

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل  
École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme  
D'Ingénieur et MASTER en Sciences de la Mer  
Option : Biotechnologie marine**

**Thème :**

**Caractérisation des bactéries marines dégradant les différentes  
fractions du pétrole**

Présenté par :

**Batouche Adem**

**Boucedra Nadjat**

Soutenu le 26/10/2021 devant le jury composé de :

Mme Mokrane Zakia	Maitre de conférences A	ENSSMAL	Présidente
M Kada Mohamed	Maitre-assistant A	ENSSMAL	Examinateur
Mme Lounas Ryhan	Docteur	ENSSMAL	Examinatrice
Mme Djahnit Nora	Maitre de conférences B	ENSSMAL	Promotrice

Année universitaire : 2020- 2021

## Résumé

Le but de ce travail était d'étudier les critères qui permettent à une bactérie marine de dégrader les hydrocarbures. 13 souches ont été sélectionnées dans cette étude, parmi une collection de 119 souches isolées et identifiées dans un travail précédent (DJAHNIT et al., 2019).

La caractérisation biochimique des souches a montré que 73% des bactéries utilisées sont à gram- et seulement 27% d'entre eux sont des bactéries à gram+, toutes les souches testées sont à catalase positif et oxydase positif à l'exception des souches *Halomonas venusta* et *Gordonia hongkongensis* qui sont des bactéries à oxydase négatif.

La majorité des isolats ont manifesté une production significative de biosurfactants avec d'importantes activités d'émulsification utiles en biodégradation et un pouvoir de formation des biofilms. L'activité d'émulsification la plus élevée a été détectée chez *Brevibacterium celere* qui appartient au phylum Actinobactérie avec 35% d'émulsification, elle dépasse celle des bactéries appartenant au phylum Protéobactérie, *Pseudomonas Taiwanensis* et *Alcanivorax borkumensis* qui présentent 27% d'activité.

La croissance bactérienne est faible dans les milieux supplémentés de 10 g/L de NaCl à travers toutes les bactéries, et à fur et à mesure que la concentration de NaCl augmente dans les milieux, la croissance bactérienne augmente jusqu'à ce que la bactérie atteigne son seuil de tolérance (20 à 30g/ NaCl) à l'exception de *Gordonia hongkongensis* qui peut croître à 40 g/L de NaCl. De plus, les souches utilisées montrent une croissance spécifique vis-à-vis le type d'hydrocarbure utilisé. À titre d'exemple, *Erythrobacter citreus* et *Alcanivorax dieselolei* montrent une croissance accrue en présence de l'hexadécane. *Alcanivorax borkumensis*, *Alcanivorax xenomutans*, montrent une meilleure croissance en présence de l'octadécane. Par contre *Brevibacterium celere* et *Gordonia hongkongensis* ont montrées une croissance accrue dans les milieux contenant du toluène. En ce qui concerne la biodégradation, 73% des bactéries ont montrés des difficultés à dégrader les hydrocarbures aromatiques par rapport aux aliphatique avec *Brevibacterium celere* montrant le taux le plus faible avec seulement 13% de dégradation aromatique par rapport à 45% de dégradation aliphatique. Le genre *Alcanivorax* est le plus performant en termes de dégradation des HAPs avec des taux allant de 33% jusqu'à 67% à l'exception d'une des souches *Alcanivorax borkumensis* qui a montré un résultat de 19% de dégradation.

**Mots clés :** Pétrole brut – Bactéries marines – Hydrocarbonoclaste – Biosurfactants – Biofilms – Bioremédiation – *Alcanivorax*

## Abstract

The aim of this work was to investigate the criteria that allow a marine bacterium to degrade hydrocarbons. 13 strains were selected in this study from a collection of 119 strains isolated and identified in a previous work (DJAHNIT et al., 2019).

The biochemical characterization of the strains showed that 73% of the bacteria used are gram- and only 27% of them are gram+ bacteria, all the strains tested are catalase positive and oxidase positive with the exception of *Halomonas venusta* and *Gordonia hongkongensis* strains which are oxidase negative bacteria.

The majority of the isolates showed significant biosurfactant production with important emulsification activities useful in biodegradation and biofilm formation. The highest emulsification activity was detected in *Brevibacterium celere* which belongs to the phylum Actinobacteria with 35% emulsification, it exceeds that of bacteria belonging to the phylum Proteobacteria, *Pseudomonas Taiwanensis* and *Alcanivorax borkumensis* which present 27% activity.

Bacterial growth is low in media supplemented with 10 g/L NaCl across all bacteria, and as the concentration of NaCl increases in the media, bacterial growth increases until the bacteria reach their tolerance threshold (20 to 30g/ NaCl) with the exception of *Gordonia hongkongensis* which can grow at 40 g/L NaCl. Moreover, the strains used show a specific growth towards the type of hydrocarbon used. For example, *Erythrobacter citreus* and *Alcanivorax dieselolei* show increased growth in the presence of hexadecane. *Alcanivorax borkumensis*, *Alcanivorax xenomutans*, show better growth in the presence of octadecane. On the other hand, *Brevibacterium celere* and *Gordonia hongkongensis* showed an increased growth in media containing toluene. Regarding biodegradation, 73% of the bacteria showed difficulty in degrading aromatic hydrocarbons compared to aliphatic ones with *Brevibacterium celere* showing the lowest rate with only 13% aromatic degradation compared to 45% aliphatic degradation. The genus *Alcanivorax* performed best in terms of PAH degradation with rates ranging from 33% up to 67% with the exception of one of the strains *Alcanivorax borkumensis* which showed a 19% degradation result.

**Keywords:** Crude oil - Marine bacteria - Hydrocarbonoclast - Biosurfactants - Biofilms - Bioremediation – *Alcanivorax*

## ملخص

الهدف من هذا العمل هو التحقيق في المعايير التي تسمح للبكتيريا البحرية بتحلل الهيدروكربونات. تم اختيار 13 سلالة في هذه الدراسة من مجموع 19 سلالات معزولة ومحددة في عمل سابق.

أظهر التوصيف البيوكيميائي للسلالات أن 73 % من البكتيريا المستخدمة هي غرام - و 27 % فقط منها بكتيريا غرام +، وجميع السلالات التي تم اختبارها هي كاتالاز إيجابية وأوكسيداز إيجابية باستثناء هالوموناس فينوستا و جوردونيا هونغونجينييس.

أظهرت غالبية العزلات إنتاجا حيويا كبيرا مع أنشطة استحلاب مهمة مفيدة في التحلل البيولوجي وتكوين الأغشية الحيوية. تم الكشف عن أعلى نشاط الاستحلاب في بريفيباكتريوم سيليري الذي ينتمي إلى الشعبة أكتينوباكتيريا مع 35 % استحلاب، فإنه يتجاوز ذلك البكتيريا التي تنتمي إلى الشعبة بروتيوباكتيريا، بسيدوموناس تاوانينييس وألكانيفوراكس بوركومنييس التي تقدم 27 % النشاط.

نمو البكتيريا منخفض في الوسائط المكملة بـ 10 جم/لتر كلوريد الصوديوم عبر جميع البكتيريا، ومع زيادة تركيز كلوريد الصوديوم في الوسائط، يزداد نمو البكتيريا حتى تصل البكتيريا إلى عتبة تحملها (20 إلى 30 جم/كلوريد الصوديوم) باستثناء جوردونيا هونغ كونغ التي يمكن أن تنمو عند 40 جم/لتر من كلوريد الصوديوم. علاوة على ذلك، تظهر السلالات المستخدمة نموا محددًا تجاه نوع الهيدروكربون المستخدم. على سبيل المثال، إريثروباكتريوس وألكانيفوراكس ديسيلولي تظهر زيادة النمو في وجود هيكساديكان. الكانيفوراكس بوركومنييس، الكانيفوراكس زينوموتان، تظهر نموا أفضل في وجود أوكتاديكان. من ناحية أخرى، أظهر بريفيباكتريوم سيليري وغوردونيا هونغونجينييس نموا متزايدا في الوسائط التي تحتوي على التولوين. فيما يتعلق بالتحلل البيولوجي، أظهرت 73 % من البكتيريا صعوبة في تحلل الهيدروكربونات العطرية مقارنة بالهيدروكربونات الأليفاتية مع سيليرات البريفيباكتريوم التي تظهر أدنى معدل مع تحلل عطري بنسبة 13 % فقط مقارنة بـ 45 % تحلل أليفاتي. قدم جنس ألكانيفوراكس أداء أفضل من حيث تحليل الهيدروكربونات مع معدلات تتراوح بين 33 % تصل إلى 67 % باستثناء واحدة من سلالات ألكانيفوراكس بوركومنييس التي أظهرت نتيجة تدهور 19 %.

**الكلمات المفتاحية:** النفط الخام-البكتيريا البحرية-الهيدروكربونية-المواد السطحية الحيوية - الأغشية الحيوية- المعالجة الحيوية-الكانيفوراكس

# Dédicaces

## À mes très chers parents

J'ai toujours attendu avec une grande impatience ce jour où de manière solennelle et devant l'ensemble de mes enseignants, camarades et amis, je vous témoignerai toute la gratitude d'un fils qui s'est toujours vanté de vous avoir comme père et mère.

Aucune dédicace n'est susceptible de vous exprimer la profondeur de mon amour, de mon estime et l'infinie reconnaissance pour tous les sacrifices et le dévouement pour mon éducation et mes longues années d'études.

Vos prières et votre soutien m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études et arriver là où je me tiens devant vous aujourd'hui.

Ce travail, et ce que je suis aujourd'hui sont le fruit de toutes les peines et tous les sacrifices que vous n'avez cessé de déployer.

Que Dieu le tout puissant, vous comble de santé, de prospérité et vous accorde une longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour.

## À mon cher et unique frère Abdelghani

Aucun mot ne saurait exprimer mes sentiments les plus profonds envers toi. Tes sacrifices, ton soutien moral et matériel, ta gentillesse sans égale, ton profond attachement m'ont permis de réussir mes études.

Je ne saurais jamais oublier tes réveils à 4h du matin pour me conduire à l'arrêt de bus pour que je puisse assister à mes cours.

Que ce travail soit témoignage de ma reconnaissance.

## **À toute ma famille**

A ma chère tante Rabia, je vous remercie du fond du cœur pour toutes vos prières et vos bénédictions qui m'ont accompagnées à travers toutes ces années d'étude, je vous ai toujours trouvé dans mes moments les plus difficiles, aucun mot ne saurait exprimer ma gratitude envers vous.

Que ce travail soit témoignage de l'aide que vous m'avez apporté.

Mes sincères remerciements à mon oncle Mohammed et mon grand-père Mohammed pour tous leurs discours de soutien et d'encouragement, à mon oncle Houssein et mon cousin Sofiane et sa femme Fatma, ainsi que tous les membres de la famille que je n'ai pu mentionner dans cet humble document, merci de votre soutien inconditionnel.

## **À tous mes amis**

Karim, Samy, Bilel, Idir, Walid, Islem, Bounab, Mazouz, Abderrahman, Abdelghani

Chers frères, je remercie Allah de nous avoir unies dans une si belle amitié. C'était difficile de citer des noms par crainte d'oublier quelqu'un, alors que vous êtes tous très chères pour moi et vous dégagez tellement de qualités qui suscitent mon profond et éternel respect.

Qu'Allah, le Très-Haut, fasse que le meilleur reste à venir.

Et je remercie mon binôme avec laquelle j'ai pris beaucoup de plaisir à travailler. Nous avons formé une belle équipe, je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté au cours de cette expérience formidable.

**BATOUCHE ADEM**

### **À mes très chers parents**

Qui par leur bonne volonté, leur patience, leurs conseils pertinents, leur assistance, m'ont aidé et m'ont soutenue tant sur le plan moral que financier pour voir se réaliser un de leurs vœux les plus chers. Sans leur soutien permanent cette thèse n'aurait pas pu voir le jour. J'aimerais vous remercier pour votre confiance en moi, votre encouragement, pour tous les efforts et les sacrifices que vous avez faits pour m'élever dignement et assurer mon éducation dans les meilleures conditions. Puisse Dieu vous préserver en bonne santé et vous accorder bonheur et longue vie.

### **À mon frère unique Housseem**

Tu es mon unique frère, tu le sais ! Peut importe ce que la vie nous a imposé. Je suis et je serais toujours là pour toi, je t'aime et te protège. Tu fais partie de moi tu es mon second moi et dans mon cœur mon petit frère. Je t'aime au delà des liens du sang et à jamais. Rien ne peut nous séparer pas même les frontières du temps. Que Dieu nous garde toujours unis.

**À ma chère grand-mère, l'exemple de l'amour éternel.**

### **À ma très chère tante Rachida**

Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

### **À ma famille**

En particulier, mes oncles, Mokhtar Baahmed, Hamitouche, Nacer et Said Boucedra, pour leurs encouragements et leur gentillesse.

### **À mon amie d'enfance Yasmine**

Pour ton sourire qui fait ma joie dans les moments heureux et qui me donne le courage de continuer dans les moments difficiles. Merci d'être toujours à mes côtés. Que Dieu nous garde toujours unies.

### **À mes sœurs de cœur**

**Yousra, Roffi, Leila, Wiaame, Amel, Zakia, Bouthaina, Ghada, Mayar, Ratiba, Amani et Ikram** pour tous les moments que nous avons partagé durant ces années des plus difficiles aux meilleurs, en espérant pouvoir en partager encore tant d'autres.

Mes sincères remerciements à mon binôme, pour son attention bienveillante dans ce travail, son soutien, sa patience et ses encouragements.

A tous mes enseignants depuis l'école primaire jusqu'à ce jour.

**BOUCEDRA Nadjet**

# Remercîments

En tout premier lieu, on remercie ALLAH, tout puissant, de nous avoir donné la force pour persévérer dans nos études, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

## **À notre promotrice Mme Djahnit Nora**

Vous nous avez fait le grand honneur d'accepter de nous diriger dans ce travail avec bienveillance et rigueur. Votre attachement au travail bien fait est l'objet de notre considération.

Nous vous remercions pour la qualité de votre encadrement exceptionnel, votre patience, votre amabilité, Votre dynamisme, et enfin pour votre rigueur et votre disponibilité durant notre préparation de ce mémoire. Votre dévouement pour le travail et votre compétence ont suscité notre admiration.

Nous gardons un excellent souvenir de la qualité de l'enseignement que vous nous avez prodigué. On espère être digne de la confiance que vous avez placée en nous en nous guidant dans l'élaboration et la mise au point de ce travail.

Veillez trouver dans ce travail, le témoignage de notre profonde gratitude et l'expression de nos sentiments les plus respectueux.

## **Au président de jury Mme Mokrane Zakia**

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider le jury de ce travail.

Nous avons pour vous l'estime et le respect qu'imposent votre compétence, votre sérieux et votre richesse d'enseignement.

Veillez trouver, cher maître, dans ce modeste travail, l'expression de notre très haute considération et notre profonde gratitude.

## **Au membre du jury M Kada Mohamed**

Nous sommes très sensibles par l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger notre travail.

Nous vous sommes très reconnaissants de la spontanéité et de l'amabilité avec lesquelles vous avez accepté de juger ce travail.

Veillez trouver, cher maître, à travers ce modeste travail la manifestation de notre plus haute estime et de nos sentiments les plus respectueux.

### **Au membre du jury Mme Lounas Ryhan**

On vous remercie vivement de l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger notre travail.

Nous vous sommes très reconnaissants de la spontanéité et de l'amabilité avec lesquelles vous avez accepté de juger ce travail.

Veillez trouver, cher maître, l'expression de notre très haute considération et notre profonde gratitude.

### **A nos professeurs et enseignants et au corps administratif de l'ENSSMAL**

Nous souhaitons leurs adresser nos remerciements les plus chaleureux, pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée

On remercie également tout le corps technique du laboratoire de l'ENSSMAL et de la station marine et laboratoire de recherche de Sidi Fredj, pour leur Accessibilité et leur disponibilité.

## Table des matières

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

### **Chapitre I : les hydrocarbures pétroliers et la pollution marine**

I.1	Le pétrole .....	4
I.2	La composition des hydrocarbures pétroliers.....	4
I.2.1	La composition chimique .....	4
I.2.1.1	Les hydrocarbures aliphatiques .....	5
I.2.1.2	Les hydrocarbures aromatiques .....	5
I.2.1.3	Les résines .....	6
I.2.1.4	Les asphaltènes .....	6
I.2.2	Les propriétés physiques .....	8
I.2.2.1	La viscosité .....	8
I.2.2.2	Densité .....	8
I.2.2.3	Le point d'écoulement .....	8
I.2.2.4	Solubilité.....	9
I.2.2.5	Point d'éclair.....	9
I.2.2.6	La tension interfaciale.....	9
I.3	Devenir des hydrocarbures .....	10
I.4	L'impact de la pollution hydrocarbonée.....	13

### **Chapitre II Les bactéries marines dégradantes les hydrocarbures**

II.1	Les bactéries marines hydrocarbonoclastes.....	14
II.2	Impact de la pollution pétrolière sur la communauté bactérienne .....	14
II.3	La biodégradation .....	15
II.4	Les facteurs influençant la biodégradation en mer.....	16
II.4.1	La température.....	16
II.4.2	Le PH.....	17

II.4.3	L'oxygène.....	17
II.4.4	L'apport en nutriments .....	17
II.4.5	L'effet de la salinité.....	18
II.4.6	La pression hydrostatique.....	18
II.4.7	La composition du pétrole.....	19
II.5	Critères d'une bactérie dégradante les hydrocarbures.....	19
II.5.1	La production de biosurfactants .....	19
II.5.1.1	Définition.....	19
II.5.1.2	Classification des biosurfactants .....	19
II.5.1.3	Biosynthèse et importance des biosurfactants.....	23
II.5.1.4	Les facteurs environnementaux influençant la synthèse des biosurfactants .....	24
II.5.1.5	Les avantages des biosurfactants .....	24
II.5.2	Production des biofilms.....	25
II.5.2.1	Définition.....	25
II.5.2.2	Étapes et cycle de la formation du biofilm à l'interface Hydrocarbure-Eau.....	26
II.5.2.3	Rôle écologique des biofilms bactériens dans les milieux marins contaminés d'hydrocarbures .....	28
II.6	Le chimiotactisme.....	28

### **Chapitre III : matériel et méthodes**

III.1	La zone d'échantillonnage.....	31
III.2	Présentation du port de Sidi Fredj .....	31
III.3	Techniques d'échantillonnage .....	32
III.4	Revivification des bactéries.....	35
III.5	Identification moléculaire.....	37
III.6	Caractérisations biochimiques des bactéries isolées .....	37
III.6.1	Coloration de Gram .....	37

III.6.2	Test de la catalase.....	38
III.6.3	Test d'oxydase.....	39
III.7	Test de production de biosurfactants .....	40
III.7.1	Drop collapse test .....	41
III.7.2	Indice d'émulsification E24 .....	41
III.7.3	Test de déplacement .....	42
III.8	Test de l'halotolérance.....	43
III.9	La croissance des bactéries sur différentes sources de carbone .....	44
III.10	Production des biofilms .....	44
III.11	Test de dégradation.....	46

