

Détermination des hydrocarbures aromatiques dans les moules de la lagune de Bizerte (Tunisie)

N. Mzoughi ^a, M. Dachraoui ^{b *}, J.-P. Villeneuve ^c, C. Cattini ^c, A. El Abed ^a, S. J. De Mora ^c

^a *Institut National des Sciences et Technologie de la Mer, Laboratoire du Milieu Marin, Salammbô, Tunisie*

^b *Laboratoire de Chimie Analytique et Electrochimie, Faculté des Sciences de Tunis, Campus Universitaire, 1060 Tunis, Tunisie*

^c *Agence Internationale de l'Énergie Atomique, Laboratoire d'Environnement Marin, 4, quai Antoine 1^{er}, BP 800, 98012 Monaco, France*

(Reçu le 21 Février 2001, accepté le 28 Janvier 2003)

RÉSUMÉ : Des échantillons de moules, considérés comme organismes bioindicateurs de pollution sont prélevés des trois stations de mytilicultures de la lagune de Bizerte, située à l'extrême Nord de la Tunisie. Ces prélèvements sont réalisés en deux saisons. Ce travail est entrepris dans le but d'évaluer l'état de la pollution de la lagune de Bizerte par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les hydrocarbures aromatiques totaux. Parmi les 21 HAP analysés, 16 font partie de la liste de l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (EPA) et jugés comme polluants prioritaires. Les hydrocarbures totaux et les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont déterminés respectivement par UV-Fluorescence et par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). L'analyse de la totalité de la chair des moules dans les trois stations d'élevage de la lagune de Bizerte montre la présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques à des teneurs inférieures à 100 µg/g, déterminées par rapport au poids sec de l'échantillon.

Mots clés : HAP, hydrocarbures aromatiques, moules, lagune de Bizerte, GC-MS, UV-F.

ABSTRACT : Mussels samples, which are considered bioindicators of pollution, were collected from three mytiliculture stations in Bizerte lagoon, situated in the extreme north of Tunisia during two seasons (summer and winter). The aim of this study is to determine total aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in mussels samples to evaluate the state of pollution in Bizerte lagoon. Among 21 PAHs analysed 16 are included in the priority pollutants list of the US Environmental protection Agency (EPA). PAHs and total hydrocarbons was carried out respectively by GC-MS and Fluorescence-UV. Analysis of total mussel flesh in samples collected from Bizerte lagoon show that PAHs are low and variable and concentrations of total aromatic hydrocarbons are less than 100 µg/g (dry weight).

Key words: PAH, aromatic hydrocarbons, mussels, Bizerte lagoon, GC-MS, UV-F.

INTRODUCTION

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) forment un important groupe de micropolluants organiques vu leur distribution dans l'environnement (atmosphère, eau et sédiments marins) [1-4]. Ils sont connus pour leurs caractères cancérogènes et/ou mutagènes [5, 6]. Parmi la liste des 21 HAP analysés, 16 sont jugés par l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (EPA) comme polluants prioritaires [7,8]. Ils sont difficilement dégradables et peuvent s'accumuler dans les différents compartiments d'un écosystème, cela est dû à leurs propriétés physico-chimiques et spécialement à leurs hauts poids moléculaires. Les origines de ces HAP sont nombreuses (anthropogénique, pyrolytique, diagénétique...) et sont rappelées par Mille et al [9]. Les HAP analysés sont les suivants: Naphthalène (Naph), 2-methylnaphthalène (2-menaph), 1-methylnaphthalène (1-menaph), Acénaphthylène (Ac), Acénaphthène (Ace), Fluorène (Flu), Phénanthrène (Phe), Anthracène (Anth), 1-methylphenanthrène (1-mephe), Fluoranthène (Fluo),

* correspondant



Pyrène (Pyr), Benz(a)anthracène (BaAn), chrysène (Chr), Benzo(b)fluoranthène (BbFl), Benzo(k)fluoranthène (BkFl), Benzo(e)pyrène (BePy), Benzo(a)pyrène (BaPy), Perylène (Pe), Indeno(1,2,3-cd)pyrène (InPy), Dibenz(a,h)anthracène (DiAn), Benzo(g,h,i)perylène (BePe).

