

Etude comparative de l'impact de trois solvants organiques, utilisés dans la dissolution de l'anthracène, sur la microflore de la lagune de Bizerte (Tunisie)

Comparative study of the impact of three organic solvents, used in the dissolution of anthracene, on the microflora of the Bizerte lagoon (Tunisia)

Héla LOUATI^{*1,2}, Olfa BEN SAID^{1,3}, Amel SOLTANI^{1,3}, Ezzeddine MAHMOUDI¹, Cristiana CRAVO LAUREAU³, ROBERT DURAN³, OLIVIER PRINGAULT^{1,2} & Patricia AISSA¹

1. Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement, Faculté des Sciences de Bizerte, Université de Carthage- Tunisie.
2. Laboratoire Ecosystèmes Lagunaires, UMR 5119 CNRS-UM2-IFREMER- IRD ECOSYM, Station Méditerranéenne de l'environnement Littoral, Sète. Université de Montpellier II, France. *(hela.louati@yahoo.fr)
3. Equipe Environnement et Microbiologie, IPREM UMR 5254, IBEAS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, France.

Résumé. La présente étude en microcosmes a été effectuée pour évaluer : 1) les effets de trois solvants organiques (acétone, éthanol et diméthylsulfoxyde), une fois évaporés, utilisés dans la dissolution de l'anthracène, sur les bactéries hétérotrophes aérobies; 2) l'impact de cet hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) à deux concentrations (C1=1ppm ; C2=10ppm) dissous dans chacun des solvants utilisés sur les bactéries des sédiments de la lagune de Bizerte. Trois réplicats ont été réalisés pour chaque type de microcosme. La quantification des bactéries hétérotrophes aérobies a été évaluée par la méthode du nombre le plus probable. Après 20 jours d'incubation, la contamination par l'acétone évaporée n'a pas entraîné une modification significative de la biomasse bactérienne totale dans la colonne d'eau, à l'interface eau-sédiment et dans le sédiment. Cependant, le diméthylsulfoxyde (DMSO) et l'éthanol ont entraîné une diminution significative et importante de la charge moyenne des bactéries hétérotrophes aérobies, principalement au sein du sédiment par rapport à celle du témoin ($p < 0,05$). Nos résultats ont également montré que l'anthracène dissous dans les trois solvants a entraîné une réduction importante de la microflore marine au niveau des trois compartiments microcosmiques. Celle-ci a été plus accentuée au niveau des microcosmes contaminés par l'anthracène dissous dans l'éthanol et le DMSO. On peut conclure que la réponse des bactéries indigènes a été dépendante des solvants et des volumes testés. L'acétone serait, donc, le solvant organique le mieux adapté pour dissoudre l'anthracène dans l'étude expérimentale des effets de la bioremédiation de sédiments contaminés par les HAP sur les bactéries hétérotrophes aérobies.

Mots-clés : solvants, anthracène, bactéries, contamination sédimentaire, lagune de Bizerte, Tunisie.

Abstract. A microcosm experiment was carried out in order to evaluate : 1) the effects of three organic solvents (acetone, ethanol and dimethylsulfoxide), after evaporation, used in the dissolution of anthracene on indigenous bacteria; 2) the impact of this polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) at two concentrations (C1 = 1 ppm; C2 = 10 ppm) dissolved in each solvent used on the indigenous bacteria of sediments from the lagoon of Bizerte. Three replicates were performed for each type of microcosm. The quantification of aerobic heterotrophic bacteria was performed by the Most Probable Number method. After 20 days of incubation, contamination by acetone evaporated did not cause a significant change in total bacterial biomass in the water column, at the water-sediment interface and in the sediment. However, dimethylsulfoxide (DMSO) and ethanol have resulted a significant decrease in the average load in aerobic heterotrophic bacteria, mainly in the sediment compared to control microcosms ($p < 0.05$). Our results also showed that the anthracene dissolved in the three solvents caused a significant reduction in marine microflora in the three compartments of microcosms. This decrease was more pronounced in contaminated microcosms by anthracene dissolved in ethanol and dimethylsulfoxide. We can conclude that the response of indigenous bacteria was dependent on solvents and volumes tested. Acetone would be the most suitable organic solvent to dissolve anthracene in the experimental study of bioremediation effects of contaminated sediment by PAHs on indigenous bacteria.

Keywords : solvents, anthracene, bacteria, sediment contamination, Bizerte lagoon, Tunisia

Abridged English version

Bioremediation has been recognized as an attractive decontamination strategy for a variety of polluted environments. Polycyclic aromatic hydrocarbons are among the most persistent and ubiquitous micro marine and coastal ecosystem.

To support the choice of a remediation technique for the decontamination of PAH contaminated dredged sediments, a characterization test is needed, it takes into account the physical state in which PAHs occur. A microcosm experiment was used to examine (1) the response of bacteria at different levels of three organic solvents (acetone, ethanol and dimethylsulfoxide), after evaporation, used in the dissolution of anthracene and (2) the effects of anthracene contamination on indigenous bacteria.

Sediment microcosms amended with 1 ppm and 10 ppm anthracene were incubated in triplicate during 20 days.

Univariate analysis showed that DMSO and ethanol have led to significant effects on bacterial biomass. However, contamination by acetone evaporated did not cause a significant change in total bacterial biomass in the water column, at the water-sediment interface and in the sediment.

Anthracene appears to have caused more important changes in aerobic heterotrophic bacteria as compared to control treatments, suggesting the dominance of non-tolerant populations despite the presence of background anthracene contamination in the studied sediment. This change was more pronounced in contaminated microcosms by anthracene dissolved in ethanol and DMSO. This indicates that the response of the bacterial community to anthracene contamination is dependent on the type of solvent used

(acetone, ethanol and dimethylsulfoxide) for the sediment contamination.