## **Chapitre IV : résultats et discussion**

IV.1	Caractérisation morphologique des bactéries isolées .....	48
IV.2	Résultats de l'identification par BLAST .....	48
IV.3	Caractérisations biochimiques des bactéries isolées .....	50
IV.3.1	Coloration de Gram .....	50
IV.3.2	Test de la catalase.....	51
IV.3.3	Test d'oxydase.....	53
IV.4	Production des biosurfactants .....	55
IV.4.1	Drop collapse test .....	55
IV.4.2	Indice d'émulsification E24 .....	57
IV.4.3	Le test de déplacement .....	60
IV.5	Test de l'halotolérance.....	62
IV.6	Croissance sur différentes sources de carbone .....	64
IV.7	Production de biofilms.....	67
IV.8	Test de dégradation.....	69
	Conclusion et perspectives .....	72

## Liste des figures

<b>Figure I.1.</b> Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers.....	<b>4</b>
<b>Figure I.2.</b> Exemples de structures moléculaires : a) asphaltène à structure condensée, b) résine, c) acide naphénique, et d) asphaltène à structure dispersée...7	<b>7</b>
<b>Figure I.3.</b> Échelle temporelle des principaux processus d'altération et de transport des hydrocarbures pétroliers à la suite d'un déversement en milieu aquatique (la largeur de chaque bande indique l'importance du processus).....	<b>11</b>
<b>Figure I.4.</b> Devenir des hydrocarbures pétroliers à la suite d'un déversement en milieu aquatique.....	<b>12</b>
<b>Figure II.1.</b> Températures optimales de biodégradation selon les différents milieux (sol, eau douce et marine).....	<b>16</b>
<b>Figure II.2.</b> Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm en milieu marin.....	<b>25</b>
<b>Figure II.3.</b> Effets des composés tensio-actives.....	<b>27</b>
<b>Figure II.4.</b> Schéma du système de signalisation chimio-sensoriel de <i>A. dieselolei</i> .....	<b>30</b>
<b>Figure III.1.</b> Position géographique de la presqu'île de Sidi Fredj.....	<b>31</b>
<b>Figure III.2.</b> Localisation des stations de prélèvement d'eau de mer et de sédiments du port de Sidi Fredj.....	<b>32</b>
<b>Figure III.3.</b> Filtration de la solution 3 dans la solution 2.....	<b>35</b>
<b>Figure III.4.</b> Suspensions bactériennesensemencées dans des tubes à essai.....	<b>36</b>
<b>Figure III.5.</b> Bactériesensemencées sur des boîtes de pétri.....	<b>36</b>
<b>Figure III.6.</b> Aspect des bactéries Gram+ et Gram- sous microscope.....	<b>38</b>
<b>Figure III.7.</b> Lecture du résultat du test de la catalase.....	<b>39</b>
<b>Figure III.8.</b> Technique du test d'oxydase.....	<b>40</b>
<b>Figure III.9.</b> Lecture des résultats du test d'oxydase.....	<b>40</b>

<b>Figure III.10.</b> Schéma du test d'effondrement de la goutte. Le liquide testé (jaune) est mis en contact avec une goutte de pétrole (bleu). Soit les deux se mélangent (en haut) soit les deux restent distincts (bas).....	<b>41</b>
<b>Figure III.11.</b> Agitation du tube à essai dans le vortex.....	<b>42</b>
<b>Figure III.12.</b> Bain à agitation Memmert.....	<b>43</b>
<b>Figure III.13.</b> Spectrophotomètre JASCO V-730.....	<b>44</b>
<b>Figure III.14.</b> a) Processus de coloration par le violet de gentiane. b) Lavage de la microplaque.....	<b>46</b>
<b>Figure III.15.</b> a) Décantation de la fraction contenant le pétrole vers le bas de l'ampoule. b) Récupération du dichlorométhane contenant le pétrole dans un flacon stérile.....	<b>47</b>
<b>Figure IV.1.</b> Formation de bulles lors d'un test catalase positif.....	<b>53</b>
<b>Figure IV.2.</b> Aspect d'un résultat positif du test d'oxydase.....	<b>55</b>
<b>Figure IV.3.</b> Résultat du drop collapse test sur microplaque.....	<b>57</b>
<b>Figure IV.4.</b> Histogramme représentant l'indice d'émulsification E24.....	<b>59</b>
<b>Figure IV.5.</b> a, c, d) Résultat positif du test d'émulsification et formation d'une couche émulsifiée. c) Résultat négatif et absence d'une couche émulsifiée.....	<b>59</b>
<b>Figure IV.6.</b> Test de déplacement effectué sur des boîtes de pétries.....	<b>60</b>
<b>Figure IV.7.</b> Histogramme montrant la croissance bactérienne en fonction de la concentration en NaCl.....	<b>63</b>
<b>Figure IV.8.</b> Histogramme représentant la croissance de chaque bactérie en fonction du taux de salinité.....	<b>64</b>
<b>Figure IV.9.</b> Histogramme représentant la croissance bactérienne selon l'hydrocarbure.....	<b>66</b>
<b>Figure IV.10.</b> Histogramme représentant la croissance de chaque bactérie en fonction des différentes sources de carbone.....	<b>67</b>
<b>Figure IV.11.</b> Coloration et mise en évidence de la formation des biofilms par le violet de gentiane.....	<b>68</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau I.1.</b> Composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers.....	<b>5</b>
<b>Tableau I.2.</b> Composition chimique des principaux hydrocarbures pétroliers.....	<b>7</b>
<b>Tableau I.3.</b> Propriétés des principaux hydrocarbures pétroliers.....	<b>10</b>
<b>Tableau II.1.</b> Les différentes classes de biosurfactants et leurs importances économiques.....	<b>20</b>
<b>Tableau III.1.</b> Sources et stations d'échantillonnage.....	<b>33</b>
<b>Tableau IV.1.</b> Aspect morphologique des bactéries sélectionnées.....	<b>48</b>
<b>Tableau IV.2.</b> Identification des séquences appartenant aux souches bactériennes choisis.....	<b>49</b>
<b>Tableau IV.3.</b> Résultats de la coloration de Gram.....	<b>51</b>
<b>Tableau IV.4.</b> Résultat du test catalase.....	<b>52</b>
<b>Tableau IV.5.</b> Résultats du test oxydase.....	<b>53</b>
<b>Tableau IV.6.</b> Résultat du Drop Collapse Test.....	<b>56</b>
<b>Tableau IV.7.</b> Pourcentage d'émulsification E24.....	<b>57</b>
<b>Tableau IV.8.</b> Diamètre du test de déplacement du pétrole.....	<b>61</b>
<b>Tableau IV.9.</b> La Croissance bactérienne en fonction de la concentration en NaCl.....	<b>62</b>
<b>Tableau IV.10.</b> Croissance bactérienne selon le type d'hydrocarbure (D.O = 600 nm).....	<b>65</b>
<b>Tableau IV.11.</b> Résultats du test de production des biosurfactants.....	<b>68</b>
<b>Tableau IV.12.</b> Résultat de la biodégradation des hydrocarbures aliphatique et aromatiques.....	<b>69</b>

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNr 16S** : ADN codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal

**ARNr 16S** : sous unité 16S de l'ARN ribosomal

**BLAST**: Basic Local Alignment Search Tool

**BTEX** : Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylène

**C** : Carbone

**COV** : Composés organiques volatils

**DO** : Densité optique

**EPS** : Les polysaccharides extracellulaires

**HAP** : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

**Lectine PSA** : Pisum sativum lectin

**MCP** : Methyl-accepting Chemotaxis Proteins

**NCBI** : National Center for Biotechnology Information

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**Rapports C/N C/P** : Carbone/Azote Carbone/Phosphore

**RR** : Régulateurs de réponse

**SAC** : Composés aux propriétés tensio-actives

**UV** : Ultra-Violet

### Unités de mesure

**h, min, s** : Heure, minute, seconde

**l, ml, µl** : Litre, milli-litre, microlitre

**ppm** : partie par million

**nm, cm, km** : nano mètre, centimètre, kilomètre

**ng, mg, g, kg** : nanogramme, milligramme, gramme, kilogramme

**Pa** : pascal

**Bar** : 1 bar = 100 000 Pa

**°C** : degré Celsius

**%** : pourcentage

**v:v** volume à volume

# Introduction

## Introduction générale

La pollution des mers et des océans par le pétrole est un fléau qui affecte profondément la faune et la flore marine mais le grand public ne s'y intéresse que quand des accidents spectaculaires surviennent (un pétrolier qui se brise ou une plateforme qui explose). Chaque année, plus de 400 000 tonnes de pétrole sont délibérément déversées dans l'océan du fait des déballastages et dégazages. Le pétrole est devenu, à partir des années 50, la première source d'énergie dans le monde. Il satisfait plus de 30 % des besoins énergétiques. L'Algérie exporte 540 000 barils/jour sur une production totale d'environ 1,1 million de barils/jour. La mer méditerranée est particulièrement vulnérable à cette pollution, ses conséquences sur la faune et la flore sont à la fois physique (étouffement des habitats, engluement) et toxique (contamination des organismes par processus chimique) (Fingas et Fieldhouse, 2012). La gravité de cette pollution dépend des conditions environnementales, météorologiques de la sensibilité du milieu, la quantité et le type d'hydrocarbures déversés. Les hydrocarbures sont considérés comme des contaminants prioritaires des écosystèmes marins du fait de leur faible solubilisation dans les milieux aqueux et leur adsorption aux particules solides. De plus, ils présentent un risque toxicologique important même à des faibles concentrations, notamment par leurs propriétés mutagènes et cancérigènes (Duran et Cravo-Laureau, 2016).

De ce fait des mesures efficaces sont nécessaire pour surveiller attentivement l'état de la pollution, mieux comprendre l'origine et la dynamique du polluant et surtout pour préserver et restaurer l'environnement. Il est donc nécessaire de développer des techniques fiables et efficaces de dépollution. La plupart des méthodes physique et chimique sont couteuses et non respectueuses de l'environnement (Azubuike et al., 2016). Toutefois, une approche biologique par bioremédiation peut être envisagée. Elle utilise le pouvoir épurateur des microorganismes de l'environnement, et présente l'avantage d'être peu invasive et moins onéreuse (Nikitha et al., 2017). Les recherches actuelles s'orientent vers l'élimination des hydrocarbures par des bioprocédés dont l'intérêt de ces nouvelles techniques réside surtout dans l'aspect non polluant et l'absence de sous-produits chimiques. La biodégradation par les populations naturelles de microorganismes est considérée comme le mécanisme principal par lequel la plupart des polluants xénobiotiques, notamment les hydrocarbures sont éliminés de l'environnement (Nikitha et al., 2017). Ce processus utilise des microorganismes pour dégrader ou éliminer les polluants, tels que les hydrocarbures et métaux lourds (Alisi et al., 2009

; Plociniczak et al., 2013) de l'environnement. Selon Molina et al., (2009), ces microorganismes montrent un potentiel élevé d'adaptation aux pollutions par les hydrocarbures dans les stations de traitement ainsi que les sites pollués. Les organismes les mieux adaptés pour la bioremédiation sont souvent les espèces indigènes d'un habitat pollué particulier. Ils peuvent survivre et se multiplier en présence de substances toxiques. En milieu marin les bactéries dégradant les hydrocarbures sont nombreuses. À titre d'exemple, *Rhodococcus* (Van Hamme et al., 2001), *Alcanivorax* (Liu et al., 2010), *Pseudomonas* (Zhang et al., 2011), *Dietzia* (Xing-Biao et al., 2011), *Acinetobacter lwoffii* (Marchal et al., 2003), *Exiguobacterium aurantiacum* et *Burkholderia cepacia* (Gita et Mukherji, 2008). Elles utilisent les hydrocarbures saturés (n-alcanes) comme unique source de carbone et d'énergie (Atlas et al., 1991 ; Zhang et al., 2011). Ces microorganismes ont la priorité d'émulsifier les hydrocarbures en solution en produisant des agents tensioactifs tels que les biosurfactants, augmentent l'adhérence des cellules au substrat et réduisent la tension interfaciale entre la phase aqueuse et la phase organique, entraînant une biodisponibilité accrue et une biodégradation ultérieure des hydrocarbures (Batista et al., 2006).

L'objectif fixé dans ce travail est d'étudier les caractéristiques des bactéries marines capables de dégrader le pétrole. Une collection de 119 souches bactériennes a été isolées et identifier préalablement dans un travail précédent (Djahnit et al., 2019) dont on a sélectionné 13 souches dans le cadre de notre étude.

Afin de présenter le contexte de l'étude et les principaux résultats obtenus, ce mémoire s'articulera autour de quatre chapitres.

La partie bibliographique comporte deux chapitres. Le premier chapitre (I), concerne les hydrocarbures pétroliers, leur composition, devenir en milieu marin, toxicité et leurs impacts sur l'environnement marin.

Le deuxième chapitre (II) concerne les bactéries marines hydrocarbonoclastes, l'impact de la pollution marine par les hydrocarbures sur la communauté microbienne, la biodégradation, les facteurs influençant la biodégradation en milieu aqueux, les critères d'une bactérie dégradante les hydrocarbures : les biosurfactants, les biofilms et le chimiotactisme.

La deuxième partie, Matériels et Méthodes, qui correspond au troisième chapitre (III), expose les protocoles utilisés dans notre travail.

La troisième partie, Résultats et Discussion, correspond au quatrième chapitre (IV), comporte :

- La caractérisation biochimique des bactéries isolées ;

- Test de production des biosurfactants ;
- Test de l'halotolérance ;
- La croissance des bactéries sur différentes sources de carbone ;
- La croissance des bactéries sur différentes concentrations en sel connues ;
- Test de production des biofilms ;
- Test de dégradation.

Enfin, une conclusion générale ainsi que des perspectives de recherche finalisent ce manuscrit.

# **Chapitre I**

## **les hydrocarbures pétroliers et la pollution marine**

# I. Chapitre I : les hydrocarbures pétroliers et la pollution marine

## I.1 Le pétrole

Le pétrole est un combustible fossile dont la formation date d'environ 20 à 350 millions d'années. Nommé aussi « huile » ou « pétrole brut », il provient de la décomposition d'organismes marins principalement le plancton accumulé dans les bassins sédimentaires, au fond des océans, des lacs et des deltas. Il arrive tout de même que le pétrole apparaisse en surface c'est pourquoi il est déjà connu depuis l'antiquité. En matière de composition, il représente un mélange de nombreuses molécules gazeuses, organiques, liquides, solides et de divers hydrocarbures en fraction considérable entre 65% et 95% (Bouderhem, 2011), de soufre et de métaux (nickel, cuivre, vanadium. Etc.).

## I.2 La composition des hydrocarbures pétroliers

### I.2.1 La composition chimique

Les hydrocarbures pétroliers renferment principalement des éléments composés d'atomes de carbone et d'hydrogène. Il s'agit d'alcane non cycliques (ou paraffines) qui sont en général abondants tant les formes normales que les formes ramifiées, des cycloalcanes (ou naphthènes), d'alcènes (ou oléfines) et d'hydrocarbures aromatiques (Figure I.1).

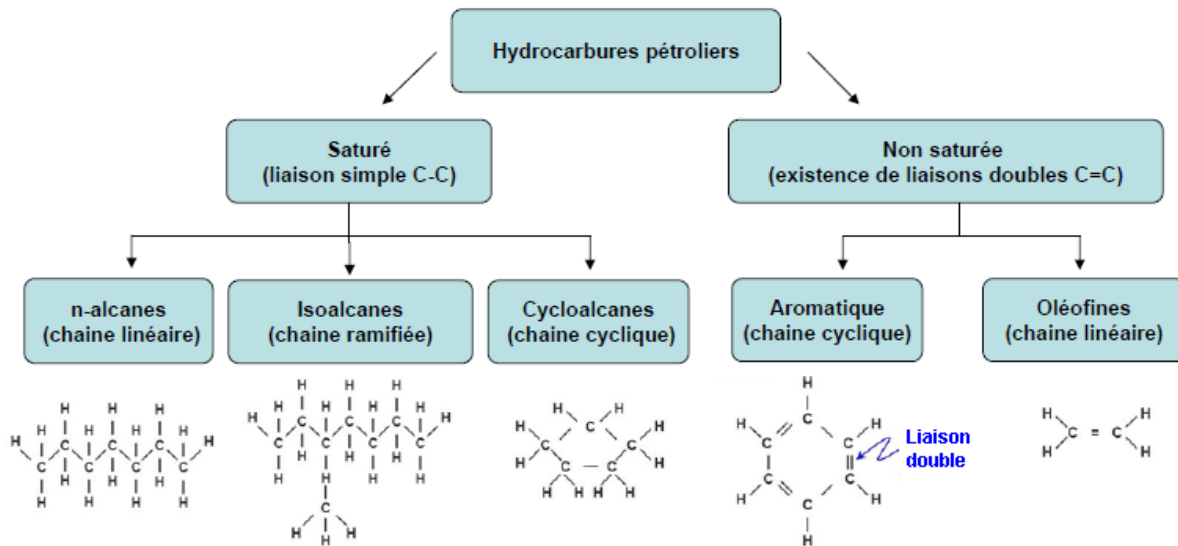


Figure I.1. Structure moléculaire de base des principaux hydrocarbures pétroliers (Colombano et al., 2008).

D'autres composés mineurs sont aussi présents, comme les métaux et les composés polaires qui contiennent de l'azote, du soufre ou de l'oxygène. Les composés polaires de faible masse moléculaire sont appelés des résines, les plus lourdes sont les asphaltènes (**Tableau I.1**).

**Tableau I.1.** Composition élémentaire des hydrocarbures pétroliers (Speight, 2014).

Éléments	Pourcentage %
Carbone	83 à 87 %
Hydrogène	10 à 14 %
Azote	0.1 à 2 %
Oxygène	0.05 à 6 %
Soufre	0.05 à 6 %
Vanadium, Nickel	< 0.1 %

### I.2.1.1 Les hydrocarbures aliphatiques

Les hydrocarbures aliphatiques sont des composés chimiques constitués d'hydrogène et de carbone, mais peuvent également contenir de l'azote, d'oxygène du chlore et du soufre. Une molécule aliphatique peut être acyclique ou cyclique saturée ou insaturée, linéaire ou ramifiée.

Les hydrocarbures aliphatiques rassemblent, les alcanes qui sont des hydrocarbures saturés répartis en deux groupes : les alcanes non cycliques, qui représentent les alcanes linéaires ou ramifiés, et les alcanes cycliques (cycloalcanes), de même connus sous le nom de naphènes (**Figure I.1**). Les alcènes qui sont des hydrocarbures insaturés distingués par la présence d'au moins une double liaison covalente entre deux atomes de carbone (**Figure I.1**). Les alcènes non cycliques ne possèdent qu'une double liaison de formule brute  $C_nH_{2n}$ . L'alcène le plus simple est l'éthylène. La plupart des hydrocarbures aliphatiques sont hautement inflammables.