Le milieu marin est très complexe, la matrice de moules constitue comme celle des sédiments, un réservoir d'évacuation pour certains polluants et notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques. L'analyse de ces derniers nécessite au préalable une extraction, une étape de purification et finalement leur quantification par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) et les hydrocarbures aromatiques totaux par spectroscopie de fluorescence-UV. Dans ce travail, nous avons appliqué une méthode de référence de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique [10] pour déterminer les concentrations en hydrocarbures aromatiques totaux et HAP dans trois échantillons de moules prélevés en deux lots (saison estivale et saison hivernale) situés dans la lagune de Bizerte. Cette dernière a fait l'objet de plusieurs travaux pour évaluer son état de pollution [11]. Pour contrôler nos méthodes nous avons utilisé un échantillon de référence de moule (IAEA-142).

PARTIE EXPERIMENTALE

1/ Echantillonnage : site et prétraitement

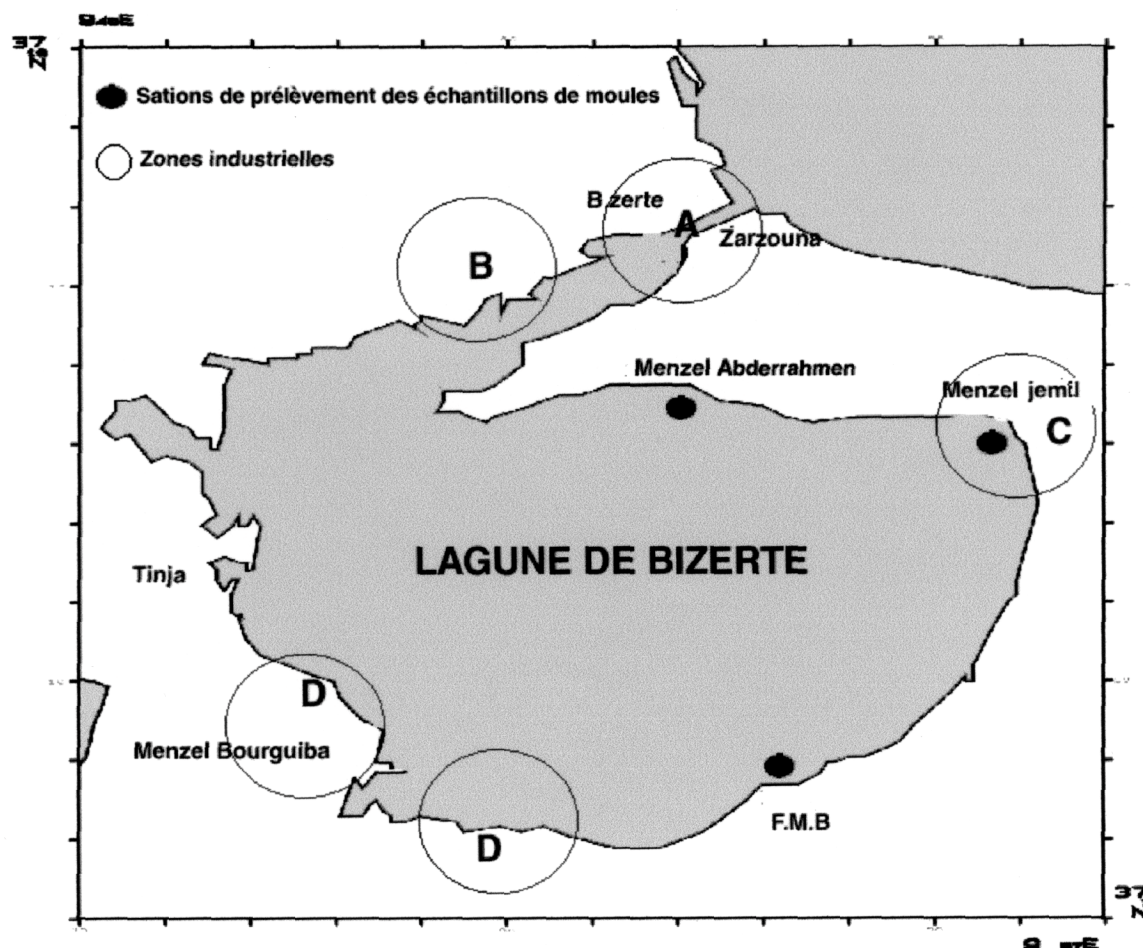


Figure 1. Présentation schématique des stations de prélèvement des échantillons de moules et des importants sources des rejets industrielles.