In conclusion, the results from the present study demonstrate that acetone would be the most suitable organic solvent to dissolve anthracene in bioremediation studies of contaminated sediment by PAHs. This finding opens

exciting axes for the future use of the bioremediation to reduce toxic effects of anthracene for bacteria in polluted sediment. Further works are still required to propose an efficient strategy to stimulate biodegradation of PAH that takes into account the complex interactions between species for resource access.

INTRODUCTION

Les écosystèmes marins côtiers sont considérés comme l'exutoire de plusieurs micropolluants tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) qui finissent par s'accumuler dans les sédiments abritant des microorganismes. Parmi ces derniers, les populations bactériennes participant à la biodégradation de ces contaminants persistants (Yuan *et al.* 2000, Mrozk *et al.* 2003). De façon générale, les HAP sont des composés très stables, hydrophobes et ayant une faible volatilité, donc peu solubles dans l'eau. Ils ont tendance à s'adsorber sur les matrices solides et notamment les matières organiques (Ke *et al.* 2002). Ces propriétés les rendent relativement résistants à la biodégradation naturelle. En effet, plusieurs travaux se sont focalisés sur la bioremédiation dans le but de réhabiliter les sédiments contaminés par les HAP (Yu *et al.* 2005, Miyazaka *et al.* 2006) et leurs effets sur les organismes vivants. Parmi ces travaux expérimentaux, aucune étude ne s'est intéressée à la méthode de contamination artificielle par les HAP des sédiments destinés à l'étude de bioremédiation. Cette méthode de contamination artificielle des sédiments marins par les HAP dépend, notamment, de leurs propriétés physico-chimiques (solubilité, constante de Henry (KH), coefficient de partage octanol/eau (KOW) etc.). Ainsi, la dissolution des HAP dans un solvant organique est une étape primordiale pour contaminer les sédiments marins afin d'étudier l'impact de ces composés et leur bioremédiation sur les bactéries indigènes. En effet, les solvants organiques ont été largement utilisés pour dissoudre les HAP (Yu *et al.* 2005, Miyazaka *et al.* 2006). L'anthracène (C₁₄H₁₀) est un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) de faible poids moléculaire (178,22 g mol⁻¹) comprenant trois noyaux benzéniques fusionnés en alignement. Il figure parmi la liste de 16 composés qui sont généralement considérés pour les études environnementales. Ce sont les polluants qui ont été retenus comme prioritaires par l'agence environnementale américaine (US-EPA) dès 1976 (Wilson & Jones 1993).

L'anthracène fait alors partie des HAP fréquemment retrouvés à des concentrations relativement élevées dans l'environnement aquatique (Bonnet *et al.* 2005). La toxicité de l'anthracène et de ses métabolites a été révélée chez de nombreux organismes marins en raison de sa forte solubilité dans l'eau (El-Alawi *et al.* 2002, Flores *et al.* 2010). Il semblait, donc, primordial de tester, d'une part, l'effet de l'anthracène sur les communautés bactériennes et, d'autre part, les conditions favorables pour sa dissolution afin de contaminer les sédiments destinés aux études de bioremédiation. Cependant, les solvants utilisés pour la dissolution de ce contaminant chimique sont susceptibles d'exercer une action toxique sur les bactéries indigènes et de

produire des interactions avec le contaminant testé (Stratton & Smith 1988).

La présente étude en microcosmes vise à choisir le solvant organique le mieux approprié (acétone, éthanol et diméthylsulfoxide) pour la dissolution de l'anthracène utilisé comme composé modèle parmi les 16 HAP prioritaires afin d'évaluer son impact sur les bactéries indigènes de la lagune de Bizerte.

MATERIEL ET METHODES

Site d'échantillonnage

La lagune de Bizerte, une lagune côtière du nord de la Tunisie (latitude Nord 37°08' - 37°16' et longitude Est 9°46' - 9°56'), fortement affectée par de multiples pressions anthropiques, reçoit des quantités importantes d'eaux usées urbaines des villes et villages avoisinants. Elle est aussi caractérisée par un nombre croissant d'unités industrielles qui couvrent des activités variées (petites et moyennes industries, industrie portuaire, aciéries, cimenterie de Bizerte etc.). Cette lagune est chroniquement exposée à des xénobiotiques tels que les métaux lourds (Yoshida *et al.* 2002), les pesticides (Cheikh *et al.* 2002) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Louiz *et al.* 2008; Trabelsi & Driss 2005).

Prélèvements

Des échantillons de sédiment naturel ont été prélevés à partir de la lagune de Bizerte en mai 2009 et plus précisément au niveau de la station Echaraà (37 13' N 9 49' E) (Fig.1). D'après les études antérieures, cette station représente des concentrations faibles en HAP (Mzoughi *et al.* 2002, Trabelsi & Driss 2005). Les échantillons de sédiment ont été extraits de façon stérile (OMS/PNUE, 1995) à l'aide de carottiers en plexiglas de 10 cm² de section (Vitiello & Aïssa 1985) introduits à une profondeur de 10 cm avant de transférer leur contenu dans des tubes en plexiglas préalablement autoclavés. Les échantillons d'eau destinés à l'étude bactériologique ont été récoltés également d'une façon stérile (OMS/PNUE, 1995).

Mesure des paramètres abiotiques

Les variables physico-chimiques de l'eau (température, salinité, pH et O₂ dissous) ont été mesurés *in situ* en utilisant un multi-paramètre portatif de type WTW LF196. La matière en suspension a été déterminée par pesées successives après filtration des échantillons d'eau sur filtre millipore (0,45 mm). Après filtration, les filtres ont été rincés à l'eau douce. Le principe de la détermination de la matière en suspension consiste à peser les filtres avant et après manipulation, la différence des pesées représentant les matières en suspension dans le volume d'eau filtrée.

