ammonium

La recherche de ces ions et leur dosage dans les milieux de culture nous a montré :

Une accumulation anormale des ions nitrites dans les milieux de culture contaminés par le benzène. La concentration des nitrites augmentant avec la concentration du benzène (figure n° 21b). Cette figure montre

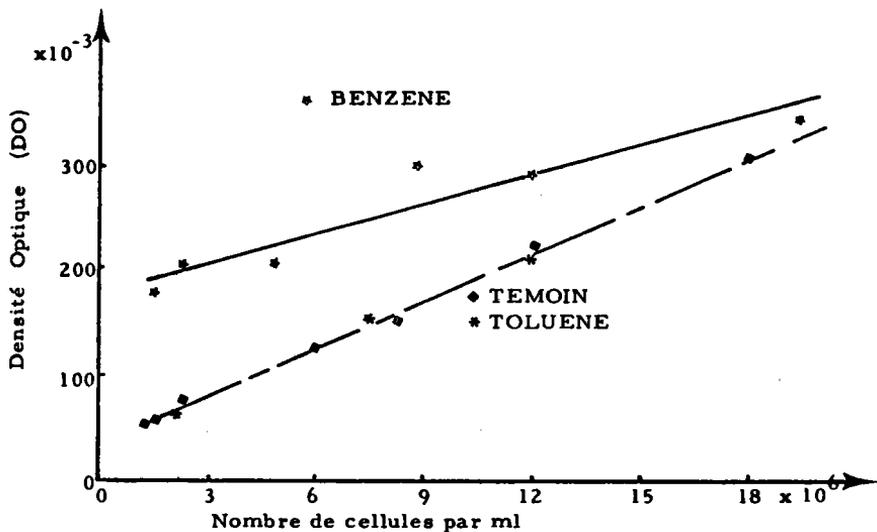


Figure n° 21 : Variations de la DO en fonction de la concentration cellulaire

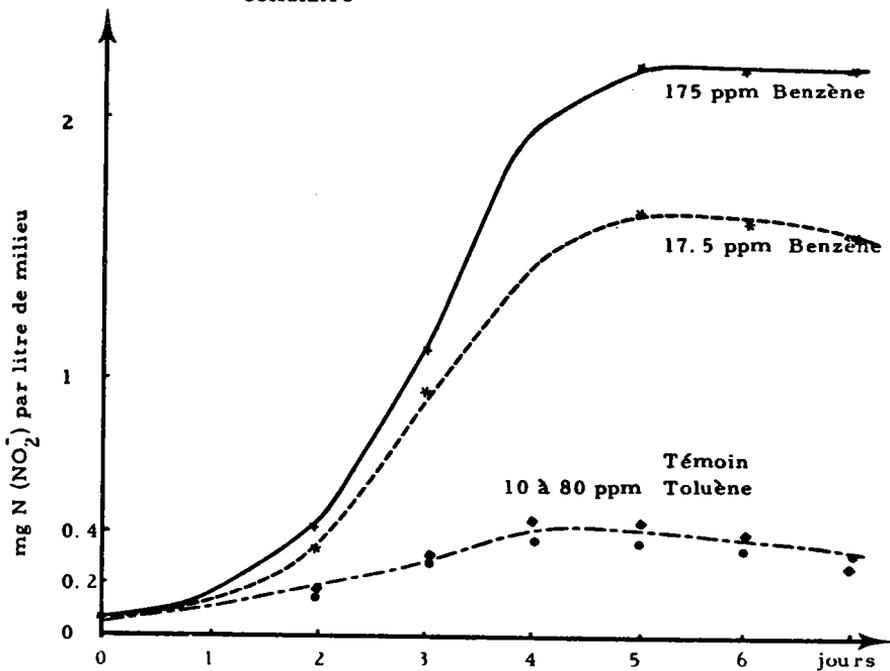


Figure n° 21 b Evolution de la concentration d'ions NO_2^- dans les milieux de culture d'algues

aussi que le taux de nitrites dans les cultures contaminées par le toluène est très faible, et comparable à celui trouvé dans les cultures témoins.

La consommation des ions nitrites augmente avec le nombre de chlorelles synthétisées. La quantité de nitrates consommés par chlorelle synthétisée est plus grande dans les milieux contaminés par le benzène. Une partie des ions nitriques consommée se retrouve dans le milieu sous forme d'ions nitrites.

Les ions ammonium n'ont pas été détectés dans les milieux de culture.

IV. 2. 3. 2. Dosage de l'azote organique et des pigments chlorophylliens

En tenant compte du nombre de cellules dans le milieu, les cultures contaminées par le benzène montrent une concentration plus forte en pigments chlorophylliens, et en azote organique (tableau n° XXXVII) que les cultures témoins.

L'augmentation de la concentration en pigments chlorophylliens et azote organique dans ces milieux de culture contaminés par le benzène n'est pas due à une augmentation de la taille des cellules, le diamètre moyen des chlorelles dans les cultures témoins et intoxiquées, restant sensiblement le même (tableau n° XXXVII).

L'inhibition de la croissance des chlorelles dans les milieux contenant du benzène n'est pas due à l'accumulation des ions nitrites dans le milieu. En effet, les chlorelles peuvent se développer normalement, même en présence de 100 ppm de nitrites

Les nitrites ne sont pas non plus responsables de l'exaltation de la synthèse chlorophyllienne. La densité optique des cultures contenant des ions nitrites est la même que celle des témoins (tableau n° XXXVIII).

Concentration de benzène (en mg/l)	Nb de cellules x 10 ⁶ par ml	Volume moyen des cellules (en μm^3)	Volume total de cellules/l ($\mu\text{l} / \text{l}$)	Densité optique à 665 nm	Azote organique (en 10 ⁻¹² g/cel)
0	7.5	19.8	148.5	0.180	0.758
17.5	5.6	19.6	109.8	0.205	0.905
50	2.5	18.9	47.3	0.180	2.0
175	2.1	19.4	40.7	0.170	2.0

Tableau n° XXXVII : Effets du benzène sur le métabolisme de l'azote par les chlorelles

Concentration mg de NO ₂ ⁻ /l	Nombre de cellules/ml x 10 ⁶	Volume moyen des cellules (μm^3)	Volume cellulaire ($\mu\text{l} / \text{l}$)	Densité optique à 665 nm
0	13.5	16.8	226.7	0.280
0.4	15.5	15.4	238.2	0.281
1	13	18.2	236.9	0.287
10	12.7	19.0	241.7	0.290
50	13.4	17.7	237.3	0.290
100	15.3	16.1	246.3	0.280

Tableau n° XXXVIII : Evolutions : du nombre de cellules, du volume cellulaire, et de la densité optique des cultures d'algues en présence d'ions nitrites.

IV. 2. 4. Recherche d'une corrélation entre biomasse et concentration de toxique

La recherche d'une corrélation entre dose et nombre de cellules produites, dans les cultures témoins (N_0) et dans les cultures intoxiquées (N) montre que le rapport :

$$\frac{N_0 - N}{N_0}$$

est pratiquement indépendant du temps entre 24 et 96 heures, et varie avec la concentration du toxique selon une loi de la forme :

$$\frac{N_0 - N}{N_0} = k C^\alpha$$

Pour le benzène, on trouve les valeurs suivantes :

$$k = \frac{1}{292}$$

et $\alpha = 1.22$

IV. 2. 5. Devenir du benzène et du toluène au contact des chlorelles

On note une pénétration importante du benzène et du toluène dans les algues cultivées en présence de ces solvants. Cette pénétration est probablement due à un partage des hydrocarbures entre l'eau et les algues se faisant en faveur de ces derniers. Le tableau n° XXXIX, donne les concentrations du benzène et du toluène trouvées dans les algues en fonction de la concentration de ces solvants dans le milieu de culture.

Remarque L'apparente décroissance du coefficient de partage des hydrocarbures entre les algues et le milieu de culture, en fonction de la concentration de ceux-ci dans le milieu est due à une faible concentration cellulaire dans les milieux les plus toxiques et à un relargage des hydrocarbures dans les milieux de lavage.

L'absence de modifications des concentrations des hydrocarbures dans les milieux de culture laisse penser qu'il n'y a pas de métabolisme ou d'assimilation de ces hydrocarbures par les algues.

Toxique	Concentration dans le milieu (Cm)	10 ⁶ cellules par ml	Concentration dans les algues (Ca)	Coefficient de partage I = Cm/ Ca
témoin	0	11	0	0
Benzène	5.7	10.3	19	3.3
	8.8	9.5	41	4.6
	11.9	7.9	64	5.4
	18.7	8.5	65	3.5
	25.2	7.4	100	4.0
	31.4	6.4	105	3.3
	37.8	5.9	98	2.6
	50.4	5.0	114	2.3
63.0	4.1	123	2.0	
Toluène	3.6	10.7	21	5.8
	7.2	8.2	34	3.4
	18.0	6.7	73	4.1
	29.0	5.0	93	3.2
	36.0	3.9	87	2.4

Tableau n° XXXIX : Imprégnation des chlorelles par le benzène et par le toluène.

IV 3. ACTION DES HOMOLOGUES SUPERIEURS DU BENZENE SUR LES CHLORELLES

Les essais de toxicité des homologues supérieurs du benzène sur les chlorelles (tableau n° XXXIX bis), montrent :

. Que les xylènes et l'éthylbenzène ont le même seuil de toxicité vis-à-vis de cette espèce.

. Que la toxicité de ces composés s'inscrit dans une suite logique de toxicité croissante du benzène à l'éthylbenzène en passant par le toluène.

. Que les xylènes et l'éthylbenzène, tout comme le toluène, n'ont pas d'effets sur le métabolisme de l'azote par les chlorelles. D'ailleurs, la mesure des DO des cultures soumises à l'action de ces composés montre qu'il n'y a pas exaltation de la synthèse chlorophyllienne comme cela a pu être constaté en présence du benzène (et légèrement en présence de l'essence auto parce qu'elle en contient).

Concentration en mg/l	BENZENE			TOLUENE			XYLENES			Ethylbenzène			Essence-auto		
	N	V	DO	N	V	DO	N	V	DO	N	V	DO	N	V	DO
Etat initial	1.3	19	55	1.3	19	55	1.3	19	55	1.3	19	55	1.3	19	55
0	0.8	160	325	9.8	160	325	9.8	160	325	9.8	160	325	9.8	160	325
16	9.5	168	335	8.8	159	330	2.7	44	76	3.2	56	126	8.3	153	330
32	4.8	91	283	4.2	82	252	1.6	27	44	1.5	26	55	7.7	143	315
64	1.7	30	198	1.6	33	68	1.4	24	42	1.7	21	39	2.4	43	79
128	1.2	17	169	1.4	23	46	1.0	13	24	1.0	13	9	1.7	20	57

Tableau n° XXXIX bis : Effets des aromatiques monocycliques sur la croissance des chlorelles.

N : nombre de millions de cellules par ml,

DO: densité optique x 10³

V : volume cellulaire µl/l

IV. 4. CONCLUSION

L'étude des effets du benzène et du toluène sur les chlorelles montre :

1 - Pour des concentrations élevées de ces composés, c'est leur pouvoir solvant qui est impliqué dans la désintégration des cellules.

2 - La présence de ces composés dans les chlorelles est due à leur plus grande solubilité dans la matière organique que dans l'eau. D'ailleurs les hydrocarbures accumulés dans les cellules sont très vite relargués par simple lavage, chauffage ou aération des algues.

3 - Ces hydrocarbures inhibent la reproduction des chlorelles.

4 - Le benzène agit sur le métabolisme de l'azote au niveau des algues où on constate, une accumulation anormale d'ions nitrites dans le milieu et une exaltation de la synthèse chlorophyllienne et d'azote organique.

CHAPITRE V

EFFETS DU BENZENE ET DU TOLUENE SUR LES CONSOMMATEURS I

Sur les daphnies, les essais ont également été réalisés en systèmes ouverts et fermés. Pour chaque système, nous avons fait :

- des essais de courte durée (96 heures), sans apport de nourriture, dans des conditions similaires à celles préconisées par le test normalisé (AFNOR).

- des essais de durée relativement longue, 4 à 40 jours. Dans ces conditions, les daphnies ont été nourries à l'aide de chlorelles.

V. 1. TEST DE TOXICITE DE COURTE DUREE DU BENZENE ET DU TOLUENE SUR LA DAPHNIE, SANS APPORT DE NOURRITURE

V. 1. 1. Système ouvert

Dès l'introduction du benzène dans le milieu, les daphnies tombent au fond des récipients, et selon la concentration de l'hydrocarbure dans le milieu, on constate les phénomènes suivants :

Pour des concentrations supérieures à 300 ppm de benzène, ou 200 ppm de toluène, les daphnies demeurent immobiles au fond des flacons pendant toute la durée de l'essai, c'est à dire 96 heures.

Pour des concentrations de benzène (CB) telles que $60 < CB < 300$ ppm et des concentrations de toluène (CT) telles que $40 < CT < 200$ ppm, les daphnies après s'être immobilisées au fond des tubes pendant un temps plus ou moins long, reprennent une certaine activité.

Pour des concentrations inférieures à 60 ppm de benzène et à 40 ppm de toluène, les daphnies tombent au fond des flacons à l'introduction du toxique, mais aucune immobilisation n'est observée.

V 1 2. Système fermé

Des essais ont été réalisés en tubes à essai à col rodé, bouchés à l'émeri ; dès l'introduction de l'hydrocarbure dans le milieu, on constate à nouveau la décantation des daphnies au fond des tubes.

Résultats : Dans les tubes témoins, les daphnies parcourent tout le volume qui leur est offert ; elles nagent partout, du fond du tube jusqu'au trait de jauge. Dans les tubes contenant le benzène, les daphnies nagent dans le fond. Il pourrait y avoir une relation entre la concentration en benzène et la hauteur à laquelle peut monter une daphnie. Pour des concentrations supérieures à 15 ppm de benzène, les daphnies sont pratiquement immobiles ; on peut toutefois distinguer, mais assez difficilement, un mouvement très lent des antennes, qui diminue avec le temps et avec les concentrations croissantes.

**V. 2. TESTS DE TOXICITE DE DUREE RELATIVEMENT LONGUE DU
BENZENE ET DU TOLUENE SUR LES DAPHNIES, AVEC
APPORT DE NOURRITURE**

V. 2. 1. Test en système ouvert

Dans ce mode d'intoxication, comme dans le cas des cultures d'algues en système ouvert, les hydrocarbures quittent les milieux de culture assez rapidement (temps de 1/2 séjour de l'hydrocarbure dans le milieu variant de 1 à 4 heures).

Et comme on l'a vu pour les chlorelles, les daphnies sont également capables de récupérer, lorsqu'il n'y a plus de toxique dans le milieu et cela se voit mieux encore en présence de nourriture.

Le tableau n° XL, montre que les concentrations supérieures ou égales à 350 ppm de benzène ou à 250 ppm de toluène, sont létales pour les daphnies. Pour les concentrations inférieures, les daphnies survivantes se développent et se reproduisent comme les daphnies témoins avec un retard qui croît avec la concentration en hydrocarbure.

Toxique	Concentration	e f f e t s			Nombre de petits produits par mère			Mortalité % de la population initiale		
		Immédiats	24 H	48 H	J 10	J 14	J 21	J 10	J 14	J 21
Témoin	0	0	0	0	3	12	30.5	0	10	10
BENZENE	17.5	0	0	0	2	13	29.5	0	0	0
	87.5	↓	0	0	0.3	11	32	0	0	0
	175	↓	↓	0	0.05	6.5	28	10	10	10
	262.5	↓	↓	↓↑	0	8	27	20	20	20
	350	↓	↓	↓	0	0	0	100	100	100
TOLUENE	10	0	0	0	1.5	12	26	0	0	0
	50	↓	0	0	1	11	28.5	0	10	10
	100	↓	↓	0	0.3	7	28.5	10	10	10
	200	↓	↓	↓↑	0	5	26.5	40	40	40
	250	↓	↓	↓	0	0	0	100	100	100

Tableau n°XL : Effets du benzène et du toluène sur les daphnies en présence de nourriture dans les systèmes ouverts. (↓ décantation ; ↓↑ mouvements lents)

V 2 2. Test en système fermé

Là encore, les seuils de toxicité sont plus bas que dans les tests en système ouvert, du fait de la persistance du toxique dans le milieu.

V. 2. 2. 1. Aspect qualitatif de l'action du benzène et du toluène sur les daphnies

Pour de faibles concentrations d'hydrocarbures dans le milieu (concentration du benzène ≤ 5 ppm et concentration du toluène ≤ 3 ppm) aucun effet apparent n'est à signaler.

Pour des concentrations comprises entre 5 et 15 ppm pour le benzène, ou entre 3 et 10 ppm de toluène, on constate un effet immédiat dès l'introduction du toxique dans le milieu ; les daphnies décantent et se regroupent au fond du récipient, ceci étant accompagné d'un ralentissement des mouvements des daphnies, qui peut se poursuivre jusqu'à l'immobilité totale.

La récupération de la mobilité peut se faire plus ou moins rapidement selon la concentration en hydrocarbure. Ainsi, par exemple, pour 6 ppm de benzène, la récupération totale est faite en moins de 24 heures alors que pour 12.5 ppm, elle se fait difficilement à partir de 48 heures. Au delà de 15 ppm de benzène, ou de 10 ppm de toluène, à part un léger mouvement des antennes dont la fréquence diminue quand la concentration en hydrocarbure augmente, les daphnies sont immobiles, la prise de nourriture est quasiment nulle, les daphnies sont transparentes, leur tube digestif est vide, et il n'y a pas de mues dans le milieu. La mortalité des daphnies est croissante avec la concentration de l'hydrocarbure dans le milieu.

Les seuils de toxicité sont différents selon le rythme de changement du milieu dans lequel vivent les daphnies. La dose de 17,5 ppm de benzène tue plus de la moitié de la population si les changements du milieu ne se font pas en moins d'une semaine, alors qu'un changement quotidien du milieu induit une certaine résistance de la daphnie, qui peut se développer et se reproduire.

V. 2. 2. 2. Aspect quantitatif de la toxicité du benzène et du toluène sur les daphnies

Pour évaluer la toxicité des hydrocarbures sur la daphnie nous avons adopté comme critère, la prise de poids par les daphnies, ainsi que le taux de reproduction.

Nous avons délaissé le critère d'immobilité car cette dernière n'est souvent que momentanée, et de ce fait n'est pas un reflet de la mortalité.

V. 2. 2. 2. 1. Evaluation de la prise de poids par les daphnies

. Mode opératoire : Des daphnies de 6 à 7 jours, dont le poids moyen a été déterminé sur un échantillon du même lot, sont soumises à l'action de benzène et de toluène en présence de quantités suffisantes de chlorelles comme source d'énergie ; la mesure de la croissance pondérale des daphnies est effectuée 7 jours plus tard.

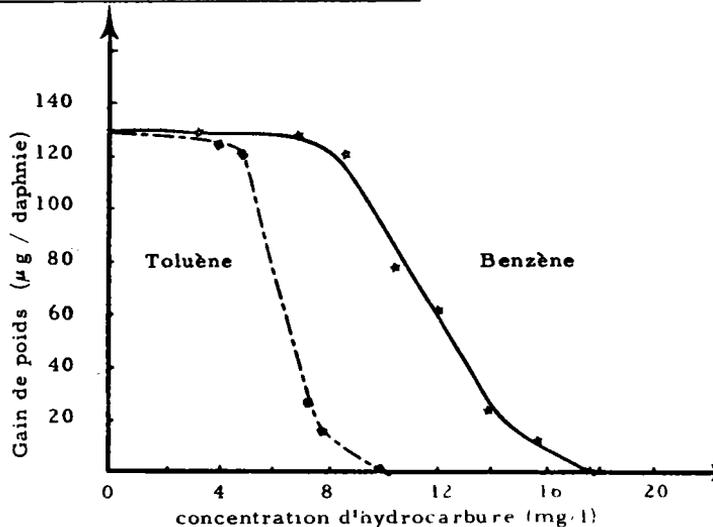
. Résultats : Le tableau n° XLI et la figure n° 22, montrent que la prise de poids de la daphnie diminue quand la concentration d'hydrocarbure dans le milieu augmente.

Toxique	Concentration (en mg/l)	Nombre de survivants	Nombre de morts	Poids moyen (μg)	Gain de poids (μg)	Manque à gagner (%)
Témoin	0	88	2	227.1	127.9	0
BENZENE	3.5	90	0	229.1	129.1	0
	7	87	3	228	128	0
	8.75	90	0	221.7	121.7	4.9
	10.5	86	4	178	78	39
	12.25	78	12	161.6	61.5	51.8
	14	57	33	124.5	24.5	80.0
	15.75	26	64	113	13	89.8
	17.5	12	78	100	0	100
	19.25	7	83			
	21	8	82			
22	0	90				
TOLUENE	2	84	6	224.5	124.5	2.7
	4	90	0	225	125	2.3
	5	88	2	223.1	123.1	9.8
	7.5	81	9	123.2	23.2	81.8
	8	57	33	117	17	86.7
	10	20	70	100	0	100
	12.5	7	83			
15	0	90				

Tableau n° XLI : Effets du benzène et du toluène sur les daphnies, élevage en système fermé, durée de l'exposition 7 jours, sans renouvellement du milieu.

Figure n° 22:

Croissance pondérale des daphnies en présence du benzène et du toluène



Remarque Les valeurs portées sur le tableau n° XLI, permettent en outre, de déterminer les concentrations létales 50 % (CL_{50}) 7 jours ainsi que les concentrations inhibitrices de croissance 50 % (CI_{50}) 7 jours (la concentration inhibitrice 50 % est, ici définie comme la concentration du toxique qui permet une croissance pondérale, moitié de la croissance des témoins). Les calculs de ces concentrations donnent :

- Pour le benzène $CL_{50} = 14.4$ ppm et $CI_{50} = 11.8$ ppm

- Pour le toluène $CL_{50} = 8.2$ ppm et $CI_{50} = 6.2$ ppm

V. 2. 2. 2. 2. Effets sur la reproduction

Les effets du benzène et du toluène sur la reproduction des daphnies, se traduisent par deux phénomènes concomitants :

1° - retard de la reproduction

2° - réduction de la fécondité

Retard de la reproduction

Le retard de maturité croît avec la concentration d'hydrocarbure et la durée d'exposition. Ainsi par exemple, pour les daphnies exposées à 10.5 ppm de benzène, on trouve des valeurs s'échelonnant de 1 à 4 jours selon le traitement (tableau n° XLII).