### I.2.1.2 Les hydrocarbures aromatiques

Les hydrocarbures aromatiques peuvent être monocycliques (benzène, toluène, xylène, styrène et leurs composés) ou polycycliques (hydrocarbures aromatiques polycycliques HAPs). Les HAPs constituent de véritables menaces et sont reconnus comme étant toxiques pour les organismes aquatiques et plusieurs pays ont établi des critères de qualité des sédiments pour ces derniers (Persaud et al., 1993 ; Swartz, 1999 ; USEPA, 2003). De manière globale les hydrocarbures

aromatiques sont liquides et volatils à température ambiante. Ils sont souvent incolores avec une odeur relativement forte, inflammables, peu solubles dans l'eau, mais miscibles aux solvants organiques et aux huiles.

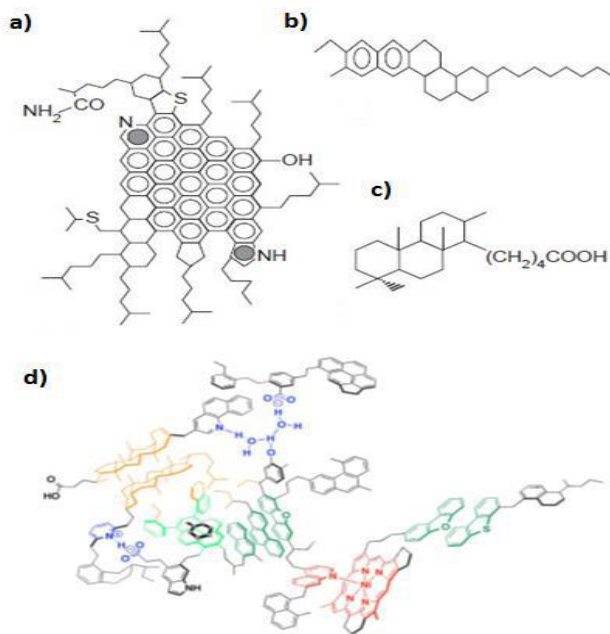
### **I.2.1.3 Les résines**

Ce sont des éléments polaires, qui constituent un groupe hétérogène de composés aromatiques qui comprend les acides naphthéniques, les cétones, les quinones et les phénols. Les résines sont caractérisées par une polarité élevée, qui les rend solubles dans l'eau, ce qui est à l'origine de leur biodisponibilité et de leur toxicité vis-à-vis des organismes en cas de déversement d'hydrocarbures en milieu marin (Melbye et al., 2009 ; Neff et al., 2000). Par ailleurs, les résines peuvent également contenir des produits issus de l'altération des hydrocarbures pétroliers, comme des composés polycycliques oxydés dont les concentrations sont souvent plus importantes dans des hydrocarbures altérés que dans des hydrocarbures frais (Ehrhardt et Douabul, 1989). Ces produits ont démontré un seuil de toxicité élevé et une persistance dans les milieux aquatiques (Hinga et Pilson, 1987).

### **I.2.1.4 Les asphaltènes**

Les asphaltènes sont des mélanges complexes de composés polyaromatiques avec des espèces hétérotopiques (azote, oxygène, soufre) ainsi que des composés organométalliques comme le fer, le nickel et le vanadium. Ils sont généralement décrits comme la fraction de pétrole brut insoluble dans les alcanes (n-heptane ou n-pentane) mais solubles dans les solvants aromatiques (toluène ou benzène).

Les asphaltènes sont ainsi constitués de centaines de composés qui ont des solubilités similaires, mais qui peuvent avoir des structures, tailles et formes différentes (Tharanivasan, 2012). Des exemples de la structure moléculaire des asphaltènes sont présentés à la **Figure I.2a** et la **Figure I.2d**. Ce sont des hydrocarbures aromatiques polynucléaires qui contiennent, en plus des chaînes n-alcanes, des alcanes cycliques et des hétéroatomes, tels que le soufre, l'azote et l'oxygène, et des traces de métaux (vanadium, nickel, fer). Ils représentent la fraction des hydrocarbures la plus stable et jouent un rôle important dans la stabilisation de l'émulsion des hydrocarbures (McLean et Kilpatrick, 1997).



**Figure I.2.** Exemples de structures moléculaires : a) asphaltène à structure condensée, b) résine, c) acide naphtéinique, et d) asphaltène à structure dispersée (Langevin et al., 2004 ; University of Alberta, s.d.)

**Tableau I.2.** Composition chimique des principaux hydrocarbures pétroliers (Fingas, 2013 ; Wang et Stout, 2007).

Groupe	Composés	Unité	Essence	Diesel	Pétrole brut		Mazout intermédiaire	Mazout n°6
					Leger	Lourd		
Alcanes	Totaux	%	50-60	65-95	55-90	25 – 80	25 – 35	20 - 30
	Alcanes non cycliques		45-55	35-45	40-85	20 – 60	10 – 25	10 – 20
	Cyclo Alcanes		5	25-50	5 – 35	0 – 10	0 - 5	0 - 5
Alcènes		%	5 - 10	0 – 10	-	-	-	-
Aromatiques	Totaux	%	25-40	5 – 25	10 - 35	15 – 40	40 – 60	30 - 50
	BTEX		15-25	0,5 - 2,0	0,1-2,5	0,01-2,0	0,05 – 1,0	0,00 – 1,0
	HAP		-	0 – 5	10 - 35	15 – 40	30 – 50	30 – 50
Composés polaires	Totaux	%	-	0 – 2	1 - 15	5 – 40	15 - 25	10 – 30
	Résines		-	0- 2	0 - 10	2 – 25	10 -15	10 - 20
	Asphaltènes		-	-	0 – 10	0 – 20	5 -10	5 – 20
Métaux		ppm	-	-	30-250	100-500	100 - 1000	100-2000
Soufre		%	0,02	0,1-0,5	0 - 2	0 – 5	0,5 - 2	2 - 4

## **I.2.2 Les propriétés physiques**

### **I.2.2.1 La viscosité**

La viscosité des hydrocarbures représente la résistance à l'écoulement, et elle est fondamentalement déterminée par la fraction de composés légers et lourds contenues dans le pétrole. Plus le pourcentage de composés légers est élevé, plus le pourcentage d'asphaltènes est faible et plus la viscosité est faible. C'est le cas des pétroles légers tels que l'essence et le diesel, qui ont des viscosités de 0,5 et 2,0mPas<sup>-1</sup> respectivement, à 15°C (**Tableau I.3**). La propagation d'une nappe d'hydrocarbures à la surface de l'eau est liée et conditionnée par la viscosité de l'hydrocarbure en question. Les hydrocarbures pétroliers ayant une faible viscosité sont très fluides et se propagent rapidement, rendant leur confinement difficile. De plus, la viscosité est influencée par la température, plus la température est faible, plus la viscosité est élevée. Ultimement, la viscosité influence les processus d'évaporation et d'émulsification des hydrocarbures (Fingas, 2011).

### **I.2.2.2 Densité**

Elle permet d'une part de distinguer les hydrocarbures légers des hydrocarbures lourds et d'autre part, elle est indispensable pour indiquer la flottabilité des hydrocarbures dans l'eau en cas de déversement. Les hydrocarbures ont tendance à s'écouler, Lorsque leur densité devient supérieure à celles de l'eau douce (1,0 g/cm<sup>3</sup>) ou marine (1,03 g/cm<sup>3</sup>). La majorité d'entre eux possèdent des densités comprises entre 0,7 et 0,99 g/ml à 15 °C (Tableau I.3), et par conséquent, flottent sur l'eau.

### **I.2.2.3 Le point d'écoulement**

Le point d'écoulement est la température minimale à laquelle le produit commence à s'écouler. En dessous de cette température les hydrocarbures ne coulent plus et prennent alors une forme semi-solide. En effet, plus la température baisse, plus les alcanes non cycliques (paraffines) présents dans l'hydrocarbure forment des structures cristallines qui en compromettent l'écoulement (ITOPF, 2012). Cette caractéristique est liée d'une manière immédiate à la viscosité. Ainsi, plus le contenu en alcanes non cycliques (paraffines) est faible, comme dans le cas des mazouts intermédiaires et lourds, plus les hydrocarbures seront caractérisés par un point d'écoulement élevé, tel qu'il est indiqué dans le **Tableau I.3**.

#### **I.2.2.4 Solubilité**

La solubilité est la propriété d'une substance à se dissoudre dans la colonne d'eau. Les hydrocarbures les plus solubles sont principalement les composés aromatiques légers tels que le benzène. Dans certains cas, une fois que les hydrocarbures sont solubilisés, ils peuvent être toxiques pour les organismes marins (Fingas, 2013), même en concentrations minimales. D'ailleurs, la solubilité du produit pétrolier dans l'eau est significative, quand la fraction d'hydrocarbures légers est importante. C'est ce qui explique les différences de solubilité entre les différents hydrocarbures pétroliers présentés dans le **Tableau I.3**.

#### **I.2.2.5 Point d'éclair**

Le point d'éclair, ou point d'inflammabilité correspond à la température la plus basse à laquelle le produit pétrolier émet suffisamment de vapeurs pour former avec l'air un mélange gazeux qui s'enflamme sous l'effet d'une flamme ou d'une étincelle. Beaucoup d'hydrocarbures fraîchement déversés peuvent facilement s'enflammer tant que les composés volatils ne se sont pas évaporés et dispersés dans l'atmosphère (Fingas, 2013). Selon le règlement sur les matières dangereuses du Québec, un liquide est considéré comme inflammable si le point d'éclair est inférieur à 61 °C. C'est le cas de l'essence, du diesel et de la majorité des pétroles bruts.

#### **I.2.2.6 La tension interfaciale**

C'est une force d'attraction ou de répulsion qui s'exerce à l'interface entre les hydrocarbures et l'eau. La tension interfaciale diminue lorsque la température augmente. Cette donnée permet d'évaluer la rapidité de la propagation des hydrocarbures sur l'eau. Plus la tension interfaciale est faible, plus les hydrocarbures se dispersent facilement sur l'eau (Fingas, 2013).

**Tableau I.3.** Propriétés des principaux hydrocarbures pétroliers (Fingas, 2013).

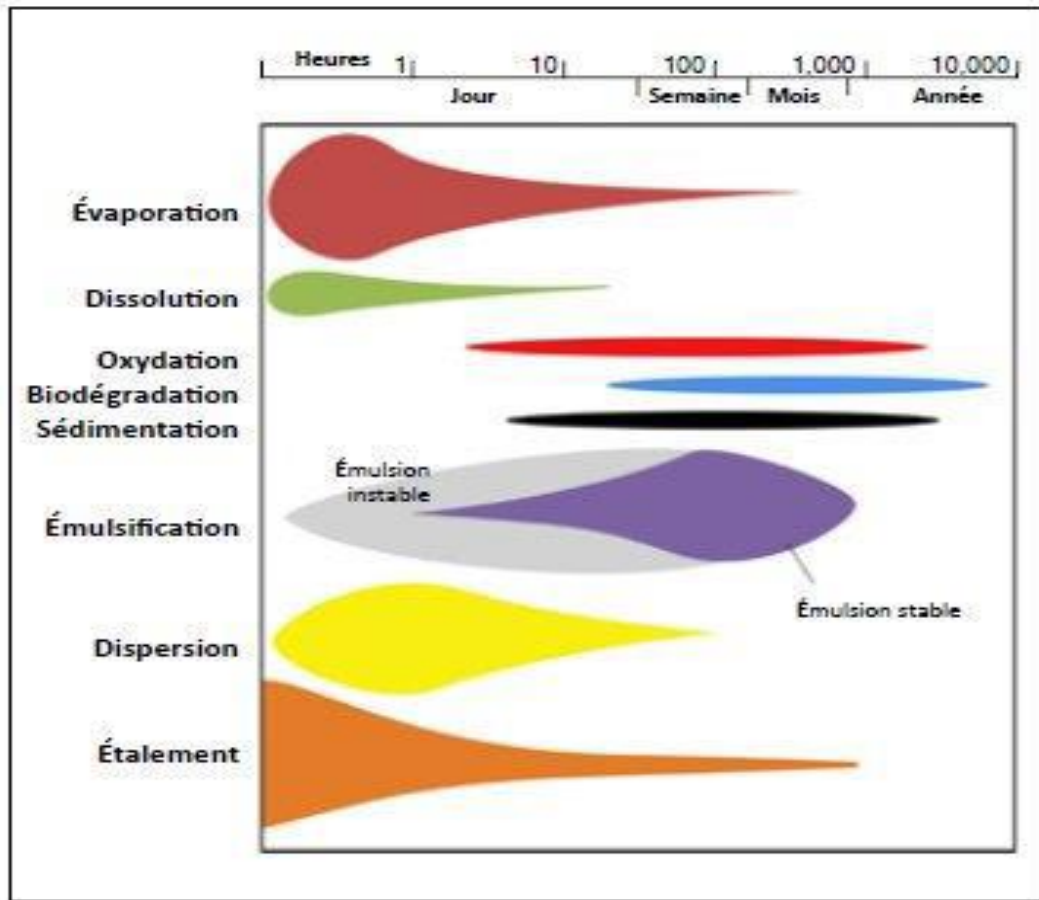
Propriété	Unité	Essence	Diesel	Pétrole brut		Mazout intermédiaire	Mazout lourd n°6
				Léger	Lourd		
Viscosité	mPas <sup>-1</sup> (15 °C)	0,5	2,0	5 à 50	50 à 50000	1000 à 15000	10000 à 50000
Point d'écoulement	°C	-	-35 à -10	-40 à 30	-40 à 30	-10 à 10	5 à 20
Densité	g/ml (15 °C)	0,72	0,84	0,78 à 0,88	0,88 à 1,00	0,94 à 0,99	0,96 à 1,04
Densité API	Degré API	65	35	30 à 50	10 à 30	10 à 20	5 à 15
Solubilité dans l'eau	mg/l	200	40	10 à 50	5 à 30	10 à 30	1 à 5
Point d'éclair	°C	-35	45	-30 à 30	-30 à 60	80 à 100	> 100
Tension interfaciale	mN/m † (15 °C)	27	27	10 à 30	15 à 30	25 à 30	25 à 35

\* La viscosité se mesure en milli pascal/seconde (mPas<sup>-1</sup>).

† La tension interfaciale se mesure en milli newtons/mètre (mN/m).

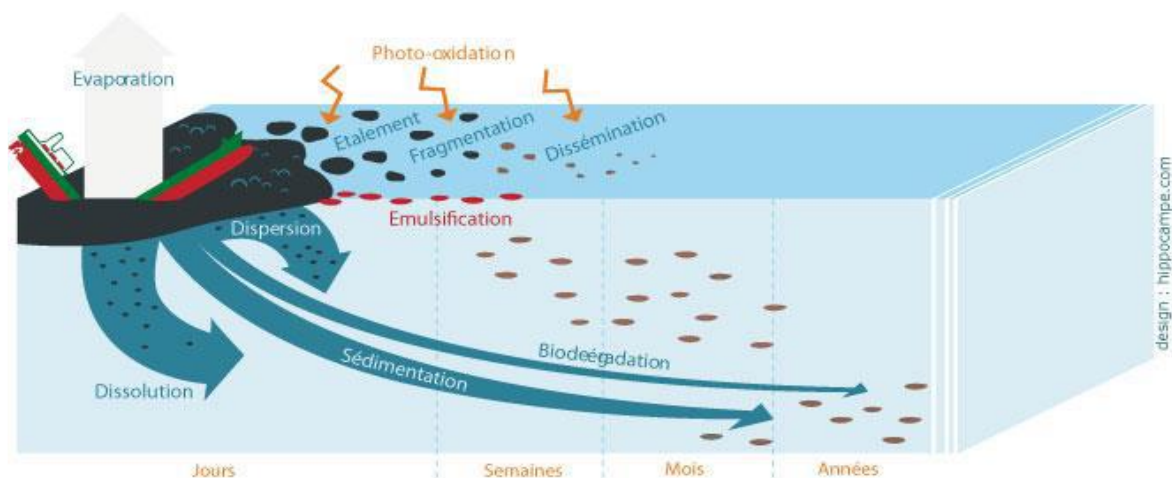
### I.3 Devenir des hydrocarbures

À la suite d'un déversement pétrolier en milieu marin, les hydrocarbures vont se propager à la surface de l'eau et seront soumis à plusieurs processus d'altération physique, chimique et biologique qui modifient leur composition chimique et leurs propriétés physiques ainsi que leur comportement dans le milieu. Il s'agit des processus d'évaporation, d'émulsification, de dispersion, de dissolution, de photooxydation, de sédimentation, d'interaction avec des particules fines et de biodégradation (Fingas, 2013). La majorité de ces processus débutent dès le début du déversement et l'importance de chacun va dépendre de la composition chimique, des propriétés physiques des hydrocarbures et des conditions environnementales du milieu pollué (température, vent, courant).



**Figure I.3.** Échelle temporelle des principaux processus d'altération et de transport des hydrocarbures pétroliers à la suite d'un déversement en milieu aquatique (la largeur de chaque bande indique l'importance du processus) (ITOPF, 2012).

Les hydrocarbures commencent à s'étaler à la surface de l'eau dès qu'ils sont déversés. La vitesse à laquelle se produit l'étalement dépend de la viscosité des hydrocarbures, du volume déversé et des conditions du milieu. Les hydrocarbures liquides ont tendance à s'étaler rapidement sous forme de nappe fine et continue, tandis que les hydrocarbures semi-solides ou très visqueux se fragmentent en plaques qui peuvent atteindre une épaisseur de plusieurs centimètres (ITOPF, 2012).



**Figure I.4.** Devenir des hydrocarbures pétroliers à la suite d'un déversement en milieu aquatique (<http://www.cedre.fr/fr/lutte/lutte-terre/polluant.php>).

Le vieillissement des hydrocarbures commence immédiatement après leur déversement et se déclenche par le processus d'évaporation des composés les plus volatils, de la dissolution des composés solubles dans l'eau et de la photooxydation sous l'effet de l'énergie solaire (CEDRE, 2005 ; Fingas, 2013). À la suite du déversement, les hydrocarbures émis se fractionnent en gouttelettes, les gouttelettes les plus fines (moins de 20  $\mu\text{m}$ ) sont maintenues en suspension dans la colonne d'eau sous l'action des vagues et des courants ce qui conduit à leur dispersion dans le milieu. Les plus grosses gouttelettes (plus de 100  $\mu\text{m}$ ) ont tendance à remonter à la surface de l'eau et à reformer une nappe par assemblage avec d'autres gouttelettes. Il s'agit de la coalescence. En présence d'énergie (courant, vagues), l'eau pénètre graduellement dans le pétrole et forme une mousse au chocolat. Il s'agit de l'émulsion inverse. Au fil du temps les hydrocarbures lourds conduisent à la formation des galettes ou boulettes de pétrole. Ce sont des agglomérats de formes variables dont la taille varie de moins d'un millimètre à plusieurs dizaines de centimètres. Ces boulettes de pétrole ont tendance à flotter si leur densité est inférieure à celle de l'eau de mer. Elles sont généralement déposées par les vagues sur le littoral. Cependant les hydrocarbures pétroliers rejetés dans l'environnement marin se dégradent au fur et à mesure par les microorganismes dont dispose le milieu, il s'agit de la biodégradation (NRC, 2003).