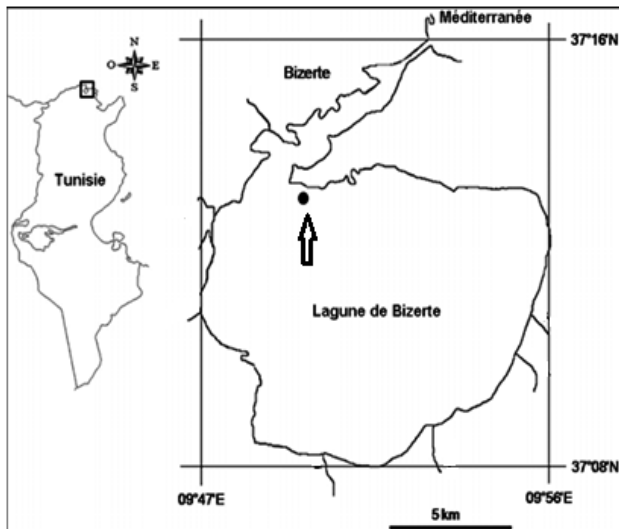


Figure 1. Localisation géographique de la station prospectée Echaraà dans la lagune de Bizerte.

Figure 1. Location of sampling stations (Echaraà) in the Bizerte lagoon.

Pour la détermination des caractéristiques granulométriques, les échantillons de sédiments prélevés ont été séchés à l'étuve à 50°C jusqu'à poids constant. Après élimination des débris végétaux, un fractionnement par voie humide a été effectué sur le tamis 63µm. La fraction grossière (> 63µm) a été analysée par voie humide sur une colonne de tamis de 2 mm à 63µm selon les normes AFNOR (*In Riviere 1977*). Les pourcentages des fractions fines et grossières ont été calculés par rapport au poids initial du sédiment. Le dosage du carbone organique total a été effectué en se basant sur la méthode Anne (1945) et l'azote total sédimentaire a été dosé selon la technique Kjeldhal.

Dès retour au laboratoire, le sédiment destiné pour la contamination a été manuellement homogénéisé avec une large spatule puis tamisé sur un tamis de 63 µm pour enlever les grosses particules.

Préparation des solvants

Trois solvants organiques [acétone, éthanol et DMSO] considérés chacun à deux volumes [acétone (V1: 200 µl; V2: 2 ml), éthanol (V1: 200 µl; V2: 2 ml) et DMSO (V1: 200 µl; V2: 2 ml)] ont été utilisés pour comparer l'effet des trois solvants après leurs évaporations sur les bactéries indigènes.

Contamination des sédiments

La contamination a été réalisée sur la fraction fine des sédiments (< 63 µm). Des solutions-mères d'anthracène dissous dans chacun des solvants utilisés pour obtenir deux concentrations finales correspondant à 1ppm et 10 ppm (Aldrich A8, 920-0; pureté, 97 %). La contamination des sédiments par les différents solvants et par l'anthracène a été réalisée dans des sédiments humides après évaporation totale des solvants (Yu *et al.* 2005, Miyazaka *et al.* 2006).

Installation des microcosmes

Les microcosmes consistent en des flacons en verre de 2 litres. La figure 2 montre le fonctionnement d'un

microcosme en indiquant les trois compartiments étudiés (microcosmes témoins et contaminés). Chacun des microcosmes fonctionnant comme un système fermé avec une aération continue assurée par une pompe d'aquarium remplie d'eau de mer stérilisée et filtrée (volume final de 1 l). Tous les microcosmes, à l'exception du témoin, ont été remplis, tout d'abord, avec 200 g de sédiment [100 g de sédiment naturel +100 g (poids sec) de sédiment contaminé]. Une agitation a été réalisée pendant 2h à température ambiante à 180 tours/mn.

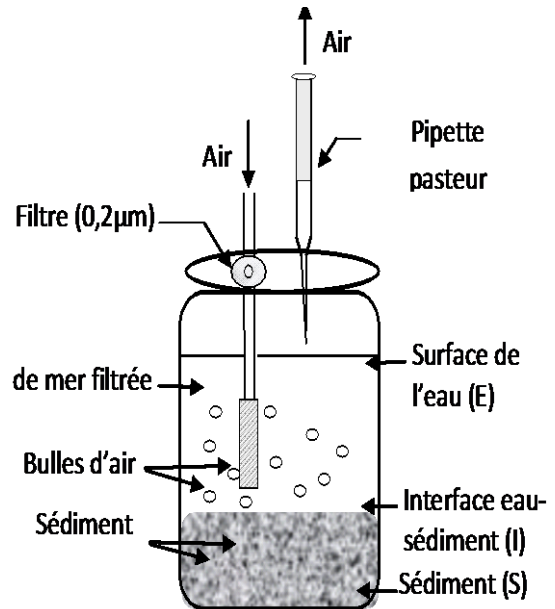


Figure 2. Microcosme

Figure 2. Microcosm.

Le sédiment a, ensuite, été recouvert d'eau de mer filtrée (0,2 µm) puis laissée reposer pour stabilisation (volume final de 1 litre). Chaque microcosme fonctionnant comme un système fermé avec une aération continue assurée par une pompe d'aquarium.

La fiabilité de ces dispositifs expérimentaux a été vérifiée par plusieurs auteurs (Austen *et al.* 1994, Mahmoudi *et al.* 2005, Miyazaka *et al.* 2006). Treize types de microcosmes ont été utilisés dont un témoin et douze contaminés. Deux concentrations d'anthracène (respectivement 1ppm et 10 ppm) ont servi pour contaminer les sédiments.

L'anthracène a été dissous dans trois types de solvants organiques (acétone, éthanol et DMSO), considérés chacun à deux volumes (200 µl et 2 ml). La contamination des microcosmes avec un volume de 200 µl de chaque type de solutions mères permet d'obtenir une concentration finale de 1ppm d'anthracène après mélange avec des quantités appropriées de sédiments.