La lagune de Bizerte est considérée comme étant la deuxième lagune en Tunisie [12]. Elle est située au sud ouest de la ville de Bizerte et à l'extrême Nord de la Tunisie. Cette lagune est utilisée pour un élevage expérimental de moules et d'autres coquillages, elle représente aussi une zone importante de pêche. Comme sources de pollution au voisinage de la lagune (figure 1), on rencontre

des ports (zones A et D) une raffinerie de pétrole au niveau de la sortie du canal vers la mer Méditerranée (zone A), une cimenterie à la limite de la ville de Bizerte (zones B et C) et une aciérie à Menzel Bourguiba (zone D). Deux campagnes d'échantillonnage de moules ont été effectuées respectivement en Août 1999 et en Janvier 2000 aux trois stations de mytilicultures de Menzel Jemil (MJ), Menzel Abderrahmen (MA), Menzel Bourguiba (station FMB) (figure 1). Les échantillons de moules collectés ont été décortiqués et conservés à une température de 4°C dans des récipients propres portant toutes les indications nécessaires (date de prélèvement, station de prélèvement...) ensuite lyophilisés, broyés puis tamisés pour enlever les filaments de tissu formés par le broyage et conservés jusqu'à l'analyse.

2/ Solvants et réactifs utilisés

Les solvants utilisés sont : l'hexane, le dichlorométhane (DCM), le méthanol (MeOH), l'acétonitrile (ACN). Ils sont de marque Burdick and Jackson (bidistillés sur verre) de haute pureté (99%). Le sulfate de sodium Na_2SO_4 anhydre, l'oxyde d'aluminium 90 activé neutre utilisé pour chromatographie sur colonne (70-230 mesh), le gel de silice 60 utilisé pour chromatographie sur colonne (230-400 mesh), le H_2SO_4 p.a, l'hydroxyde de potassium sont tous de marque Merck. Le gel de silice et l'oxyde d'aluminium sont nettoyés à l'aide de l'extracteur de Soxhlet pendant 16 heures avec le mélange de solvants d'extraction puis activés pendant 4h à 200 °C et finalement désactivés avec 5 % d'eau distillée préalablement extraite avec de l'hexane. Les étalons provenant du National Institut of Science and Technologie (NIST) sont utilisés pour la GC-MS, ils contiennent les 21 HAP dont la concentration est 1ng/ μl . Les standards deutérés anthracène d_{10} , chrysène d_{12} , pyrène d_{10} , perylène d_{10} sont achetés chez Cambridge Isotopes. Le 9,10 dihydroanthracène est utilisé comme étalon interne [13]. Les deux standards de chrysène et le brut de ROPME (brut du Koweït) sont utilisés pour la quantification des hydrocarbures aromatiques totaux. L'échantillon de référence de sédiment IAEA-142, le 9,10 dihydroanthracène et les deux standards de chrysène et le brut de ROPME proviennent de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique.

3/ Procédure d'extraction [10]

On réalise l'extraction de 5 g environ de chair de moules lyophilisées au Soxhlet pendant 8h avec 200 ml de méthanol. Lorsque l'extraction est terminée, on rajoute 20 ml d'hydroxyde de potassium 0,7 M et 30 ml d'eau et on continue l'extraction au Soxhlet pendant encore 2 heures, cela saponifiera une partie des lipides qui peuvent donner des pics interfèrent avec les composés à analyser. On transfère le contenu du ballon dans une ampoule à décanter et on extrait trois fois avec 80 ml d'hexane. La phase organique contient les hydrocarbures à analyser et les lipides non saponifiés. La phase aqueuse est acidifiée avec H_2SO_4 0,5 M, ensuite extraite trois fois avec 30 ml d'hexane, cette phase contient les lipides saponifiés (après détermination de la quantité des lipides, cette fraction peut être jetée). La détermination des lipides est réalisée à l'aide d'une électrobalance. Le calcul de la somme des lipides saponifiés et non saponifiés de nos échantillons de moules et de l'échantillon de référence utilisé sont inférieures à 100 mg.