Traitement	Retard
Daphnies de 6 à 7 jours, exposées de manière continue	2 j
Daphnies de 6 à 7 jours, exposées de manière répétée	1 j
Daphnies de 2 à 3 jours, exposées de manière répétée	4 j
Daphnies de 4 à 5 jours, exposées de manière répétée	3 j
Daphnies de 2 à 3 jours ou de 4 à 5 jours, exposées pendant 72 h à du benzène, puis remises dans un milieu sain	1 j

Tableau n° XLII Variation du retard de maturité des daphnies exposées au benzène avec le traitement

Réduction de la fécondité

La fécondité des daphnies, exprimée en nombre de petits produits par daphnie adulte dans le milieu, est réduite en présence d'hydrocarbure.

La représentation graphique des courbes de natalité cumulée pour 100 daphnies en fonction du temps, à diverses concentrations d'hydrocarbures dans le milieu (figure n° 23), montre .

a) - Le taux de reproduction diminue quand la concentration de l'hydrocarbure dans le milieu augmente.

b) - Des irrégularités dans les écarts entre courbes de natalité des daphnies témoins, et courbes de natalité des daphnies intoxiquées. Ce phénomène est probablement dû à la non synchronisation des naissances

		Témoïn	Concentration de benzène			Concentration de toluène		
			6.8 mg/l	10.5 mg/l	13.7 mg/l	2.5 mg/l	4 mg/l	6 mg/l
taux de repro- duction moyen	J10	4.3	3.42	1.70	0.30	4.23	2.40	0.50
	J24	1.53	3.28	1.83	0.88	1.31	1.28	0.47
	J34							

Tableau n° XLIII : Taux de reproduction des daphnies en présence du benzène et du toluène.

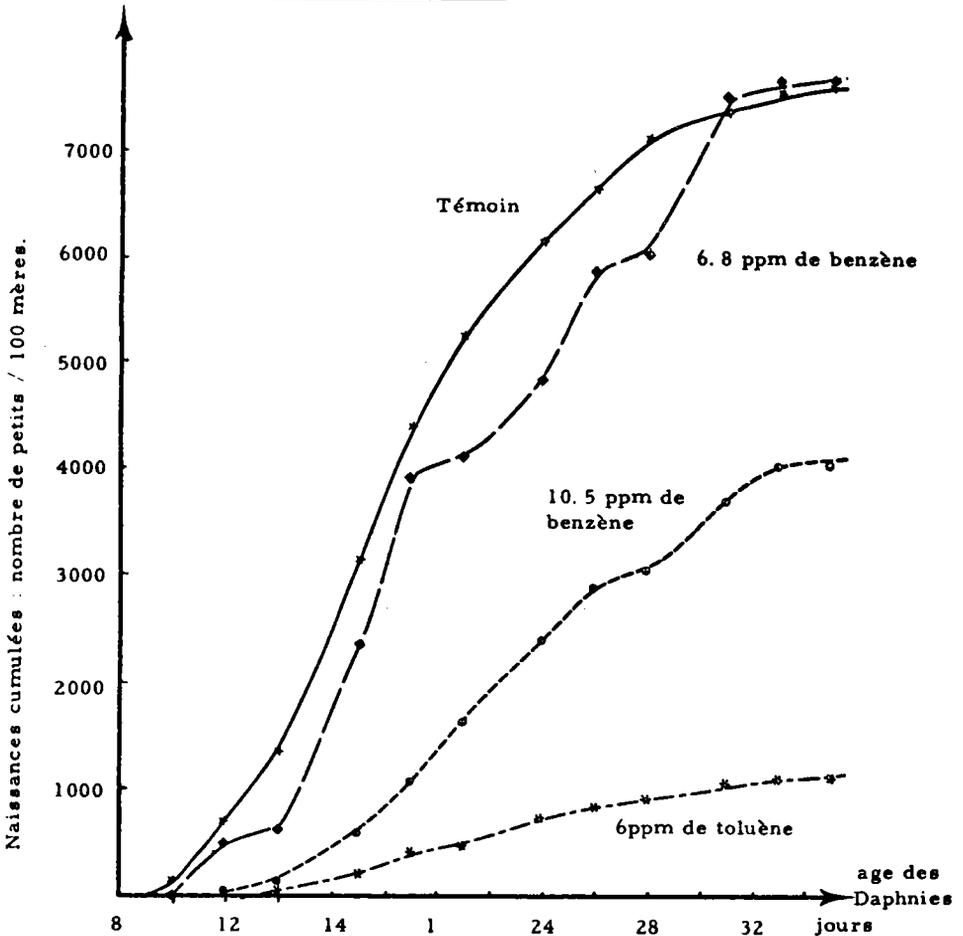


Figure n° 23 : Evolution de la natalité en présence de benzène ou de toluène.

entre élevage témoin et élevage intoxiqué. Le déphasage est induit chez les daphnies par l'introduction d'hydrocarbures dans le milieu d'élevage

c) - A partir du 10^{ème} jour d'essai, on constate une relative augmentation du taux de reproduction dans les élevages contaminés par le benzène (tableau n° XLIII). Ce phénomène est dû à un développement dans le milieu d'une flore bactérienne capable de dégrader le benzène, et qui, tout en détoxifiant le milieu, constitue un apport de nourriture supplémentaire aux daphnies.

L'âge à partir duquel les daphnies sont exposées aux hydrocarbures n'a pratiquement pas d'influence sur leur fécondité (tableau n° XLIV), d'où l'avantage, de l'utilisation des daphnies de 6 à 7 jours.

Ages des daphnies en début d'essai	Daphnies de 48 à 72 heures (2 à 3 jours)				Daphnies de 144 à 160 heures (6 à 7 jours)			
	concentration en jours	Témoin	6.8	10.5	13.2	Témoin	6.8	10.5
10	175	0	0	0	160	0	0	0
12	911	420	0	0	715	540	53	0
14	1813	1220	360	0	1370	631	126	0
17	3050	1890	580	10	3188	2355	636	10
19	4180	2875	1100	57	4393	3960	1080	84
21	4980	3410	1700	180	5260	4120	1660	258
24	6200	5100	2830	360	6188	4795	2386	424
26	6400	5730	3000	535	6690	5858	2880	582
28					7150	6017	3060	774
31					7400	7566	3724	1107
33					7560	7747	4035	1215
35					7580	7747	4035	1215

Tableau n° XLIV : Effets du benzène sur la reproduction des daphnies, influence de l'age des daphnies en début d'expérience sur la natalité (nombre de petits produits par 100 daphnies adultes).

V. 2. 2. 2. 3. Autre méthode pour évaluer la toxicité des hydrocarbures sur la daphnie

La présence d'hydrocarbures dans le milieu d'élevage inhibe la croissance des daphnies, et influe sur leur prise de nourriture.

Si des daphnies sont introduites dans un milieu contenant une forte concentration d'algues (6 à 7 millions de cellules/ml), la consommation de ces dernières par les crustacés conduit à une clarification du milieu qu'on peut quantifier par photométrie.

Exemple - Dans des tubes à essai, à col rodé, nous avons mis des daphnies en présence d'algues, et de quantités variables de toluène. nous avons mesuré l'absorption d'une lumière de longueur d'onde 610 nm par les divers tubes en début et en fin d'expérience. Les résultats obtenus par cette technique sont similaires de ceux obtenus pour la prise de poids par les daphnies, (figure n° 24).

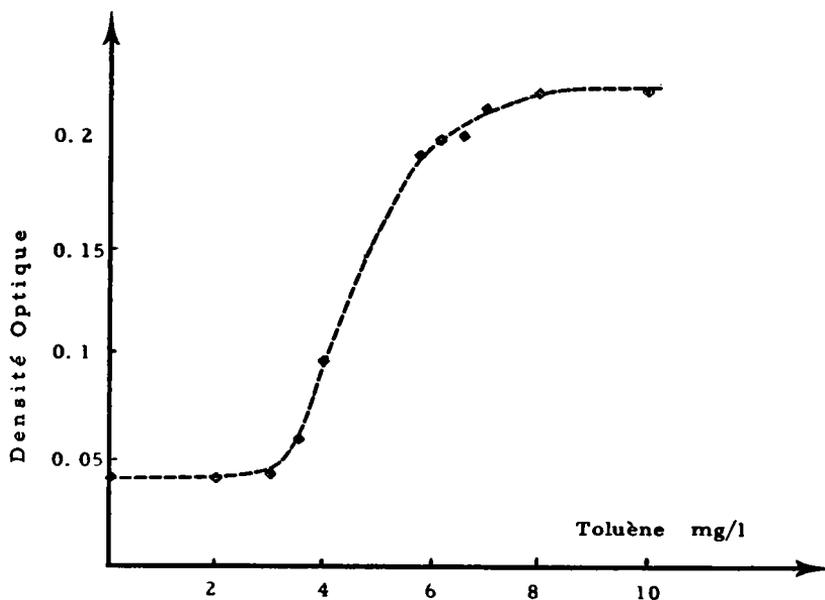


Figure n° 24 Evaluation de la toxicité du toluène sur les daphnies par des mesures de la clarification du milieu

V. 2 2 3. Effets chroniques d'une intoxication au benzène

Comme la littérature nous apprend que le benzène peut avoir des effets chroniques sur les individus exposés, nous avons suivi le développement et la reproduction

a) - Chez des daphnies ayant été exposées à ce toxique directement pendant un temps suffisamment long pour la vie d'une daphnie (10 jours).

b) - Chez des jeunes daphnies issues de daphnies mères exposées à ce carburant.

Une exposition de durée limitée des daphnies au benzène semble ne pas avoir d'effets sur leur fécondité. Aussi, par exemple, des daphnies de 48 à 120 heures soumises à l'action du benzène pendant 72 heures donnent, une fois matures, le même nombre de petits que des daphnies témoins. Même des daphnies exposées pendant une assez longue période (10 à 12 jours) au benzène, peuvent quand on les place dans un milieu sain, donner, au bout de 3 à 6 jours, un nombre de petits par mère équivalent à celui des daphnies témoins, tableau n° XLV

Age des daphnies en jours	daphnies témoins	Daphnies exposées entre le 2 ^e et le 5 ^e jour	Daphnies exposées entre le 6 ^e et le 15 ^e jour
10 à 15	4.5	3	0.31
16 à 20	5.1	4.9	3.2
21 à 25	2.84	3.5	3.4
26 à 30	2	2.6	3.1

Tableau n° XLV : Effets d'une exposition de durée limitée sur la reproduction des daphnies

Le benzène n'entraîne pas de modification apparente dans le cycle biologique des daphnies issues de daphnies mères intoxiquées par ce solvant, ce que nous avons pu apprécier grâce à l'expérience suivante :

Un lot de petites daphnies, nées dans un milieu contenant 10.5 ppm de benzène, a été réparti entre trois séries de milieux :

a) - un milieu sain (ne contenant pas de benzène)

b) - un milieu isotoxique (contenant la même concentration de benzène que le milieu original, c'est à dire, 10.5 ppm).

c) - un milieu hypertoxique (contenant une plus forte concentration de benzène que le milieu initial soit 13.2 ppm).

Les résultats de cette investigation nous ont montré :

- que les daphnies remises dans un milieu sain ont un développement analogue à celui des daphnies témoins, de même âge. Aucune différence significative n'a été notée entre les taux de reproduction de ces deux catégories de daphnies (tableau n° XLVI).

- les daphnies remises dans un milieu de toxicité supérieure à la toxicité du milieu natal, manifestent, parfois, une sensibilité plus faible vis-à-vis du benzène que les daphnies mères. En fait cette diminution de la sensibilité (ou augmentation de la résistance) n'est qu'apparente, et elle est due à un développement dans le milieu d'une flore bactérienne capable de dégrader le benzène. La diminution de la concentration du benzène dans le milieu, ainsi que la production de phénols, ont été observés dans certains cas. Plus précisément, c'est dans ces milieux là que le taux de reproduction des daphnies est supérieur à la moyenne. Le tableau n° XLVII, montre ces résultats.

	daphnies témoins	daphnies provenant de mères intoxiquées
taux de reproduction moyen : nombre de petits produits par daphnie adulte et par jour. (entre le 10 ^e et le 19 ^e jour)	3. 9 4. 07 4. 39 4. 6 3. 45 3. 69	3. 71 4. 2 3. 85
Moyenne des taux moyens	4. 01	3. 92
écarts types	0. 4299	0. 2524
covariance	0. 150	
t de student	0. 277	

Tableau n° XLVI : Comparaison des taux de reproduction de daphnies témoins et de daphnies issues de mères intoxiquées.

	Daphnies provenant d'un élevage de mères témoins (première génération)		Daphnies provenant d'un élevage de mères intoxiquées (deuxième génération)	
	10. 5	13. 2	10. 5	13. 2
Concentration de benzène (mg/l)				
taux de reproduction entre le 10 ^e et le 20 ^e jour (± σ)	1. 5 ± 0. 15	0. 12 ± 0. 02	1. 94 ± 0. 55	0. 32 ± 0. 2
taux de reproduction entre le 20 ^e et le 30 ^e jour (± σ)	2. 06 ± 0. 14	0. 85 ± 0. 07	2. 61 ± 0. 6	1. 11 ± 0. 25

Tableau n° XLVII : Effets du benzène sur la reproduction des daphnies provenant de mères intoxiquées.

V. 3. DEVENIR DES HYDROCARBURES AU CONTACT DES DAPHNIES

Lors des expériences effectuées en système ouvert, plus de 99 % de la quantité de benzène ou de toluène initialement introduite dans les milieux d'élevage, est évaporée en moins de 24 heures. Le phénomène dominant est donc l'évaporation des solvants.

Pour des essais effectués en système fermé, il y a deux étapes à considérer dans l'évolution des hydrocarbures au contact des daphnies :

a) - Les essais de courtes durées (moins de 10 jours) : la quasi-totalité de la quantité d'hydrocarbures introduite initialement dans le milieu d'élevage s'y retrouve inchangée.

Les daphnies s'imprègnent de l'hydrocarbure auquel elles sont exposées. Cependant, malgré une concentration élevée d'hydrocarbure dans les organismes exposés (10 à 15 fois la concentration dans le milieu), la quantité fixée par les daphnies reste très faible, et n'entraîne pas de variations mesurables de la concentration d'hydrocarbure dans le milieu (ceci en raison du faible rapport de poids des deux phases : Daphnies/Eau).

b) - Lors des essais de durée supérieure à 15 jours, les quantités d'hydrocarbures retrouvées dans les milieux expérimentaux, deux jours après les renouvellements des milieux, varient de 10 à 100 % de la quantité qui doit y être normalement présente, compte tenu de la répartition de l'hydrocarbure entre le liquide et l'atmosphère

Dans les milieux où il y a une baisse de la concentration du benzène, il y a apparition de phénols.

La dégradation du benzène dans les milieux d'élevage des daphnies est un phénomène aléatoire, il ne dépend pas de la concentration du

carburant dans le milieu, et son apparition n'est pas systématique pour des concentrations identiques de benzène engagé.

Cela laisse penser que la dégradation des hydrocarbures dans les milieux d'élevage des daphnies, est l'oeuvre d'une flore spécifique qui s'est développée de manière différente dans certains milieux, au cours des opérations successives de renouvellement de ceux-ci.

Remarques La dégradation du benzène est beaucoup plus fréquente que celle du toluène. La dégradation du benzène est plus rapide dans les milieux faiblement toxiques, sans doute parce que les daphnies sont plus grosses et par conséquent, capables de transporter davantage de germes, lors des opérations de changement des milieux d'élevage.

Dans les milieux où a été constatée une dégradation du benzène, nous avons remarqué que celle-ci continue, même lorsque les daphnies sont retirées du milieu.

Une souche bactérienne capable de dégrader le benzène et le toluène a été isolée de ces milieux, sa description sera faite plus loin.

Imprégnation des daphnies par les hydrocarbures

Les daphnies exposées au benzène ou au toluène s'imprègnent de ces composés, leurs concentrations dans ces organismes pouvant atteindre leurs limites supérieures en moins de 24 heures. Le taux d'imprégnation des daphnies exposées est fonction de la concentration du carburant dans le milieu et du poids moyen des organismes soumis à l'action des hydrocarbures, (tableau n° XLVIII)

On doit tout d'abord remarquer que les facteurs de concentration sont plus élevés pour le toluène que pour le benzène. L'âge des daphnies en début d'essai paraît jouer un rôle mais en fait, c'est le poids des individus

Toxique	Age des daphnies en début d'essais	Durée d'exposition continue en jours	Poids moyen des daphnies en μg	Concentration de solvant dans le milieu en mg /l	Concentration de solvant dans les daphnies $\mu\text{g/g}$	Facteur de concentration
BENZENE	0 à 1	5	444	6.8	21	3.1
			310	10.5	19	1.8
			255	13.2	28	2.1
	6 à 7	5	1442	6.8	59	8.7
			1175	10.5	73	6.9
			903	13.2	70	5.3
	6 à 7	1	672	6.8	39	5.7
			833	6.8	35	5.2
			1162	6.8	43	6.3
			1337	6.8	62	9.1
1442			6.8	59	8.7	
TOLUENE	0 à 1	5	511	2.5	19	7.5
			469	4	43	10.7
			287	6	57	9.6
	6 à 7	1	700	4	43.2	10.8
			777	4	42	10.5
			1190	4	47	11.8
			1351	4	56	14
			1372	2.5	28	11.2
			1071	6	47	7.8

Tableau n° XLVIII : Imprégnation des daphnies par le benzène ou le toluène

qui doit être pris en considération. En effet, les facteurs de concentration paraissent augmenter en fonction du poids des individus, mais il faut garder à l'esprit une cause d'erreur possible : chez les plus petits animaux, la surface d'échange est relativement plus grande et les possibilités de pertes du solvant, pendant les manipulations précédant les dosages, sont plus importantes.

Elimination des hydrocarbures par les daphnies

L'élimination des hydrocarbures par les daphnies contaminées et remises dans un milieu sain, est très rapide : plus de 90 % de la quantité d'hydrocarbure, accumulée dans les daphnies pendant leurs expositions à ces produits, est relarguée dans l'environnement, en moins de 4 heures lorsque les daphnies sont retirées du milieu contaminé.

V. 4 CONCLUSION

Au cours de ce chapitre, nous avons montré :

1°) - L'insuffisance du critère d'immobilité pour l'appréciation des effets toxiques sur les daphnies.

2°) - Les hydrocarbures provoquent une immobilisation momentanée des daphnies exposées. L'une des conséquences de cette immobilisation est le ralentissement de la croissance générale des organismes exposés, qui se traduit par un freinage de la croissance pondérale et un retard de la reproduction.

3°) - Le toluène est plus toxique que le benzène vis-à-vis des daphnies.

4°) - L'absence d'effets chroniques apparents sur la

reproduction et la croissance pondérale des daphnies ayant été exposées pendant une durée limitée à l'action du toxique, et sur des daphnies provenant de mères intoxiquées.

5°) - Au cours des essais de longues durées (plus de 15 jours), on peut voir apparaître dans les milieux d'élevage des daphnies contaminés par le benzène, le développement d'une flore bactérienne spécifique de la dégradation du toxique.

6°) - La concentration des hydrocarbures et leurs éliminations par les daphnies sont très rapides, et ils font intervenir la taille des organismes et la concentration dans le milieu.

CHAPITRE VI

EFFETS DU BENZENE ET DU TOLUENE SUR LES
CONSOMMATEURS II

Sur le poisson, nous avons retenu un seul critère biologique, la mort. L'appréciation de cette dernière est nettement plus aisée que pour la daphnie qui peut rester immobile pendant 72 heures, puis se remettre à nager. L'immobilisation du poisson semble totale et irréversible. Elle peut être déterminée avec précision et ainsi rendre les mesures de toxicité aigue plus précises. C'est pour cela que nous avons adopté ce matériel biologique pour évaluer les variations de toxicité de certaines associations dans lesquelles les hydrocarbures ou leurs métabolites sont engagés.

VI. 1 EFFETS DU BENZENE ET DU TOLUENE SUR L'ABLEVI. 1. 1. Système ouvert

Comme nous l'avons fait pour les chlorelles et pour les daphnies, nous avons effectué sur l'able des tests de toxicité du benzène et du toluène en système ouvert.

Des poissons à jeun, sont introduits dans des cristallisoirs contenant l'eau de Volvic. Les hydrocarbures sont introduits dans le milieu, soit directement sous forme de solvant pur (méthode A), soit sous forme de solution aqueuse mère, saturée (méthode B).

Les effets sont rapides, les mortalités apparaissent au cours des 24 premières heures. Aucune mortalité significative n'est à noter par la

Temps en Heures	CL ₅₀ du benzène en mg/l		CL ₅₀ du toluène en mg/l	
	Méthode A	Méthode B	Méthode A	Méthode B
1	180	137		
2	165	122	215	100
4	151	113	200	100
16	132	100	195	90
24	125	97	195	90
48	125	97	"	"
96	126	97	195	90

Tableau n° IL : Evolution de la concentration létale 50 % du benzène et du toluène sur l'able en système ouvert.

Temps en heures	nombre de morts	nombre de survivants
0.5	3	42
1	15	30
2	17	28
4	19	26
16	21	24
24	22	23
48	22	23
120	23	22

Tableau n° L : Mortalité de l'able au cours du temps pour une exposition à 100 mg/l du benzène, en système ouvert (Méthode B)

suite, même parmi les poissons ayant survécu dans des milieux contaminés par l'un des solvants à des concentrations supérieures ou égales à la concentration létale 50 %. Le tableau n°IL, montre l'évolution de la CL_{50} du benzène et du toluène au cours du temps. Dans le tableau n° L, nous avons reporté l'évolution de la mortalité d'un lot de poissons, dans un milieu où la concentration initiale du benzène était de 100 mg/l.