Par contre, des volumes plus grands [2 ml pour l'anthracène dissous dans chaque solvant] ont permis d'obtenir une concentration finale de 10ppm d'anthracène. Pour chaque type de microcosme, trois répliqués ont été considérés. Toutes les expériences ont été achevées après 20 jours d'incubation des microcosmes. Les microcosmes sont identifiés dans le texte selon les codes présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Codes utilisées pour identifier les différents microcosmes.

Table 1. Codes used to designate microcosms.

Traitement	Code
Sédiment naturel témoin	T
Sédiment contaminé par l'acétone V1 (200µl)	AC (1)
Sédiment contaminé par l'acétone V2 (2ml)	AC (2)
Sédiment contaminé par 1 ppm d'anthracène dissous dans l'acétone V1	AC + C1
Sédiment contaminé par 10 ppm d'anthracène dissous dans l'acétone V2	AC + C2
Sédiment contaminé par l'éthanol V1 (200µl)	ETH (1)
Sédiment contaminé par l'éthanol V2 (1 ml)	ETH (2)
Sédiment contaminé par 1ppm d'anthracène dissous dans l'éthanol V1	ETH + C1
Sédiment contaminé par 10 ppm d'anthracène dissous dans l'éthanol V2	ETH + C2
Sédiment contaminé par le DMSO V1 (200 µl)	DMSO (1)
Sédiment contaminé par le DMSO V2 (2 ml)	DMSO (2)
Sédiment contaminé par 1 ppm d'anthracène dissous dans le DMSO V1	DMSO + C1
Sédiment contaminé par 10 ppm d'anthracène dissous dans le DMSO V2	DMSO + C2

Dénombrement des bactéries

Après 20 jours d'incubation des microcosmes, 1g de sédiment et 1 ml d'eau ont été prélevés dans chaque microcosme pour la quantification de la charge en bactéries cultivables selon la méthode du nombre le plus probable (NPP) (Yu *et al.* 2005) dans les trois compartiments de chacun des microcosmes à la surface de l'eau "E" (*bactéries/ml d'eau*), à l'interface eau-sédiment "I" (*bactéries/ml d'eau*) et au niveau du sédiment "S" (*bactérie/gramme de sédiment humide*).

Analyse statistique des données

Dans cette étude bactériologique, toutes les données obtenues ont subi une transformation du type $y = \log(x+1)$ pour homogénéiser les variances. Les analyses statistiques ont été faites selon la méthode standard d'analyse des communautés décrites par Clarke (1993) et Clarke & Warwick (2001).

Le test ANOVA à un critère de classification (ANOVA 1) ou le test de Kruskal-Wallis (en cas de non homogénéité des variances) ont été employés pour mettre en évidence une différence significative globale entre les microcosmes. Le test de différence significative de Tukey (Tukey HSD) a été utilisé pour des comparaisons multiples entre les différents microcosmes. Le seuil de signification a été fixé à 5% pour toutes les analyses statistiques considérées.

RESULTATS ET DISCUSSION

Variabiles abiotiques du site de prélèvement

Paramètres hydrologiques

Les eaux de la station d'étude prospectée se distinguent par leur salinité de $30,4 \text{ g l}^{-1}$, leur richesse en matières en suspension avec 40 mg L^{-1} , leur température de $24 \text{ }^\circ\text{C}$, leur pH de 8,28 et leur teneur moyenne en oxygène dissous avec $5,7 \text{ mg L}^{-1}$.

Paramètres sédimentologiques

Les teneurs sédimentaires en carbone organique total de la station de prélèvement sont de 0,79 %. Le pourcentage

sédimentaire en azote total est de 1,03 %. Le sédiment présente des teneurs élevés en fraction fine entre 50% et 70%.

Effets des solvants organiques sur les bactéries indigènes

Cas de l'acétone

Après 20 jours d'expérimentation et dans tous les microcosmes contaminés par les deux volumes d'acétone évaporée [AC (1) et AC (2)], les charges des bactéries indigènes par le NPP n'ont pas varié aussi bien au niveau de la colonne d'eau qu'à l'interface eau-sédiment et au niveau du sédiment.

Il a été noté dans le microcosme contaminé par AC2, au niveau de la colonne d'eau $1,77 \pm 0,15$ (bactéries/ml d'eau) dans T contre $1,77 \pm 0,11$ (bactéries/ml d'eau). A l'interface eau-sédiment nous avons enregistré $1,87 \pm 0,07$ (bactéries/ml d'eau) dans T contre $1,86 \pm 0,08$ (bactéries/ml d'eau) (Fig. 3). En effet, la charge sédimentaire en bactéries a été plus importante dans tous les compartiments sédiments de tous les microcosmes, de l'ordre de $2,24 \pm 0,11$ (bactéries/g de sédiment).

L'analyse statistique par le test ANOVA 1 indique que l'acétone évaporée n'a pas entraîné une modification significative des biomasses bactériennes par rapport à celles du témoin ($p < 0,05$).

Plusieurs travaux ont montré également que l'acétone utilisé dans des études de bio-essais n'a pas d'effet toxique sur les algues *Chlamydomonas eugametos* (Hess 1980) et l'amphipode *hyalella azteca* (Gust 2006).

Cas de l'éthanol

La quantification des charges moyennes en bactéries aérobies hétérotrophes par le NPP dans les microcosmes contaminés par l'éthanol évaporé met en évidence leur nette réduction par rapport aux témoins et cela dans la colonne d'eau $1,77 \pm 0,15$ (bactéries/ml d'eau) dans T contre $1,47 \pm 0,2$ (bactéries/ml d'eau), à l'interface eau-sédiment $1,87 \pm 0,07$ (bactéries/ml d'eau) dans T contre $1,57 \pm 0,19$ (bactéries/ml d'eau) et dans le sédiment $2,24 \pm 0,11$

(bactéries/g de sédiment) dans T contre $1,72 \pm 0,14$ (bactéries/g de sédiment) dans les microcosmes traités par l'éthanol ETH (1) (Fig. 4). En effet, l'éthanol évaporé a entraîné une baisse de la charge moyenne en bactéries viables dans tous les compartiments.