## **I.4 L'impact de la pollution hydrocarbonée**

Le déversement d'hydrocarbures est une grave menace pour l'environnement marin, car un nombre important d'organismes vivants, liés par une chaîne alimentaire complexe, sont endommagés. Son impact toxique est défini par le potentiel et la capacité à provoquer des effets nocifs létaux ou sublétaux sur les organismes (Environnement canada, 2000). Cet impact peut être difficile à établir en raison d'alternance variable du pétrole, ainsi que les différentes vulnérabilités des milieux et des organismes récepteurs. L'exposition des organismes marins aux hydrocarbures fait partie d'un des facteurs déterminants importants de la toxicité. L'exposition peut être aiguë (pour une courte période) ou chronique (pour une période prolongée). Cependant, en raison de la biodisponibilité des composés solubles et des composés aromatiques polycycliques persistants, organiques soufrés et hétérocycliques, les produits pétroliers légers (essences, diesel, pétrole brut léger) sont plus toxiques que les produits pétroliers lourds (pétrole brut lourd, pétrole altérés), qui ont plus tendance à engluer les organismes et le milieu récepteur (ITOPF, 2013a et GENIVAR, 2013). Les composés aromatiques sont plus toxiques que les composés aliphatiques, Les composés organiques volatils (COV) du pétrole brut sont extrêmement nocifs pour l'être humain. Les mollusques et les crustacés de mer (huître, moule, crevette, crabe) sont les plus susceptibles d'accumuler les hydrocarbures à cause de leur mode de vie. Ils ont une aptitude naturelle à bioaccumuler les contaminants même si la concentration est faible dans le milieu pollué ou si la source est éliminée. Les crustacés qui se nourrissent de débris ou de particules en suspension seront affectés par perturbation de leur taux de reproduction (réduction du taux d'éclosion) ou leurs habitudes alimentaires. Par contre, les huîtres accumulent moins d'hydrocarbures que les moules, car elles sont capables de se fermer pendant des périodes assez longues une fois soumises à l'agression d'un agent chimique toxique.

**Chapitre II**  
**Les bactéries marines**  
**dégradantes les hydrocarbures**

## II. Chapitre II Les bactéries marines dégradantes les hydrocarbures

### II.1 Les bactéries marines hydrocarbonoclastes

Une seule goutte d'eau de mer peut contenir des milliers de bactéries marines. Ces minuscules êtres vivants se différencient en termes de fonction. On trouve parmi eux les bactéries hydrocarbonoclastes qui sont caractérisées par leur capacité à utiliser le carbone du pétrole comme unique source de carbone et d'énergie et d'avoir l'aptitude à biodégrader les hydrocarbures pétroliers selon un mode d'assimilation précis. Ces microorganismes font l'objet de recherche et d'application contre les marées noires. Une liste de 9 genres de cyanobactéries, 103 genres de champignons, et 14 genres d'algues et 79 genres bactériens ont été identifiés pour leur pouvoir de dégrader ou transformer les hydrocarbures. Quelques genres tels que *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Alcaligenes*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Thalassolituus*, *Oleispira* et *Vibrio* présentent une abondance remarquable. Des essais ont montré que les souches *Alcanivorax* peuvent croître sur n-alcanes et les alcanes ramifiés, mais ne peuvent pas utiliser tous les sucres ou des acides aminés comme source de carbone. De même, les souches de *Cycloclasticus* poussent sur des hydrocarbures aromatiques, le naphthalène, le phénanthrène et l'anthracène, alors que les souches d'*Oleispira* et *Oleiphilus* poussent sur les hydrocarbures aliphatiques, alcanols et alcanates. *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Marinomonas* et *Halomonas* sont connues comme des bactéries marines capables de dégrader le phénanthrène ou le chrysène (Engelhardt et al., 2001).

### II.2 Impact de la pollution pétrolière sur la communauté bactérienne

Le pétrole peut être toxique ou peut changer les conditions physico-chimiques et le comportement des communautés bactériennes affectées. Les tapis microbiens sont caractérisés par une importante biodiversité et une grande richesse métabolique, ce qui permet de bien étudier ces fonctions métaboliques et les processus de modification de leur structure. À la suite d'une contamination par le pétrole les structures bactériennes se comportent différemment selon leur résistance à la contamination, de la manière de contamination, la quantité du polluant, le degré de sensibilité aux hydrocarbures pétroliers et la composition initiale de la communauté. Les bactéries qui dégradent les hydrocarbures dans un site non pollué présentent moins de 1% de la communauté bactérienne, leur pourcentage augmente de 1 à 10% dans un endroit pollué aux hydrocarbures pétroliers (Atlas, 1991). L'introduction de ces derniers facilite la prolifération des bactéries hydrocarbonoclastes et donc stimule la

biodégradation du polluant. Dans des essais in-situ, après contamination, la dominance de genres affiliés aux  $\gamma$ - et  $\alpha$ -protéobactérie et aux *Bacilli* a été observée.

### II.3 La biodégradation

Il s'agit d'une décomposition, et d'une dégradation moléculaire des substances organiques sous l'action des microorganismes. En milieu marin, La biodégradation des hydrocarbures est un facteur déterminant de leur devenir (Leahy et Colwell, 1990). Elle est essentiellement réalisée par le métabolisme des microorganismes hétérotrophes, qu'il soit respiratoire ou fermentatif, et peut avoir lieu en aérobose et en anaérobose (Head et al., 2006). Les bactéries marines hydrocarbonoclastes aérobies sont principalement des *Gammaproteobacteria* et certaines bactéries à Gram-positif (Head et al., 2006). Les microorganismes ont dans le cas général une capacité de dégradation spécifique d'un type d'hydrocarbures (Berthe-Corti et Höpner, 2005). En aérobose, ces bactéries ont développé des systèmes enzymatiques permettant l'incorporation d'un ou deux atomes d'oxygène à la molécule cible, l'introduction de groupements polaires les rendent plus facilement dégradables par le métabolisme bactérien d'où le cas de la plupart des *n*-alcane qui sont oxydés par des monooxygénases/hydrolases par l'incorporation d'un atome d'oxygène dans la molécule pour former l'alcool primaire correspondant. Après l'oxydation initiale de l'alcane, l'alcool correspondant est ensuite oxydé par une déshydrogénase pour former l'aldéhyde, puis l'acide gras qui servira de substrat pour l'acétyl CoA synthétase, pour être ensuite transformé par la voie de la  $\beta$ -oxydation (Van Beilen et al., 2003). Dans le cas des composés aromatiques, deux étapes clés interviennent dans la biodégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques, mono- ou polycycliques. La première est l'activation des noyaux benzéniques stables, par incorporation d'un ou deux atomes d'oxygène grâce à des monooxygénases et des dioxygénases, et la seconde étape correspond au clivage du noyau réalisé grâce à une enzyme du type extradiol- ou intradiol-dioxygénase. Les réactions enzymatiques suivantes entraînent la formation de métabolites qui seront ensuite transformés en intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques.

La biodégradation du pétrole par les bactéries marines est un phénomène bien établi, bien que mal connu, et est considérée comme le mécanisme le plus efficace pour l'élimination de ce polluant.

## II.4 Les facteurs influençant la biodégradation en mer

### II.4.1 La température

La température a tendance à influencer la biodégradation et les hydrocarbures en affectant le comportement physico-chimique de ceux-ci, mais aussi la physiologie et la diversité des micro-organismes indigènes. À faible température la viscosité des hydrocarbures augmente ce qui empêche l'émulsification et la volatilité des composés toxiques à faible poids moléculaire tel que les alcanes ce qui limite la biodégradation microbienne en raison de la diminution du métabolisme microbien (Leahy, 1990 ; Head et al., 2006). À des températures extrêmes la solubilité de l'oxygène augmente ce qui limite davantage la biodégradation microbienne aérobie. Tous les micro-organismes possèdent un intervalle de tolérance et une température optimale de croissance caractéristique à laquelle ils ont leur seuil maximal de multiplication. Les bactéries marines dégradantes les hydrocarbures sont à l'état général des mésophiles, leur forme de vie prospère au milieu des conditions de température modérée comprise entre 20 et 40°C avec un optimum de croissance entre 30 et 37°C. Des études ont montré que la dégradation dans des milieux à température mésophile est plus efficace que celle en zones froides ou chaudes (Boopathy, 2000). Au-delà de la limite supérieure, on observe la réduction du taux des activités enzymatiques et de la vitesse de croissance menant à un ralentissement voire absence du processus de la biodégradabilité favorisant la dispersion, et l'indisponibilité du pétrole accompagné par un degré de toxicité significatif.



**Figure II.1.** Températures optimales de biodégradation selon les différents milieux (sol, eau douce et marine)

## II.4.2 Le PH

Les fluctuations du pH varient de façon moindre dans les écosystèmes marins. Les bactéries dégradantes les hydrocarbures sont généralement des neutrophiles. Le métabolisme microbien est influencé par un pH extrêmement bas ou élevé (Leahy et Colwell, 1990). Selon Bamforth et Singleton (2005), 40 % de la dégradation du phénanthrène a été effectuée à pH 5,5 par *Burkholderia cocovenenans*. Cependant, la dégradation des hydrocarbures à pH neutre dans les mêmes conditions était de 80 %. Le pH approprié dépend des micro-organismes utilisés pour les bioremédiations environnementales.

## II.4.3 L'oxygène.

La concentration en oxygène est définie comme étant le taux variable limite pour la dégradation des hydrocarbures dans l'environnement. L'oxygène est indispensable pour le fonctionnement du métabolisme des organismes et peut devenir un facteur limitant en milieu froid (Yang et al., 2009). Le catabolisme des hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques par les bactéries et les mycètes se fait par l'oxydation des hydrocarbures et par une oxygénase ce qui nécessite la présence d'oxygène. Des conditions limitantes en oxygène n'existent normalement pas dans les niveaux supérieurs de la colonne d'eau (Leahy 1990 ; Juhasz et Naidu, 2000). Cependant, des zones hypoxiques peuvent apparaître dans les eaux profondes (ex. zone hypoxique du chenal Laurentien) et limiter les capacités de biodégradation. La dégradation des hydrocarbures pétroliers est beaucoup plus efficace en conditions oxiques qu'en anoxie (Widdel et Rabus, 2001).

## II.4.4 L'apport en nutriments

Les nutriments tels que l'azote et le phosphore, sont des éléments indispensables pour la croissance de la communauté bactérienne et le déroulement du processus de biodégradation. Un excès en ces substances peut être un facteur limitant pour la croissance bactérienne et la biodégradabilité mais, leurs absences ralenties et bloque la biodégradation.

Dans l'écosystème marin, les proportions d'azote et de phosphore sont faibles. Lors d'un déversement pétrolier la concentration en carbone fournie par les hydrocarbures augmente par rapport aux concentrations d'azote et de phosphore disponibles, il se crée alors un déséquilibre entre la source de Carbone et les concentrations en nutriments qui conduit à des rapports C/N C/P élevés défavorables pour la croissance microbienne (Leahy et Colwell, 1990). L'efficacité de l'azote et du phosphore

n'est significative que lorsque leurs concentrations dans le milieu permettent d'établir un rapport C/N C/P favorable. Des taux plus élevés de biodégradation du pétrole pourraient être obtenus par l'addition d'azote et de phosphore. Gibbs (1975), a déduit que 1 m<sup>3</sup> d'eau de mer contient une quantité d'azote suffisante pour dégrader 30 g de pétrole par an à des températures estivales et 11 g de pétrole par an à des températures hivernales. Atlas et Bartha (1972) ont démontré que les concentrations de 1 mg d'azote et 0,07 mg de phosphore par litre sont suffisantes pour la dégradation maximale du pétrole brut dans une eau de mer à une concentration de 8 g/L de pétrole.

#### **II.4.5 L'effet de la salinité**

La salinité moyenne des zones océaniques est de 3,5 % avec un intervalle de variation de 3,3% et 3,7%. Ces concentrations en sels sont compatibles avec la croissance des bactéries hydrocarbonoclastes (Bertrand et Mille, 1989). Ward et al., 1978, ont montrés que les fortes salinités dans les marais salants seraient un frein à la dégradation en raison du manque d'oxygène régnant dans ces zones. Bertrand et al (1993) ont étudié l'effet de la concentration en sel sur la biodégradation des hydrocarbures par deux communautés microbiennes, ils ont prouvé que la biodégradation est optimale pour une concentration de 0,4 M et diminue progressivement pour des valeurs supérieures et inférieures à celle-ci. Cet effet dépend de la nature du substrat utilisé comme source de carbone. Fernandez et al (1996) ont montré que la souche *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, bactérie marine halotolérante dégrade l'eicosane, avec un taux de biodégradation de 90% pour des concentrations en sels comprises entre 0,2 et 2,5 M.

#### **II.4.6 La pression hydrostatique**

À la suite d'un accident pétrolier, l'attention est généralement portée sur le pétrole qui s'étale à la surface de l'eau mais une grande partie de ce pétrole coule en profondeur. La profondeur moyenne des océans est de 3800 m ce qui correspond à une pression de 380 bar. Jannash et al., 1971, ont montré que dans les zones benthique la dégradation des hydrocarbures par les microorganismes est réduite voir absente en raison du manque des conditions favorables pour la croissance de la communauté bactérienne.

## II.4.7 La composition du pétrole

Le pétrole brut est un mélange extrêmement complexe d'hydrocarbures saturés, aromatiques, asphaltènes et résines. L'aptitude des bactéries à le consommer comme source de carbone dépend de la composition qualitative et quantitative de chaque fraction en particulier les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les aromatiques légers, les aromatiques à haut poids moléculaire, et enfin les composés polaires. Ratledge (1978), a rassemblé des règles à application générale pour l'ensemble des microorganismes : les hydrocarbures aliphatiques sont assimilés par une grande variété de microorganismes, les composés aromatiques peuvent être oxydés mais sont assimilés par quelques bactéries seulement. Les *n*-alcane à chaînes courtes, tel que le *n*-nonane ne sont pas toujours assimilés, mais peuvent être oxydés. Seules quelques bactéries ont la capacité de croître sur des alcanes plus courts tel que le *n*-octane. Quand la longueur de chaîne augmente au-delà de C<sub>9</sub>, le facteur de production augmente, mais la vitesse d'oxydation décroît. Les composés saturés sont plus rapidement dégradés que les insaturés. Les composés ramifiés sont moins rapidement dégradés que les composés non substitués

## II.5 Critères d'une bactérie dégradante les hydrocarbures

### II.5.1 La production de biosurfactants

#### II.5.1.1 Définition

Les biosurfactants sont des composés amphiphiles produits principalement sur les surfaces des cellules microbiennes, ou excrétés dans le milieu extracellulaire sous forme de fraction hydrophobe non polaires et de fraction hydrophile polaire (Karanth et al., 1999). Généralement, le groupement hydrophobe est constituée d'acides gras saturés ou non saturés, alors que le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) (Desai et Banat, 1997).

#### II.5.1.2 Classification des biosurfactants

Les biosurfactants sont généralement catégorisés par leur composition chimique dictée par les différentes molécules formant les moitiés hydrophobes et hydrophiles, ainsi que leur origine microbienne. Rosenberg et al. (1999) ont suggéré que les biosurfactants peuvent être divisés en deux catégories :

- Biosurfactants de faible masse moléculaire, qui abaissent efficacement la tension superficielle et interfaciale.
- Biosurfactants de masse moléculaire élevée, qui sont plus efficaces comme agents stabilisateurs d'émulsion.

**Tableau II.1.** Les différentes classes de biosurfactants et leurs importances économiques

Biosurfactants		Microorganismes	Importance économique	Références
Groupe	Class			
Glycolipides	Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Burkholderia glumae</i> , <i>Burkholderia plantarii</i> , <i>Burkholderia thailandensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activité antimicrobienne contre <i>Mycobacterium tuberculosis</i>.</li> <li>• Activité antiadhésive contre plusieurs souches bactériennes et de levures isolées de Prothèse phonatoire.</li> <li>• Amélioration de la dégradation et de la dispersion de différentes classes d'hydrocarbures.</li> <li>• Emulsification des hydrocarbures et des huiles végétales.</li> <li>• Elimination des métaux du sol.</li> </ul>	Herman et al., 1995 ; Maier et al., 2000 ; Sifour et al., 2007 ; Whang et al., 2008 ; Dubeau et al., 2009 ; Hörmann et al., 2010
	Trehaloselipides	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Nocardia erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i> , <i>Arthobacter sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amélioration de la biodisponibilité des hydrocarbures.</li> <li>• Activité antivirale contre le HSV et le virus de la grippe.</li> </ul>	Franzetti et al., 2010
	Sophorolipides	<i>Torulopsis bombicola</i> ,	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Récupération d'hydrocarbure à partir de</li> </ul>	Whang et al., 2008

		<i>Torulopsis apicola</i> , <i>Torulopsis petrophilum</i>	<p>boue.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Elimination des métaux lourds se trouvant dans les sédiments.</li> <li>• Amélioration de la récupération du pétrole.</li> </ul>	
	Lipides de mannosylerythritol	<i>Candida antarctica</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antimicrobien.</li> <li>• Propriétés immunologiques et neurologiques.</li> </ul>	Wakamatsu et al., 2001
	Cellobiolipides	<i>Ustilago zaeae</i> , <i>Ustilago maydis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• -</li> </ul>	Desai et Banat, 1997
<b>Lipopeptides et lipoprotéines</b>	Surfactine/iturine /fengycine	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amélioration de la biodégradation des hydrocarbures et des pesticides chlorés.</li> <li>• Elimination des métaux lourds des sols, des sédiments et des eaux contaminés.</li> <li>• Augmentation de l'efficacité de la phytoextraction.</li> <li>• Activités antimicrobienne et antifongique ; inhibition de la formation de caillots de fibrine ; hémolyse et formation de canaux ioniques dans les membranes lipidiques ; activité antitumorale contre des cellules de carcinome ascitique d'Ehrlich.</li> <li>• Activité antivirale contre le virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1).</li> <li>• Activité antimicrobienne et antifongique contre les effets profonds des mycoses sur la morphologie et la structure membranaire</li> </ul>	Tanaka et al., 1997 ; Awashti et al., 1999 ; Ahimou et al., 2001