4/ Séparation par chromatographie d'adsorption

La pré-séparation des hydrocarbures aliphatiques et des hydrocarbures aromatiques est effectuée par chromatographie d'adsorption. Elle est réalisée sur une colonne en verre (1cm de diamètre interne) équipée de robinet en Téflon. Chaque colonne est remplie de 5 g de silice, 10 g d'alumine et 1 g de Na_2SO_4 . L'extrait de la phase organique est concentré à un volume d'environ 15 ml à l'aide d'un évaporateur rotatif ensuite à 1 ml sous courant d'azote celui-ci est appliqué au sommet de la colonne. Une première élution est réalisée avec 20 ml d'hexane (F1) et renferme les hydrocarbures aliphatiques saturés. La seconde fraction (F2) est obtenue par élution avec 30 ml d'un mélange



contenant 90 % d'hexane et 10 % de dichlorométhane, suivi de 10 ml du mélange hexane/DCM (50/50). Cette fraction contient les hydrocarbures insaturés ainsi que les aromatiques.

5/ Analyse

L'analyse concerne la fraction F2, en effet cette fraction regroupe les principales familles des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Les HAP sont analysés par GC-MS et les hydrocarbures aromatiques totaux par spectroscopie de fluorescence-UV [14, 15].

a/ GC-MS

Le chromatographe en phase gazeuse (GC) utilisé est de type HP 5890 series II. Il est équipé d'une colonne HP-5 (SE-52) (30 m de long, 0,25 mm de diamètre interne, et 0,25 μ m d'épaisseur de film). La température initiale est de 60 °C, maintenue pendant 1 min. puis programmée à 10 °C/min. jusqu'à 100 °C ensuite à 4 °C/min. jusqu'à 285 °C puis maintenue à cette température durant 10 min. L'analyse des HAP par GC-MS a été réalisée en utilisant la méthode de structuration d'ions spécifiques "Selected Ion Monitoring" (SIM) en partant du fait que les structures chimiques des composés recherchés sont connues. Le spectromètre de masse opère en mode d'impact électronique avec une énergie de bombardement ionique de 70 eV. La quantification des 21 HAP par GC-MS-SIM et avec une colonne de SE52 se fait en utilisant les standards deutérés comme suit: anthracène-d10, m/z :188, chrysène-d12, m/z :240, pyrène-d10, m/z :212 et pérylène-d10, m/z :264. Notons que les facteurs de réponse relatifs des HAP élués avant le fluoranthène sont déterminés par rapport à l'anthracène deutéré. Le fluoranthène et le pyrène sont déterminés par rapport au pyrène deutéré. Le pérylène et le benzo(ghi)peryène sont déterminés par rapport au peryène deutéré. Les composés restants de la liste des 21 HAP analysés sont déterminés par rapport au chrysène deutéré.

b/ Spectroscopie de fluorescence-UV

L'intensité de fluorescence de l'échantillon à analyser est déterminée par rapport à une courbe de calibration réalisée avec une série de concentrations de la solution de référence dans la gamme de linéarité. L'analyse des hydrocarbures aromatiques totaux par spectroscopie de fluorescence-UV est réalisée à l'aide d'un appareil PERKIN-ELMER modèle LS50B permettant l'utilisation de la technique d'excitation-émission synchrones ($\Delta\lambda = 23$ nm). Cette méthode permet d'avoir une idée globale sur les hydrocarbures aromatiques totaux dans un échantillon donné et aussi de différencier très rapidement les hydrocarbures aromatiques polycycliques en fonction du nombre de noyaux condensés. Les échantillons dissous dans l'hexane ont été analysés entre 230 nm et 500 nm et les calculs de concentrations effectués par rapport aux deux standards : chrysène et brut du ROPME.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Sur le tableau I sont rassemblés les résultats des concentrations (μ g/g en poids sec) des hydrocarbures aromatiques totaux trouvés.