Le test Tukey HSD a montré une diminution plus importante et significative ($p < 0,05$) dans le compartiment sédimentaire où la charge moyenne en bactéries viables est passée de $2,24 \pm 0,11$ (bactéries/g de sédiment) dans les microcosmes T à $1,53 \pm 0,21$ (bactéries/g de sédiment) dans les microcosmes traités par l'éthanol ETH (2).

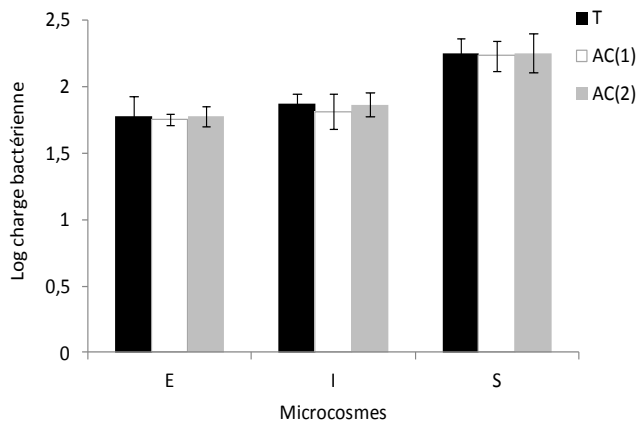


Figure 3. Dénombrement après 20 jours de la charge des bactéries indigènes totales au niveau des différents compartiments : E (colonne d'eau), I (interface eau-sédiment) et dans le sol S (sédiment) dans les microcosmes témoins (T) et de ceux contaminés par l'acétone évaporée [AC (1) ; AC (2)].

Figure 3. Total counts, after 20 days, of the indigenous bacteria in the different compartments of control microcosms (T) and those contaminated with evaporated acetone [AC (1); AC (2)].

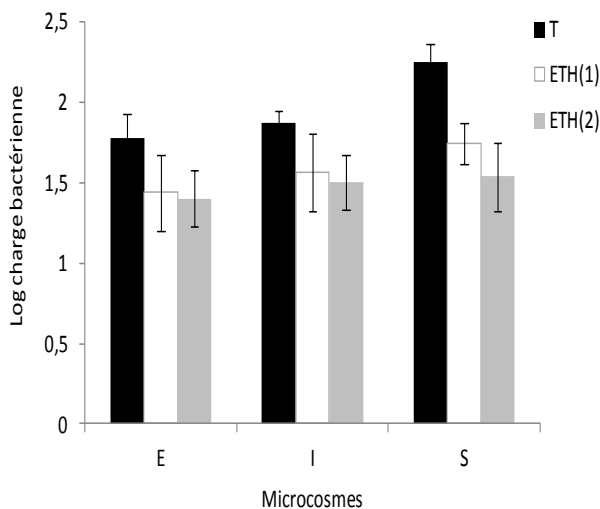


Figure 4. Dénombrement de la charge des bactéries indigènes totales au niveau des différents compartiments des microcosmes témoins (T) et de ceux contaminés par l'éthanol évaporé [ETH(1); ETH (2)].

Figure 4. Total counts of the indigenous bacteria in the different compartments of control microcosms (T) and those contaminated with evaporated ethanol [ETH (1); ETH (2)].

Cas du diméthylsulfoxyde (DMSO)

Après 20 jours d'expérimentation, la contamination du sédiment avec le DMSO après évaporation a provoqué

notablement et significativement une diminution des charges moyennes en bactéries hétérotrophes aérobies au niveau de tous les compartiments microcosmiques mais davantage au niveau des sédiments où la charge en bactéries aérobies est passée de $2,24 \pm 0,11$ bactéries/g de sédiment humide dans les microcosmes T à $1,70 \pm 0,08$ bactéries/g de sédiment humide dans ceux contaminés par la faible concentration de DMSO (DMSO (1)) et à $1,46 \pm 0,15$ bactéries/g de sédiment humide dans les microcosmes DMSO (2) (Fig.5).

Ainsi, le test Tukey HSD a montré des différences significatives des charges moyennes ($p < 0,05$) des bactéries des microcosmes DMSO (1) et DMSO (2) par rapport au témoin (T).

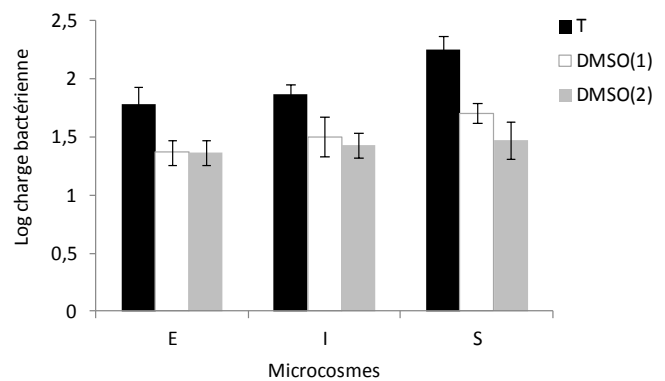


Figure 5. Dénombrement de la charge des bactéries indigènes totales au niveau des différents compartiments des microcosmes témoins (T) et de ceux contaminés par le DMSO évaporé [DMSO (1) ; DMSO (2)].

Figure 5. Total counts of the indigenous bacteria in the different compartments of control microcosms (T) and those contaminated with evaporated DMSO [DMSO (1); DMSO (2)].

Effets de l'antracène dissous dans les différents solvants sur les bactéries indigènes

Anthracène dissous dans l'acétone

Les analyses univariées ont montré des fluctuations de la charge moyenne des bactéries hétérotrophes aérobies dans tous les microcosmes contaminés par les deux concentrations d'antracène dissous dans l'acétone au niveau des trois compartiments microcosmiques (Fig. 6). On note que ces fluctuations sont plus importantes quand la concentration de l'antracène augmente (passage de la C1 à C2).