			<ul style="list-style-type: none"> <li>des cellules de levure.</li> <li>Augmentation de la conductance électrique des membranes biomoléculaires lipidiques.</li> <li>Adjuvant immunologique non toxique et non pyrogène.</li> </ul>	
	Viscosine	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Activité antimicrobienne</li> </ul>	Saini et al., 2008
	Lichensine	<i>Bacillus licheniformis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Amélioration de la récupération du pétrole.</li> <li>Activité antibactérienne.</li> <li>Propriétés chélatrices qui pourraient expliquer l'effet perturbateur de la membrane des lipopeptides.</li> </ul>	Sen, 2008
	Serrawettine	<i>Serratia marcescens</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Chimio-répulsif</li> </ul>	Pradel et al., 2007
	Subtilisme	<i>Bacillus subtilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Activité antimicrobienne</li> </ul>	Ghribi et al., 2012
	Gramicidine	<i>Brevibacterium brevis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Antibiotique</li> <li>Contrôle des maladies</li> </ul>	Elad et Stewart, 2007
	Polymixine	<i>Bacillus polymyxa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Activité bactéricide et fongicide</li> </ul>	<a href="http://www.cyberlipid.org/simple/simp0005.html">www.cyberlipid.org/simple/simp0005.html</a>
	Antibiotique TA	<i>Myxococcus xanthus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Activité bactéricide.</li> <li>Applications chimio-thérapeutiques.</li> </ul>	Karanth et al., 1999 ; Xiao et al., 2012
<b>Acides gras/lipides neutres/phospholipides</b>	Acide corynomycologique	<i>Corynebacterium lepus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Amélioration de la récupération du bitume</li> </ul>	Gerson et al., 1978
	Acide spiculisporique	<i>Penicillium spiculisporum</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Élimination des ions métalliques d'une solution aqueuse.</li> <li>Action dispersante pour les pigments hydrophiles.</li> <li>Préparation de nouveaux</li> </ul>	Hong et al. 1998 ; Ishigami et al., 2000

			organogels de type émulsion, de séquestrants de métaux lourds.	
	Phosphatidyléthanolamine	<i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycococcus sp.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Augmenter la tolérance des bactéries aux métaux lourds</li> </ul>	Appanna et al., 1995
<b>Tensioactifs Polymères</b>	Emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stabilisation des émulsions d'hydrocarbures dans l'eau</li> </ul>	Zosim et al., 1982
	Alasan	<i>Acinetobacter radioresistens</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stabilisation des émulsions d'hydrocarbures dans l'eau</li> </ul>	Toren et al., 2001
	Biodispersane	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> A2	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dispersion du calcaire dans l'eau</li> </ul>	Rosenberg et al., 1988
	complexe polysaccharide-protéine	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bioémulsifiant</li> </ul>	Kaplan et al., 1987
	Liposan	<i>Candida lipolytica</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Stabilisation des émulsions d'hydrocarbures dans l'eau</li> </ul>	Cirigliano et Carman, 1985 ; Cameron et al., 1988
	Mannoprotéine	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
	Protéine PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bioémulsifiant</li> </ul>	Karanth et al., 1999
<b>Biosurfactants particuliers</b>	Vésicules	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Pseudomonas marginalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dégradation et élimination des hydrocarbures</li> </ul>	Karanth et al., 1999 ; Rosenberg et al., 1999
	Cellules microbiennes entières	<i>Cyanobacteria</i>		

### II.5.1.3 Biosynthèse et importance des biosurfactants

La synthèse des biosurfactants est généralement observée lors de la croissance des microorganismes sur des substrats insolubles dans l'eau (Pruthi et al., 1995) car ces derniers sont impératifs pour l'obtention d'une émulsion stable entre deux liquides non miscibles (Krepsky et al., 2007). Néanmoins Leur importance ne se limite pas uniquement à l'émulsification, en effet les biosurfactants jouent aussi un rôle très important dans l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms

(Alasan d'Acinetobacter), la régulation du niveau énergétique cellulaire (sophorose de *T.bombicola*), l'activité bactéricide (gramicidine, polymexine, surfactine), la pathogénicité de certaines bactéries (rhamnolipides de *Pseudomonas*), ainsi que le piégeage des métaux lourds (Vandecasteele, 2008). Ceci fait en sorte que leur utilisation s'étale sur différentes disciplines telle que, l'industrie pharmaceutique, cosmétique et même alimentaire, ils sont aussi utilisés en agriculture dans la fabrication des pesticides et des herbicides, dans l'industrie pétrochimique, et peut-être beaucoup plus important dans le domaine de La protection de l'environnement et la bioremédiation. Certaines des applications potentielles des biosurfactants dans le contrôle de la pollution et de l'environnement sont l'amélioration de la récupération microbienne du pétrole, la dégradation des hydrocarbures dans le sol et la dégradation de l'hexachloro cyclohexane, l'élimination des métaux lourds des sols contaminés et des hydrocarbures dans l'environnement aquatique (Singh et al., 2007), en facilitant la diffusion des hydrocarbures et leurs dérivés à l'intérieur de la cellule bactérienne pour qu'ils puissent être dégradés (Al-arajil et al., 2007).

#### **II.5.1.4 Les facteurs environnementaux influençant la synthèse des biosurfactants**

La synthèse des biosurfactants, comme toute autre réaction chimique, est influencée par un certain nombre de facteurs environnementaux qui augmentent sa productivité ou l'inhibent (Rahman et Gakpe, 2008). Différents facteurs environnementaux sont nécessaires pour la synthèse de biosurfactants, ce qui fait que les mêmes conditions ne conviennent pas forcément à tous les microorganismes, par exemple, certaines bactéries synthétisent un maximum de biosurfactant dans le n-hexadécane alors que d'autres ne le tolèrent même pas. Les facteurs environnementaux tels que le pH, la température, la salinité, l'agitation et l'apport en oxygène affectent la production de biosurfactants (Rahman et al., 2002 ; Raza et al., 2007). Le type, la qualité et la quantité des biosurfactants produits sont aussi influencés par la nature du substrat carboné (Raza et al., 2007), la concentration en ions N, P, Mg, Fe, et Mn dans le milieu, ainsi que les conditions de culture (Kretschmer et al., 1982).

#### **II.5.1.5 Les avantages des biosurfactants**

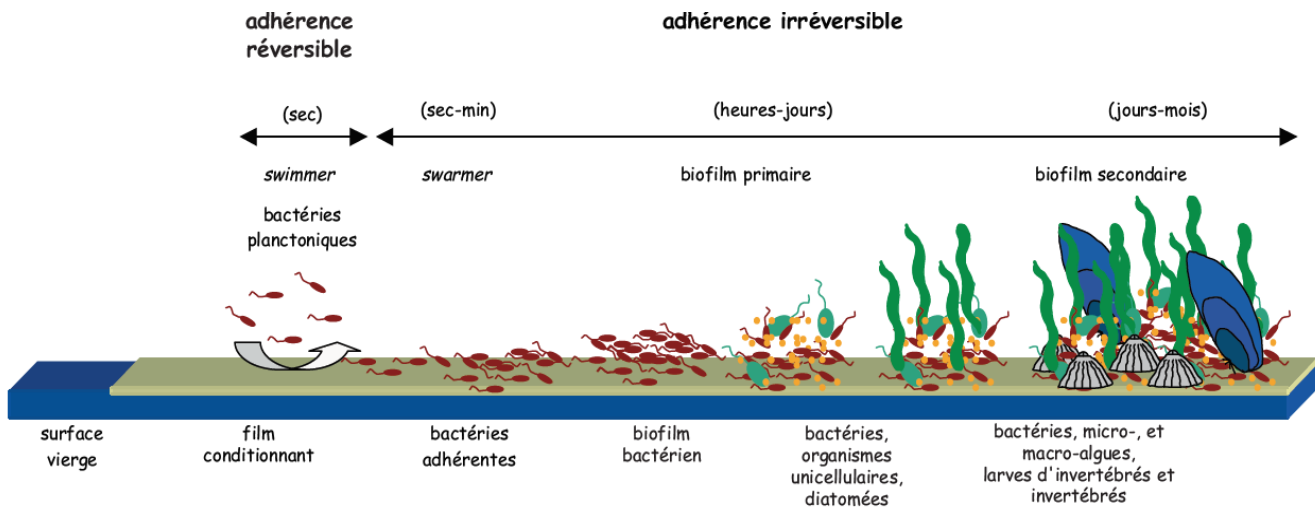
Par rapport aux tensioactifs synthétiques, les biosurfactants présentent plusieurs avantages, notamment une biodégradabilité élevée, une faible toxicité, une faible irritation et une compatibilité avec la peau humaine (Banat et al., 2000 ; Cameotra et Makkar, 2004). L'avantage le plus significatif

d'un tensioactif microbien par rapport à un tensioactif chimique est son acceptation écologique (Desai et Banat, 1997 ; Karsa et al., 1999 ; Banat et al., 2000). Parmi les autres avantages des tensioactifs biologiques par rapport aux synthétiques, citons la sélectivité et l'activité spécifique à des températures, pH et salinités extrêmes.

## II.5.2 Production des biofilms

### II.5.2.1 Définition

Les biofilms sont la forme la plus importante de vie microbienne et sont des matrices biologiquement actives de cellules et de substances extracellulaires en association avec une surface solide (Bakke et al., 1984). Les biofilms sont attachés à un substrat et consistent en de nombreuses bactéries implantées dans une substance de polymère organique.



**Figure II.2.** Représentation schématique des différentes étapes conduisant à la formation d'un biofilm en milieu marin (Haras, 2005).

Les polysaccharides extracellulaires (EPS) sont une sécrétion insoluble et visqueuse libérée par les cellules bactériennes, qui encapsule des millions de cellules adjacentes dans une matrice bien organisée et structurée (Upadhyayula et Gadhamshet, 2010). L'encapsulation par les EPS offre trois avantages importants aux cellules qui résident dans les biofilms.

- L'EPS peut contribuer à la dissémination des nutriments nécessaires à la croissance cellulaire (Cheng et al., 2007).
- En raison de la composition diversifiée des groupes polysaccharides chargés qui peuvent facilement se lier aux molécules nutritives, l'EPS piège les nutriments externes nécessaires à la subsistance et à la croissance des cellules (Cheng et al., 2007).
- Les cellules encapsulées dans la matrice d'EPS bénéficient d'une meilleure protection contre les agressions environnementales externes contrairement aux bactéries planctoniques (Pang et al., 2005)

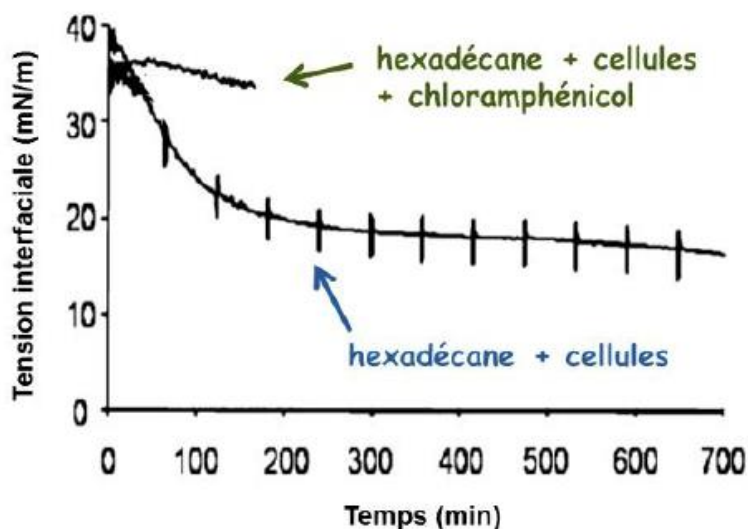
Les avantages de la formation de biofilms sont les suivants :

- La protection contre les antibiotiques (Goldberg, 2002).
- La protection contre les désinfectants (Peng et al., 2002).
- Et la protection contre les facteurs environnementales (Chen et al., 1998).

La croissance des biofilms est régie par un certain nombre de facteurs physiques, chimiques et biologiques.

### **II.5.2.2 Étapes et cycle de la formation du biofilm à l'interface Hydrocarbure-Eau**

Les biofilms formés aux interfaces Hydrocarbures-Eau, sont différents des modèles classiques où les bactéries poussent sur des surfaces inertes non nutritives telles que du verre, différents plastiques, des métaux ou des biomatériaux. En effet, ceux-ci se développent sur une interface nutritive qui fournit l'énergie et le carbone nécessaires à la croissance bactérienne, alors que les autres éléments tel que l'eau et l'oxygène proviennent de l'autre face du biofilm (Mounier, 2013). Afin de décrire les étapes qui conduisent à la formation d'un biofilm à l'interface Hydrocarbure-Eau on prend l'exemple d'une étude de cas de la formation de biofilm par une bactérie du genre *Marinobacter* sur l'hexadécane ( $C_{16}H_{34}$ , liquide à température ambiante) qui est un alcane modèle, et sur l'eicosane. Les étapes initiales de perception, d'interaction et d'adhésion des cellules à l'interface sont primordiales pour la subséquente formation du biofilm. Cette étude a révélé que la bactérie atteint l'interface hexadécane-Eau par simple diffusion, puis elle produit des composés aux propriétés tensio-actives (SACs) qui servent à diminuer la tension interfaciale (Figure II.3) (Klein et al., 2010).



**Figure II.3.** Effets des composés tensio-actifs (Klein et al., 2010).

Les observations par microscopie confocale du biofilm formé par la bactérie sur l'eicosane et sur l'hexadécane ont permis de suivre les différents stades de développement du biofilm.

Dans un premier temps, le biofilm, d'environ 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, est constitué d'un ensemble de plusieurs couches de cellules englobées dans une matrice contenant un glyco-conjugué, probablement un polysaccharide, mis en évidence par la lectine PSA. Le biofilm est hétérogène car il ne recouvre pas entièrement la surface de l'hexadécane. Après 24 h d'incubation, des cellules isolées adhérentes aux cristaux d'eicosane sont visibles. A 48 h, elles sont agencées en microcolonies et développent une matrice de polysaccharides qui est détectée par la lectine PSA. Il n'est pas encore établi si ce stade de microcolonies provient du rassemblement de bactéries par migration à l'interface et/ou d'une division cellulaire de cellules adhérentes. De plus, des microcolonies de tailles et d'épaisseurs différentes sont présentes simultanément indiquant que la formation du biofilm ne se fait pas de manière homogène. Les jours suivants, le biofilm se développe par l'expansion des microcolonies. A 120 h, toute la surface de l'eicosane est recouverte par le biofilm. D'autre part, quel que soit l'hydrocarbure, il a été observé que le biofilm de *Marinobacter* se désagrège complètement au bout d'un certain temps d'incubation. Une hypothèse est que les cellules au plus près de l'interface n'ont plus accès à suffisamment d'oxygène pour maintenir ce style de croissance et entraînent le démantèlement de la structure (Mounier 2013).

### **II.5.2.3 Rôle écologique des biofilms bactériens dans les milieux marins contaminés d'hydrocarbures**

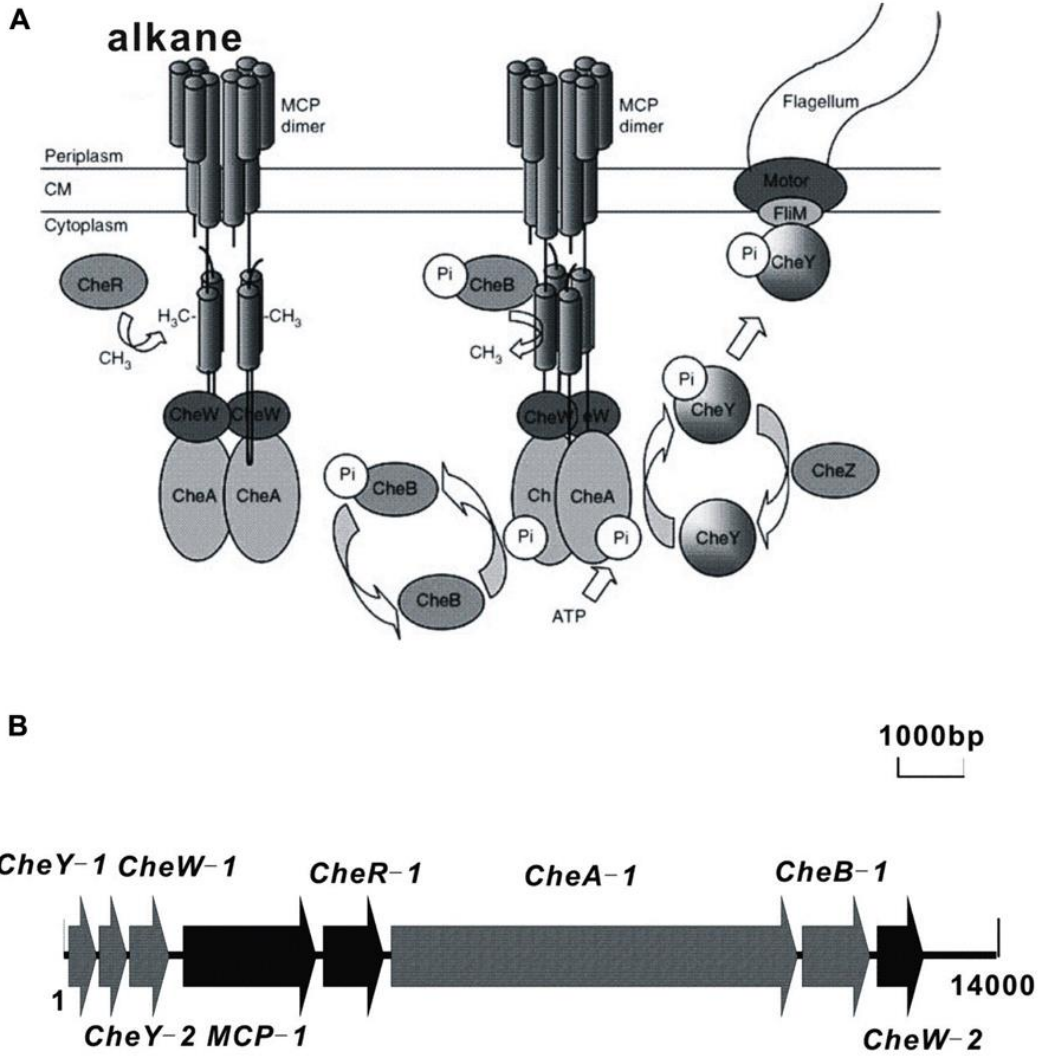
La formation de biofilm est une stratégie aujourd'hui largement reconnue comme permettant de favoriser le transfert de masse d'un substrat hydrophobe et donc d'en améliorer sa biodégradation (Froehner et al., 2012 ; Jiménez et al., 2011 ; Ławniczak et al., 2011 ; Tribelli et al., 2012). En effet, dans les biofilms, les cellules sont typiquement situées à moins de 1  $\mu\text{m}$  de l'interface et consomment le substrat directement dans sa couche limite (Johnsen et al., 2005). De plus, la matrice du biofilm et plus particulièrement les propriétés physicochimiques des composés qui la composent sont suspectées d'intervenir dans le maintien du contact du biofilm à l'interface Hydrocarbure-Eau, dans la solubilisation et le transfert des Hydrocarbures vers la cellule. Il est aussi envisagé que les polysaccharides de la matrice pourraient permettre l'adsorption et l'accumulation des Hydrocarbures au sein du biofilm, qui seraient alors métabolisés par les cellules (Fong et al., 2010 ; Zhang et al., 2011). Par ailleurs, la production de biosurfactants qui peut s'opérer au sein d'un biofilm assure une solubilisation accrue de l'hydrocarbure pour une meilleure dégradation. Les biosurfactants peuvent aussi accroître la solubilité de certaines molécules signal qui sont sécrétées par les cellules d'un biofilm afin d'en améliorer leurs activités (van Hamme et al., 2006).