Il faut noter que la CL_{50} diminue quand le solvant est introduit dans le milieu sous forme de solution aqueuse. En effet, quand le benzène (ou le toluène) est introduit dans le milieu à l'état de produit pur, il se comporte comme tous les hydrocarbures. Une partie importante monte à la surface de l'eau, son évaporation est plus rapide et la partie solubilisée par l'eau n'est qu'une fraction de la quantité introduite dans le milieu. En d'autres termes la concentration du solvant dans l'eau est inférieure à la concentration calculée à partir de la quantité d'hydrocarbures mise en jeu. D'autre part la concentration du toxique n'est pas la même dans tous les points du milieu expérimental, ce qui peut expliquer une certaine dispersion dans les résultats obtenus. En effet, des anomalies peuvent être plus fréquemment constatées ; quand le toxique est introduit dans le milieu à l'état de solvant pur, par exemple, l'augmentation de la mortalité et l'augmentation des concentrations ne varient pas toujours dans le même sens.

VI. 1. 2. Système fermé

L'utilisation des fioles coniques (erlenmeyers) à col rodés, bouchées à l'émeri, pour des tests de toxicité du benzène et du toluène sur l'able conduit à des seuils de toxicité de même ordre de grandeur que ceux enregistrés pour les deux autres espèces. Comme cela a été montré chez la daphnie et chez les chlorelles, les concentrations létales déterminées en système fermé sont plus faibles que celles mesurées en système ouvert.

Dans le chapitre "Evolution abiotique du benzène et du toluène dans l'eau", nous avons montré que dans les systèmes fermés, il se produit une partition de l'hydrocarbure entre la phase liquide et l'atmosphère du récipient. Nous allons considérer ici l'influence de cette partition sur la toxicité du benzène et du toluène sur l'able.

. Mode opératoire : Dans des fioles coniques de 300 ml, à cols rodés, bouchées à l'émeri, sont introduits successivement dans chaque récipient : un poisson dans une quantité connue d'eau, du benzène ou du toluène sous forme de solution aqueuse, saturée, et la quantité d'eau nécessaire pour ramener le volume total du liquide à 100, 150, 200, ou 250 ml.

. Résultats : La détermination graphique des concentrations létales 50 %, par la méthode des totaux cumulatifs (de poissons morts et vivants), et le calcul de ces concentrations par la méthode dite SPEARMAN-KARPER modifiée par HAMILTON M. A et coll. (1977), donnent les résultats présentés dans le tableau n° LI.

Ce dernier montre qu'en rapportant le calcul des concentrations létales 50 % aux concentrations initiales dans le milieu, les résultats obtenus dépendent du volume de liquide dans le récipient. Les CL_{50} diminuent quand le volume occupé par le milieu augmente. Par contre si on prend en compte, pour la détermination de ces CL_{50} la partition des hydrocarbures entre l'eau et l'atmosphère du contenant, on trouve d'une part que les concentrations létales du benzène et du toluène sont équivalentes et d'autre part que les CL_{50} de ces solvants ne dépendent pas du volume du milieu.

Remarque :

a) - L'abaissement de la CL_{50} pour les volumes de liquide de 250 ml observé pour les deux hydrocarbures, traduit un phénomène général déjà signalé par de nombreux auteurs. Il y a accroissement de la sensibilité

Volume du milieu liquide (en ml)	Durée d'exposition en heures	CL ₅₀ du benzène		CL ₅₀ du toluène	
		rapportée aux quantités introduites	* corrigée	rapportée aux quantités introduites	* corrigée
100	24	26	17.3	30	21
	48	25	16.7	28	19.6
	72	21.5	14.3	19.5	13.7
	96	20	13.3	17	11.9
150	24	23	17.3	27	20.9
	48	22	16.5	25	19.4
	72	19	14.3	18	14
	96	17.7	13.3	16	12.4
200	24	25	17.1	25	21.3
	48	20	16.7	24	20.4
	72	17	14.2	16.5	14
	96	16.1	13.4	15	12.8
250	24	15.5	14.2	20	18.5
	48	15.5	14.2	18	16.7
	72	14	12.8	15	13.9
	96	13.8	12.7	14	13

Tableau n° LI : Evolution des CL₅₀ du benzène et du toluène, en fonction du temps dans les flacons fermés.

***corrigée : tenant compte de la répartition de l'hydrocarbure entre les deux phases (air et eau)**

aux agents toxiques, des organismes vivants dans des conditions restrictives. Dans le cas signalé, c'est le faible volume de l'atmosphère, qui est responsable de la sensibilité des poissons, car la quantité d'oxygène disponible pour la survie de ces organismes, devient très faible.

b)- Au cours des 48 premières heures, la CL_{50} du benzène est plus faible que celle du toluène. Les deux composés ont pratiquement la même CL_{50} en 72 heures alors que la CL_{50} (96 heures) du toluène est plus basse que celle du benzène. Cela pourrait être en relation avec la vitesse de pénétration du toxique dans l'organisme.

Conclusion

Nous voyons donc que les CL_{50} du benzène et du toluène peuvent varier selon la manière dont la détermination est faite.

Pour étudier la toxicité des substances volatiles sur la faune ou la flore aquatique, il est primordial de connaître les coefficients de partage du toxique entre la phase aqueuse et l'atmosphère. Quand on ignore ce coefficient, ou quand la concentration dans le milieu liquide à l'équilibre, ne peut être prévue, les essais de toxicité doivent être faits dans des flacons bouchés, remplis de liquide, en l'absence de toute bulle d'air.

L'avantage de ce procédé est de très bien connaître la concentration de toxique dans le milieu mais l'inconvénient est que la quantité d'oxygène disponible devient faible, ce qui limite la durée des expériences.

La possibilité de prévoir la concentration de toxique dans le milieu liquide à l'équilibre, permet de travailler avec des rapports de volume Air/Eau convenables, c'est à dire autorisant des teneurs en oxygène suffisantes pour permettre la prolongation de la durée des tests.

Lorsque le calcul des CL_{50} est ramené à la concentration réelle de l'hydrocarbure dans le milieu liquide, les résultats deviennent alors plus cohérents

VI. 2. DEVENIR DU BENZENE ET DU TOLUENE AU CONTACT DE L'ABLE

VI. 2. 1. Concentration et élimination du benzène et du toluène par l'able

VI. 2. 1. 1. Imprégnation de l'able par les hydrocarbures

La recherche et le dosage du benzène et du toluène dans la chair des poissons exposés à ces hydrocarbures, ont été faits d'une manière systématique et les résultats obtenus montrent que le taux d'imprégnation de l'animal dépend de la concentration dans le milieu, du temps d'exposition, et du poids du poisson.

Les résultats obtenus (figure n° 25), montrent que :

a) - La pénétration du benzène dans le poisson atteint sa limite supérieure plus rapidement que la pénétration du toluène. Pour une concentration donnée d'hydrocarbure dans le milieu, la concentration maximale du benzène dans la chair de l'able est atteinte en 48 heures, alors que la concentration maximale du toluène n'est atteinte qu'au bout de 96 heures.

b) - Pour une concentration initiale donnée d'hydrocarbure dans le milieu, en valeur absolue, la concentration maximale d'hydrocarbure dans le poisson est atteinte entre le troisième et le quatrième jour d'exposition. En effet, on note à partir du 4^{ème} jour une diminution de la concentration d'hydrocarbure dans le poisson, sans doute en relation avec la diminution de la concentration d'hydrocarbure dans le milieu par un phénomène de bio-dégradabilité

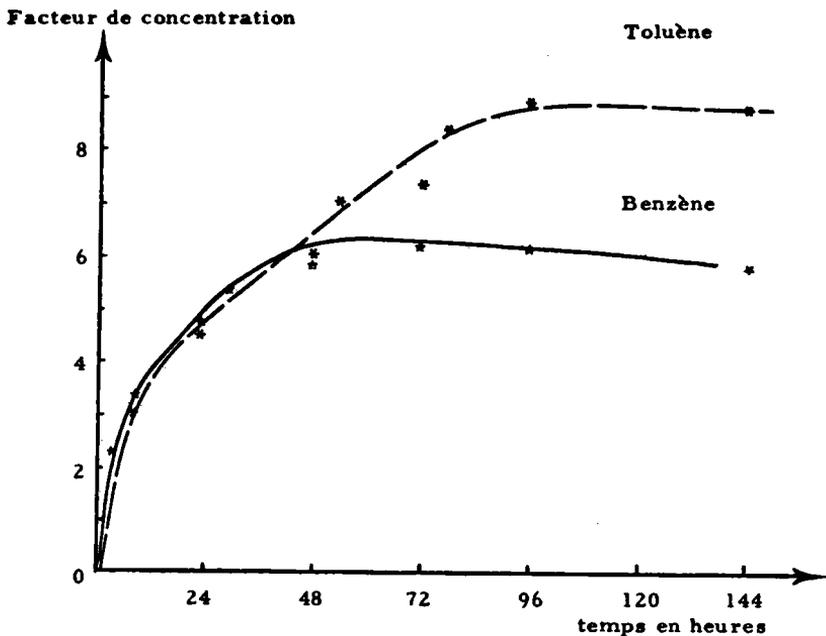


Figure n° 25 : Evolution du facteur de concentration du benzène et du toluène dans le poisson, au cours du temps.

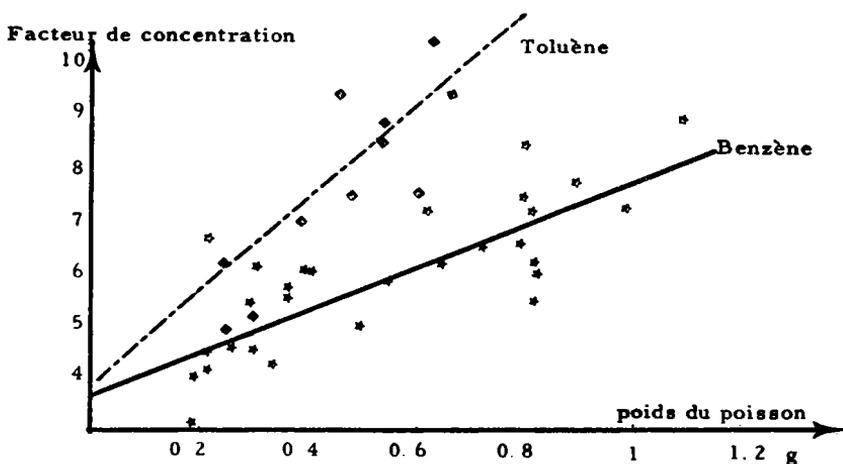


Figure n° 26 Evolution du facteur de concentration en fonction du poids du poisson.

c) - Le facteur de concentration des hydrocarbures dans le poisson est défini de la manière suivante

$$F = \frac{\text{concentration d'hydrocarbure dans le poisson}}{\text{concentration d'hydrocarbure dans le milieu}}$$

Il montre que le taux d'imprégnation du poisson par le toluène est plus grand que le taux d'imprégnation par le benzène ; en effet, les valeurs moyennes de F pour ces deux solvants sont 6 et 9 respectivement pour le benzène et le toluène.

La figure n° 26 montre que le facteur de concentration croît avec le poids de l'animal. La recherche d'une corrélation entre F et p (poids du poisson), nous a montré que ces deux phénomènes pourraient être reliés entre eux par une relation de la forme :

$$F = ap + b$$

La détermination des constantes a et b par la méthode des moindres carrés, conduit aux relations suivantes :

$$F = 3.76 + 3.8 p \text{ pour le benzène } (r^2 = 0.82)$$

et

$$F = 3.8 + 8.7 p \text{ pour le toluène } (r^2 = 0.79)$$

VI. 2. 1. 2. Élimination des hydrocarbures par le poisson

Lorsque des poissons contaminés par des hydrocarbures sont remis dans un milieu sain, on constate une diminution de la teneur en hydrocarbures dans leurs tissus. Il y a donc "épuration" ou "relargage" par le poisson des hydrocarbures accumulés dans sa chair.

La cinétique de cette élimination des hydrocarbures, dépend des conditions opératoires, et semble obéir aux lois générales de migration d'un soluté à travers la surface d'échange séparant deux phases. Ainsi, par exemple tous les facteurs qui contribuent à diminuer la concentration des hydrocarbures éliminés à l'interface poisson/milieu facilitent l'épuration par l'animal, ces facteurs pouvant être

- un renouvellement continu du milieu à la surface du poisson (soit par agitation du milieu, soit par excitation du poisson).

- une aération du milieu qui tout en renouvelant le milieu, permet d'avoir un gradient de concentration maximal entre poisson et milieu, par l'évaporation des hydrocarbures éliminés par l'organisme animal.

Mesure de l'élimination des hydrocarbures par l'able

Mode opératoire :

Dans des ballons d'une capacité de 2 litres, nous avons introduit d'abord environ 800 ml d'eau de Volvic, puis 20 poissons, puis 6 ml d'une solution saturée de benzène, ou 20 ml d'une solution saturée de toluène, enfin la quantité d'eau de Volvic nécessaire pour compléter à 1 litre.

Au bout de 48 heures (ou 96 heures), temps nécessaire pour que l'infiltration du benzène (ou du toluène) dans l'able atteigne son palier.

les poissons sont retirés de leur milieu puis lavés un par un, à l'aide de 3 x 50 ml d'eau saine.

Deux lots de 10 poissons chacun ont été retenus pour la détermination immédiate du taux d'imprégnation de l'animal par le benzène et le toluène, ces teneurs constituant en outre la concentration en début de l'élimination.

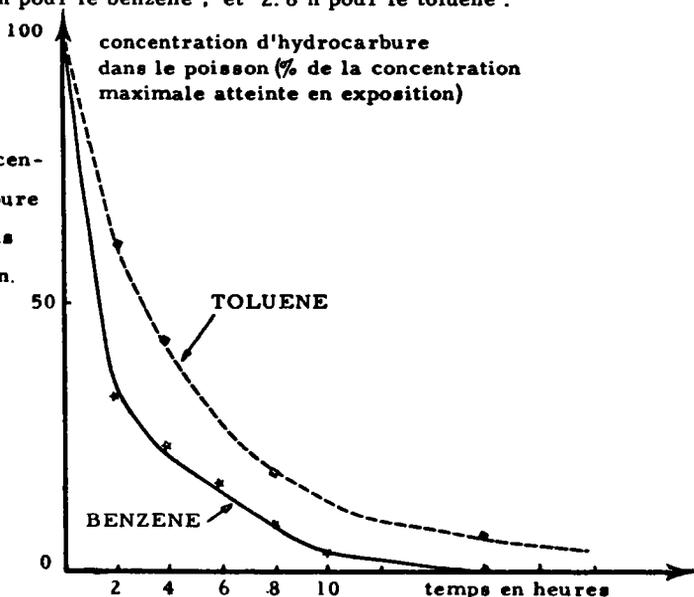
Les autres poissons ont été répartis dans des fioles coniques de capacité 300 ml, contenant chacune 100 ml d'eau de Volvic exempt de hydrocarbures.

Les dosages du benzène et du toluène apparaissant dans les milieux et restant dans le poisson ont été effectués au cours du temps.

La figure n° 27, montre clairement que l'élimination du benzène est plus rapide que celle du toluène ; les temps de 1/2 vie de ces substances dans la chair du poisson, en phase d'épuration dans les conditions décrites sont : 1.2 h pour le benzène , et 2.8 h pour le toluène .

Figure n° 27 :

évolution de la concentration d'hydrocarbure dans le poisson dans la phase d'épuration.



VI. 2. 1. 3. Conclusion

L'imprégnation du poisson par les hydrocarbures est rapide. La concentration maximale du benzène dans l'animal entier est atteinte en 48 h alors que la concentration maximale du toluène est atteinte en 96 heures. Le fait que ces concentrations puissent atteindre une limite qui ne dépend que de la nature de l'hydrocarbure et de la concentration du solvant dans le milieu, laisse penser que la pénétration de l'hydrocarbure dans le poisson est un phénomène purement physico-chimique. Le facteur de concentration calculé dans ce chapitre serait le coefficient de partage de l'hydrocarbure entre la phase eau et la phase poisson.

En effet, l'introduction dans une eau contenant du benzène ou du toluène, d'un ou de plusieurs poissons morts, conduit également à une distribution du benzène entre les deux phases (eau-poisson).

Le calcul des coefficients de partage (I_p) a été réalisé par application de la formule :

$$I_p = \frac{C'_p}{C_1}$$

où

- I_p : coefficient de partage de l'hydrocarbure entre l'eau et le poisson.
- C'_p : concentration de l'hydrocarbure dans le poisson mort.
- C_1 : concentration de l'hydrocarbure dans la phase liquide à l'équilibre.

La comparaison de ces coefficients de partage avec les facteurs de concentration (F_c) est faite dans le tableau n° LII.

	Benzène		Toluène	
	F _c	I _p	F _c	I _p
24 h	4.4	9.5	4.7	8.4
48 h	5.5	10.2	5.8	13.7

Tableau n° LII : Coefficient de partage du benzène et du toluène entre l'eau et les poissons : (F_c : pour les animaux vivants ; I_p pour les animaux morts).

Il est intéressant de noter que les concentrations du benzène et du toluène sont plus grandes dans les poissons morts que dans les poissons vivants pour une même période d'exposition. Cela nous permet d'avoir de bonnes raisons de croire que la concentration du benzène et du toluène par le poisson est un phénomène passif. L'absence d'activité des poissons morts, qui s'opposerait à l'imprégnation par des phénomènes de rejets, est probablement la cause de la différence des concentrations.

Par ailleurs, il faut signaler que l'élimination des hydrocarbures par les cadavres de poisson est plus lente que par les poissons vivants. Ainsi, les temps de 1/2 vie du benzène et du toluène dans les poissons mis en épuration dans les conditions expérimentales décrites plus haut donnent les résultats suivants :

	temps de 1/2 vie dans les poissons vivants (heures)	temps de 1/2 vie dans les poissons morts (heures)
Benzène	1.2	2.2
Toluène	2.8	5.2

D'autre part, les variations des vitesses d'imprégnation et d'élimination avec la taille des organismes exposés, montrent que les organismes de petites tailles concentrent et éliminent les hydrocarbures plus rapidement que les gros. Ce phénomène est sans doute en relation avec le rapport surface d'échange/volume des individus.

Toutes ces observations nous permettent de penser qu'il n'y a pas de bioaccumulation évidente des hydrocarbures légers dans les organismes exposés, mais au contraire, une bioélimination s'oppose aux lois de l'équilibre thermodynamique.

VI. 2. 2. Transformation de benzène et du toluène au contact de l'able

Au cours des tests de toxicité du benzène et du toluène sur l'able, nous avons constaté que ces hydrocarbures subissaient systématiquement une dégradation partielle. Des phénols à des concentrations facilement détectables par notre technique d'analyse, apparaissaient dans les milieux contaminés par ces hydrocarbures.

Remarques :

1 - Les phénols apparaissent uniquement dans les milieux qui contiennent à la fois un poisson et l'un des deux hydrocarbures.

2 - Il n'y a pas de relation directe, évidente entre la quantité de phénol produite dans le milieu et la concentration d'hydrocarbure mise en oeuvre. (tableau n° LIII).

3 - Curieusement, c'est dans les milieux où le poisson a été tué que la dégradation des hydrocarbures est la plus grande.

4 - La dégradation continue même après la mort du poisson

5 - Dans les milieux n'ayant pas abrité de poissons, il n'y a pas de dégradabilité des hydrocarbures.

6 - Il y a biodégradabilité du benzène et du toluène dans l'eau prélevée des aquariums servant à l'acclimatation de l'able.

La concordance de ces observations nous a conduit à examiner l'éventualité d'une dégradation du benzène et du toluène par des microorganismes symbiotiques ou saprophytes de l'able ; ce que nous verrons dans le chapitre suivant.

Concentration initiale de benzène dans le milieu	Concentrations de phénols apparaissant dans les milieux							
	au 4 ^{ème} jour				au 6 ^{ème} jour			
	A	B	C	D	A	B	C	D
0	0	0	0	0	0	0	0	0
7.6	0	traces	x	traces	0	200	x	500
10	0	200	x	traces	0	150	600	50
14	0	50	700	traces	0	150	400	200
17.8	0	50	300	traces	0	traces	2000	100

Tableau n° LIII : Comparaison des concentrations de phénols apparaissant dans les milieux d'élevages de l'able. A: milieu n'ayant pas abrité de poisson B: milieu abritant un poisson vivant, C: milieu abritant un poisson mort en cours d'essai, et D: milieu ayant abrité les ables.

VI. 3. EFFETS DES XYLENES ET DE L'ETHYLBENZENE SUR L'ABLE

VI. 3. 1. Toxicité

Les variations des CL_{50} de l'éthylbenzène et des xylènes vis-à-vis de l'able, au cours du temps, sont nettement plus grandes que celles obtenues pour le toluène ou le benzène (tableau n° LIV). On remarque au cours des 24 premières heures d'exposition, une diminution de la toxicité lelong de la série : benzène - toluène - xylènes = éthylbenzène.

Entre 72 et 96 heures, on obtient sensiblement la même CL_{50} pour tous les hydrocarbures monoaromatiques étudiés.

Temps en heures	CL_{50} en mg/l				
	Benzène	Toluène	p-Xylène	Xylènes	Ethylbenzène
24	17.3	21	26	24	24.5
48	16.7	19.6	20.5	18.5	19
72	14.3	14	15	15	14.7
96	13.3	12	13	12.7	12
ΔCL_{50}	4	9	13	11.3	12.5

Tableau n° LIV : Evolution des CL_{50} de quelques hydrocarbures monoaromatiques, au cours du temps.

$$\Delta CL_{50} = CL_{50} (24h) - CL_{50} (96h)$$

IV. 3. 2. Imprégnation

Le facteur de concentration (F_c), pour le régime stationnaire (à l'équilibre) croît avec la masse molaire de l'hydrocarbure (tableau n°LV)

Hydrocar- bure	Volume molaire	Ts (en heures)	Facteur de concentration	temps de 1/2 vie du solvant dans l'able
Benzène	88.7	48	6	1.2
Toluène	106.3	80	8.7	2.8
Xylènes	120.6	130	13.4	4
Ethylbenzène	122.4	130	14.1	3.7

Tableau n° LV : Variations des facteurs de concentration et des temps de 1/2 vie des hydrocarbures aromatiques dans l'able.

T_g : temps nécessaire pour que soit atteint le régime stationnaire (concentration d'équilibre entre l'able et le milieu).