Il a été noté dans le microcosme contaminé par AC+C2, au niveau de la colonne d'eau $1,69 \pm 0,13$ (bactéries/ml d'eau) contre $1,77 \pm 0,15$ (bactéries/ml d'eau) dans T. A l'interface eau-sédiment, nous avons enregistré $1,87 \pm 0,07$ (bactéries/ml d'eau) dans T contre $1,65 \pm 0,37$ (bactéries/ml d'eau) dans AC+C2 (Fig. 3).

En effet, l'antracène dissous dans l'acétone n'a pas pu entraîner des modifications significatives des charges bactériennes dans la colonne d'eau et au niveau de l'interface eau-sédiment.

Les densités des bactéries dans le sédiment ont chuté significativement de $2,24 \pm 0,11$ bactéries/g de sédiment humide dans les microcosmes (T) à $1,43 \pm 0,09$ bactéries/g

de sédiment humide dans les microcosmes contaminés par la concentration de 10 ppm d'anthracène (AC+C2).

Anthracène dissous dans l'éthanol

La détermination des charges bactériennes dans les microcosmes contaminés par l'anthracène dissous dans l'éthanol a montré leur nette réduction que ce soit dans la colonne d'eau, à l'interface eau-sédiment ou bien au niveau du sédiment [$1,87 \pm 0,07$ (bactéries/ml d'eau) dans T contre $1,27 \pm 0,1$ (bactéries/ml d'eau) dans ETH + C2] (Fig.7).

Leur variation est apparue plus importante et très significative ($p < 0,01$) dans le sédiment [$2,24 \pm 0,11$ (bactéries/g de sédiment) dans T contre $1,24 \pm 0,15$ (bactéries/g de sédiment) dans ETH + C2] (Fig. 7).

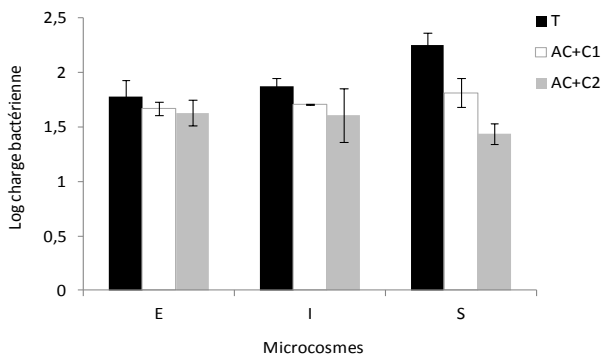


Figure 6. Dénombrement de la charge des bactéries indigènes totales au niveau des différents compartiments des microcosmes témoins (T) et de ceux contaminés par l'anthracène dissous dans l'acétone [AC+C1; AC+C2].

Figure 6. Total counts of the indigenous bacteria in the different compartments of control microcosms (T) and those contaminated with anthracene dissolved in acetone [AC (1); AC (2)].

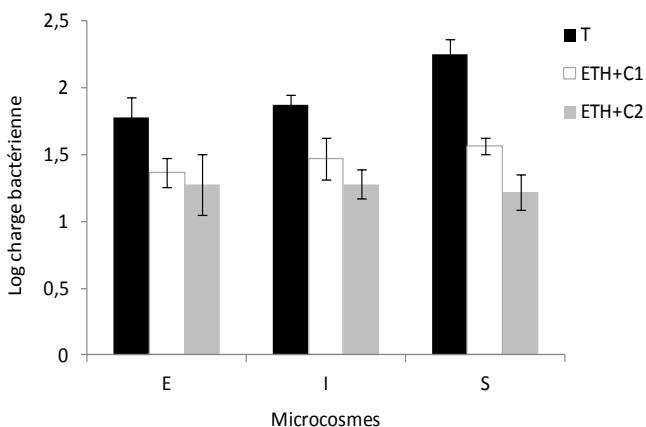


Figure 7. Dénombrement de la charge des bactéries indigènes totales au niveau des différents compartiments des microcosmes témoins (T) et de ceux contaminés par l'anthracène dissous dans l'éthanol [ETH+C1; ETH+C2].

Figure 7. Total counts of the indigenous bacteria in the different compartments of control microcosms (T) and those contaminated with anthracene dissolved in ethanol [ETH+C1; ETH+C2].

Anthracène dissous dans le DMSO

La quantification à la fin de la période d'incubation des bactéries hétérotrophes aérobies dans les microcosmes contaminés montre que l'anthracène dissous dans le DMSO

a eu un effet plus toxique par rapport à la dissolution dans l'acétone et dans l'éthanol.

D'après le test d'analyse de la variance, la contamination par l'anthracène a entraîné une chute remarquable des charges moyennes des bactéries au niveau des trois compartiments microcosmiques et particulièrement au niveau du sédiment [$2,24 \pm 0,11$ bactéries/g de sédiment dans (T) contre $1,12 \pm 0,3$ bactéries/g de sédiment dans (DMSO+C1) et $0,77 \pm 0,07$ bactéries/g de sédiment dans (DMSO+C2)] (Fig.8).

Les densités des bactéries dénombrées ont été plus élevées au niveau des microcosmes DMSO+C1 par rapport à ceux de DMSO +C2. Ainsi, la diminution des densités des bactéries a été dépendante du niveau de contamination des sédiments par l'anthracène dissous dans le DMSO.

Nous déduisons de nos résultats que les deux solvants organiques, éthanol et DMSO, et contrairement à l'acétone, ont pu provoquer une diminution significative de la biomasse en bactéries indigènes dans la colonne d'eau, à l'interface eau-sédiment et dans le sédiment. Cette réduction a été plus accentuée au niveau du compartiment sédimentaire et dans le cas du DMSO. La variation de la charge des bactéries hétérotrophes dépend largement du solvant organique utilisé.