## **II.6 Le chimiotactisme**

Pour survivre et se développer dans un environnement dont les conditions physicochimiques varient constamment, les bactéries doivent continuellement adapter leur métabolisme (Vladimirov et Sourjik, 2009 ; Alexandre, 2010). Les facteurs tel que les nutriments, le dioxygène (accepteur final d'électron), la lumière ou la température sont métabolisables ou peuvent affecter le métabolisme. Tous ces facteurs peuvent agir comme des signaux pour les bactéries (Alexandre, 2010). La détection de signaux spécifiques dépend de la présence de récepteurs dédiés, qui sont caractérisés par leur spécificité vis-à-vis du signal détecté et la sensibilité de la détection (Alexandre, 2010). Le chimiotactisme est défini comme le mouvement dirigé de cellules mobiles dans des gradients de divers paramètres physico-chimiques (Alexandre, 2010). Que les signaux soient attractifs ou répulsifs, ils sont détectés par des récepteurs transmembranaires appelés MCP (« Methyl-accepting Chemotaxis Proteins »). Le chimiotactisme a pour fonction de réguler la probabilité de changement dans le sens de

rotation des moteurs flagellaires. Ce changement affecte à son tour la façon dont les bactéries nagent dans leur environnement. Chez les organismes modèles *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*, Le chimiotactisme repose sur la présence des MCPs, d'une histidine kinase particulière (CheA), de deux régulateurs de réponse (RR) (CheY et CheB, un RR à activité méthylestérase) et d'une méthyltransférase constitutive (CheR) qui permet la méthylation à partir de S-adénosylméthionine de résidus glutamates des récepteurs MCPs. La fixation d'une molécule attractive ou répulsive sur le récepteur modifie l'activité d'auto-phosphorylation normale de CheA, associée aux récepteurs par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice CheW. La formation de CheA-P permet la phosphorylation de CheY. C'est la forme phosphorylée du RR CheY-P qui induit un changement du sens de rotation du flagelle en se fixant sur le moteur flagellaire (Prescott *et al.*, 2003 ; Sourjik et Armitage, 2010 ; Wadhams et Armitage, 2004).

Ce processus joue un rôle dans la biodégradation en mettant les cellules en contact avec les substrats de dégradation (Parales et Harwood, 2002 ; Parales *et al.*, 2008). Les alcanes sont des sources de carbone et d'énergie pour de nombreuses espèces bactériennes et il a été démontré qu'ils fonctionnent comme des chimio-attractifs pour certains micro-organismes. Un isolat bactérien de *Flavimonas oryzae*, obtenu à partir d'un sol contaminé par des hydrocarbures, s'est révélé chimiotactique vis-à-vis l'hexadécane (Lanfrancini *et al.*, 2003). De même, *Pseudomonas aeruginosa* est chimiotactique à l'hexadécane (Smits *et al.*, 2003). Le gène *tlpS*, qui est situé en aval du gène de l'alcane hydroxylase *alkB1* dans le génome de *P. aeruginosa*, est prédit pour coder des récepteurs transmembranaires appelés methyl accepting chemotaxis proteins (MCP) qui peuvent jouer un rôle dans le chimiotactisme des alcanes (Smits *et al.*, 2003). De même, le gène *alkN* est prédit pour coder une MCP qui pourrait être impliquée dans le chimiotactisme des alcanes dans *P. putida* (van Beilen *et al.*, 2001). Une enquête sur la séquence du génome d'*Alcanivorax dieselolei* (Lai *et al.*, 2012) a identifié la machinerie de chimiotaxie des alcanes d'*Alcanivorax*, qui consiste en huit protéines cytoplasmiques qui transmettent les signaux des protéines MCP aux moteurs flagellaires (Figure II.4). Cette machinerie de chimiotactisme est similaire à celle d'*Escherichia coli* (Parales et Ditty, 2010).



**Figure II.4.** Schéma du système de signalisation chimio-sensoriel de *A. dieselolei*

# Chapitre III

matériel et méthodes

### III. Chapitre III : matériel et méthodes

Les souches utilisées dans cette étude proviennent d'anciens échantillons (Djahnit et al., 2019).

#### III.1 La zone d'échantillonnage

Les souches bactériennes caractérisées dans cette étude proviennent d'échantillons d'eau de mer et de sédiments prélevés du port de Sidi Fredj. Le choix s'est porté sur ce port, d'une part à cause de la facilité d'accès et d'autre part du fait que c'est un port soumis à une pollution chronique par les hydrocarbures qui constitue donc un modèle de choix pour comprendre les mécanismes microbiens impliqués dans la réponse à la présence d'hydrocarbures.

#### III.2 Présentation du port de Sidi Fredj

Formant le cap Est de la baie de Bou-Ismaïl et la limite Ouest de la baie d'El Djamilia, Sidi Fredj est considérée comme une presqu'île entre  $2^{\circ} 50' 48''$  Est et  $2^{\circ} 50' 41''$  Est de longitude et  $36^{\circ} 45' 17''$  Nord et  $36^{\circ} 45' 06''$  Nord de latitude. Située à environ 25 Km à l'Ouest d'Alger, étendue sur un kilomètre au bord de la mer, Sidi Fredj est orientée vers le Nord-Ouest.

Commune de Staouéli, daïra de Zeralda et wilaya d'Alger ; Sidi Fredj est un promontoire rocheux en saillies, par rapport aux côtes sableuses limitrophes, caractérisée par deux pointes :

- ❖ La pointe de Marabout à l'Est (port de plaisance).
- ❖ La pointe de St Janvier à l'Ouest (baie d'El Djamilia).



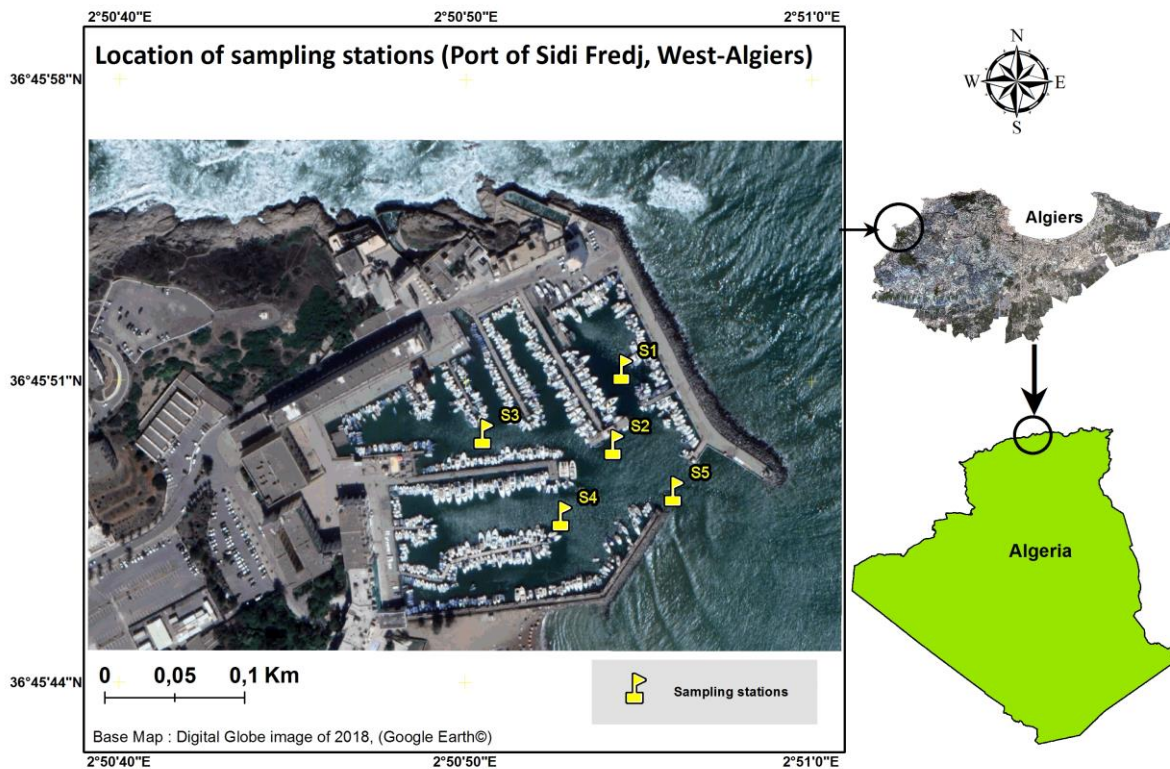
Figure III.1. Position géographique de la presqu'île de Sidi Fredj (Google Earth, 2021)

### III.3 Techniques d'échantillonnage

Le prélèvement des échantillons d'eau de mer et de sédiment, ont été effectués depuis une embarcation durant le mois de mars 2016. Cinq différentes stations ont été choisies pour les prélèvements d'eau et de sédiments (**Figure III.2**).

Environ un litre d'eau a été collecté de chaque station, l'échantillonnage a été effectué manuellement dans des flacons préalablement stérilisés, à environ 30 cm sous la surface de l'eau. Les échantillons de sédiments ont également été prélevés à partir des mêmes stations à l'aide d'une benne de type Van Veen (Duncan et associés KC Scientific Instrument Corporation de KC Denmark). Tous les échantillonnages pour l'étude microbiologique ont été effectués dans des conditions stériles.

Après la collecte, les échantillons ont été immédiatement transportés au laboratoire dans une glacière (4-8 ° C). Une fois au laboratoire, les échantillons ont été utilisés immédiatement comme inoculum pour la culture d'enrichissement dans un milieu minéral (ONR7a) additionné d'hydrocarbures comme unique source de carbone et d'énergie (Djahnit et al., 2019).



**Figure III.2.** Localisation des stations de prélèvement d'eau de mer et de sédiments du port de Sidi Fredj (Djahnit et al., 2019)

Au totale, 119 souches bactériennes ont été isolées de l'eau de mer et sédiments par cultures d'enrichissement sur le milieu minéral (ONR7a) additionné de pétrole brut comme source de carbone.

Parmi cette collection, 13 bactéries ont été sélectionnées pour notre étude (**Tableau III-1**)

**Tableau III.1.** Sources et stations d'échantillonnage

Code de la souche	Source d'échantillonnage	Station
PSF-5	L'eau de mer	Sw3
PSF-54	Sédiment	Sed3
PSF-14	L'eau de mer	Sw2
PSF-18	Sédiment	Sed4
PSF-12	L'eau de mer	Sw3
PSF-13	L'eau de mer	Sw3
PSF-21	L'eau de mer	Sw3
PSF-35	L'eau de mer	Sw5
PSF-90	L'eau de mer	Sw1
PSF-6	Sédiment	Sed1
PSF-42	Sédiment	Sed1
PSF-23	Sédiment	Sed3
PSF-26	L'eau de mer	Sw1

### Préparation du milieu ONR7a.

#### Solution 1 :

NaCl	22.8 gr
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.98 gr
KCl	0.72 gr
NH <sub>2</sub> Cl	0.27 gr
TRIS	1.3 gr
NaBr (0,83 gr dans 10 ml)	1.3 gr
NaHCO <sub>3</sub> (1,55 gr dans 50 ml)	1 ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (1,35 gr dans 50 ml)	1 ml
NaF (0,13 gr dans 50 ml)	1 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (4,45 gr dans 50 ml)	1 ml
Volume Final	600 ml

- Transférer les constituants solides dans un bécher contenant de l'eau distillée (50 ml moins que le volume final) remuer avec un agitateur magnétique jusqu'à solubilisation complète.
- Ajouter tous les éléments traces.

- Ajuster le pH à 7,6.
- Porter au volume final (600 ml).
- Autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes.

❖ Pour le milieu solide : ajouter 15 gr d'agar-agar directement dans la solution 1

### Solution 2 :

MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	11.18 gr
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	1.46 gr
SrCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O (1,2 gr dans 50 ml)	1 ml
Volume final	300 ml

- Transférer les constituants solides dans un bécher contenant de l'eau distillée (30 ml moins que le volume final) remuer avec un agitateur magnétique jusqu'à solubilisation complète.
- Ajouter tous les éléments traces.
- Porter au volume final (300 ml).
- Autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes.

### Solution 3 :

FeCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O (0,1 gr dans 50 ml)	1 ml
Volume final	100

- Placer la quantité désirée de solution de FeCl<sub>2</sub> dans un flacon de 50 ml.
- Ajouter de l'eau distillée.
- Stériliser la solution par filtration à travers le filtre de 0,22 µm directement dans la solution 2
  - ❖ Verser le tout dans la solution 1.



**Figure III.3.** Filtration de la solution 3 dans la solution 2

### III.4 Revivification des bactéries

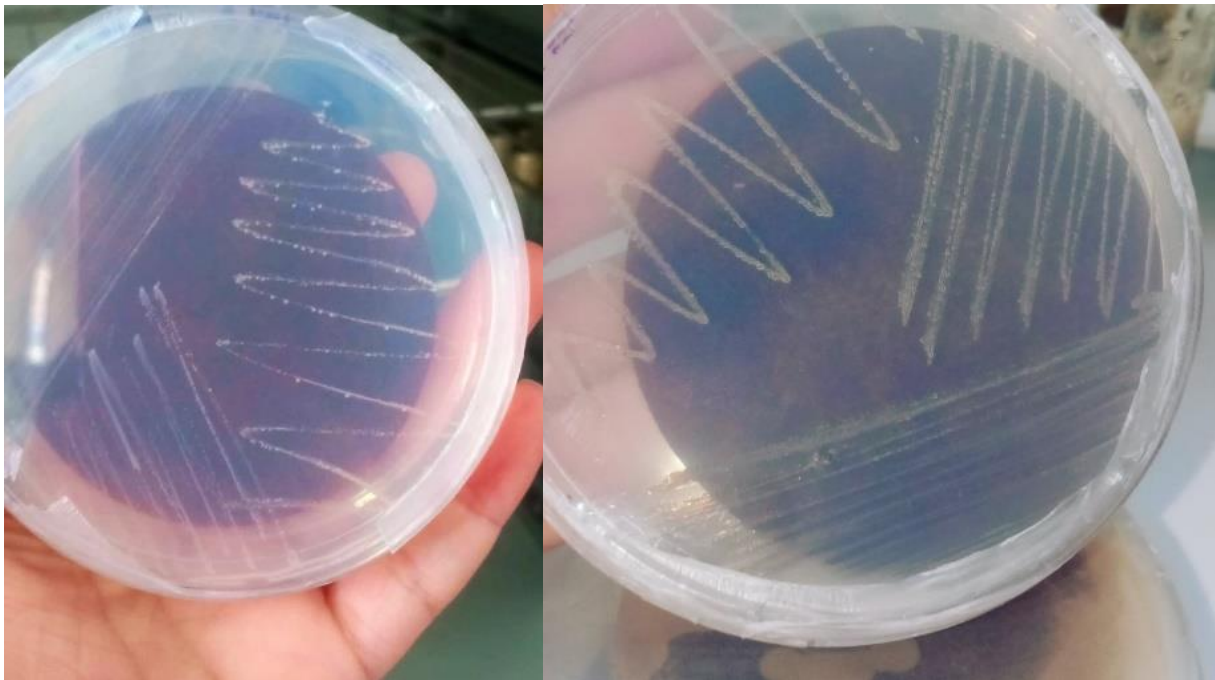
Les souches fournies pour notre étude étaient conservées dans du glycérol (50%) à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Afin de les revivifier, les bactéries préalablement enrichies et isolées ont été inoculé dans le milieu ONR7a additionné d'hydrocarbures comme unique source de carbone. ONR7a est un milieu synthétique dont la composition imite celle de l'eau de mer mais qui manque, à lui seul, d'une source principale de carbone (Dyksterhouse et al., 1995).

Les suspensions bactériennes ont été vortexés puis des aliquotes ont été transférés dans des tubes à essai stériles contenant 5 ml d'ONR7a additionné de 0.1% (v/v) de pétrole brut. Les cultures ont ensuite été incubé à  $30^{\circ}\text{C}$  sous agitation jusqu'à apparition de trouble signifiant une croissance bactérienne.



**Figure III.4.** Suspensions bactériennes ensemencées dans des tubes à essai

Un volume de (100 $\mu$ l) de chaque suspension bactérienne est ensuite étalé sur la surface des boîtes de pétri contenant du milieu ONR7a solide (ONR7a Agar) avec un papier filtre stérile imbibé de pétrole brut et placé sur le couvercle de la boîte. Les boîtes ont été incubées à 30°C.



**Figure III.5.** Bactéries ensemencées sur des boîtes de pétri

### III.5 Identification moléculaire

Dans le cadre de notre étude, les souches ont été fournies avec leurs séquences brutes. La caractérisation moléculaire des isolats a été basée sur l'analyse de la séquence du gène de l'ARN ribosomal 16S (ARNr).

L'ADN bactérien a été extrait suivant la méthode de « colonie PCR » (China et al., 1996). C'est une méthode basée sur le choc thermique. Les colonies isolées et purifiées sont immergées dans 25 µl de TE dans des microtubes de 1,5 ml. Les tubes sont ensuite immergés dans de l'eau bouillante avec un flotteur pendant cinq minutes, puis mis sur de la glace pendant 5 minutes supplémentaires et enfin centrifugés pendant 5 minutes à 13 000 g. Au cours de ce processus, l'ADN est obtenu sous forme de surnageant.

L'amplification PCR du gène de l'ARNr 16S a été réalisée en utilisant le couple d'amorce Bac27\_F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et de l'amorce inverse universelle Uni\_1492R (5'-TACGYTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991 ; Frank et al., 2008). La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel final de 30 µl contenant 1 µl d'ADN, 0,6 µl de chaque amorce, 0,6 µl de desoxyribonucleoside triphosphate (dNTPs 0,2 mM) (Gibco, Invitrogen Co., Carlsbad, CA), 0,5 U de Taq polymérase (Qiagen, Milano, Italie) avec son tampon réactionnel 1× final. La PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Mastercycler Gradient, Eppendorf) en suivant un programme de cycles bien définie.

Les fragments d'ADNr 16S amplifiés ont été séquencés par le biais de Macrogen Europe Service (Amsterdam, Pays-Bas).

Ayant les séquences de chaque bactérie (Annex 1), on les a comparés avec les séquences de la banque de données dans Genbank-BLASTn, pour une éventuelle identification moléculaire.

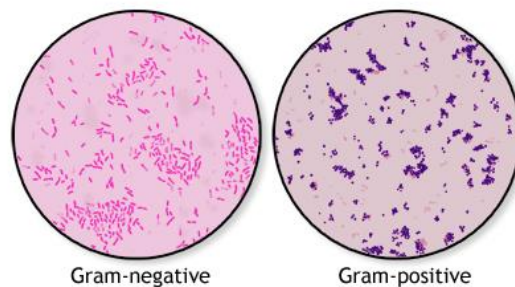
### III.6 Caractérisations biochimiques des bactéries isolées

#### III.6.1 Coloration de Gram

C'est un test qui permet la distinction entre deux groupes bactériens, les Gram + et les Gram-, Cette différence vient de la présence du maillage du peptidoglycane au niveau de la membrane, ce maillage est énorme chez les bactéries Gram+, et minuscule chez les bactéries Gram-.