Tableau I. Concentration exprimée en μ g/g en poids sec des hydrocarbures aromatiques totaux (valeurs moyenne $\pm$ déviation standard) dans les différentes stations (Menzel Abderrahmen, Menzel Bourguiba (FMB) et Menzel Jemil) pendant les deux saisons estivale et hivernale.

Stations	μ g/g eq chrysène	μ g/g eq brut de ROPME
MA (S.S)	5.3 $\pm$ 0.9	48.7 $\pm$ 1.7
MA (S.H)	7.4 $\pm$ 1.2	66.1 $\pm$ 1.8
FMB (S.S)	2.5 $\pm$ 0.5	21.3 $\pm$ 1.7
FMB (S.H)	7.5 $\pm$ 0.9	52.5 $\pm$ 1.9
MJ (S.S)	2.5 $\pm$ 0.5	21 $\pm$ 1.1
MJ (S.H)	11.2 $\pm$ 0.6	93.4 $\pm$ 1.2

Ces concentrations sont comprises entre 2,5 et 11 $\mu\text{g/g}$ en équivalent chrysène et entre 21 et 94 $\mu\text{g/g}$ en équivalent brut du ROPME. Le tableau I présente les moyennes des résultats de 3 lectures pour chaque expérience.

On aurait pu penser trouver au niveau de la station de Menzel Bourguiba (FMB) des taux d'hydrocarbures aromatiques assez élevés en raison de l'intense activité industrielle et portuaire de cette zone. En réalité, des taux d'hydrocarbures aromatiques assez faibles ont été décelés au niveau des moules de cette station (figure 2).

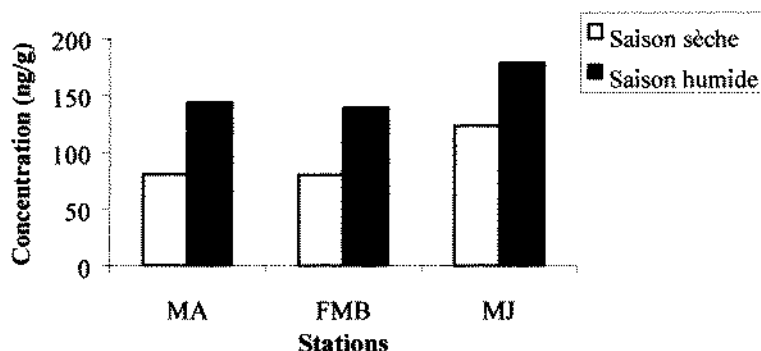


Figure 2. Somme des 21 HAP analysés dans les différentes stations (Menzel Abderrahmen, Menzel Bourguiba (FMB) et Menzel Jemil) pendant les deux saisons sèche et humide (ng/g poids sec de l'échantillon)

On constate pour chacune des stations, et en saison hivernale, que la présence des hydrocarbures aromatiques polycycliques à 4 et à 5 noyaux aromatiques (phénanthrène, fluoranthène, pyrène et chrysène) est plus importante et que les concentrations sont faibles pour les dérivés aromatiques à 2 noyaux (naphthalène, acénaphthylène, acénaphthène et fluorène) (figures 3, 4 et 5). Ceci indique des origines principalement pyrolytiques et pétrolières.

On constate d'après le tableau I que les concentrations trouvées pour toutes les stations en saison estivale sont relativement faibles par rapport à la saison hivernale.

Les taux des hydrocarbures aromatiques totaux trouvés dans les moules qui sont considérés comme organismes bioindicateurs de pollution sont inférieurs à 100 $\mu\text{g/g}$ en poids sec. les concentrations trouvées sont faibles et proches de celles obtenues dans la littérature relatives à des régions non polluées [16].

Les concentrations trouvées après extraction de la totalité des chairs des moules prélevées dans les trois stations d'élevage ne montrent pas une pollution significative.