La toxicité de l'éthanol et de DMSO a été mise en évidence chez plusieurs espèces aquatiques, telles les zooplanctons (Takahashi *et al.* 1987), la bactérie *E. Coli* (Sakharov & Volkov 1989) ou les micro-organismes *Vibrio harveyi* et *Vibrio fischeri* (Boksha 1994). Si la toxicité des solvants organiques est bien connue pour certains organismes marins (Stratton & Smith 1988), l'impact de l'éthanol et DMSO sur les microorganismes benthiques a été relativement peu étudié (Harrar 2012).

Dans leur étude, Rowe *et al.* (1982) ont constaté que le DMSO causait une toxicité plus élevée que l'éthanol pour l'algue *Chlorella pyrenoidosa*. Par ailleurs, Ziehl & Schmitt (2000) ont rapporté l'effet négatif du DMSO à la formation de certains métabolites toxiques suite à la biotransformation de ce solvant par des bactéries abritant les sédiments.

Si plusieurs travaux réalisés ont montré l'impact nocif des solvants sur les organismes vivants, relativement peu d'entre eux ont été focalisés sur le suivi de leurs interactions possibles que ce soit une synergie ou un antagonisme avec les contaminants sur les espèces testées (Stratton *et al.* 1982; Stratton & Smith 1988). Ces travaux ont montré un antagonisme des effets entre les solvants utilisés et le pesticide sur l'algue *Chlorella pyrenoidosa* (Stratton & Smith 1988).

La comparaison des résultats des analyses univariées et de celles après contamination par l'anthracène montre que les bactéries ont été significativement ($p < 0,05$) affectées par l'anthracène dissous dans les différents solvants testés. Ainsi, la biomasse bactérienne a chuté de manière significative quelque soit le volume ou le solvant utilisé au niveau des différents compartiments du microcosme (E, I et S) pour l'éthanol et le DMSO, et au niveau du sédiment seulement dans le cas de l'acétone. L'acétone, après évaporation, n'a pas entraîné une modification de la charge des bactéries hétérotrophes.

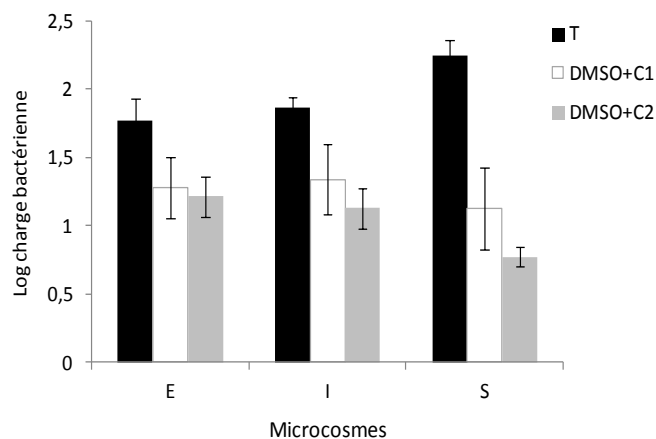


Figure 8. Dénombrement de la charge des bactéries indigènes totales au niveau des différents compartiments des microcosmes témoins (T) et de ceux contaminés par l'anthracène dissous dans le DMSO [DMSO+C1; DMSO+C2].

Figure 8. Total counts of the indigenous bacteria in the different compartments of control microcosms (T) and those contaminated with anthracene dissolved in DMSO [DMSO+C1; DMSO+C2].

De ce fait, on peut conclure que la réduction significative des densités bactériennes est due principalement à l'effet toxique de l'anthracène dissous dans l'acétone. Par contre, cette diminution a été plus importante dans les microcosmes contaminés par l'anthracène dissous dans l'éthanol et le DMSO, ceux-ci peut être expliquée par les effets cumulatifs et négatifs de l'anthracène associés à celui de ces deux solvants.

Ces résultats sont en accord avec ceux des études sur l'effet cumulatif de toxicité du chlorure de mercure avec l'éthanol et le DMSO sur la bactérie luminescente *Vibrio harveyi* (Mariscal *et al.* 2003).

D'après notre étude, la toxicité de l'anthracène vis à vis des bactéries a été dépendante du niveau de contamination des sédiments par les doses utilisés (1et 10 ppm). Par ailleurs, peu de travaux ont signalé l'effet toxique de l'anthracène sur les microorganismes (El-Alawi *et al.* 2002; Flores *et al.* 2010). Louati *et al.* (2013, 2014) ont montré que la contamination artificielle des sédiments de la lagune de Bizerte par l'anthracène a eu un impact certain sur les peuplements bactériens et nématologiques avec une réduction drastique de la densité et de la diversité nématologique. Ils ont suggéré que la toxicité de cet HAP est due principalement à sa forte accumulation et son activité mutagène.

CONCLUSION

La présente étude a pu montrer que le degré de toxicité de l'anthracène observé sur les bactéries indigènes a été dépendant de la nature du solvant organique utilisé. L'acétone serait donc le solvant le mieux adapté pour dissoudre les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans des études expérimentales. Il sera très important de développer des stratégies telles que la bioremédiation pour essayer de réhabiliter les sédiments contaminés par les HAP et de mesurer par la suite l'impact écologique sur les microorganismes benthiques.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons nos plus vifs remerciements aux PHC Utique, CMCU, CNRS et DGRT pour leurs soutiens financiers.