VI. 3. 3. Elimination

Au cours des opérations d'épuration du poisson (remise de l'animal dans un milieu sain), l'élimination de la moitié des hydrocarbures contenus initialement dans celui-ci a lieu dans des délais qui augmentent le long de la série : benzène - toluène - xylènes et éthylbenzène (tableau n° LV).

VI. 3. 4. Conclusion

Les augmentations de l'amplitude de variations des CL_{50} des facteurs de concentration, du temps de 1/2 épuration, et du temps nécessaire pour que la concentration d'hydrocarbure dans le poisson atteigne sa valeur d'équilibre, le long de la série : benzène toluène xylènes et éthylbenzène ; semble en relation avec l'augmentation des volumes molaires de ces composés. Ainsi la recherche de corrélations entre les paramètres cités et le volume molaire conduit aux relations suivantes

F_c	= 0.24	V	-16	$r^2 = 0.98$
ΔCL_{50}	= 0.24	V	-17	$r^2 = 0.97$
T_s	= 2,54	V	- 182	$r^2 = 0.98$
τ	= 0.08	V	- 5.8	$r^2 = 0.98$

où

F_c : facteurs de concentration

ΔCL_{50} : CL_{50} (24h) - CL_{50} (96h)

T_s : temps nécessaire pour que la concentration d'hydrocarbure dans le poisson atteigne sa valeur d'équilibre,

τ : temps de 1/2 vie de l'hydrocarbure dans la chair du poisson en phase d'épuration.

VI. 4. COMPARAISON DE LA SENSIBILITE DE L'ABLE A CELLE D'UN POISSON "DE REFERENCE" LE BRACHYDIANO RERIO

VI. 4. 1. Sensibilité

Le fait que l'able soit un poisson peu utilisé dans les essais biologiques nous a conduit à comparer sa sensibilité à celle d'un poisson mieux connu le Brachydiano rerio. Les résultats obtenus montrent que les deux espèces ont des sensibilités du même ordre de grandeur à l'égard des hydrocarbures aromatiques, et d'un toxique de référence, le dichromate de potassium.

La détermination des concentrations létales 50 % du benzène et du toluène sur le Brachydiano rerio, nous a montré que cette espèce est légèrement moins sensible que l'able à l'action des hydrocarbures. En effet, dans les mêmes conditions d'expérience on trouve les valeurs suivantes :

Toxique	Able	Brachydiano
Benzène	13.3	16.8
Toluène	13.4	16.2
$K_2 Cr_2 O_7$	420	390

La différence de sensibilité des deux espèces vis-à-vis des hydrocarbures peut être due à la différence de taille entre les deux lots mis en oeuvre. En effet, au cours de nos tests de toxicité du benzène sur l'able, nous avons remarqué que dans les milieux de mêmes concentrations la mortalité la plus forte est enregistrée pour les plus gros individus. Un test semi-quantitatif nous a permis de conforter cette remarque.

En effet, la détermination des concentrations létales 50 % du benzène et du toluène sur deux lots de poissons (le premier lot est constitué par des jeunes de taille moyenne 40 mm environ et de poids moyen 300 mg environ ; le deuxième lot est formé de gros poissons dont la taille moyenne et le poids moyen seraient respectivement 50 mm et 600 mg). Les résultats suivants ont été obtenus :

Taille du poisson en mm	Poids du poisson en mg	CL ₅₀ du benzène en mg/l	CL ₅₀ du toluène en mg/l
L < 45	P < 400	16	15
L > 45	P > 400	13	13.2

VI. 4. 2. Capacités de concentration et d'élimination

Compte tenu de leur différence de taille, les deux espèces de poisson ont pratiquement la même capacité de concentration et d'élimination des hydrocarbures. Les facteurs de concentration du benzène et du toluène pour le Brachydiano sont respectivement 5 et 8.

VI. 5. CONCLUSION

Les CL_{50} varient avec la méthode de leur détermination : quand elles sont rapportées aux quantités introduites dans le milieu, les valeurs trouvées sont en général plus élevées que celles rapportées aux concentrations. L'écart entre les deux déterminations est plus grand dans le système ouvert que dans le système fermé.

Le volume molaire des hydrocarbures aromatiques monocycliques semble avoir un effet sur l'évolution des CL_{50} au cours du temps, ainsi que sur les cinétiques de leur concentration et élimination par l'able.

Plus le volume molaire est petit, plus rapides sont l'imprégnation et l'élimination ; et plus faible est l'évolution de la CL_{50} au cours du temps (cas du benzène).

Les molécules les plus grosses (xylènes et éthylbenzène) par contre, pénètrent l'organisme plus difficilement et leur élimination est également plus lente. Les variations des CL_{50} entre 24 heures et 96 heures sont importantes.

Les facteurs de concentration augmentent également avec le volume molaire.

CHAPITRE VII

LES DECOMPOSEURS

VII. 1. Recherche et Identification des Microorganismes Dégradant le Benzène et le Toluène dans les Milieux d'Elevage du Poisson et des Daphnies**VII. 1. 1. Identification des bactéries**

Les isolements et recherches de souches pures de bactéries capables de dégrader le benzène ou le toluène, ont été tentés à partir des milieux où le catabolisme de ces produits a été constaté.

Dans tous les milieux contaminés par le benzène et ayant abrité l'able, une souche bactérienne a été trouvée systématiquement. Comme elle a paru sensible à la pénicilline, nous avons traité les milieux d'élevage par cet antibiotique. Constatant que la dégradation pouvait continuer à se faire, nous avons pu alors en isoler une 2^{ème} souche, pénicillino-résistante.

Nous avons ensuite cherché à les identifier par une série de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques décrits dans les tableaux n° LVI et LVII.

La première souche se présente sous forme de bâtonnets Gram (-), immobiles, présentant beaucoup de caractères communs avec Acinetobacter calcoaceticus (Moraxella II) tant sur le plan de l'aspect des cultures que sur les propriétés biochimiques (activités catalasiques et oxydasiques, utilisation des sucres, dérivés soufrés, ...). Pourtant elle

Caractères	Souche M	Souche M'	<u>Acinetobacter calcoaceticus</u> (Moraxella II)
Morphologie	bâtonnets	bâtonnets trapus	bâtonnets
{ Coloration de Gram	-	-	-
{ Mobilité à l'état frais	immobile	immobile	immobile
{ Mobilité au mannitol	immobile	immobile	immobile
Culture à 4°C	+	+	+
Culture à 24°C	+(crème)	+(crème)	+(crème)
Culture à 41°C	+	-	+
King A	blanc crème	crème	crème
King B	blanc crème	crème	crème
Lasser I N	blanc crème	crème et cristallisation	crème et cristallisation
Citrate de Simons	-	-	+
Urée	+	-	-
Indole	-	-	-
Oxydase	-	-	-
Catalase	+ léger	+	+
Rouge de méthyle	-	-	+
Voges Proskauer	-	-	-
Klieger Lactose	-	-	-
H ₂ S	-	-	-
Gaz	-	-	-
Glucose	-	-	±
Hugh et Leifson	alcalinisation dans le tube sans huile	alcalinisation dans le tube sans huile	oxidative
Mannitol	-	-	-
Saccharose	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Maltose	-	-	-
Arabinose	-	-	-
Galactose	-	-	+
Levulose	-	-	-
ONPG	-	-	-
Bouillon nitrate	trouble +léger	trouble -	+(léger)
{ Bouillon Thioglycolate	trouble épais dans la partie supérieure	trouble épais dans la partie supérieure	trouble épais dans tout le tube
Gélatine	-	-	-
Caséine	-	-	-
Tween 80	+	+	+
Amidon	-	-	-
{ Action de la Pénicilline	sensible	sensible	résistante

Tableau n° LVIII Quelques caractères des souches M et M' isolées et de la souche Acinetobacter calcoaceticus

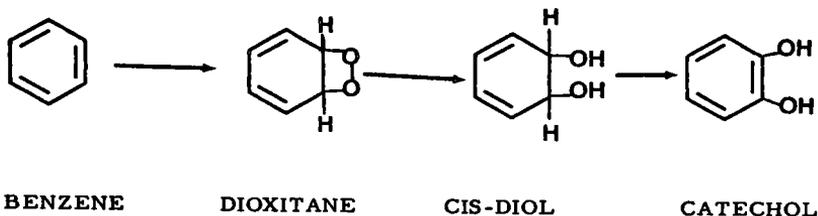
Caractères	Souche P	<u>Pseudomonas</u> <u>putida</u>
Morphologie	bâtonnets	bâtonnets
Coloration de Gram	-	-
Mobilité à l'état frais	mobile	mobile
Mobilité au Mannitol	mobile	mobile
Culture à 4°C	+	+
Culture à 24°C	+jaune pâle	+ crème
Culture à 41°C	-	-
King A	colonies jaunes pâles	crème
King B	colonies jaunes pâles	crème, pigments
	} pigments diffusibles	diffusibles verts
		verts fluorescents
Lasser 1 N	colonies jaunes pâles	crème
	} pigments diffusibles	pigments diffusibles
		verts bruns
	+ cristallisations	+ cristallisations
Citrate de Simons	+	+
Urée	+	+
Indole	-	-
Oxydase	+ lent	+
Catalase	+	+
Rouge de méthyle	-	+
Voges Proskauer	-	-
Klieger Lactose	-	-
H ₂ S	-	-
Gaz	-	-
Glucose	±	±
Hugh et Leifson	oxidative	oxidative
Mannitol	-	-
Saccharose	-	-
Sorbitol	-	-
Maltose	-	-
Arabinose	-	-
Galcatose	+	+
Levulose	-	-
ONPG	-	-
Bouillon nitrate	+ léger	+ très léger
Bouillon Thioglycolate	} trouble épais 1/3 supérieure	trouble épais 1/3 supérieure
Gélatine		
Caséine	-	-
Tween 80	-	-
Amidon	-	-
Action de la Pénicilline	résistante	résistante

Tableau n° LIX : Quelques caractères de la souche P et de la souche
Pseudomonas putida

s'en différencie par le fait qu'elle est sensible à la pénicilline.

Elle pourrait alors être considérée comme très voisine de Moraxella lacunata (Moraxella I) pénicillino-sensible, mais cette dernière est oxydase (+) et non oxydase (-).

Le genre *Moraxella* (II) a été décrit par HOGN T. et JAENICKE L.(1972) comme spécifique de la dégradation du benzène. Nous nous sommes procurés un échantillon d'Acinetobacter calcoaceticus à l'Institut Pasteur de Paris et à notre grande surprise, cette souche s'est avérée incapable de dégrader le benzène dans les mêmes conditions que la souche que nous avons isolé. Cette dernière semble se singulariser des autres microorganismes par la manière de dégrader cet hydrocarbure. En effet, il semble que les microorganismes, actuellement isolés et reconnus capables d'exercer cette action, le font tous selon la voie suivante :



Notre souche emprunte une voie conduisant d'abord à la formation du phénol à partir du benzène et de l'o-crésol à partir du toluène comme cela a pu être observé chez les mammifères. Toutefois, étant donné la forte ressemblance de notre souche avec les genres *Moraxella*, nous l'appellerons souche "M" Elle est très adaptée à la dégradation du benzène, du toluène et du phénol, qui peuvent même, lui servir d'unique source de carbone

La deuxième souche se présente également sous forme de bâtonnets mobiles Gram (-), ses caractères sont tout à fait comparables à ceux de Pseudomonas putida, qui a déjà été décrite comme apte à dégrader le benzène, (GIBSON D. T. et coll. 1968, 1970, 1971 ; AXCELL B. C. et GEARY P. J. 1973, 1975).

Dans ce cas, le diagnostic n'a pas posés de problèmes et nous l'appelons la souche P.

A partir des milieux d'élevage des daphnies, nous avons isolé une souche bactérienne très voisine à la première souche M, que nous avons appelé souche (M') mais qui pose à nouveau les mêmes problèmes de caractérisation.

VII. 1. 2. Cinétique de dégradation du benzène et du toluène par la souche M

La vitesse de dégradation des hydrocarbures par les bactéries obéit aux lois générales de l'utilisation des substrats par les organismes vivants et par conséquent elle va dépendre entre autre de :

- la taille de l'inoculum, de
- la concentration de l'hydrocarbure, de
- la quantité d'oxygène disponible, et
- des conditions opératoires (température, salinité, . . .).

L'étude entreprise dans ce chapitre n'a pas la prétention d'être exhaustive, elle permettra néanmoins d'apprécier les limites d'utilisation par cette souche des hydrocarbures aromatiques.

Le tableau n° LVIII, montre :

- a) - que les bactéries de la souche M se développent mieux

Temps en heures	0	4	24	48	78	144	168
Evolution des cultures de bactéries dans des milieux exempts de benzène (milliers de cellules par ml)	45		127				90
Evolution des cultures de bactéries en présence de benzène (milliers de cellules par ml)	45	43	151	166	122	220	12230
Evolution de la concentration de benzène (en mg/l)	20	20	20	19	18	2	0.1
Evolution de la concentration de phénols (en mg/l)	0	0	0	0	0.5	2.5	2
Evolution des cultures de bactéries dans des milieux exempts de benzène (milliers de cellules par ml)	2550		3400		2200		
Evolution des cultures de bactéries en présence de benzène (milliers de cellules par ml)	2550	2600	4100	12300	21500	21700	21800
Evolution de la concentration de benzène (en mg/l)	20	16	0.5	00	0	0	0
Evolution de la concentration de phénols (en mg/l)	0	1	2	0.5	0	0	0

Tableau n° LVIII : Evolution des cultures des bactéries de la souche M en présence de benzène ; influence de la taille de l'inoculum sur la dégradation du benzène

en présence du benzène que dans le milieu exempt de cet hydrocarbure.

Les hydrocarbures étant la seule source de carbone dans les milieux de culture, le développement des bactéries dans les milieux contaminés par le benzène, explique l'abilité des bactéries à l'utiliser comme unique source de carbone.

b) - plus la taille de l'inoculum est grande, plus rapide est la dégradation du benzène.

. Influence de la quantité d'oxygène disponible sur la dégradation du benzène

La dégradation du benzène, du phénol ou du toluène par la souche M dépend de la quantité d'oxygène disponible dans le milieu, la dégradation diminue ou s'arrête quand la quantité d'oxygène dans le milieu devient faible.

La figure n° 28 montre l'évolution de la dégradabilité du benzène au cours du temps dans l'atmosphère confinée d'un flacon à col rodé bouché à l'émeri.

On note une chute du nombre de bactéries viables, et un arrêt de la dégradabilité du benzène quand la quantité d'oxygène disponible dans le milieu devient nulle.

Cet arrêt de l'activité bactérienne n'est pas dû à une accumulation de substances toxiques dans le milieu, mais bien à un manque d'oxygène. En effet, la quantité du benzène ou du phénol dégradé ainsi que le nombre de bactéries viables augmentent avec la quantité d'oxygène disponible dans le milieu, (figure n° 29).

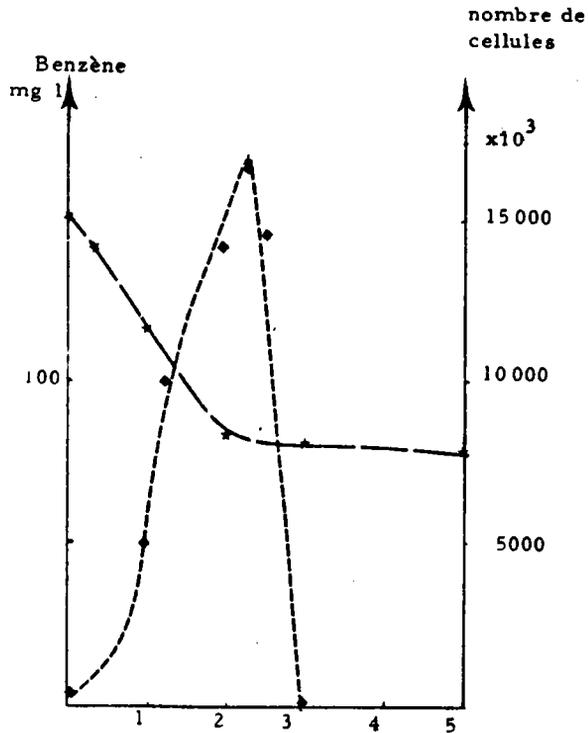


Figure n° 28 : Dégradation du benzène par la souche M

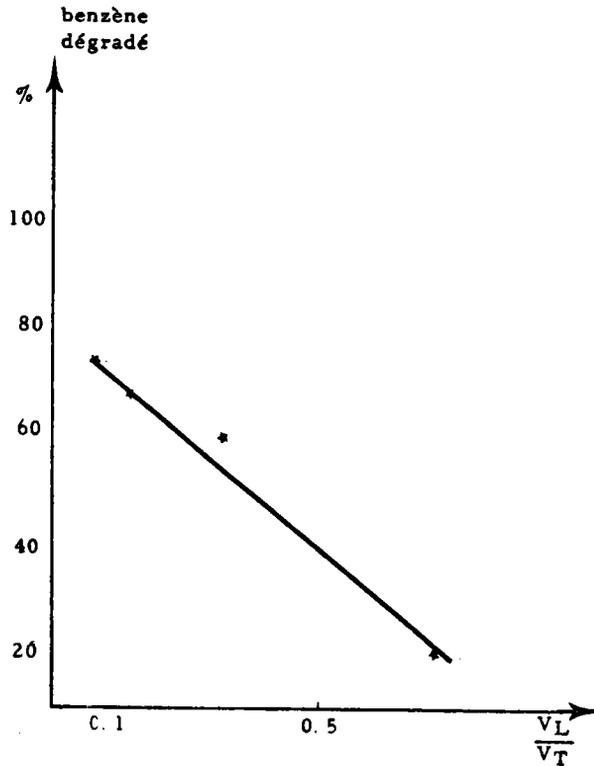


Figure n° 29 : Dégradation du benzène par la souche M
influence de la quantité d'oxygène disponible
 V_L : volume du liquide
 V_T : volume total du flacon

Influence de la concentration de l'hydrocarbure sur la vitesse de dégradation

La dégradation du benzène ou du toluène par la souche M dépend de la concentration de ces carburants dans le milieu :

a) - pour des concentrations supérieures à 400 mg/l de benzène ou 320 mg/l de toluène, il y a inhibition de la croissance des bactéries.

b) - pour des concentrations inférieures à 120 mg/l ou 100 mg/l de toluène, le temps de 1/2 vie du carburant dans le milieu augmente avec sa concentration initiale alors que la production de biomasse au cours d'une durée déterminée augmente avec celle du carburant.

c) - pour les concentrations intermédiaires, le temps de 1/2 vie de l'hydrocarbure dans le milieu augmente beaucoup avec la concentration mais la biomasse produite pendant un temps déterminé, diminue avec la concentration de l'hydrocarbure.

VII. 2. TOXICITE DES METABOLITES

La possibilité de production *in situ*, dans les milieux contaminés par le benzène ou le toluène, de quantités non négligeables de phénols et d'ions nitrites, nous a conduit à situer la toxicité de ces métabolites vis-à-vis des trois espèces choisies par rapport à celles des composés ayant entraîné leur synthèse.

VII. 2. 1. Le phénol

La responsabilité du phénol, métabolite majeur dans tous les milieux contaminés par le benzène a été appréciée.

VII. 2. 1. 1. Effets du phénol sur les chlorelles

Les essais de toxicité du phénol sur les chlorelles, menés aussi bien en système ouvert qu'en système fermé, montrent que pour des concentrations inférieures à 80 mg/l de milieu, il n'y a pas inhibition de la croissance des algues. Par contre une très légère stimulation a été notée pour cette gamme de concentration, phénomène analogue à celui décrit par GONCHAROVA A. V. (1975), cet auteur signale que le phénol exalte la photosynthèse d'une algue bleu-verte Oscillatoria splendida quand sa concentration dans le milieu est comprise entre 1 et 100 mg/l ; pour les concentrations supérieures, il y a inhibition de la croissance.

Un fait paraît important : sur le métabolisme de l'azote par les chlorelles, le phénol semble agir de la même manière que le benzène ; on constate une accumulation d'ions nitrites dans le milieu, croissante avec la concentration de phénol, (tableau n° LIX).

VII. 2. 1 2 Effets du phénol sur les daphnies

L'action du phénol sur les daphnies semble différer de celle du benzène

Concentration du phénol en mg/l	nombre de cellules/ml 10^6	D. O à 665 nm $\times 10^3$	volume moyen des cellules en μm^3	volume cellulaire $\mu\text{l/l}$	Concentration de NO_2^- en mgN/l
0	14	278	15.3	214	0.3
0.4	12.7	305	17.2	219	0.3
1	15.2	310	16.3	248	0.3
2	14	310	16.9	237	0.4
5	13.2	315	17.7	234	0.6
10	16.7	340	15.7	261	0.8
20	15.4	325	16.1	248	1
40	17.2	330	15.8	272	0.8
50	16	320	15.7	250	1.3
80	11.6	301	17.2	200	2
100	11	287	16.6	183	1.7

Tableau n° LIX : Effets du phénol sur les chlorelles

a) - Toxicité aigue

L'immobilisation des daphnies par le phénol, présente les deux caractères suivants :

- elle est irréversible
- elle n'est pas immédiate

Les CI_{50} (concentrations immobilisatrices de 50 % de la population), du phénol vis-à-vis des daphnies varient de 50 mg/l en 24 heures à 30 mg/l en 96 heures, et évoluent donc avec le temps.

b) - Toxicité sub-aigue

Pour des concentrations inférieures à 10 mg/l de phénol, on note en général une précocité de la reproduction avec un taux de naissance plus élevé chez les daphnies exposées au phénol que chez les daphnies témoins le taux de natalité devient par contre inférieur à celui des témoins après 5 à 6 jours.

Pour des concentrations supérieures à 12 mg de phénol par litre, la reproduction des daphnies intoxiquées est retardée par rapport aux témoins, le taux de natalité est plus bas (tableau n° LX).

La mortalité des daphnies exposées au phénol augmente logiquement avec la concentration de ce composé dans le milieu.

Dans tous les cas, la mort des daphnies exposées au phénol présente un aspect particulier ; elles restent accrochées dans leur mue jusqu'à la mort, phénomène déjà observé chez des daphnies témoins mortes de vieillesse entre le 45^{ème} et le 60^{ème} jour de leur vie.

Remarque . Les daphnies exposées au phénol, dans des systèmes fermés, ont une pigmentation brune, et sont en général plus foncés que les daphnies témoins.