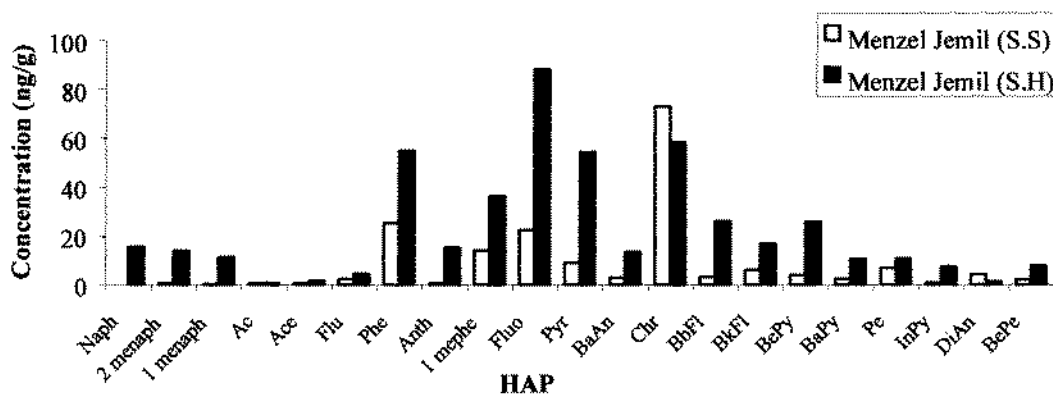


Figure 3. Concentration des HAP exprimée en ng/g poids sec de l'échantillon dans les moules de la station de Menzel Jemil pour les deux saisons (sèche et humide).

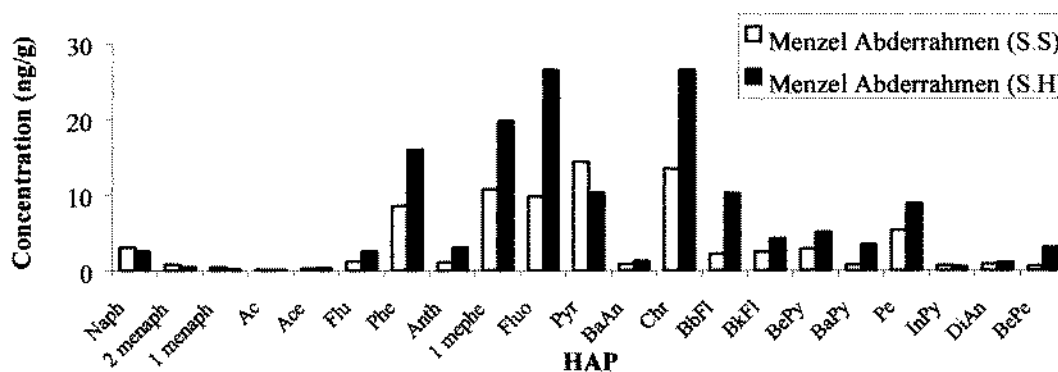


Figure 4. Concentration des HAP exprimée en ng/g poids sec de l'échantillon dans les moules de la station de Menzel Abderrahmen pour les deux saisons (sèche et humide).

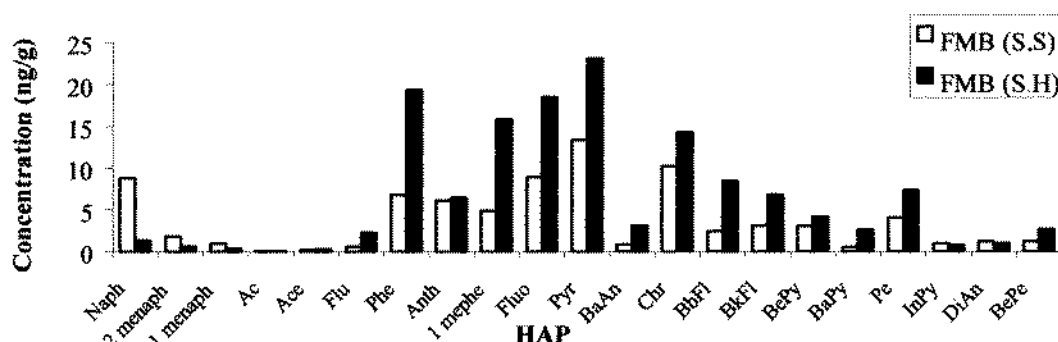


Figure 5. Concentration des HAP exprimée en poids sec de l'échantillon dans les moules de la station de Menzel Bourguiba (FMB) pour les deux saisons (sèche et humide).