REFERENCES

- Anne P. 1945. Dosage rapide du carbone organique dans les sols. *Annales agronomiques*, 2, 161-172.
- Austen M.C., Mcevoy A.J. & Warwick R.M. 1994. The Specificity of Meiobenthic Community Responses to Different Pollutants: Results from Microcosm Experiments. *Marine Pollution Bulletin*, 28, 557-563.
- Boksha I.S. 1994. The alcohols and ionol action on the bacterial bioluminescence. *Biology Membrany.*, 11, 62-67.
- Bonnet J.L., Guiraud P. *et al.* 2005. Assessment of anthracene toxicity toward environmental eukaryotic microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and selected micromycetes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 1, 87-100.
- Cheikh M., Derouiche A. & Driss M.R., 2002. Détermination par (CPG-ECD) des résidus de pesticides organochlorés dans les sédiments de la lagune de Bizerte. *Institut National des Sciences et Technologie de la Mer*, 7, 160-163.
- Clarke K. R. 1993. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18, 117-143.
- Clarke K. R. & Warwick R. M. 2001. *Changes in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*. 2nd edition. Primer-e, plymouth, uk, 164 p.
- El-Alawi Y.S., Mcconkey B.J. *et al.* 2002. Measurement of short- and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51, 12-21.
- Flores G.P., Badillo C.M. *et al.* Toxic effects of linear alkylbenzene sulfonate, anthracene and their mixture on growth of a microbial consortium isolated from polluted sediment. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 26, 39-46.
- Gust K.A. 2006. Joint toxicity of cadmium and phenanthrene in the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 7-13.
- Harrar A.N. 2012. *Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Rhamnus alaternus L.* Thèse de doctorat. Université Ferhat Abbas de Sétif, Algérie, 73 p.
- Hess F.D. 1980. A chlamydomonas algal bioassay for detecting growth inhibitor herbicides. *Weed Science*, 28, 515-520.
- Ke L., Wong T.W.Y. & Tam N.F.Y. 2002. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in a mangrove swamp in hong kong following an oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 45, 339-347.
- Louati H., Ben Said O. *et al.* 2013. Microbial community responses to bioremediation treatments for the mitigation of low-dose anthracene in marine coastal sediments of Bizerte lagoon (Tunisia). *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 300-310.
- Louati H., Ben Said O. *et al.* 2014. Impact of low dose anthracene contamination on the diversity of free-living marine benthic nematodes. *Ecotoxicology*, 23, 201-212.
- Louiz I., Kinani S. *et al.* 2008. Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerte lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays: Contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Science of the Total Environment*, 402, 318-329.
- Mahmoudi E., Essid N. *et al.* 2005. Effects of hydrocarbon contamination on a free-living marine nematode community:

- results from microcosm experiments. *Marine Pollution Bulletin*, 50, 1197-1204.
- Mariscal A., peinado M. T. *et al.* 2003. Influence of organic solvents on the sensitivity of a bioluminescence toxicity test with *Vibrio harveyi*. *Chemosphere*, 50, 349-354.
- Miyasaka T., Asami H. & Watanabe K. 2006. Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene contaminated marine sediments. *Biodegradation*, 17, 227-235.
- Mrozik A., Piotrowska-Seget Z. & Labuzek S. 2003. Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12, 15-25.
- Mzoughi N., Hellal F., Dachraoui M. *et al.* 2002. Méthodologie de l'extraction des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Application à des sédiments de la lagune de Bizerte (Tunisie). *Geoscience*, 334, 893-901.
- OMS/PNUÉ 1995. *Recommandations pour la surveillance sanitaire des zones côtières à usage récréatif et des zones conchylicoles (II & III)*. Programme à long terme de surveillance continue et de recherche en matière de pollution de la mer Méditerranée (MED/POL phase II & III), Danemark, 75 p.
- Riviere A. 1977. *Méthodes granulométriques, techniques et interprétations*. Masson, Paris, Newyork, Barcelone, 170 p.
- Rowe E.L., Ziobro R.J. *et al.* 1982. The use of an alga *Chlorella pyrenoidosa* and a duckweed *Lemna perpusilla* as test organisms for toxicity bioassays of spent bleaching liquors and their components. *Environmental Pollution*, 27, 289-296.
- Sakharov B.V. & Volkov V.I. 1989. The effect of dimethylsulfoxide and thiourea on the water diffusion permeability of the *E. Coli* membrane. *Biofizika*, 34, 464-467.
- Stratton G.W., Burrell R.E. & Corke C.T. 1982. Technique for identifying and minimizing solvent-pesticide interactions in bioassays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 11, 437-445.
- Stratton G. W. & Smith T. M. 1988. Interaction of organic solvents with the green alga *Chlorella pyrenoidosa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 40, 736-742.
- Takahashi I. T., Cowgill U. M. & Murphy P. G. 1987. Comparison of ethanol toxicity to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* tested at two different temperatures: static acute toxicity test results. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 39, 229-236.
- Trabelsi S. & Driss M. R. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons in superficial coastal sediments from Bizerte Lagoon, Tunisia. *Marine Pollution Bulletin*, 50, 3, 344-348.
- Yoshida M., Hamadi K. & Ghrabi A. 2002. *Solid waste landfills and soil/sediment contamination around Bizerte lagoon: Possible pollution sources*. In: Ghrabi A. & Yoshida M. (eds) *Study on Environmental Pollution of Bizerte Lagoon*. INRST-JICA Publishers, 55 p.
- Yuan S.Y., Wei S.H. & Chang B.V. 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere*, 41, 1463-1468.
- Yu S.H., Ke L., *et al.* 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environment International*, 31, 149-154.
- Vitiello P. & Aïssa P. 1985. Structure des peuplements de nématodes en milieu lagunaire pollué. 110^{ème} Congrès National Savantes, Montpellier. *Sciences*, II, 115-126.
- Ziehl & Schmitt 2000. Sediment quality assessment of flowing waters in south-west Germany using acute and chronic bioassays. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, 3, 347-357.
- Wilson S.C. & Jones K.C. 1993. "Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Environmental Pollution*, 81, 229 – 249.

Manuscrit reçu le 21/02/2014

Version révisée acceptée le 16/11/2015

Version finale reçue le 28/12/2015

Mise en ligne le 06/01/2016