Concentration de phénol en mg/l	Taux de reproduction moyens des daphnies en présence de phénol (nombre de petits par daphnie adulte et par jour).					Mortalités cumulées des daphnies en présence de phénol (exprimées en % de la population témoin).				
	0	4	8	12	16	0	4	8	12	16
Age des daphnies en jours										
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0.8	1	0	0	0	0	0	0	6.7
10	0.9	0.9	1	0.2	0	0	0	0	3.3	6.7
12	2.3	2.7	3	1.8	0	0	0	6.7	13.3	16.7
14	3.0	3.1	2.9	2.3	0.7	0	10	10	16.7	40
17	3.4	3.1	3	2.8	1.4	0	10	10	26.7	60
19	3.7	3.5	3.2	2.8	1.7	0	10	20	40	70
22	3.6	3.2	2.8	2.7	1.7	0	13.4	20	46.7	73

Tableau n° LX : Effets du phénol sur les daphnies : daphnies exposées à partir du 2^{ème} jour, dans des systèmes fermés, en présence de chlorelles, les milieux étant renouvelés tous les deux ou trois jours.

VII 2. 1 3. Effets des phénols sur l'able

Sur l'able, seules les déterminations des CL_{50} de divers phénols ont été faites, les résultats obtenus sont consignés dans le tableau n° LXI. Ils montrent que les diphénols sont plus toxiques que les monophénols et que d'autre part la forme quinone est plus toxique que le diphénol correspondant.

Composé	CL_{50} (24h)	CL_{50} (48 h)
Phénol	35	30
o-Crésol	30	25
Catéchol	15	13
Hydroquinone	5	2
p-Benzoquinone	0.3	0.2

Tableau n° LXI : CL_{50} de quelques phénols sur l'able

VII. 2. 2 Les nitrites

VII. 2. 2. 1 Effets des nitrites sur les algues

Dans le chapitre IV, nous avons montré que les chlorelles cultivées en présence de 100 mg/l de NO_2^- , ne présentent aucune différence apparente avec les cultures témoins.

VII. 2. 2. 2. Effets sur les daphnies

Les nitrites à la concentration de 10 mg/l dans le milieu sont nocifs pour les daphnies ; dans les milieux toxiques, nous avons trouvé environ deux fois plus de mues et quatre à six fois moins de petits, que dans les milieux témoins.

Examinées à la loupe, les daphnies provenant d'un milieu toxique sont très sales, par rapport aux daphnies témoins, on observe des tas de détritits (d'algues), collés aux extrémités mobiles des daphnies.

VII. 3. CONCLUSION

A partir des milieux contaminés par le benzène et ayant abrité l'able, nous avons pu isoler deux souches bactériennes, la première que nous appelons M est pénicillino-sensible et proche des genres *Moraxella* ; elle est strictement aérobie, très bien adaptée à la dégradation du benzène, du phénol et du toluène ; elle peut s'en servir comme unique source de carbone.

La deuxième souche isolée est par contre pénicillino-résistante et identifiée comme étant *Pseudomonas putida* dont l'aptitude à dégrader les

noyaux aromatiques est bien connue.

Le phénol quoique, apparamment moins toxique que le benzène vis-à-vis des chlorelles, semble agir de la même manière sur le métabolisme de l'azote chez ces organismes.

En ce qui concerne la toxicité des phénols, il semble que les diphénols soient plus toxiques que les monophénols et que les quinones soient encore plus toxiques que les diphénols correspondants.

CHAPITRE VIII

ASSOCIATIONS D'ESPECES OU DE TOXIQUES

VIII. 1. ASSOCIATIONS D'ESPECESVIII. 1. 1. Associations trophiques

L'accumulation d'un toxique dans un organisme vivant, est considérée comme un danger potentiel, pour les autres espèces animales placées aux échelons supérieurs dans la hiérarchie de la chaîne trophique.

Dans ce chapitre, nous allons examiner les effets du benzène et du toluène sur les trois espèces d'organismes vivants (adoptées pour cette étude), associées en chaîne alimentaire, ainsi, ont été considérées les quatre associations suivantes :

- Chlorelles - Daphnies
- Daphnies - Poisson
- Chlorelles - Poissons
- Chlorelles - Daphnies - Poisson.

Remarque : Les hydrocarbures monoaromatiques sont des composés diffusibles, nous avons déjà montré que

a) - Leur concentration dans les espèces exposées dépendent de l'espèce, mais surtout de leur concentration dans le milieu environnant.

b) - Lorsque des organismes, contaminés par les hydrocarbures sont remis dans un milieu sain, l'élimination du carburant par ces organismes

s'opère, jusqu'à une concentration résiduelle qui ne dépend que de la concentration d'hydrocarbures atteinte dans le milieu, donc par le rapport des volumes :

$$\frac{\text{biomasse contaminée}}{\text{volume du milieu}}$$

Ainsi plus le volume du milieu est grand, plus faible est la concentration résiduelle de l'hydrocarbure dans les organismes préalablement contaminés.

c) - La libération de l'hydrocarbure dans le milieu est très rapide.

On peut s'attendre à ce qu'il n'y ait pas d'intoxication des daphnies ou des ables par le seul biais de proies contaminées par les hydrocarbures.

VIII. 1. 1. 1. Association Chlorelles - Daphnies

- Effets biologiques

Aucune différence significative n'a été notée entre élevage de daphnies nourries avec des chlorelles témoins et élevage de daphnies nourries de chlorelles ayant été cultivées 5 jours dans des milieux contenant du benzène ou du toluène à des concentrations pouvant atteindre les CI_{50} (5 jours) de ces hydrocarbures, c'est à dire 50 ppm de benzène ou 40 ppm de toluène.

En effet, les algues centrifugées et lavées ne renferment plus qu'une très faible quantité d'hydrocarbure (50 à 100 ppm). Compte tenu de la faible quantité d'algues à mettre en suspension dans un milieu sain pour l'élevage de daphnies (rapport de dilution compris entre 0.5 et 2 pour mille),

on ne trouve guère plus de 1 mg/l d'hydrocarbure dans les milieux d'élevage ce qui explique l'absence d'effets des algues contaminées par les hydrocarbures sur les daphnies. Le toxique apporté par la nourriture est relargué dans le milieu où la concentration est très inférieure à la concentration limite tolérable des daphnies.

Remarque : Lorsque les algues contaminées sont remises en suspension dans un milieu, lui même déjà contaminé par le même hydrocarbure, les effets sont légèrement plus grands que lorsque seul le milieu est contaminé. On note une diminution du taux de reproduction de 10 à 20 %.

- Effets analytiques

Il n'y a pas de biomagnification de la concentration de l'hydrocarbure dans les daphnies nourries par les chlorelles contaminées. La concentration d'hydrocarbures dans les daphnies ne dépend que de la concentration de ceux-ci dans le milieu d'élevage.

Toxique	Concentration d'hydrocarbure en $\mu\text{g/g}$				poids moyen d'une daphnie	taux de reproduction (daphnies)
	milieu algues	algues	milieu daphnies	daphnies		
Témoin	0	0	0	0	2.85	4
Benzène	10	40	TRACES	0.7	2.84	4.1
	15	55	"	0.8	3.10	3.7
	20	75	"	0.4	2.87	3.3
	30	105	"	1	2.90	4.2
	40	130	"	1.2	3.01	3.6
Toluène	5	20	"	0.6	3.1	3.8
	10	35	"	0.9	2.73	3.2
	15	70	"	0.5	3.28	3.6
	20	80	"	0.7	3.14	3.9

Tableau n° LXII Influence des chlorelles contaminées sur le développement et la reproduction des daphnies.

VIII. 1. 1. 2. Association Daphnies - Poissons

- Effets biologiques

Lorsqu'on donne au poisson des daphnies contaminées par le benzène ou le toluène, aucun effet apparent n'est à signaler. La prédation des daphnies imprégnées par les hydrocarbures se fait au même rythme que la prédation des daphnies saines

Là encore, la quantité d'hydrocarbures amenée par les daphnies dans le milieu des poissons est très faible, du fait du relargage des contaminants et leur dilution dans le milieu d'élevage du poisson, ceux-ci ne constituant pas de danger immédiat pour l'able.

- Effets analytiques

De faibles concentrations d'hydrocarbures ont été trouvées dans les poissons nourries de daphnies contaminées. Même si toutes les daphnies introduites dans le milieu sont consommées par le poisson, la quantité d'hydrocarbures retrouvées dans la chair de ce dernier n'est qu'une fraction très faible de celle apportée par les daphnies dans le milieu.

VIII. 1. 1. 3. Les autres associations

Telles que :

- Chlorelles - Ables et
- Chlorelles - Daphnies - Ables

ont également montré qu'il n'y a pas de risque direct pour l'able ou la daphnie à se nourrir de proies contaminées par les hydrocarbures aromatiques légers.

Ces composés sont pourtant nocifs à tous les échelons de

Toxique	Concentration d'hydrocarbure en mg/l		poids moyen d'une daphnie	Nombre de daphnies		poids moyen du poisson	Concentration dans le poisson	quantité d'hydrocarbure	
	milieu	daphnies		données	mangées			apportée par les daphnies	retrouvée dans le poisson
Témoin	0	0	2.4	50	16	537	0	0	0
Benzène	6.8	50	2.1	50	31	624	0.5	3.26	0.31
	10.5	70	1.8	50	29	487	0.9	3.65	0.44
	13.2	75	1.4	50	50	761	0.3	5.25	0.23
Toluène	2.5	28	2	50	15	421	0.2	0.84	0.08
	4	50	1.9	50	42	832	0.5	3.99	0.42
	6	55	1.6	50	34	635	0.8	2.99	0.51

Tableau n° LXIII Concentration de benzène et de toluène par l'able
nourri à l'aide de daphnies contaminées.

la chaîne alimentaire, par leur effet direct sur chaque espèce, où leur action se traduit à chaque niveau par une réduction de la biomasse. On peut donc parler d'effet biocénitique.

VIII. 1. 2. Associations symbiotiques

Comme nous l'avons signalé plus haut, nous avons pu isoler du milieu d'élevage du poisson, une espèce bactérienne (M) capable de dégrader le benzène, ainsi que d'autres composés aromatiques.

Dans ce qui suit, nous allons examiner l'influence du benzène sur les algues et les daphnies en présence de bactéries de la souche (M). Ceci symbolisera un aspect du rôle des décomposeurs dans les études d'impacts des hydrocarbures sur la faune et la flore aquatiques.

VIII. 1. 2. 1. Associations Bactéries - Algues

L'introduction de bactéries (de la souche (M) à la concentration initiale de 1000 cellules/ml) dans les milieux de culture d'algues contaminées par le benzène ou le toluène, entraîne une croissance des algues, plus grande dans les milieux toxiques que dans les milieux témoins, (tableau n° LXIV).

D'autre part, la dégradation des hydrocarbures est plus rapide quand les deux espèces sont associées.

Ce phénomène s'explique de la manière suivante

a) - Les algues se développent mieux que dans les cultures témoins, parce que les bactéries détoxifient le milieu et y produisent du dioxyde de carbone, nécessaire pour la photosynthèse (rappelons que dans les systèmes fermés, le CO_2 est un facteur limitant pour la croissance

algale)

b) - La dégradation des hydrocarbures par les bactéries est elle même, activée par la formation progressive de l'oxygène par les algues.

VIII. 1. 2. 2. Associations Bactéries - Daphnies

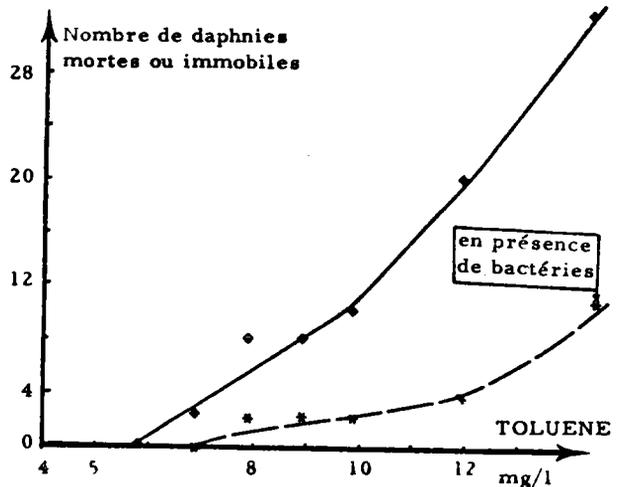
L'introduction de bactéries de la souche (M) dans le milieu d'élevage des daphnies à la concentration initiale de 1000 cellules/ml se traduit par l'atténuation des effets du benzène et du toluène sur les daphnies.

Le nombre de daphnies mortes ou immobiles après 72 heures d'exposition au benzène est réduit de 50 à 60 % dans les milieux où les bactéries ont été introduites. A signaler aussi que les daphnies élevées en présence de bactéries sont plus grosses et ont une mobilité plus grande que les daphnies élevées dans un milieu qui ne contient que du benzène ou du toluène.

Ceci laisse penser que les daphnies peuvent se nourrir des bactéries de la souche (M) et, ou de métabolites des hydrocarbures.

Figure n°30 :

Effets de la présence de bactéries de la souche M sur la toxicité du toluène vis à vis des daphnies



	Algues Témoins	Algues + Bactéries	Algues + Benzène (100 mg/l)	Algues + Bactéries + Benzène (100 mg/l)	Bactérie + Benzène (100 mg/l)	Algues + Toluène (25 mg/l)	Algues + Bactéries + Toluène (25 mg/l)
nombre de cellules par ml (10^6)	10	10.3	2.5	36.6	1*	5.9	21.5
volume moyen des cellules μm^3	16	17	14.2	14.5	2.6	16.1	14.8
volume total des cellules comptées $\mu l/l$	160	175	35.5	530	2.6	95	318
concentration d'hydrocarbure après 5 jours	0	0	80	0	10	18	0
concentration du phénol	0	0	0	0	5	0	0
analyse bacté- riologique bactéries par ml		64×10^3		78.5×10^6	24.5×10^6		

Tableau n° LXIV : Action du benzène et du toluène sur l'association algues-bactéries

Les mesures sont effectuées 5 jours après l'ensemencement

* : Comptage au Coulter Compteur

VIII. 2. ASSOCIATIONS DE TOXIQUES

Les phénomènes de pollution sont difficiles à rattacher à la présence d'un seul polluant, car on ne connaît pas encore à l'heure actuelle un contaminant qui aurait atteint dans la biosphère son seuil de limite tolérable pour l'homme. La dégradation de l'environnement constatée ici et là est sans doute due à une sommation des effets des divers polluants.

Ainsi l'étude de certaines associations de toxiques vis-à-vis de l'able nous a montré que les CL_{50} des substances essayées varient dans de très larges proportions selon qu'elles soient seules ou associées à d'autres composés, comme le montre les tableaux n° LXV et LXVI.

Concentration du Mercure	CL_{50} du benzène en présence du Hg	A	B	A + B
		$\frac{x_{Hg}}{CL_{50}(Hg)}$	$\frac{x_B}{CL_{50}(B)}$	
400	0	1	0	1
200	8.9	0.5	0.5	1
150	11.5	0.37	0.65	1.02
100	13.2	0.25	0.74	0.99
50	16.8	0.12	0.94	1.06
0	17.8	0	1	1

Tableau n° LXV : Evolution de la CL_{50} du benzène sur l'able en présence du Mercure

Concentration du Toluène	CL_{50} du benzène.	A	B	A + B
		$\frac{x_T}{CL_{50}(T)}$	$\frac{x_B}{CL_{50}(B)}$	
0	17.8	0	1	1
1.8	14.7	0.09	0.82	0.91
3.6	12.3	0.18	0.69	0.87
7.2	9.2	0.35	0.52	0.87
20.4	0	1	0	1

Tableau n° LXVI : Evaluation de la CL_{50} du benzène sur l'able en présence du Toluène

Si on écrit .

$CL_{50} \text{ (Hg)}$: CL_{50} (24 heures) du mercure seul sur l'able.

$CL_{50} \text{ (B)}$: CL_{50} (24 heures) du benzène seul sur l'able,

$CL_{50} \text{ (T)}$: CL_{50} (24 heures) du toluène seul sur l'able,

x_B : Concentration du benzène conduisant à la mort de 50 % des ables exposés en 24 heures en présence soit du mercure à la concentration x_{Hg} soit du toluène à la concentration x_T .

et si on considère la somme des deux rapports :

$$\frac{x_{Hg}}{CL_{50} \text{ (Hg)}} + \frac{x_B}{CL_{50} \text{ (B)}}$$

on trouve une somme constante et égale à l'unité ; ce qui permet de dire que dans le cas de l'association benzène plus mercure, il y a une simple addition des effets des deux toxiques. Alors que si on considère la somme des deux rapports suivants

$$\frac{x_T}{CL_{50} \text{ (T)}} + \frac{x_B}{CL_{50} \text{ (B)}}$$

on trouve des valeurs inférieures à l'unité, ce qui permet de dire qu'il y a potentialisation des effets du benzène par la présence du toluène et vice et versa.

D'une manière générale les phénomènes de synergisme peuvent être exprimés par l'une des méthodes suivantes

1 - Soient x_1, x_2, \dots, x_i , les concentrations dans le milieu des substances S_1, S_2, \dots, S_i , concentrations pour lesquelles la DL_{50} du mélange est atteinte. Si, C_1, C_2, \dots, C_i , sont les concentrations létales 50 % de chacune des substances prise séparément, on peut définir des fractions toxiques des substances S_i par le rapport :

$$f_i = \frac{x_i}{C_i}$$

considérons maintenant :

$$\sum f_i = f_1 + f_2 + \dots + f_i$$

trois cas peuvent se présenter :

- $\sum f_i = 1$, on a addition des effets toxiques des substances en présence : synergisme (B + Hg)

- $\sum f_i < 1$ dans ce cas on a un synergisme toxifiant : potentialisation (NO_2^- + Hydroquinone) ou (Benzène + Toluène)

- $\sum f_i > 1$, neutralisme ou antagonisme (NO_2^- + Aniline).

2 - Un effet biologique B qu'on obtient par l'administration des substances $S_1, S_2, \dots, S_i, S_n$, séparément à des concentrations $C_1, C_2, \dots, C_i, \dots, C_n$, peut également être obtenu par la présence concomitante de toutes ces substances à des concentrations $x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_n$, telles que :

$$\frac{1}{n} \sum_{j=1}^{j=n} \sum_{i=1}^{i=n} \alpha_{ij} \frac{x_i}{C_i} = 1$$

où α_{ij} est le coefficient de synergisme entre la substance (i) et la substance (j), ces coefficients peuvent être déterminés par une étude de la toxicité des substances, seules puis associées deux à deux.

Si on prend $\alpha_{ij} = \alpha_{ji}$, ce qui semble logique, on trouve dans le cas de l'association benzène - mercure $\alpha_{ij}=1$ et dans le cas de l'association benzène - toluène $\alpha_{ij}=1,15$.

Selon la valeur de α_{ij} trouvée, trois cas peuvent être considérés :

- a) - $\alpha_{ij}=1$, il y a synergisme (addition des effets)
- b) - $\alpha_{ij}>1$, il y a potentialisation des effets d'un toxique par la présence de l'autre.
- c) - $\alpha_{ij}<1$, il y a antagonisme (détoxification ou neutralité d'une substance vis à vis de l'autre).

L'évolution de la CL_{50} du benzène en présence du toluène montre une potentialisation des effets toxiques réciproques de ces deux composés vis à vis de l'autre. Plus généralement on constate qu'à concentration égale, un mélange d'hydrocarbures est plus toxique que n'importe quel constituant du mélange. (Ce phénomène est à rapprocher de l'observation classique en physico- chimie à savoir : l'abaissement des températures de changement d'état physique, par la réalisation de mélanges).

Ainsi par exemple, la moyenne des CL_{50} des trois xylènes pris séparément est supérieure à la CL_{50} du mélange.

	CL ₅₀ 24 h sur l'able
Moyenne des 3 xylènes	26.5
Mélange des 3 xylènes	24

LACAZE J. C. (1978) trouve une CL₅₀ des algues par un pétrole brut du Koweit bien plus faible que les CL₅₀ des constituants réputés les plus toxiques, et pense à un effet de synergisme.

La comparaison des CL₅₀ de l'essence automobile et des CL₅₀ des aromatiques monocycliques montre que lorsqu'on ne tient compte que de la fraction soluble, l'essence semble plus toxique alors que si on considère la quantité d'essence introduite dans le milieu, on trouve des seuils de toxicité comparables.

En général, lorsqu'on ne tient compte que de la fraction soluble dans l'eau d'un produit pétrolier, on constate une interpotentialisation des effets toxiques des hydrocarbures solubilisés ; les concentrations létales de la fraction soluble sont plus petites que la concentration létale de n'importe quel constituant du produit pétrolier. Cependant, il ne faut pas perdre de vue une source d'erreur possible : la composition exacte du produit pétrolier est souvent inconnue, et la concentration de la fraction soluble n'est pas déterminée avec précision.

VIII. 3. CONCLUSION

L'association des espèces nous a montré que les organismes contaminés par les hydrocarbures aromatiques légers ne présentent pas de risques évidents pour leurs prédateurs. Certaines associations telle que l'association Chlorelle - Bactéries, peuvent constituer un moyen d'épuration du milieu contaminé par les hydrocarbures et une source non négligeable de synthèses protéiques.

L'étude de quelques associations de toxiques montre la difficulté de prévoir les effets d'une substance sur le milieu naturel à partir de simples essais de laboratoire.

CONCLUSION

La crainte d'une pollution massive par les produits pétroliers comme cela fut le cas lors du naufrage du TORREY-CANYON en 1967 ou de l'AMOCO CADIZ en 1978 au large des côtes bretonnes, a entraîné une prise de conscience de l'acuité du problème et fait que la pollution par les hydrocarbures est bien perçue par l'opinion publique.

A) Le nombre de publications techniques sur le devenir des hydrocarbures dans l'environnement et leurs effets sur les organismes vivants est très important. Mais la diversité des produits pétroliers et celles des espèces animales et végétales utilisées par divers auteurs dans des conditions expérimentales variées, font qu'en général les résultats publiés sont très difficilement comparables entre eux. Cependant, les conclusions générales énoncées peuvent être confrontées et on peut en déduire les idées suivantes :

1 - Les émissions d'hydrocarbures dans l'environnement sont très importantes car elles se chiffrent par dizaines de millions de tonnes par an (environ 60 millions de tonnes en 1974, ce qui représente une fois et demie la consommation annuelle de l'ensemble des pays du continent Africain).