Pour résumer les résultats obtenus, deux origines principales peuvent être proposées pour ces hydrocarbures aromatiques polycycliques : une origine pétrolière caractérisée par une grande variété de composés aromatiques alkylés ou non, et une origine pyrolytiques que ce soit par combustion naturelle (feux de forêt) ou combustion anthropogénique (combustion de produits fossiles).

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons effectué une analyse qualitative et quantitative des hydrocarbures contenus dans les échantillons de moules considérés comme organismes bioindicateurs de pollution prélevés de trois stations de mytilicultures de la lagune de Bizerte. Les hydrocarbures mis en évidence ont des origines diverses, si une origine pétrolière est souvent évidente, il existe pour certains hydrocarbures d'autres origines : terrigènes, marine (n-alcane), biogénique (oléfinés) ou pyrolytique (hydrocarbures aromatiques polycycliques).

D'après les résultats obtenus dans cette étude, on peut conclure que les concentrations trouvées sont faibles et proches de celles obtenues dans la littérature relatives à des régions non polluées. Les résultats montrent que les concentrations sont plus élevées dans toutes les stations en saison hivernale par rapport à la saison sèche. Les stations les moins touchées sont la station FMB et la station Menzel Jemil en saison estivale comparée à l'autre station dans les deux saisons et aux mêmes stations en saison hivernale. D'une façon générale, on peut dire qu'il n'y a pas une grande fluctuation saisonnière dans les trois stations étudiées.

Remerciements

Les auteurs remercient le Département de la Coopération Technique de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (IAEA) pour le support financier du présent travail.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] F.O. Onuska, in: B.K. Afghan, A.S. Chau (Eds.), CRC Press, Boca Raton, **1989**.
- [2] M. Neiderer, Maschka-selig, Chr. Hohl, *Sci. Pollut. Res.* **1995**, 2, 83.
- [3] J.D. Berset, R. Holzer, *Int. J. Environ. Chem.* **1995**, 59, 145.
- [4] J.D. Berset, R. Holzer, *Landw. Fo. Schweiz*, **1993**, 32, 169.
- [5] J. Jacob, W. Karcher, J.J. Belliardo, R. Dumler, A. Boenke, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1991**, 340, 755.
- [6] G. Grimmer, H. Brune, G. Dettbarn, J. Jacob, J. Misfeld, U. Mohr, W.K. Naujack, J. Timm, *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1991**, 339, 792.
- [7] D. Mazzera, T. Hayes, D. Lowenthal, B. Zielinska, *Sci. Total Environ.* 229, **1999**, 65-71.
- [8] T. F. Guerin, *J. Environ. Monit.* **1999**, 1, 63-67.
- [9] G. Mille, Y. Y. Chen, H. Dou, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1982**, 11, 295-304.
- [10] J.P. Villeneuve, **1996**. IAEA-MEL/MESL. Détermination des composés organochlorés et des hydrocarbures pétroliers dans l'environnement.
- [11] N. Suissi, thèse de spécialité, université Paul Sabatier de Toulouse **1981**.
- [12] J. Kamens, O. Pilkey, P. Whreling. *Notes de services Géologique*, **1984**, N° 49.
- [13] M. P. Fricocourt, F. Berthon, Y. Dreano, M. Marchand, *Analisis.* **1981**, 9:10, 468-476.
- [14] J.S. Miller, *Analytica. Chemica Acta* **1999**, 388, 27-34.
- [15] S. Dridi, S. Sabbah, M.S. Medimagh. *J. Soc. Chim. Tunisie.* **2000**, 4(7) 650.
- [16] G. Mille, Y. Y. Chen, H. Dou. *Vies journées d'études sur les pollutions marines en Méditerranée.* **1982**. CIESM, Monaco.