Le mécanisme de cette coloration est connu. Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après un temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool (ou le mélange alcool + acétone) qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute avec une solution de violet de gentiane, le frottis coloré est rincé rapidement avec une solution iodo-iodurée de Lugol, et il y est maintenu pendant une minute. Le frottis est ensuite décoloré avec l'alcool à 95 % pendant quelques secondes jusqu'à élimination de l'excès du colorant puis rincé immédiatement avec l'eau du robinet. Le frottis est ensuite traité avec un colorant qui est une solution de Fushine, rincé rapidement au robinet et séché. Après ce traitement, La lame est examinée au microscope optique (objectif 100 X sous immersion). Les cellules Gram négatif apparaissent roses et les cellules Gram positif apparaissent sous une couleur violette (Singleton et Sainsbury, 1984).

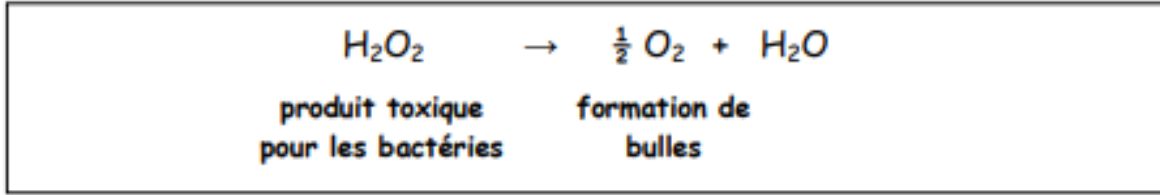


**Figure III.6.** Aspect des bactéries Gram<sup>+</sup> et Gram<sup>-</sup> sous microscope

### **III.6.2 Test de la catalase**

#### **Principe**

La catalase est une enzyme contenant du fer, qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et en oxygène.





Synthétisée par la plupart des bactéries aérobies, elle élimine le peroxyde d'hydrogène produit au cours du métabolisme aérobie. Le test de la catalase sert à détecter la production de cette enzyme par une souche bactérienne donnée (Singleton, 1999).

**Technique**

- ❖ On dépose à l'aide d'une pipette Pasteur stérile une goutte d'eau oxygénée à 10% au centre d'une lame propre et dégraissée.
- ❖ On prélève une colonie à l'aide d'une anse stérile.
- ❖ On dissocie la colonie dans la goutte d'eau oxygénée.

**Lecture**

Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulles traduit la décomposition de l'eau oxygénée en oxygène gazeux sous l'action de la catalase (Guiraud, 1998).

<b>Bulles d'oxygène</b>	<b>Pas de bulle</b>
La bactérie possède la catalase, elle est dite :  <b>Catalase +</b>	La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite :  <b>Catalase -</b>
	

**Figure III.7.** Lecture du résultat du test de la catalase

**III.6.3 Test d'oxydase**

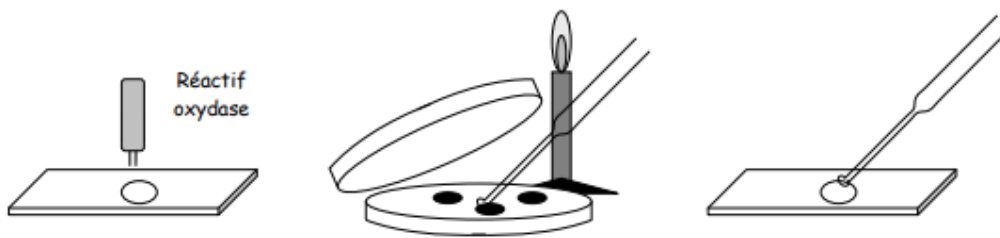
**Principe**

Le test de l'oxydase détecte un type particulier de chaîne respiratoire, qui comporte en fin de chaîne un cytochrome C et l'oxydase associée. Les bactéries qui possèdent une telle chaîne peuvent oxyder des composés chimiques (N-N diméthyle-p-phenylenediamine). Les électrons

sont transférés de ce réactif au cytochrome C et de là, via l'oxydase, à l'oxygène. Ainsi oxydé, le réactif développe une couleur violette intense (Singleton, 1999).

**Technique**

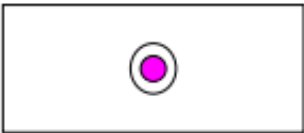

- ❖ On dépose stérilement le disque d'oxydase au centre d'une lame propre à l'aide d'une pince flambée.
- ❖ On humidifie le disque d'oxydase par une goutte d'eau distillée stérile.
- ❖ On prélève une colonie bactérienne (culture fraîche) recueillie sur gélose avec une pipette Pasteur et on l'étale sur le disque.



**Figure III.8.** Technique du test d'oxydase

**Lecture :**

Les espèces oxydase-positives donnent une coloration bleu/violette dans les 10 secondes (Singleton, 1999).

<b>Tâche rose violette</b>	<b>Pas de tâche rose violette</b>
<p>La bactérie possède l'activité oxydase, elle est dite :</p> <p style="text-align: center;"></p> <p><b>Oxydase +</b></p>	<p>La bactérie ne possède pas l'activité oxydase, elle est dite :</p> <p style="text-align: center;"></p> <p><b>Oxydase -</b></p>

**Figure III.9.** Lecture des résultats du test d'oxydase

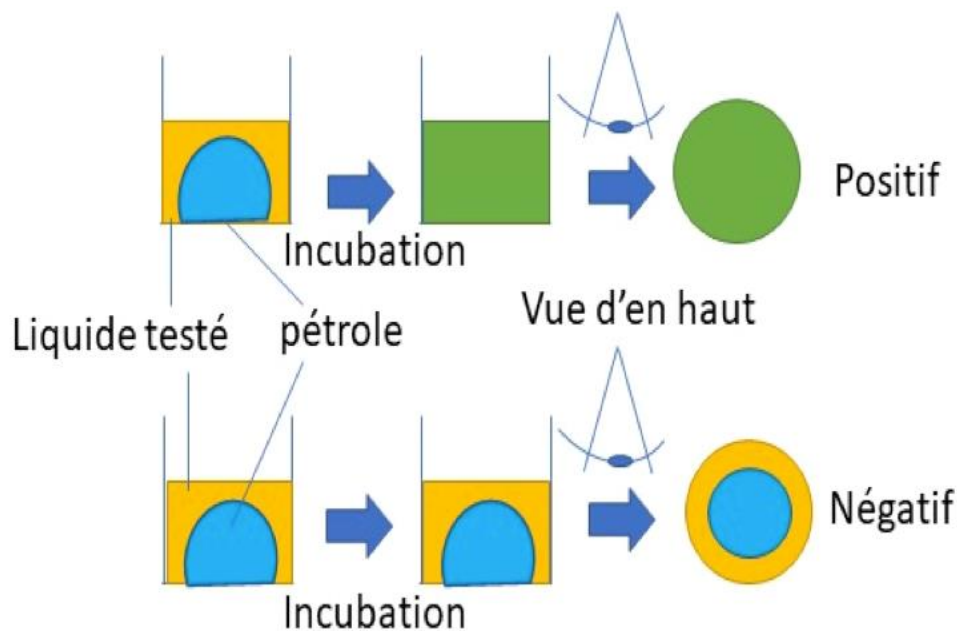
**III.7 Test de production de biosurfactants**

Les bactéries ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures ont la propriété de l'émulsifier en solution en produisant des agents de surface tels que les biosurfactants qui augmentent l'adhérence des cellules sur le substrat et qui réduisent la tension interfaciale entre les phases

aqueuse et organique ce qui conduit à une biodisponibilité accrue et à la biodégradation des hydrocarbures (Batista et al., 2006).

### III.7.1 Drop collapse test

Le drop collapse test ou test d'effondrement des gouttes a été réalisé en ajoutant 7  $\mu\text{l}$  de pétrole brut dans chaque puits d'une plaque microtitre à 96 puits. Le couvercle a été équilibré pendant 1 heure à température ambiante, puis 20  $\mu\text{l}$  de culture bactérienne de chaque isolat ont été ajoutés à la surface du pétrole. Après une minute d'incubation, la forme de la goutte à la surface du pétrole a été observée. Si la goutte s'effondre, elle indique la présence de surfactant (résultat positif) ; si elle reste perlée, ceci indique l'absence de surfactant (réponse négative). L'eau distillée stérile a été utilisée comme contrôle négatif (Bodour et Miller-Maier, 1998 ; Mahjoubi et al., 2013).



**Figure III.10.** Schéma du test d'effondrement de la goutte. Le liquide testé (jaune) est mis en contact avec une goutte de pétrole (bleu). Soit les deux se mélangent (en haut) soit les deux restent distincts (bas)

### III.7.2 Indice d'émulsification E24

L'indice d'émulsification (E24) de différentes cultures bactériennes a été déterminé en ajoutant 3 ml d'éther de pétrole au même volume de culture bactérienne. Le mélange a été agité

vigoureusement (vortex) pendant 2 minutes. Le mélange est resté pendant 24 h avant la mesure. L'activité d'émulsification a été calculée en tant que pourcentage de la hauteur de la couche émulsionnée divisée par la hauteur totale de la colonne du liquide

$$E24 = \frac{\text{Hauteur couche émulsionnée}}{\text{Hauteur totale de la colonne}} * 100 \text{ (Hassanshahian et al., 2012).}$$



**Figure III.11.** Agitation du tube à essai dans le vortex

### III.7.3 Test de déplacement

20 ml d'eau distillée ont été mis dans une boîte de Pétri vide (90 mm), 10 µl de pétrole brut ont été ajoutés à la surface de l'eau pour former une fine couche d'hydrocarbures à la surface. L'étape suivante consistait à appliquer 10 µl de culture bactérienne à la surface de l'huile. Le diamètre de la zone claire autour de la suspension bactérienne a été mesuré. (Cappello et al., 2016). Plus le diamètre est grand, plus la production de biosurfactants est importante.

### III.8 Test de l'halotolérance

Dans le but d'étudier la capacité des souches bactériennes à s'adapter aux différentes concentrations de salinité, 5 milieux ONR7 ont été préparés ayant comme variant la concentration d'NaCl qui va de 10 g/L puis 20,30,40 jusqu'à 50 g/L.

Ensuite 100  $\mu$ L de chaque suspension bactérienne ont été inoculées dans des tubes à essai contenant 5 ml du milieu, auquel on a rajouté 50  $\mu$ L d'hexadécane  $C_{16}H_{34}$ , une fois toutes les souches ont été inoculées dans les 5 milieux, les tubes ont été mis dans un bain-marie agitateur (**Figure III-12**) à une température de 30°C pour une durée de 10 jours, des blancs servant de contrôle négatif ont été préparés et soumis aux mêmes conditions. A la fin de la période d'incubation on a mesuré l'absorbance des échantillons à une densité optique (D.O) de = 600 nm en utilisant un spectrophotomètre (UV-Visible JASCO V-730).

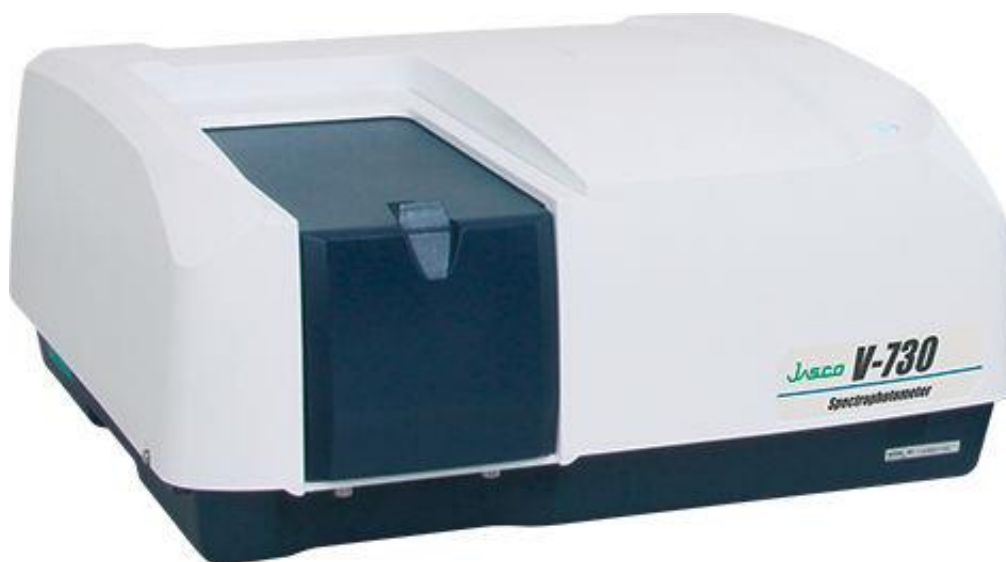


Figure III.12. Bain à agitation Memmert

### III.9 La croissance des bactéries sur différentes sources de carbone

Dans des tubes à essai stériles on a inoculé 100  $\mu$ L de suspension bactérienne dans 5 ml de milieu ONR7a, puis on leur a rajouté 50  $\mu$ L d'hydrocarbure (1% V/V). Pour cette étude on a utilisé 4 différentes sources de carbone, deux aliphatiques étant l'Hexadécane et l'Octadécane, et deux autres aromatiques étant le Benzène et le Toluène. Des blancs ont été préparés pour chaque sources de carbone et ces tubes ont étaient soumis aux mêmes conditions.

Les tubes ont été ensuite mis au bain marie agitateur à une température de 30°C pendant 10 jours. A la fin de la période on mesure leur absorbance par rapport au blanc à une D.O = 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (UV-Vis JASCO V-730) (**Figure III.13**).



**Figure III.13.** Spectrophotomètre JASCO V-730

### III.10 Production des biofilms

#### Préparation des bactéries

Les bactéries ont été inoculés dans des tubes à essais stériles contenant 5 ml de milieu ONR7a. Ces suspensions ont été cultivés jusqu'à la phase stationnaire.

Les cultures ont ensuite été diluées à 1/100 dans un milieu frais.

On a prélevé 100  $\mu$ l des cultures diluées à l'aide d'une micropipette et on les a déposés dans les puits de la microplaque, et on a rajouté un blanc qui va agir comme témoin. Il est recommandé de faire 3 répliquât pour avoir des résultats statistiquement représentatifs.

On couvre la plaque à l'aide d'un couvercle s'il est disponible ou bien en utilisant du para-film et on l'incube à 30°C pendant 72h (O'toole et Kolter, 1998).

### **Détection des biofilms**

Ces étapes sont effectuées à une température ambiante.

Après l'incubation on jette le contenu des puits en inversant la microplaque et en la secouant doucement au-dessus d'une bassine poubelle contenant de l'eau de javel dilué.

On rince ensuite la plaque en la submergeant dans une bassine contenant de l'eau claire, une fois submergée on frotte doucement la plaque avec les doigts tout en portant des gants, pour libérer les bulles d'air et assurer que l'eau pénètre tous les puits. On retire ensuite la plaque de la bassine, on l'inverse et on la secoue encore pour éliminer l'eau contenue dans les puits et on répète cette étape pour une deuxième fois.

On inverse ensuite la plaque sur un chiffon et on tape doucement la plaque pour éliminer le maximum d'eau possible.

En utilisant une micropipette on ajoute 125 µL de violet de gentiane à chaque puits.

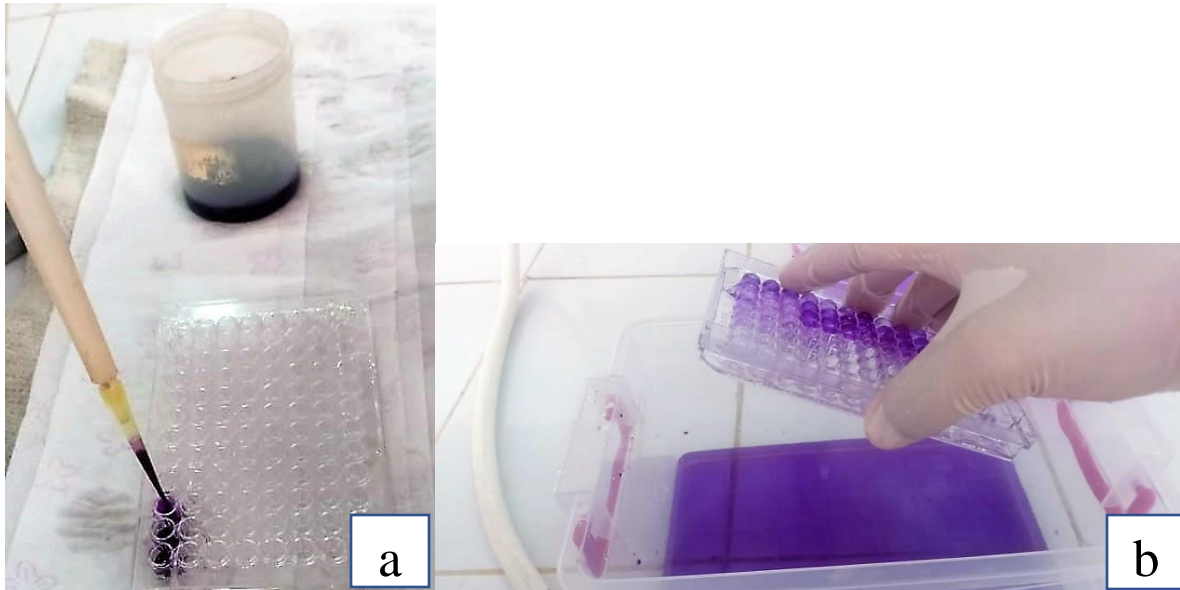
On laisse au repos pendant 10 minutes, puis on élimine le violet de gentiane en le déversant de la plaque dans une poubelle.

On submerge la plaque dans une nouvelle bassine contenant de l'eau et on frotte doucement la surface de la plaque pour que l'eau pénètre dans les puits, puis on retire la plaque de l'eau on l'inverse et on secoue pour éliminer l'excès d'eau, on rince une deuxième fois pour éliminer le violet de gentiane en surplus.

On rince ensuite encore 2 fois dans une nouvelle bassine contenant de l'eau claire et on inverse la plaque au-dessus de la poubelle pour éliminer l'eau des puits.

Enfin on tape doucement sur la plaque inversée sur un chiffon pour éliminer le maximum d'eau possible.

A ce stade si on voit un anneau violet à l'interface air-eau ou au bout des puits cela indique qu'il y a eu une formation de biofilm (Coffey et Anderson, 2014).