2 - Les risques ne sont a priori à craindre que localement dans les zones atteintes par un déversement massif d'hydrocarbures (cas de pollution accidentelle), ou par une pollution chronique par déversement répété de petites quantités (cas de zones industrielles).

Malgré une émission importante des produits pétroliers dans l'environnement, leur dispersion et leurs dégradations, tant abiotiques

que biologiques, semblent éliminer une grande partie sinon la totalité de la nocivité de ces polluants. Tout hydrocarbure paraffinique est effectivement susceptible d'être métabolisé.

Dans les zones atteintes par un déversement massif, les effets semblent surtout aigus et observables tant que demeure la source de pollution.

3 - Les effets d'un déversement massif d'hydrocarbures sont plus persistants dans le sol que dans l'eau, et plus persistants dans l'eau que dans l'atmosphère. Dans le milieu aquatique, les effets de ce type de pollution sont plus marqués dans une eau stagnante que dans des eaux mouvementées.

4 - Les produits pétroliers ou leurs produits de combustion peuvent contenir des composés aromatiques polycycliques dont le pouvoir cancérogène est prouvé chez l'animal.

5 - La toxicité aiguë des produits pétroliers est liée en grande partie à leur concentration en fractions légères et plus particulièrement en hydrocarbures aromatiques monocycliques. L'étude écotoxicologique de ces derniers constitue donc un indice prédictif de l'effet aigu maximum d'une pollution de telle nature.

Au cours de ce travail, les risques écotoxicologiques des hydrocarbures aromatiques ont été appréciés sur trois espèces d'organismes vivants, ayant déjà servi séparément à des tests de toxicité de produits pétroliers et susceptibles de constituer une chaîne alimentaire à trois niveaux. Ces trois espèces sont : une algue, Chlorella vulgaris B. ; un micro-crustacé, Daphnia magna St. ; un poisson, Leucaspis delineatus Heck.

6 - Des études de la toxicologie des hydrocarbures vis-à-vis

des organismes vivants de laboratoire, il ressort qu'en général les résultats obtenus sont difficilement comparables pour plusieurs raisons

- a) Les produits utilisés ne sont pas les mêmes.
- b) les espèces animales ou végétales utilisées ne sont pas les mêmes,
- c) les conditions expérimentales ne sont pas les mêmes

Les flacons destinés aux tests biologiques (tubes à essais, fioles coniques, cristallisoirs) ne sont pas standardisés et pratiquement, dans tous les tests de toxicité des hydrocarbures sur les organismes aquatiques, la concentration réelle du toxique dans le milieu semble étonnamment ignorée. De nombreux auteurs ont entrepris de faire des tests de toxicité des hydrocarbures en général, et des aromatiques légers en particulier. Les résultats obtenus sont malheureusement imprécis parce qu'ils se rapportent souvent à une concentration en hydrocarbures "présumée", calculée à partir de la quantité d'hydrocarbures introduite initialement dans le milieu et dont on ne sait de quelle manière elle évolue. En effet, les milieux de culture ou d'élevage sont mis dans des flacons qui permettent l'évaporation et sont le plus souvent agités à la main. La surface d'échange n'est pas fixée, donc l'évaporation n'est pas uniforme, ce qui rend les résultats peu reproductibles. La dose à laquelle sont exposés les organismes n'est évidemment pas connue.

Une étude de l'évolution de la concentration du toxique dans le milieu expérimental était donc tout d'abord nécessaire pour pouvoir évaluer les risques toxiques avec une meilleure précision.

7 - L'adaptation de la méthode du Head Space pour le dosage des hydrocarbures par chromatographie en phase gazeuse aussi bien dans les milieux que dans les organismes exposés, a donné des résultats satisfaisants compte tenu de la variabilité en poids et en tailles des échantillons

étudiés. Cette technique a été ainsi pour nous un outil analytique précieux.

B) L'étude de l'évolution abiotique du benzène et du toluène dans l'eau nous a permis de faire les constatations suivantes :

1 - La dissolution dans l'eau d'un hydrocarbure dépend évidemment de sa solubilité et de sa concentration dans la fraction hydrocarbonée. Ainsi pour le benzène et le toluène, nous avons trouvé les relations suivantes :

$$C_B = 1750 x_B$$

$$C_T = 505 x_T$$

où C_B et C_T représentent les concentrations du benzène et du toluène dans l'eau en contact avec un mélange d'hydrocarbures dans lequel les fractions volumiques du benzène et du toluène seraient respectivement x_B et x_T .

2 - Dans les systèmes ouverts, le temps de séjour du solvant dans le milieu aquatique est très court, et en outre, il est très influencé par la variation de nombreux paramètres tels que : température, agitation, aération, surface d'échange, etc. La concentration dans le milieu est une fonction décroissante du temps de la forme :

$$C = C_0 e^{-\lambda t}$$

où C_0 et C sont les concentrations initiales et actuelles du solvant dans l'eau et λ une constante dépendant du mode opératoire et mettant en jeu les tensions de vapeur des composés

3 - Dans les systèmes fermés, la concentration de l'hydrocarbure dans l'eau C_1 évolue vers une valeur qui, à température constante,

dépend de la fraction du volume occupé par le liquide, et de la concentration initiale C_0 , dans les gammes de concentration utilisées au cours de ce travail on a

$$C_1 = C_0 \left[0.5 + 0.5 \frac{V_1}{V_t} \right] \quad \text{pour le benzène}$$

$$C_1 = C_0 \left[0.55 + 0.45 \frac{V_1}{V_t} \right] \quad \text{pour le toluène}$$

où V_1 et V_t représentent respectivement le volume du liquide et le volume total du système.

Ainsi quand le liquide occupe tout le volume qui lui est offert, la concentration de l'hydrocarbure dans le milieu reste constante et égale à C_0 .

4 - La contamination de l'eau par les hydrocarbures aromatiques peut se faire également à partir d'une atmosphère polluée.

5 - L'utilisation dans les tests biologiques de flacons fermés, dans lesquels le liquide remplit la totalité du volume utile du récipient, semble être un excellent procédé pour développer les tests de toxicité. Malheureusement cette méthode ne peut être généralisée, car en l'absence d'atmosphère gazeuse, la quantité d'oxygène disponible dans le milieu est limitée à la quantité d'oxygène dissoute dans le liquide, qui est très faible, et la durée des tests se trouve ainsi trop réduite

Au cours des essais de toxicité, nous avons adopté des erlenmeyers bouchés à l'émeri, d'une capacité de 300 ml, contenant 100 ml de milieu. Un tel système fermé permet à un able de vivre, en moyenne, pendant 10 jours sans apport extérieur d'oxygène, la concentration d'hydro-

carbures à l'équilibre dans le milieu ayant été déterminée au préalable.

Des erlenmeyers de capacité de 125 ml ou 500 ml, bouchés à l'émeri ont également été utilisés dans ce travail et cela, en fonction de certains besoins particuliers, par exemple pour la culture d'algues. A cet égard, les petits flacons présentent l'avantage de pouvoir multiplier le nombre des essais, par contre les erlenmeyers de grandes capacités permettent pour chaque essai d'avoir un volume de milieu suffisant pour contrôler correctement plusieurs paramètres.

Les tests de toxicité conduits en flacons ouverts ont également été utilisés, mais ils nécessitent le contrôle de nombreux paramètres ; leur intérêt réside cependant dans le fait qu'ils peuvent dans une certaine mesure rendre compte des effets des polluants gazeux en milieu naturel.

Les seuls auteurs qui, à notre connaissance, ont utilisé des flacons fermés, (DUNSTAN W. M. et coll. 1975 ; ATKINSON L. P. et coll. , 1977), s'étonnaient de voir disparaître la moitié des hydrocarbures introduits dans leurs flacons, et attribuent cela à la volatilité de ces types de composés. Quant à nous, nous pensons que cela peut être également dû à la répartition de l'hydrocarbure entre la phase liquide et la phase gazeuse, ou à l'absorption de l'hydrocarbure par les bouchons utilisés par ces auteurs.

C) Critères d'évaluation de la toxicité des aromatiques légers

1 - Sur les chlorelles : nous avons retenu comme critères d'observations le dénombrement des cellules au compteur de particules Coulter, le volume cellulaire et les mesures d'opacimétrie, de teneurs en ATP ou en

2 - Sur les daphnies nous avons surtout considéré la croissance pondérale et le taux de reproduction. Nous avons plus ou moins délaissé le critère d'immobilité, car celle-ci n'est que momentanée et n'est pas, de ce fait, un reflet de la mortalité.

3 - Sur les poissons : nous avons retenu le critère biologique le plus simple, la mort, dont l'appréciation est plus aisée que pour la daphnie, (les daphnies peuvent ainsi rester immobiles pendant 72 heures puis se remettre à nager, alors que l'immobilisation du poisson semble totale et irréversible).

D) Evaluation de la toxicité

Elle a été faite systématiquement en systèmes ouverts et fermés.

1 - L'utilisation des systèmes ouverts, nous a permis de constater que les concentrations létales 50 % (rapportées à la quantité d'hydrocarbures introduite dans le milieu) sont plus élevées que les concentrations effectivement présentes qui provoquent le même phénomène. L'action de l'hydrocarbure étant ainsi limitée dans le temps ; les organismes exposés non affectés par le toxique peuvent ainsi se développer et croître comme les organismes témoins de la même espèce. On enregistre souvent de faibles variations des CL_{50} au cours du temps

a) - Toxicité sur les algues : les seuils de toxicité mesurés dans nos essais sur les cultures de Chlorella vulgaris, sont en accord avec ceux trouvés par KAUSS P. B. et HUTCHINSON T. C. (1975) pour les mêmes produits et sur la même espèce. Pour des concentrations d'hydrocarbures inférieures à la saturation du milieu, il y a possibilité de récupération. Celle-ci est d'autant plus longue que la concentration d'hydrocarbures dans le milieu est grande.

Cependant l'étude de l'histogramme de taille des chlorelles dans les cultures témoins et intoxiquées montre que, dans les milieux les plus toxiques (contenant plus de 1300 ppm de benzène ou plus de 400 ppm de toluène), il y a en début d'exposition, une augmentation significative du nombre total de particules comptées, (avec une prédominance de petites cellules) suivie d'une diminution lente de ce nombre, avec disparition dans l'histogramme de toute particule qui aurait un diamètre supérieur ou égal au diamètre moyen des chlorelles. Le fort pourcentage de "cellules" de petites tailles corroboré par d'autres phénomènes observés sur les cultures intoxiquées tels que la décoloration progressive de la culture, les diminutions de concentration en chlorophylle et en ATP, permet de penser que, dans ce mode d'intoxication, l'action principale du benzène et du toluène est liée à leurs qualités de solvant se manifestant par une lyse de la membrane cellulaire des chlorelles. Ce phénomène a déjà été évoqué par VAN OVER BEEK J. et BLONDEAU R. (1954).

L'analogie entre les courbes de croissance des chlorelles en présence de benzène et de toluène et les courbes de croissance de ces organismes pour diverses tailles d'inoculum, nous a conduit à rechercher une corrélation entre ces deux phénomènes. L'idée directrice est la suivante :

L'action du benzène et du toluène étant limitée dans le temps, les cellules non touchées se comportent comme un inoculum de taille réduite pour la culture. A cette occasion, nous avons développé un modèle mathématique.

Ce modèle, en accord avec les résultats expérimentaux, permet de prédire :

- la concentration algicide 100 % pour les chlorelles même dans des conditions expérimentales différentes de celles utilisées dans ce travail.

- si une concentration donnée de toxique permet aux algues de se développer ou non et si oui, quelle taille d'inoculum donnerait un développement analogue

b) - Toxicité sur les daphnies : en l'absence de nourriture, il est difficile d'apprécier la toxicité des produits pétroliers sur la daphnie. L'immobilisation qui peut être réversible, coïncide dans les expériences de durée supérieure ou égale à 4 jours, avec la mort des témoins par inanition ce qui rend difficile l'interprétation des résultats.

En présence de nourriture, les daphnies survivantes après expositions peuvent se développer et se reproduire normalement comme des daphnies témoins, mais plus jeunes. En effet, si on retranche la durée d'incapacité de la vie des daphnies exposées aux toxiques, on constate qu'elles se comportent alors comme des daphnies témoins.

c) - Toxicité sur l'able : l'action toxique est limitée dans le temps : le maximum de mortalité est observé entre 30 minutes et 4 heures. On ne constate aucune mortalité significative au delà des premières 24 heures d'exposition et pendant 6 mois d'observation. Cela a été confirmé chez des animaux exposés à des concentrations supérieures à la CL_{50} .

2 - L'utilisation des systèmes fermés, permet de travailler à une concentration constante et déterminée du toxique dans le milieu, ce qui permet de bien apprécier les relations dose-effet. Cette méthode d'intoxication en système fermé permet par ailleurs de mettre en évidence des effets à des concentrations plus faibles de toxique, c'est à dire des concentrations plus proche de celles que l'on peut rencontrer dans le milieu naturel. L'action du benzène et du toluène devient ainsi sensible à partir des concentrations de 10 à 20 ppm d'hydrocarbure dans le milieu.

L'action du toxique, qui ne peut distiller hors du milieu, est plus persistante que dans le système ouvert, et les concentrations létales déterminées en systèmes fermés sont toujours nettement plus faibles que celles mesurées en systèmes ouverts.

Rappelons toutefois que même dans les systèmes fermés, les valeurs des CL_{50} dépendent de leur mode de calcul. En effet, si on ne tient pas compte du partage du solvant entre l'eau et l'atmosphère du flacon on trouve des valeurs qui dépendent du volume du milieu.

a) - Toxicité sur les chlorelles : 3 types d'effets toxiques sont à signaler selon la gamme de concentration du toxique choisi :

- Action inhibitrice : les algues se développent et se multiplient, mais à des taux plus faibles que les cultures témoins, ce que l'on obtient pour des concentrations inférieures à 80 ppm pour le benzène ou inférieures à 60 ppm pour le toluène.

- Action algistatique : les algues ne se développent pas et ne se multiplient pas, mais conservent le pouvoir de se développer quand elles sont soustraites de l'action de l'hydrocarbure (concentration comprise entre 100 et 300 ppm pour le benzène ou entre 80 et 150 ppm de toluène).

- Action algicide : on constate la diminution au cours du temps du nombre de cellules susceptibles de se développer, phénomène obtenu pour des concentrations supérieures ou égales à 300 ppm du benzène ou supérieures ou égales à 150 ppm du toluène.

L'étude de toxicité sur les chlorelles nous a permis de mettre en évidence un certain nombre de points importants :

. L'action du benzène sur les algues nous montre les limites des techniques d'évaluation des risques toxiques sur les algues, car les concentrations inhibitrices 50 dépendent du temps et des conditions de culture.

Dans les milieux carencés en éléments nutritifs comme c'est le cas des cultures en "batch", on note souvent que le même palier, (phase de croissance zéro) est atteint dans des délais différents pour les algues témoins et intoxiquées. Il est ainsi commun de trouver des CI_{50} qui croissent avec le temps jusqu'à atteindre les concentrations algostatiques ; en effet, les concentrations inhibitrices ralentissent la croissance des cultures intoxiquées, mais, dans le même temps, le milieu de cultures témoins devient limitant et provoque l'arrêt de croissance de celles-ci. De ce fait les cultures intoxiquées auraient, au bout d'un temps plus ou moins long, les mêmes biomasses que les cultures témoins.

. Il est important de suivre l'évolution de la culture pendant plusieurs jours. Une seule mesure n'est pas réaliste, elle ne reflète que l'état de la culture au moment de la mesure. En effet, un désynchronisme des cultures témoins et intoxiquées peut faire croire à une stimulation ou au contraire à une inhibition qui n'existe pas. D'ailleurs PROUZE N. J. et coll. (1976) signalent que la mise en évidence de phénomène de stimulation apparaissant au cours d'une mesure isolée de l'activité photosynthétique, n'est plus évidente quand l'étude porte sur la croissance des cultures.

. Le seul critère de numération n'est pas suffisant et peut conduire à des résultats erronés en cas de fragmentation des cellules. La mesure de la chlorophylle ou de la densité optique des cultures n'est pas non plus suffisante : il peut y avoir exaltation de synthèse chlorophyllienne sans évolution de la biomasse (cas du benzène et de l'essence).

D'ailleurs la covariation des deux paramètres, numération

et dosage de chlorophylle, en fonction du temps n'est pas uniforme. Ainsi les cultures intoxiquées par le benzène s'écartent de la corrélation établie entre densité optique mesurée à 665 nm et nombre de cellules mesuré au compteur Coulter. L'absorption de lumière par une suspension algale intoxiquée par le benzène est nettement plus grande que celle qu'aurait donnée une suspension de chlorelles témoins de même concentration cellulaire. Cette singularité du benzène n'a par contre pas été observée pour le toluène.

. Nous avons tenté de faire un bilan de l'azote dans les cultures témoins et intoxiquées par ces deux solvants pour confirmer le phénomène précédent. Les résultats trouvés montrent :

- Une accumulation anormale des ions nitrites dans les milieux de culture contaminés par le benzène, la concentration de nitrites augmentant avec la concentration du solvant. Par contre le taux de nitrites dans les cultures contaminées par le toluène est très faible et comparable à celui trouvé dans les cultures témoins.

- La consommation des ions nitrates augmente avec le nombre de chlorelles formées. La quantité de nitrates consommés par cellule formée est plus grande dans les milieux contaminés par le benzène, toutefois une partie se retrouve dans le milieu sous forme d'ions nitrites.

- Les ions ammonium n'ont pas été détectés dans les milieux de culture.

- En tenant compte du nombre de cellules présentes dans le milieu, les cultures contaminées par le benzène montrent une concentration plus forte en pigments chlorophylliens et en azote organique que les cultures témoins.

- L'inhibition de la croissance des chlorelles dans les milieux contenant du benzène n'est pas due à l'accumulation des ions nitrites

dans le milieu. En effet, les algues peuvent se développer normalement même en présence de 100 ppm de nitrites.

- Les nitrites ne sont pas non plus responsables de l'exaltation de la synthèse chlorophyllienne. La densité optique des cultures contenant les ions nitrites est la même que celle des témoins.

b) - Toxicité sur les daphnies : en ce qui concerne le choix de l'âge des daphnies mises en expérience, les daphnies de 6 à 7 jours se sont révélées très intéressantes pour mesurer la toxicité des produits pétroliers. Celles-ci sont en phase de croissance rapide et offrent la possibilité de faire des mesures de croissance pondérale dans des délais assez courts (4 jours) et sur un petit nombre de daphnies (en général 10 suffisent) De plus, on peut voir l'effet sur la natalité dans des délais réduits (5 à 7 jours).

L'action du benzène et du toluène se traduit rapidement par l'immobilisation et la décantation des daphnies exposées. Pour des concentrations inférieures à 13 ppm de benzène ou à 10 ppm de toluène, il y a récupération ; les daphnies se remettent à nager après une immobilisation plus ou moins longue. La prise de nourriture, se traduisant par un accroissement de poids des daphnies exposées, diminue quand la concentration du toxique dans le milieu augmente.

Le retard dans la reproduction des daphnies exposées augmente avec la concentration de l'hydrocarbure. La fertilité des daphnies exposées diminue également avec la concentration du toxique dans le milieu.

Remises en milieu sain, les daphnies peuvent à nouveau se développer et se reproduire comme des daphnies témoins.

La vitesse d'imprégnation et d'élimination des hydrocarbures par les daphnies est beaucoup plus grande que chez le poisson, sans doute

parce que les daphnies ont un rapport surface d'échange/volume, beaucoup plus grand.

c) - Toxicité sur les poissons : les recherches sur la toxicité des hydrocarbures aromatiques légers vis-à-vis de l'able, ainsi que l'étude de la cinétique d'imprégnation et d'élimination de ces hydrocarbures par ce poisson montrent que

- La vitesse de pénétration des hydrocarbures dans l'able diminue le long de la série benzène - toluène - xylènes et éthylbenzène,

- la vitesse d'élimination des hydrocarbures par l'able diminue dans le même sens,

- l'équilibre des échanges des hydrocarbures entre le milieu et le poisson est atteint dans des délais qui augmentent avec le volume molaire de l'hydrocarbure (2 jours pour le benzène, 4 jours pour le toluène, 5 jours pour les xylènes et l'éthylbenzène),

- à l'équilibre, les facteurs de concentrations augmentent avec le volume molaire de l'hydrocarbure ($F_{\text{benzène}} = 6$; $F_{\text{toluène}} = 9$; $F_{\text{xylènes}} = 14$)

Les facteurs de concentration sont liés aux volumes molaires par la relation suivante :

$$F_c = 0.24 V_M - 16 \quad (r^2 = 0.98)$$

où F_c représente le facteur de concentration ; V_M le volume molaire et r , le coefficient de corrélation.

- les concentrations létales 50 % des hydrocarbures monoaromatiques évoluent avec la durée d'exposition

. au cours des 24 premières heures d'exposition, la toxicité semble diminuer quand le volume molaire augmente.

. après 72 heures, les concentrations létales sont équivalentes,

. après 96 heures, la toxicité semble augmenter avec le volume molaire de l'hydrocarbure.

- il semble que ces variations relatives des concentrations létales des hydrocarbures aromatiques soient dues à leurs pouvoirs de pénétration différents dans la chair du poisson,

- le facteur de concentration des hydrocarbures dans le poisson augmente avec le poids de l'animal. Les plus gros poissons semblent cumuler davantage que les petits, ces derniers étant par ailleurs moins sensibles à l'action du toxique que les gros,

- la recherche d'une corrélation entre F_c et p (poids du poisson), nous a montré que ces deux paramètres pourraient être reliés entre eux par une relation de la forme :

$$F_c = ap + b$$

La détermination des constantes a et b par la méthode des moindres carrés, conduit aux relations suivantes :

$$F_c = 3.76 + 3.8 p \quad \text{pour le benzène}$$

et

$$F_c = 3.8 + 8.7 p \quad \text{pour le toluène}$$

- les variations du facteur de concentration au cours du temps, avec l'hydrocarbure et avec le poids des animaux laissent penser que la pénétration des hydrocarbures dans le poisson est un phénomène purement physico-chimique ; le facteur de concentration serait le coefficient de partage de l'hydrocarbure entre la phase eau et la phase poisson. En effet, nous avons pu montrer que l'imprégnation des poissons morts est plus grande que celle des vivants. Ce qui nous a permis de dire que la concentration du benzène et du toluène par le poisson est un phénomène passif, l'absence d'activité des poissons morts, qui s'opposerait à l'imprégnation par des phénomènes de rejets, est probablement la cause de la différence des concentrations

Il paraît donc qu'il n'y a pas de bioaccumulation des hydrocarbures par le poisson, mais au contraire une bioélimination qui s'oppose aux lois de l'équilibre thermodynamique.

En travaillant sur une autre espèce, OGATA M. et MIYAKE Y. (1979) utilisant des hydrocarbures aromatiques monocycliques (benzène, toluène, xylène) trouvent que l'accumulation de ces derniers dans Anguilla japonica, un poisson pesant entre 130 et 180 g, atteint son maximum pour le benzène au bout de 24 heures d'exposition. Les facteurs de concentrations trouvés sont de 3 5 - 13 2 - 23 6 - 21 4 respectivement pour le benzène, le toluène, le méta ou le p-xylène et l'o-xylène

Ces auteurs ont défini des conditions expérimentales mettant en jeu un système ouvert, un milieu renouvelé tous les jours, les hydrocarbures étant introduits dans le milieu en mélange. Tout cela peut expliquer les différences entre les facteurs de concentration qu'ils ont trouvé et les nôtres. On peut encore évoquer l'évaporation du benzène et des fractions légères du mélange introduit dans l'eau, l'enrichissement de celui-ci en fractions moins volatiles telles que toluène et xylène. Ajoutant encore à cela la taille du poisson qui est 100 à 200 fois plus gros que l'able

NEFF J M et coll (1976), utilisant Rungia cuneata, trouvent des facteurs de concentrations (24 heures) qui augmentent le long de la série naphthalène, méthyl-1 naphthalène, méthyl-2 naphthalène, diméthyl-naphthalène et triméthyl-naphthalène ; les valeurs trouvées par ces auteurs sont pour les composés cités respectivement : 2.3 - 8.5 - 8.1 - 17.1 et 26.7

Le fait que l'able soit une espèce peu utilisée dans les tests biologiques, nous a conduit à comparer sa sensibilité à celle d'un poisson mieux connu, le Brachydiano rerio : les résultats obtenus montrent que les deux espèces ont la même sensibilité et la même capacité de concentration et d'élimination des hydrocarbures aromatiques monocycliques. Cependant la dégradation du benzène dans les milieux du Brachydiano n'a pas eu lieu.

E) Action des décomposeurs

A partir des milieux contaminés par le benzène et ayant été en contact avec l'able, nous avons isolé deux souches bactériennes capables de dégrader le benzène, le toluène, et les phénols. L'une d'elles a été trouvée systématiquement et nous l'avons baptisé "M" pour sa ressemblance avec les genres Moraxella ; mais elle en diffère par certains caractères biochimiques et physiologiques, et aussi par son abilité à dégrader le benzène.

La souche M isolée dans ce travail semble se différencier de l'ensemble des microorganismes reconnus capables de dégrader le benzène par la voie métabolique qu'elle emprunte. En effet, GIBSON D. T. (1971) ; HOGN T. et JAENICKE L. (1972), signalent que les microorganismes utilisent, pour dégrader le benzène, une voie métabolique différente de celle des mammifères, car il n'y aurait pas de production de monophénol. Or

dans nos essais, la souche M produit essentiellement du phénol à partir du benzène et des crésols à partir du toluène.

La détermination de la deuxième souche a pu être faite sans ambiguïté ; c'est l'espèce Pseudomonas putida qui a pu être isolée des milieux où la souche M a été inhibée, par l'introduction de la pénicilline. Cette souche bien connue à cet égard dégrade également le benzène, le toluène, et les phénols.

F) Association des espèces

L'accumulation d'un toxique dans un être vivant est considérée comme un danger potentiel pour les espèces animales placées aux échelons supérieurs dans la hiérarchie de la chaîne trophique.

Les effets du benzène et du toluène sur les associations d'espèces telles que : chlorelles-daphnies, daphnies-poissons, chlorelles-poissons et chlorelles-daphnies-poissons, ont montré qu'il n'y a pas de risque évident d'intoxication des daphnies ou de l'able par le seul biais de proies contaminées.

Ainsi, aucune différence significative n'a été observée entre élevage de daphnies nourries de chlorelles témoins et élevage de daphnies nourries de chlorelles ayant été cultivées pendant 5 jours dans des milieux contenant du benzène ou du toluène à des concentrations pouvant atteindre les CI_{50} (5 jours) de ces hydrocarbures, c'est à dire 50 ppm de benzène ou 40 ppm de toluène

L'élimination des hydrocarbures et leurs dilutions dans les milieux d'élevage des prédateurs, font que très rapidement les concentrations d'hydrocarbures dans les milieux descendent en dessous des concentrations limites tolérables

G) Introduction des décomposeurs dans une chaîne trophique

L'influence du benzène sur les algues et les daphnies en présence de bactéries de la souche M, symbolisant un aspect du rôle des décomposeurs dans les études d'impacts des hydrocarbures sur la faune et la flore aquatiques, a également été entreprise.

L'introduction de bactéries de la souche M à la concentration initiale de 1000 cellules/ml dans les milieux de culture d'algues contaminées par le benzène, le phénol, ou le toluène entraîne une croissance des algues plus grande dans les milieux toxiques que dans les milieux témoins.

D'autre part, la dégradation des hydrocarbures est plus rapide quand les deux espèces sont associées. Ce phénomène s'explique de la manière suivante :

- les algues se développent mieux que dans les cultures témoins, parce que d'une part les bactéries introduites dans les milieux de culture détoxifient ceux-ci et d'autre part, produisent par leur métabolisme du dioxyde de carbone nécessaire pour la photosynthèse des algues et dont les milieux sont carencés.

- la dégradation des hydrocarbures par les bactéries est accélérée par la présence d'algues qui fournissent l'oxygène nécessaire pour cela.

- à l'exception de cultures où nous avons introduit des bactéries, aucune stimulation de la croissance des chlorelles n'a pu être observée par l'incorporation dans les milieux de culture de produits pétroliers.

- nous n'avons pas noté d'assimilations du benzène par les algues, comme semble l'affirmer ATKINSON L. P. et coll. (1977), ces auteurs utilisant des flacons obturés à l'aide de bouchons à vis, trouvent après exposition des algues moins d'hydrocarbures qu'ils en ont mis dans leurs milieux de cultures, et pensent à une assimilation des hydrocarbures monoaromatiques par les algues.

H) Effets des métabolites

Dans les milieux contaminés par le benzène ou le toluène de quantités mesurables de phénols ou d'ions nitrites ont été trouvées. La toxicité de ces métabolites vis-à-vis des trois espèces choisies a été entreprise, afin de situer leur toxicité par rapport à celle des composés ayant entraîné leur synthèse.

Les essais de toxicité des ions nitrites et des phénols, sur les espèces choisies montrent que les seuils de toxicité de ces produits quand ils sont seuls dans les milieux, sont beaucoup plus élevées par rapport aux concentrations rencontrées dans les milieux contaminés par le benzène, et ne peuvent donc être considérés comme seuls responsables des effets provoqués par le solvant.

Si phénol et benzène agissent de façon comparable vis-à-vis des chlorelles, sur les daphnies : les effets du phénol sont différents. En effet :

. Pour des concentrations inférieures à 12 ppm il y a précocité de la reproduction.

. Pour des concentrations supérieures à 12 ppm il y a retard de la reproduction.

Dans tous les cas de concentrations, on note un vieillissement prématuré des daphnies exposées à ce toxique.

1) Formulation mathématique des synergismes

Un effet biologique B qu'on obtient par l'administration des substances $S_1, S_2, \dots, S_i, S_n$ séparément à des concentrations $C_1, C_2, \dots, C_i, \dots, C_n$, peut également être obtenu par la présence concomitante de toutes ces substances à des concentrations $x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_n$ telles que :

$$x_i \neq C_i, \quad \forall i$$

C'est le cas courant de tout problème de polluants dans l'environnement, un toxique n'est jamais seul. Sans avoir la prétention de pouvoir comptabiliser toutes les nuisances présentes à un moment donné et en un point donné et d'apprécier leurs possibilités de synergismes ou d'antagonisme, nous avons essayé par des exemples simples d'aboutir à une formulation mathématique généralisable, qui peut être de la forme :

$$\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^{i-1} \alpha_{ij} \frac{x_j}{C_j} = 1$$

Nous avons pu constater une addition des effets pour le benzène et le mercure, une potentialisation de l'action toxique de l'hydroquinone par la présence dans le milieu d'ions nitrites, ou de chlore et enfin un antagonisme pour l'aniline et des ions nitrites.

Ce travail a tenté d'apporter une contribution dans le cadre de l'Ecotoxicologie, branche nouvelle de la Toxicologie, dans laquelle les schémas expérimentaux ne sont pas encore parfaitement fixés du fait de son

apparition récente. La manipulation des composés volatils s'est avérée une fois de plus délicate et nous avons été sensibles aux nécessités impérieuses de lier de façon aussi rigoureuse que possible les aspects physico-chimiques et les aspects biologiques. Cela correspond bien au caractère pluridisciplinaire que semblent imposer les sciences de l'environnement.

BIBLIOGRAPHIE

- ACKMAN R. G. et NOBLE D. , 1973
Cité par ZITKO V . 1975
- AFNOR (norme) T 90-301, 1974
Détermination de l'inhibition de la mobilité - Daphnia magna straus
(crustacés, cladocères)
Edité par l'Association Française de Normalisation (AFNOR)
Tour Europe, Cedex 7 92080 Paris la Défense.
- ALBERS P H. , 1976 (C. A. 88-45941)
Effect of external applications of fuel oil on hatchability of mallard eggs.
Fate Eff. Petrol. Hc. Mar. Ecosystems. Org. Proc. Symp.
(publi. 1977), pp : 158-163, Edited by Wolfe Douglas A. Pergamon.
Elmsford New York
- ALTSHULLER A. P. , 1969
Composition and reaction of pollutants in community atmosphere.
Bull. World. Health. Org. GENEVE, 40 (4), pp : 616-623
- ANDERSON I. W. , NEFF J. M. , COX B. A. , TATEM H. E. et
HIGHTOWER G. M. , 1974
Characteristics of dispersions and water soluble extracts of crude
and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish.
Marine Biology 27, pp : 75-88
- ANDERSON R. D. , 1975
Petroleum hydrocarbons and oyster resources of galveston bay, Texas.
Conference on Prevention and Control of Oil Pollution. San Fransisco,
California, pp : 541-548
- ATKINSON L. P. , DUNSTAN W. M. , et NATOLI J. G. , 1977
The analysis and control of volatile hydrocarbon concentration during
oil bioassays.
Water. Air and Soil Pollution 8, pp : 235-242
- ATLAS R M. et BARTHA R. , 1972
Biodegradation of petroleum in sea water at low temperatures.
Can. J. Microbiol. 18, pp 1851-1855
- AXCELL B. C. et GEARY P I. , 1973
The metabolism of benzene by bacteria
Biochem J. 136, pp 927-934

- AXCELL B. C. et GEARY P. J. , 1975
Purification and Some properties of a soluble benzene-oxidizing system from a strain Pseudomonas.
Biochem. J. , 146, pp : 173-183
- BAKER J. M. , 1969
The effects of oil pollution on salt marsh communities.
In Field Studies Council Oil Pollution, Research Unit. Annual Report for 1968, Section B. , pp 1-10
- BAKER J. M. , 1970
The effects of oils on plants
Environ. Pollut. , (1), pp : 27-44
- BARNETT C. J. et KONTAGIANNIS I. E. , 1975
The effect of crude oil fractions on the survival of a tidepool Copepod, Tigriopus californicus.
Environ. Pollut. , (8), pp : 45-54
- BAUDIN G. et SANTONI B. , 1977
Possibilités d'utilisation du contrôle de la teneur en adénosine triphosphate.
Recherche dans le domaine de la lutte contre les nuisances.
Journées des 16 et 17 février à Saclay à la demande de Ministère de la Qualité de la vie. , 22p.
- BAYEN M. , 1975
Propriétés physico-chimiques, structure moléculaire et réplication des ADN nucléaire et chloroplastique de Chlorella pyrenoidosa.
Thèse de Doctorat es Sciences naturelles, ORSAY, Université Paris Sud, 191 p.
- BENTON Y. K. et VROMAN A. , 1960
In LANDES K. K. , 1973
- BLUMER M. , 1972
1 Submarine seeps: Are they a major source of open ocean oil pollution?
Science 176, pp : 1257-1258
- BLUMER M. et YOUNGBLOOD W. W. , 1973
Alkane and alkenes in marine benthic algae.
Marine. Biology. , 21, pp : 163-172
- BOEHM P. D. et QUINN I. G. , 1976
The effects of dissolved organic matter in sea water on the uptake of mixed individual hydrocarbons and number 2 fuel oil by a marine filter-feeding bivalve (Mercenaria mercenaria)
Estuarine and Coastal Marine Science . 4, pp 93-105

- BOS R. , GUICHERIT R et HOOGEVEEN A. , 1977
Distribution of some hydrocarbons in ambient air near delft and the influence on the formation of secondary air pollutants.
The Science of the Total Environment. , 7, pp : 269-281
- BOURNE N. F. , 1959
The determination of carbon transfert from Chlorella vulgaris Beijerinck to Daphnia magna Strauss, using radio-active carbone (^{14}C) as a tracer.
Thèse Ph. D. , Université de Toronto. , 103 p.
- BOYLAN D. B. , et TRIPP B. W. , 1971
Determination of hydrocarbons in seawater extracts of crude oil and crude oil fractions.
Nature. Vol. , 230, pp: 44-47
- BRUNS V. F. , RASMUSSEN L. W. , WOLFE H. H. , 1955
The use of aromatic solvents for control of submerged aquatic weeds in irrigation channels.
U. S Dep. Agric. Circ. , N° 971. , pp 33
- BURKI K. , WHEELER J. E. , AKAMATSU Y. , et BRESNICK E. , 1974
Early differential effects of 3 methylcholanthrene and its K region epoxide on mouse skin.
J. Nat. Cancer. Inst. , 53, pp : 967-976
- BURWOOD R. et SPEERS G. C. , 1974
Photo-oxydation as a factor in the environmental dispersal of crude oil.
Estuarine and Coastal Marine Science. , 2, pp : 117-135
- CADLE R. D. et ALLEN E. R. , 1970
Atmospheric photochemistry
Science. , Vol. 167, N° 3916, pp : 243-249
- CAIRNS J. Jr. et SCHEIER A. , 1962
The effects of temperature and water hardness upon the toxicity of naphthenic acid to the common blue gill sunfish, Lepomis macrochirus Raf, and the Pond Snail Physa heterostropha Say.
Not. Nat. Acad. Nat. Sci. Philadelphia N° 353, 2 pp
- CAGLAR M. A. , THOMPSON A. R. , HOUSTON C. W. , ROSE V. C. , 1971
Kinetics of bacterial growth during aerobic oxidation of organics.
pp : 533-553 , in FAUST S. D. et HUNTER J. V 1971
- CALVERT J. G. , 1976
Test of the theory of ozone generation in Los Angeles atmosphere.
Environmental Science & technology. , Vol. 10, pp : 248-262

- CARR R. S. et REISH D. I. , 1976**
 The effect of petroleum hydrocarbons on the survival and life history of poly chaetous annelids
 Fate of Petrol HC Mar. Ecosystems. Org. Proc. Symp., (publi 1977), pp : 168-173
 Edited by Wolfe Douglas A. Pergamon Elmsford N. Y.
- CHAMBON P. et CHAMBON-MOUGENOT R. , 1970**
 La pollution de l'eau : Interférence des acides gras dans le dosage des hydrocarbures aliphatiques par spectrométrie infra rouge.
 Bull. Ass. Phar. Fr. Hydrologie. , 3, pp : 105-110
- CHOVIN P. et ROUSSEL A , 1973**
 Physico-chimie et physiopathologie des polluants atmosphériques.
 Masson et C^{1e} Editeurs. , 303 p
- CHOVIN P. , 1975**
 Les réactions thermiques, et photochimiques des polluants dans l'atmosphère.
 Analisis. . Vol. 3, N° 8, pp : 462-469
- CIRN du Rapport PB. , 1975**
 V- Problèmes d'actualité. Raffinage et pollution atmosphérique.
 CIRN. Inf. , pp : 19-27
- CRAFTS A. S. et REIBER H. G. , 1948**
 Herbicidal properties of oil.
 Hilgardia. , (18), pp : 77-156
- CURRIER H. B. , 1951**
 Herbicidal properties of benzene and certain methyl derivatives
 Hilgardia. , (20), pp : 383-406
- CURRIER H. B. et PEOPLES S. A. , 1954**
 Phytotoxicity of hydrocarbons.
 Journal of Agricultural Science Vol. 23, N° 6, pp 155-173
- DAVIS I B. , 1961**
 Oxidation of alkyl substituted cyclic hydrocarbons by a Nocardia during growth on n-alkanes
 Appl. Microbiol. , 9, 383-388
- DAVIS I B , 1967**
 Petroleum Microbiology
 Elsevier, Amsterdam.
- DAVIS R I , SHELDON V L et AUERBACH S. I , 1956**
 Cités par DOMMERGUES Y et MANGENOT F 1970

- DAYHOFF M O . 1971
Origin of organics from inorganics
In FAUST and HUNTER, pp 1-28
- DENNIGTON V. N. , GEORGE J. J. , WYBORN C. H. E. , 1975
The effects of oils on growth of freshwater phytoplankton.
Environ. Pollut. , (8), pp : 233-237
- DESOILLE H. , SCERRER J. et TRUHAUT R. , 1978
Précis de médecine du travail.
2^{ème} édition, Masson
- DOMMERGUES Y. et MANGENOT F. , 1970
Ecologie microbienne du sol.
Masson. Editeurs. , 796 p
- DOVODA A. M. , 1978
Content and composition of long chain hydrocarbons, isolated from
different parts of apple fruits
Résumé n° 88 - 47 489, dans Chemical Abstracts
- DOWDEN B. F. , 1965
Toxicity of commercial waste-oil emulsifiers to Daphnia magna
J. W. P. C. F. , 34 (10), pp : 1010-1014
- DUNSTAN W. M. , ATKINSON L. P. et NATOLI J. , 1975
Stimulation and inhibition of phytoplankton growth by low molecular
weight hydrocarbons.
Marine Biology 31, pp : 305-310
- EHRHARDT M. et BLUMER M. , 1972
The source identification of marine hydrocarbons by gas chromatography.
Environ. Pollut. (3), pp : 179-194
- EISLER R. , 1975
Toxic sublethal, and latent effects of petroleum on Red Sea Macrofauna.
Conference on Prevention and Control of Oil Pollution, San Fransisco,
California. pp : 535-540
- FARRINGTON J. W. et MEREIROS G. C. , 1975
Evaluation of some methods of analysis for petroleum hydrocarbons
in marine organisms.
Conference of Prevention and Control of Oil Pollution, San Fransisco,
California. pp : 115-121
- FAUST S. D. and HUNTER J. V. , 1971
Organic compounds in aquatic environments.
MARCEL DEKKER, INC. New York, 638 p

- FERARD J. F. et MUGEL M. , 1978**
 Elaboration d'un modèle de chaîne trophique dulçaquicole et application à une étude écotoxicologique du cadmium.
 Thèse de Doctorat de Spécialité présentée à l'Université de Metz.
- FOX D. L. , KAMENS R. et JEFFRIES H. E. , 1975**
 Photochemical smog systems : Effects of dilution on ozone formation.
 Science, Vol. 188, pp : 1113-1114
- FOX H. M. , 1957**
 Cité par GREEN J. , 1963
- FUCIK K. W. et NEFF J. M. , 1976**
 Effects of temperature and salinity on naphthalenes up take in the temperate clam Rugia cuneata and the boreal clam Protothaca staminea
 Fate eff. Petrol. HC. Mar. Ecosystems. Org. Proc. Symp.
 Published 1977, pp : 305-312, Edited by WOLFE DOUGLAS A. PERGAMON
- GARDNER G. R. , YEVICH P. P. , et ROGERSON P. F. , 1975**
 Morphological anomalies in adult oyster, scallop, and atlantic silversides exposed to waste motor oil.
 Conference on Prevention and Control of Oil Pollution San Fransisco, California, pp : 473-477
- GATELLIER C. R. , 1971**
 Les facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures dans l'épuration des eaux.
 Chimie et Industrie. Génie Chimique. Vol. 104 - n° 18, pp : 2283-2289
- GIBSON D. T. , WOOD J. M. , CHAMPAN P. J. et DAGLEY S. , 1967**
 Bacterial degradation of aromatic compounds.
 Biotechnology and Bioengineering. Vol. IX, pp : 33-44
- GIBSON D. T. , KOCH J. R. et KALLIO R. E. , 1968**
 Oxydative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms I-Enzymatic formation of catechol from benzene.
 Biochemistry Vol. 7, n° 7, pp : 2653-2662
- GIBSON D. T. , CARDINI G. E. , MASELES F. C. et KALLIO R. E. , 1970**
 Incorporation of oxygen-18 into benzene by Pseudomonas putida
 Vol. 9 n° 7, pp : 1631-1635
- GIBSON D. T. 1971**
 The microbial oxidation of aromatic hydrocarbons.
 CRC Critical Reviews in Microbiology. 1 (2), pp : 199-223

GLASSON W M , 1975

Effects of carbon monoxide on atmospheric photo-oxidation of nitric oxide hydrocarbon mixtures.

Env. Sc Technol. U. S. A. Vol. 9, n° 4, pp : 343-347

GOLDSTEIN B. D. , 1977

Introduction

J. Toxicol Environ. Health. Suppl (2), pp : 1-4

GONCHAROVA A. V. , 1975

Effect of phenol on the blue green algae Oscillatoria splendida grew.

Biol. Vnutur. Vod. , 28, pp : 19-21, (CA : 87-79276 x)

GREEN J. , 1963

A biology of crustacea.

Witherby. London. , 158 p

HACHENBERG H. et SCHMIDT A. P. , 1977

Gas chromatographic Head Space analysis.

HACHENBERG H. and SCHMIDT A. P. , Heyden. , London, New York, Rheine.

HAMILTON M. A. , RUSSO R. C. et THURSTON R. V. , 1977

Trimmed spearman karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays.

En vironmental Science & Technology, Vol. 11, n° 7, pp : 714-719

HAVIS J. R. , 1950

Herbicidal properties of petroleum hydrocarbons.

Agr. Exp. Sta. Mem. , New York, 1950 (298), pp : 1-20

HAWKES J. W. , 1976

The effects of petroleum hydrocarbons exposure on the structure of fish tissues.

Fate Eff. Pet. Hydrocarbons. Mar. Ecosyst. Org. Proc. Symp.

(Publi. 1977) pp : 115-128, Edited by WOLFE. DOUGLAS A PERGAMON Elmsford, New York

HELLEBUST J. A. , HANNA B. , SHEAT R. G. , GERGIS M. ,

HUTSHINSON T. C. , 1975

Expermental crude oil spills on a small subarctic lake in the

Mackenzie Valley, N. W. T. : Effects on phytoplankton, periphyton and attached aquatic vegetation.

Conference on Prevention and Control of Oil Pollution. San Fransisco, California. pp : 509-515

- HIROSE H. , YAMANAKA S. , KAWAI S. , 1975
Photochemical reactions in sulfur dioxide lower hydrocarbon-oxygen systems in a nitrogen atmosphere.
Chemosphere n° 1, pp : 47-54
- HOGN T. et JAENICKE L. , 1972
Benzene metabolism of Moraxella species.
Eur. J. Biochem. , 30, pp : 369-375
- HORTON A. W. , ESHLEMAN D. N. , SCUFF A. R. et PERMAN W. H. , 1976
Correlation of cocarcinogenic activity among n-alkanes with their physical effects on phospholipid micelles.
J. Nat. Cancer. Inst. , 56, pp : 387-396
- HUTSHINSON T. C. et FREEDMAN W. , 1975
Effects of experimental crude oil spills on taiga and tundra vegetation of the Canadian arctic.
Conferection on Prevention and Control of Oil Pollution.
San Fransisco, California. pp : 517-525
- JACQUEMAIN R. , REMY F. et GUINCHARD C. , 1975
Etudes et comparaisons des déterminations des phénols dans les eaux ; application à l'examen d'un rejet de papeterie.
Journal Français d'Hydrologie publié par l'Association Pharmaceutique Française pour l'Hydrologie ISSN 0335-9581, pp : 25-31
- JEFFERY P. G. , 1973
Large scale experiments on the spreading of oil at sea and its disappearance by natural factors.
Proceedings Joint EPA API USCG Conference on Prevention and Control of Oil Spills. pp : 469-474
- JOHNSON C. M. et HOSKINS W. M. , 1952
The relation of acids and peroxides in spray oils to the respiration of sprayed bean leaves and the development of injury.
Plant. Physiol. , 27, pp : 507-525
- JONES J. G. , 1977
The long term effects of kerosine pollution on the microflora of moorland soil.
Journal of Applied Bacteriology 1977, 43, pp : 123-128
- KATZ L. M. , 1973
The effects of water soluble fraction of crude oil on larvae of the decapod crustacean Neopanope texana (Sayi).
Environ Pollut . (5), pp : 199-204

- KAUSS P B . HUTSHINSON T. C . 1975
The effects of water soluble petroleum components on the growth of Chlorella vulgaris Beijerinck.
Environ Pollut , (9), pp : 157-173
- KESSLER E. et coll , 1963
Cités par FERARD J. F. et MUGEL M. , 1978
- KONTOGIANNIS J E. , BARNETT C. J. , 1973
The effect of oil pollution on survival of the tidal pool copepod, Tigriopus californicus .
Environ. Pollut. (4). pp 69-79
- KOPCZYNSKI S. L . KUNTZ R. L. et BUFALINI J. , 1975
Reactivities of complex hydrocarbon mixtures.
Environental. Science and Technology, (9), pp : 648-653
- KORTE E. et BOEDEFELD E. , 1978
Ecotoxicological review of global impact of petroleum industry and products.
Ecotoxicology an Environmental Safety Vol. 2, n° 1, pp : 55-103
- KREUTZER W. A. , 1963 & 1965
Cité par DOMMERGUES Y. et MANGENOT F. , 1970
- LACAZE J. C. et NAIDE O. V. , 1976
Influence of illumination on phytotoxicity of crude oil.
Marine Pollution Bulletin Vol. 7, n° 4, pp : 73-76
- LACAZE J. C. , 1978
Etude sur la phytotoxicité des produits pétroliers.
Contrat CNEOX n° 76 1547 -Rapport Final- Institut Océanographique
pp : 154
- LANDES K. K. , 1973
Mother nature as an oil polluter.
The American Association of Petroleum Geologists Bulletin
Vol. 57, n° 4, pp 637-641
- LAUGHLIN R. B. Jr. et NEFF J. M. , 1976
Interactive effects of temperature salinity shock and chronic exposure to n° 2 fuel oil on survival development and respiration rate of the horse shoe crab, Limulus polyphemus.
Fate eff. Petrol. Hydrocarbons Mar. Ecosystems. Org. Proc. Symp. (Published 1977) Ed. WOLFE DOUGLAS A. PERGAMON Elmsford
New York pp : 182-191

- LEPAILLEUR H. , 1973
 Choix d'une technique d'étude de la toxicité d'un polluant vis-à-vis
 d'une souche d'algue.
 Etude n° E. 4220, IRCHA
- LEONARD O. A. , HARRIS V. C. , 1952
 The effect of aliphatic hydrocarbons on the shoots of nutgrass
 Johnson grass and other weeds by the directional spray technique.
 Weeds 1, pp : 256-273
- LEONG B. K. J. , 1977
 Experimental benzene intoxication.
 J. Toxicol. Environ. Health. Suppl 2. pp: 45-62
- LEE R. F. , 1975
 Fate of petroleum hydrocarbons in marine zooplankton.
 Confernece on Prevention and Control of Oil Pollution. San Fransisco,
 California. pp : 549-553
- LEE W. Y. , WINTERS K. , NICOL J. A. C. , 1978
 The biological effects of the water soluble fractions of a n° 2
 fuel oil on the planktonic shrimp Lucifer faxoni .
 Environ. Pollut. (15), pp : 167-183
- LE LOURD P , 1976
 La lutte contre la pollution des mers par les hydrocarbures dans
 la pollution des eaux marines de PERES J. M.
 Ed. G. VILLARS. pp : 99-104
- MACKIE P R. , Mc GILL A. S. , et HARDY R. , 1972
 Cités par ZITKO V. , 1975
- MAYRSOHN H. , et CRABTREE J. H. , 1975
 Source reconciliation of atmospheric hydrocarbons.
 California Air Resources Board Division of Technical Services
 Atmospheric Studies Section, 63 p
- MAYRSOHN H. , CRABTREE J. H. , KURAMOTO M. , SOTHERN R. D. ,
 MANO S. H. , 1975
 Source reconciliation of atmospheric hydrocarbons in the south
 coast air basin.
 California Air Resources Board Division of Technical Services
 Atmospheric Studies Section. 49 p.
- Mc AULIFFE C. , 1966
 Solubility in water of paraffin cycloparaffin olefin acetylene, cycloolefin,
 and aromatic hydrocarbons
 The journal of Physical Chemistry, Vol 70, n° 4 pp 1267-1275

- Mc AULIFFE C , 1969
Determination of dissolved hydrocarbons in subsurface brines.
Chemical Geology 4, pp : 225-233
- Mc AULIFFE C. , 1971
GC determination of solutes by multiple phase equilibration.
Chemical Technology, Vol. 1, 46 p
- Mc CAULEY R. N. , 1966
The biological effects of oil pollution in a river.
Limnol. Oceanogr II, pp 475-486
- Mc KEOWN B. A. et MARCH G. L. , 1978
The acute effect of bunker C oil and oil dispersant on : 1 serum glucose,
serum sodium and gill morphology in both fresh water and sea water
acclimated rainbow trout (*Salmo gairdneri*).
Water Research. Vol. 12 n° 3, pp : 153-163
- Mc LAREN A. D. et coll. , 1962
Cités par DOMMERGUES Y. et MANGENOT F. , 1970
- Mc MAHON J. W. et RIGLER F.H. , 1963
Mechanisms regulating the feeding rate of Daphnia magna strauss.
Can. J. Zool. , 41, pp : 321-322
- MECKLENBURG T A , RICE S D. , et KARINEN J. F. , 1976
Molting and survival of king crab (Paralithodes camtschatica) and
coonstripe shrimp (Pandalus hypsinotus) larvae exposed to cooked
inlet crude oil water soluble fraction.
Fate eff. Petrol. HC. Mar. Ecosystems. Org. Proc. Symp.
(Published 1977), pp 221-228, Edited by WOLFE DOUGLAS A. PERGAMON
Elmsford, New York.
- MESTERS R. , CAUSSE C. , DUBOUL-RAZAVET Ch. , GADEL F. , 1975
Etude des résidus d'hydrocarbures dans les sédiments du plateau
continental Languedocien en Méditerranée.
Travaux de la Société de Pharmacie de Montpellier. 35, Fasc. 2,
pp : 137-142
- MICHEL P. , 1976
Pollution par les hydrocarbures, interaction avec les biocénoses.
La pollution des eaux marines, Editeur GAUTHIER-VILLARS
pp : 105-116
- MILES D. H. , COIGN M. J. et BROWN L. R. , 1975
The estimation of the amount of empire mix crude oil in mullet,
shrimp and oysters by liquid chromatography.
Conference on Prevention and Control of Oil Pollution. San Francisco,
California. EPA et API, pp : 149-154

- NEFF J. M., COX B. A., DIXIT D. et ANDERSON J. W., 1976
Accumulation and release of petroleum derived aromatic hydrocarbons
by four species of marine animals.
Marine Biology 38, pp : 279-289
- National Environmental Research Center., 1973
In CIRN., 1975.
- O'BRIEN R. J., 1975
Formation of photochemical aerosol from hydrocarbons.
- Atmospheric analysis.
Environmental Science and Technology -9- (6), pp : 577-582
- O'BRIEN R. J., HOLMES J. R. et BOCKIAN A. H., 1975
Formation of photochemical aerosol from hydrocarbons : chemical
reactivity and products.
Environmental Science and Technology -9- (6), pp : 568-576
- ODIER E., 1976
Croissance microbienne et accidents de stockage des réservoirs de
carburants.
Ann. Microbiol. (Institut Pasteur), 127 B, pp : 213-225
- OGATA M. et MIYAKE Y., 1975
Compound from floating petroleum accumulating in fish.
Water Research. Vol. 9, pp : 1075-1078
- OGATA M. et MIYAKE Y., 1978
Disappearance of aromatic hydrocarbons and organic sulfur
compounds from fish flesh reared in crude oil suspension.
Water Research, Vol. 12, pp : 1041-1044
- OGATA M. et MIYAKE Y., 1979
Disappearance of aromatic hydrocarbons and organic sulfur
compounds from fish flesh reared in crude oil suspension.
Water Research, Vol. 13, pp : 75-78
- LOUDIN J. L., 1972
Dosage des hydrocarbures dans les eaux et les sols.
Bull. Ass. Pharm. F. Hydrologie., 7, pp : 39-43
- PARKE D. V. et WILLIAMS R. T., 1953
Studies in detoxication. The metabolism of benzene. (a) The
formation of phenylglucuronide and phenylsulfuric acid from
(¹⁴C) benzene (b) The metabolism of (¹⁴C) phenol.
Biochem. J 55, pp : 337-340
- PATE C T., ATKINSON R., PITTS J N. Jr., 1976
The gas phase of O₃ with a series of aromatic hydrocarbons
J Environ Sci Health Environ Sci Eng., A11(1), pp 1-10

- PEARSALL W. H. et LOOSE L. , 1937
Growth of Chlorella vulgaris in pure culture.
Proc. Royal. Soc. London B, 121, pp : 451-501
- PERRY R. H. et CHILTON C. H. 1973
Chemical engineers' Hand-book.
Fifth Edition Mc Graw Hill Book Compagny
- PITTS J. N. Jr. , LLOYD A. C. et SPRUNG J. L. , 1975
Ecology and Economics.
Chem. In. Brit. G. B. , 11, (7), pp : 247-256
- PRATT R. , 1943
Studies on Chlorella vulgaris. VI. Retardation of photosynthesis by
a growth inhibiting substance from Chlorella vulgaris
- PROOZE N. J. GORDON D. C. et KEIZER P. O. , 1976
Effects of low concentration of oil accommodated in sea water on
the growth of unialgal marine phytoplankton cultures.
J. Fish. Res. Board. Can. 33, pp : 810-818
- RANDERATH K. , 1971
Chromatographie sur couche mince.
Deuxième édition GAUTHIER-VILLARS, 398 p
- RICE S. D. , MOLES D. A. et SHORT J. W. , 1975
The effect of prudho bay crude oil on survival and growth of eggs
alvins and fry of pink salmon, Oncorhynchus gorbuscha
Conference on Prevention and Control of Oil Pollution.
San Fransisco, California, pp : 503-507
- ROBERTS P. T. et FRIEDLANDER S. K. , 1976
Phtochemical aerosol formation SO₂, 1-heptene, and NO_x in ambient
air.
Env. Sci. Technicol. Vol. 10 n° 6, pp : 573-580
- RODIER J. , 1975
L'analyse de l'eau.
T-1, 5^e édition DUNOD, Paris, 629 p
- ROTHSCHEIN J. , 1970
About the maximum permissible pollution of surface waters by oil
products owing to their effect on the water fauna and on the organoleptic
properties of water.
Vyskumny Ustav Vadnehottospodarstva, 26, pp : 57-59
- RUNION H. A. , 1975
Benzene in gasoline.
Amer. Industrial. Hygiene. Assoc Journal . 36 (5), pp 338-380

- RUSH G. M. , LEONG B. K. J. et LASKIN S. , 1977
Benzen metabolism.
J. Toxicol. Environ. Health. Supp. n° 2, pp : 23-36
- SAUDERS R. A. , BLACHLY C. H. , KOVACINA T. A. , LAMONTAGNE R. A. ,
SWINNERTON J. W. et SAALFELD F. E. , 1975
Identification of volatile organic contaminants in Washington D. C.
Municipal water.
- SAURAT A. H. , 1976
Le pétrole et le gaz.
Encyclopoche Larousse Editions Larousse, pp : 9-16 et 196-197
- SAWICKI E. , 1977
Chemical composition and potentiel genotoxic aspects of polluted
atmosphere.
In Air Pollution and Cancer in Man. , IARC Scientific publications
n° 16, pp : 127-157
- SDIKA A. , CABRIDENC R. , 1976
Mises au point analytiques concernant la micropollution organique
des eaux.
Journal Français d'Hydrologie. Tome 7 - Fascicule 2, n° 20
- SENEZ J. C. et KONOVALTSHINOFF M. M. , 1956
Formation d'acides gras dans les cultures de Pseudomonas aeruginosa
Académie des Sciences, 24, pp : 2873-2875
- SEVERS R. K. , 1975
Air pollution and health.
Texas Reports on Biology and Medecine, Vol. 33, n° 1, pp : 45-60
- SHAW J. M. et TIMMONS F. L. , 1949
Controlling submersed water weeds in irrigation systems with
aromatic solvents.
U. S. Bur. Reclam. U. S. Dept. Agri. Laboratory, Report CH 97, 10 p
- SIMON P. et MEUNIER R. , 1970
Microbiologie industrielle et génie biochimique.
Masson et C^{ie} Editeurs.
- SICE J. , 1966
Tumor promoting activity of n-alkanes and 1 alkanols.
Toxicol. Appli. Pharmacol. 9, pp : 70-74

SMITH P. V . 1954

Cité par ZITKO V. , 1975

SNYDER R. , 1974

Relation of benzene metabolism to benzene toxicity.

In Symposium on Toxicology of Benzene and Alkylbenzenes,

D. BRAUN ed. , pp : 44-83, Industrial Health Foundation, Pittsburgh

STAINKEN D. M. , 1975

Preliminary observation on the mode of accumulation of n° 2 fuel oil by the soft shell clam, Mya arenaria.

Conference on Prevention and Control of Oil Pollution.

San Fransisco, California, pp : 463-468

STAINKEN D. , 1976 (CA : 88-45950)

The accumulation and depuration of n° 2 fuel oil by the soft shell-clam Mya arenaria L.

In Fate eff. Petrol. Hydroc. Mar. Ecosystems. Org. Proc. Symp.

Edited by WOLFE DOUGLAS A. PERGAMON Elmsford N. Y. pp : 313-322

STANDARD METHODS for the Examination of water and waste. 1971

13^e Ed. American. Public. Health. Association. N. Y. 874 p

STEELE R. L. , 1976 (CA : 88-45939)

Effect of certain petroleum products on reproduction and growth of zygotes and juvenile stages of the algae Fucus edentatus. Phyl.

(Phaeophyceae : Fucales).

In Fate Eff. Petrol. HC. Mar. Ecosystems. Org. Proc. Symp.

Edited by WOLFE DOUGLAS A. PERGAMON Elmsford, N. Y. , pp : 138-142

STEEMAN NIELSEN E. , 1961

Chlorophyll concentration and rate of photosynthesis in

Chlorella vulgaris

Physiologia Plantarum, 14, 868-876

STEEMAN NIELSEN E. , HANSEN V. K. et JØRGENSEN E. G. , 1962

The adaptation to different light intensities in Chlorella vulgaris and the time dependance on transfert to a new light intensity.

Physiol. Pl. 15, pp : 505-517

SUTTON C. , CALDER J. A. , 1974

Solubility of high-molecular-weight n-paraffins in distilled water and sea water.

Environmental Science and technology, vol. 8, n° 7, pp : 654-657

- TATEM H. E. , 1976
Accumulation of naphthalen by grass shrimp : effects on respiration, hatching, and larval growth.
In fate eff. Petrol. HC. Mar. Ecosystems. (Published 1977)
Edited by WOLFE DOUGLAS A. PERGAMON Elmsford N. Y. pp : 201-209
- TATEM H. E. COX B. A. et ANDERSON J. W. , 1978
The toxicity of oils and petroleum hydrocarbons to estuarine crustaceans
Reprinted from Estuarine and Coastal Marine Science, 6, pp : 365-373
- TEISINGER J. , FISEROVA-BERGEROVA V. et KUDORNA J. , 1952
The metabolism of benzen in man.
Prac. Lek. 4, pp : 175-188
- TEMPLETON W. L. , SUTTON E. A. , BEAN R. M. , ARNETT R. C. ,
BLAYLOCK J. W. , WILDUNG R. E. & MOORE H. J. , 1975
Oil pollution studies on Lake Maracaibo, Venezuela.
Conference on prevention and control of oil pollution. San Francisco, California, pp: 489-496.
- VAN DER LINDEN A. C. & THIJSSE G. J. , 1965
The mechanisms of microbial oxidations of petroleum hydrocarbons.
Advanc. Enzymol. , 27, pp : 469- 546
- VAN DUUREN B. L. , 1969
Tumor - promoting agents in two stage carcinogenesis.
Progr. Exp. Tumor Res. (Basel), 11, pp : 31-68
- VAN DUUREN B. L. , 1972
Epoxides hydroperoxides and peroxides in air pollution.
Int. J. Environ. Anal. Chem. , 1, pp : 233-241
- VAN OVER BEEK J. , et BLONDEAU R. , 1954
Mode of action of phytotoxic oils.
Weeds. , 3, pp : 55-65
- WALKER P. , 1976
Air pollution assessment of toluene.
U. S. Environmental Protection Agency 68-02-1495, 077B. W-54, 92 p
- WATABE T. et YAMADA N. , 1975
The biotran formation of 1-hexadecane to carcinogenic
1,2 epoxyhexadecane by hepatic microsomes.
Biochem. Pharmacol. 24, pp . 1051-1053

- WHITE W C et GAMMON A M. , 1914
The influence of benzol inhalations on experimental pulmonary tuberculosis in rabbits
Trans Assoc Am. Physicians. 29, pp . 332-337
- WHITMORE F. C. , 1944
Annual report of progress : Fondamental research on the occurrence and recovery of petroleum (1943).
Am. Petrol. Inst. New York, pp : 124-125
- WILLIAMS F. M. , 1971
Dynamics of microbiol populations.
In systems analysis and simulation in ecology.
Ed. PATTEN B. C. , Academic Press. New York & London,
Vol. 1, Chap. 3 , pp 198-267
- WILLIAMS G. N. , HANN R. et JAMES W. P. , 1975
Predicting the fate of oil in the marine environment.
Conference on Prevention and Control of Oil Pollution.
San Fransisco, California. pp : 567-572
- WITHEY R. J. et MARTIN L. , 1974
A sensitive micro method for the analysis of benzene in blood.
Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, Vol. 12
n° 6, pp : 659-664
- WUITHIER P. , 1972
Le pétrole : Raffinage et génie chimique.
2^d Editions 1972, Tome 1 Editions Technip
- YANG W. C. , et WANG H. , 1977
Modeling of oil evaporation in aqueous environment.
Water Research Vol. 11, pp : 879-887
- YEUNG C. K. K. et PHILLIPS C. R. , 1975
Hydrocarbon consumption and synergistic effects in photooxidation of olefins.
Environmental Science & Technology, 9, (8), pp : 732-737
- ZARELLA W. M. , MOUSSEAU R. J. . COGGESHALL N. D. , NORRIS M. S.
et SCHRAYER G. J. , 1963
Analysis and interpretation of hydrocarbons in subsurface brines.
Paper Presented at Divn. Petroleum Chemistry. ACS Meeting.
pp : A7-16

ZITKO V. , et CARSON W. V. , 1970

The characterisation of petroleum oils and their determination in the aquatic environment.

Tech. Rep. Fish. Res. Bd. Can. n° 217

ZITKO V. , 1975

Aromatic hydrocarbons in aquatic fauna.

Bulletin of Environmental Concentration and Toxicology. Vol. 14

n° 5, pp : 621-631