**Figure III.14.** a) Processus de coloration par le violet de gentiane. b) Lavage de la microplaque

### III.11 Test de dégradation

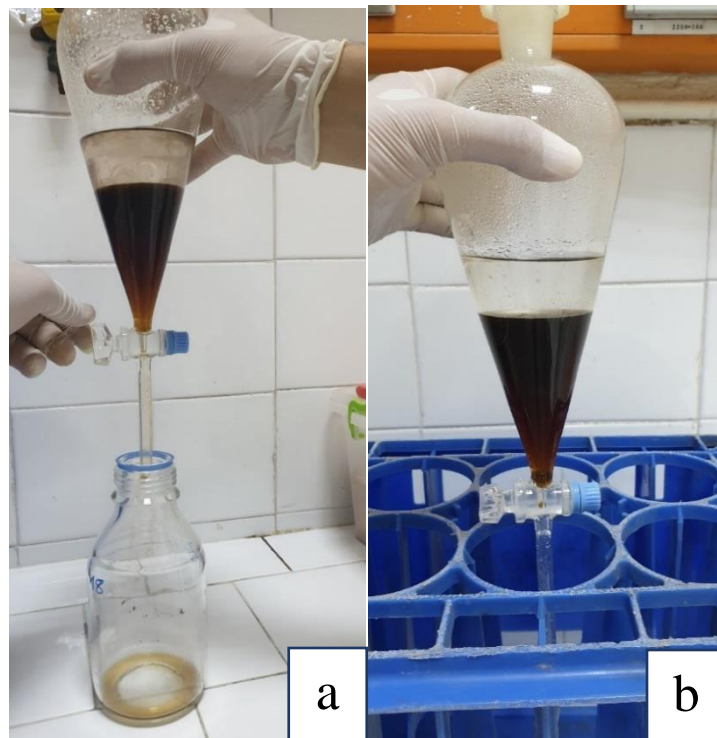
On a inoculé 2 ml de onze suspensions bactériennes différentes dans des flacons stériles contenant 100 ml de milieu ONR7a supplémentés de 1 ml de pétrole brut, les flacons ont ensuite été mis dans le bain marie agitateur à une température de 30°C pendant 25 jours.

Une fois la phase stationnaire est atteinte (10 jours) (Djahnit et al., 2019), on tente de séparer le pétrole brut du reste du milieu à l'aide d'une technique de séparation liquide-liquide, pour ce fait on a besoin d'une ampoule à décanter ainsi que son support. On s'assure que le robinet est bien fermé, on retire le bouchon et on introduit d'abord les 100 ml du milieu contenant notre suspension bactérienne et le pétrole brut dans l'ampoule assise sur le support, ensuite on rajoute 100 ml de dichlorométhane au mélange on ferme bien le bouchon et on prend l'ampoule avec les deux mains, une qui tient l'ampoule et la deuxième main contrôle le robinet, bouchon vers le bas et robinet visé vers un mur, on agite ensuite l'ampoule avec prudence mais en faisant attention à libérer le gaz cumulé à l'intérieur tout simplement en ouvrant et en refermant le robinet, on peut répéter cette étape 2 à 3 fois jusqu'à ce que le gaz soit totalement libéré. Une fois cette étape terminée on s'assure encore une fois que le robinet est bien fermé on remet l'ampoule sur le support et on laisse décanter jusqu'à ce que le pétrole passe totalement du milieu vers le dichlorométhane.

On s'aperçoit que le pétrole qui se lie au dichlorométhane se dépose en bas de l'ampoule alors que le milieu contenant les bactéries reste en haut, ce qui facilite la récupération.

Une fois la séparation finit on met un flacon dans lequel on veut récupérer le pétrole brut, on ouvre le robinet et on laisse passer que le pétrole contenu dans le dichlorométhane visiblement reconnu par sa couleur foncée et on referme le robinet, puis dans un bécher on récupère le milieu transparent qu'on va jeter par la suite.

Une fois la phase organique récupérée, elle est desséchée avec du  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhydre, les hydrocarbures (HAP et alcanes) sont analysés par Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse GC-SM (QP5050 SHIMADZU), avec les conditions opératoires suivantes : Le gaz porteur, utilisé à un débit de 1 ml/min, est l'hélium. La température de l'injecteur a été fixée à 250 °C. Le programme du gradient de la température est comme suit : 2 min à 50 °C, puis la température augmente jusqu'à atteindre 280 °C à raison de 5 °C/min et se stabilise à cette température pendant 15 min. L'injection se fait en mode Split 1/52, le volume injecté est 1  $\mu\text{L}$ . Le pourcentage de biodégradation des souches testées est calculé en incluant les valeurs résiduelles en GC-SM et le témoin abiotique. Cela correspond au rapport entre la quantité de substrat dosée par GC-SM dans les essais et le substrat présent dans les témoins abiotiques à la fin de la période d'incubation et la quantité de substrat initialement introduite afin de valider l'expérience.



**Figure III.15.** a) Décantation de la fraction contenant le pétrole vers le bas de l'ampoule  
b) Récupération du dichlorométhane contenant le pétrole dans un flacon stérile

# **Chapitre IV**

## **résultats et discussion**

## IV. Chapitre IV : résultats et discussion

### IV.1 Caractérisation morphologique des bactéries isolées

Après la fin de la période d'incubation des bactériesensemencées dans les boîtes de pétri, on a étudié l'aspect morphologique et la couleur des colonies qui se sont formées (**Tableau IV-1**).

**Tableau IV.1.** Aspect morphologique des bactéries sélectionnées

Code de la souche	Forme	Couleur	Aspect morphologique	Diamètre (mm)
PSF-5	Bacille	Jaune	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque	1.3 mm
PSF-54	Bacille	Beige	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque	1 mm
PSF-14	Bacille	Jaune	Circulaire, contour irrégulier, convexe, translucide	1 mm
PSF-18	Bacille	Transparente	Circulaire, contour irrégulier, convexe, translucide	1 mm
PSF-12	Bacille	Blanche	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque	1 mm
PSF-13	Bacille	Blanche	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque	1 mm
PSF-21	Bacille	Jaunâtre	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque	1.5 mm
PSF-35	Bacille	Jaune	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque, lisse	2 mm
PSF-90	Bacille	Blanche	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque	1 mm
PSF-6	Bacille	Orangé-rouge	Circulaire, contour régulier, aplati, opaque	2 mm
PSF-42	Bacille	Blanche	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque	1.5 mm
PSF-23	Cocci	Jaune	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque, lisse	2 mm
PSF-26	Bacille	Beige	Circulaire, contour régulier, convexe, opaque	1.4 mm

Les souches ont un aspect circulaire, elles ont majoritairement le contour régulier et sont convexe avec des tailles qui varient de 1mm à 2mm. Ce sont des bacilles à l'exception de la souche PSF-23.

### IV.2 Résultats de l'identification par BLAST

Après comparaison des séquences bactériennes avec les séquences de la banque de données dans Benbank-BLASTn on est arrivés aux résultats représentés dans le tableau (IV-2).

**Tableau IV.2.** Identification des séquences appartenant aux souches bactériennes choisis

Code de la souche	Phylum	Famille	Espèce	Id. (%)	Accession number
PSF-5	Actinobactérie	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium celere</i> strain KMM 3637	99%	NR_025727.1
PSF-54	Protéobactérie	Alcanivoracaceae	<i>Alcanivorax xenomutans</i> strain JC109	99%	NR_133958.1
PSF-14	Protéobactérie	Erythrobacteraceae	<i>Erythrobacter citreus</i> strain RE35F/1	99%	NR_028741.1
PSF-18	Protéobactérie	Alcanivoracaceae	<i>Alcanivorax dieselolei</i> strain B5	99%	NR_074734.1
PSF-12	Protéobactérie	Alcanivoracaceae	<i>Alcanivorax borkumensis</i> strain SK2	99%	NR_074890.1
PSF-13	Protéobactérie	Halomonadaceae	<i>Halomonas venusta</i> strain NBRC 102221	99%	NR_114048.1
PSF-21	Protéobactérie	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> strain BCRC 17751	99%	NR_152090.1
PSF-35	Protéobactérie	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas oceani</i> strain DSM 100277	99%	NR_116172.1
PSF-90	Protéobactérie	Alcanivoracaceae	<i>Alcanivorax borkumensis</i> strain SK2	99%	NR_074890.1
PSF-6	Actinobactérie	Gordoniaceae	<i>Gordonia hongkongensis</i> strain HKU50	99%	NR_152023.1
PSF-42	Protéobactérie	Alteromonadaceae	<i>Marinobacter nitratireducens</i> strain AK21	99%	NR_136469.1
PSF-23	Actinobactérie	Micrococcaceae	<i>Micrococcus yunnanensis</i> strain YIM 65004	99%	NR_116578.1
PSF-26	Protéobactérie	Alteromonadaceae	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> strain ATCC 49840	99%	NR_074619.1

A l'exception de trois bactéries, la majorité des bactéries testées appartiennent aux Protéobactéries qui est un phylum majeur regroupant des bactéries à Gram-négatives. Nos résultats sont compatibles avec les recherches précédentes qui ont trouvées que les protéobactéries constituent le phylum le plus abondant dans plusieurs environnements, notamment le sol (Spain et al., 2009), les sédiments (Mason et al., 2014) et l'eau de mer (Feng et al., 2009). En outre, les protéobactéries se sont avérées être le phylum dominant dans les sites contaminés par des hydrocarbures pétroliers (Zhang et al., 2010 ; Mukherjee et al., 2014). La dominance de ce phylum peut être due à leur membrane lipopolysaccharide qui peut jouer le rôle de biosurfactant (Vasconcellos et al., 2009), ceci se passe en présence de biosurfactants qui peuvent rendre la surface cellulaire plus hydrophobe par la production de lipopolysaccharide, augmentant ainsi l'association de la cellule avec le substrat (Al-Tahhan et al., 2000). Cette étude soutient aussi les recherches existantes, où Gamma-protéobactérie, et dans une moindre mesure Alpha-protéobactérie, deviennent dominantes dans les communautés bactériennes des

écosystèmes marins après une exposition aux hydrocarbures pétroliers (Head et al., 2006 ; Yakimov et al., 2007 ; Greer, 2010 ; Kostka et al., 2011).

En revanche pour les deux bactéries Gram-positives elles appartiennent au phylum Actinobactérie qui est souvent présent dans les milieux marins contaminés par les hydrocarbures mais à des taux inférieurs à ceux des protéobactéries et le fait que ces deux bactéries appartenant au genre *Brevibacterium* et *Gordonia* ont pu pousser en ayant que du pétrole brut comme source unique de carbone est en accord avec les recherches de Yakimov et al (1999, 2004), De Domenico et al (2004) et Pini et al (2007) qui affirment avoir isolé des Actinobactérie à partir de milieux marins contaminés par des hydrocarbures.

### **IV.3 Caractérisations biochimiques des bactéries isolées**

On a effectué Cet ensemble d'expériences dans le but d'étudier les différents mécanismes qui permettent aux bactéries de non seulement survivre dans le milieu marin, mais aussi de se défendre contre les différents risques, internes soit ils ou externes. L'objectif étant de mettre en évidence ce qui permet à de telles bactéries d'être performantes dans la dégradation des hydrocarbures dans le milieu marin par rapport à d'autres, et d'identifier ces derniers.

#### **IV.3.1 Coloration de Gram**

On a trouvé que 8 bactéries (82% des bactéries) étaient des bactéries à Gram<sup>-</sup> et seulement 2 (18%) étaient des bactéries à Gram<sup>+</sup> ce qui est en accord avec les résultats trouvés précédemment par l'identification des séquences ou on a trouvé que la majorité des bactéries appartenait au phylum des Protéobactéries.

**Tableau IV.3.** Résultats de la coloration de Gram

Code de la souche	Bactérie	Résultat du test
PSF-5	<i>Brevibacterium celere</i>	Gram <sup>+</sup>
PSF-54	<i>Alcanivorax xenomutans</i>	Gram <sup>-</sup>
PSF-14	<i>Erythrobacter citreus</i>	Gram <sup>-</sup>
PSF-18	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	Gram <sup>-</sup>
PSF-12	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Gram <sup>-</sup>
PSF-13	<i>Halomonas venusta</i>	Gram <sup>-</sup>
PSF-21	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	Gram <sup>-</sup>
PSF-35	<i>Pseudomonas oceani</i>	Gram <sup>-</sup>
PSF-90	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	Gram <sup>-</sup>
PSF-6	<i>Gordonia hongkongensis</i>	Gram <sup>+</sup>
PSF-42	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	Gram <sup>-</sup>

### IV.3.2 Test de la catalase

Le tableau (IV.4) résume les résultats obtenus durant ce test pour onze différentes bactéries, parmi celles qui ont été les plus performantes en termes de dégradation d'hydrocarbures.

Le résultat des onze bactéries testées revient positif sans exceptions, ce qui signifie que toutes ces bactéries ont la capacité de produire l'enzyme catalase.

La présence de l'enzyme catalase chez une souche bactérienne pure, permet une première orientation dans l'identification de celle-ci, car du fait de la production de l'oxygène par la catalase, elle est absente chez les bactéries anaérobies strictes.

Ce test est donc utile pour différencier entre les bactéries aérobies et anaérobies obligatoires, car ces derniers sont généralement dépourvus de l'enzyme catalase

**Tableau IV.4.** Résultat du test catalase

Bactérie	Résultat du test catalase
<i>Brevibacterium celere</i>	+
<i>Alcanivorax xenomutans</i>	+
<i>Erythrobacter citreus</i>	+
<i>Alcanivorax dieselolei</i>	+
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	+
<i>Halomonas venusta</i>	+
<i>Pseudomonas taiwanesis</i>	+
<i>Pseudomonas oceani</i>	+
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	+
<i>Gordonia hongkongensis</i>	+
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	+

Pour complètement identifier une bactérie il faut d'abord connaître le type respiratoire de cette dernière. Les bactéries Gram + possèdent majoritairement un type respiratoire aéro-anaérobie facultatif, sauf le genre *Micrococcus* qui est un type aérobie strict. Alors que la majorité des bactéries à Gram – ont un type respiratoire aérobie strict possédant donc une catalase positive.

La détection de la présence de la catalase chez les bactéries est essentielle pour différencier différents genres (*Staphylococcaceae* et *Micrococcaceae* catalase-positives des *Streptococcaceae* catalase-négative). Elle permet aussi la distinction entre les espèces appartenant au même genre (*Aerococcus urinae* catalase positif et *Aerococcus viridians* catalase négatif).

Mis à part l'utilité de la catalase dans l'identification des bactéries, elle permet aussi aux bactéries de réparer ou d'échapper aux dommages oxydatifs du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en facilitant la désintoxication cellulaire, en neutralisant les effets bactéricides du peroxyde.

La catalase accélère la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en eau et oxygène (2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Catalase → 2H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub>).

Cette réaction est évidente par la formation rapide de bulles.



**Figure IV.1.** Formation de bulles lors d'un test catalase positif

### IV.3.3 Test d'oxydase

La recherche de l'oxydase est un des critères les plus utilisés pour l'identification des bactéries, surtout celle des bacilles à Gram négatif

**Tableau IV.5.** Résultats du test oxydase

Bactérie	Résultat du test Oxydase
<i>Brevibacterium celere</i>	+
<i>Alcanivorax xenomutans</i>	+
<i>Erythrobacter citreus</i>	+
<i>Alcanivorax dieselolei</i>	+
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	+
<i>Halomonas venusta</i>	-
<i>Pseudomonas taiwanesis</i>	+
<i>Pseudomonas oceani</i>	+
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	+
<i>Gordonia hongkongensis</i>	-
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	+

Les résultats sont positifs pour les bactéries du genre *Brevibacterium*, pour les 4 différentes espèces d'*Alcanivorax*, pour le genre *Erythrobacter* ainsi que *Marinobacter nitratireducens* et les 2 espèces de *Pseudomonas*.

Contrairement aux bactéries du genre *Halomonas* et *Gordonia* qui ont montrées l'incapacité à oxyder le dérivés méthylés du paraphénylène diamine ce qui a résulté en un test négatif.

Ce test consiste à mettre en évidence la capacité de la bactérie testée à oxyder la forme réduite incolore de dérivés méthylés du paraphénylène diamine, en leur forme oxydée rose violacé, grâce à une enzyme dite phénylène diamine oxydase.

Les cytochromes sont des protéines qui appartiennent à la chaîne respiratoire, composée d'une succession de transporteurs d'électrons, en particulier les cytochromes porteurs de coenzymes héminiques.

L'activité oxydasique ainsi déterminée est difficile à attribuer à tel ou tel élément de la chaîne respiratoire bien qu'une correspondance avec un cytochrome C soit avancée par plusieurs auteurs.

Pour un certain nombre de bactéries oxydase négative, possédant donc une chaîne respiratoire complète et fonctionnelle comme les micro-organismes aérobies stricts *Micrococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*. . . mais aussi des bactéries aéro-anaérobies comme les entérobactéries, le cytochrome C est remplacé par un autre cytochrome ne possédant pas la capacité de réagir avec le réactif utilisé.

De ce fait le terme de cytochrome oxydase pose donc problème : la cytochrome oxydase est la dernière enzyme de la chaîne respiratoire qui assure le transfert des électrons sur l'oxygène (ou un autre oxydant minéral). Le terme d'oxydase est, d'autre part, réservé aux enzymes utilisant l'oxygène comme substrat. . . En bactériologie, il faut donc comprendre le terme d'oxydase comme la présence d'une enzyme réagissant avec un dérivé méthylé du paraphénylène diamine.



**Figure IV.2.** Aspect d'un résultat positif du test d'oxydase

## **IV.4 Production des biosurfactants**

Les bactéries produisent une large gamme de produits extracellulaires aux propriétés et applications multiples. Les biosurfactants sont l'un de ces composés amphiphiles extracellulaires produits par les bactéries, les levures et les champignons, en particulier lorsqu'ils sont cultivés sur des substrats hydrophobes.

Plusieurs méthodes différentes sont utilisées pour étudier les biosurfactants, parmi eux on a choisi trois méthodes différentes qui ont pour objectif, la mise en évidence et la quantification des biosurfactants produits par les micro-organismes.

### **IV.4.1 Drop collapse test**

La méthode du drop collapse est une méthode sensible à la présence des biosurfactants et facile à réaliser, elle nécessite qu'un petit volume ( $\sim 5\mu\text{l}$ ) de culture bactérienne ou de solution de biosurfactants pour tester la propriété du tensioactif.

Tableau IV.7. Résultat du Drop Collapse Test

Numéro du puits	La bactérie	Résultats
D6	Témoin	-
A2	<i>Halomonas venusta</i>	+
A3	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	+
A4	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	+
A5	<i>Erythrobacter citreus</i>	+
A6	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	+
A7	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	+
A8	<i>Alcanivorax xenomutans</i>	+
A9	<i>Brevibacterium celere</i>	+
A10	<i>Gordonia hongkongensis</i>	+
A11	<i>Pseudomonas oceani</i>	+
A12	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	+

Résultat + : l'apparition d'un mélange.

Résultat - : l'apparition de deux phases

Les résultats trouvés du drop collapse test étaient positifs pour tous les puits contenant les bactéries, à l'exception du blanc qui est dépourvu de suspension bactérienne, ce test ne permet qu'une mise en évidence et non pas la quantification des biosurfactants.



Figure IV.3. Résultat du drop collapse test sur microplaque

#### IV.4.2 Indice d'émulsification E24

L'indice d'émulsification E24 et l'activité d'émulsification sont des tests de dépistage pour mesurer la capacité d'émulsification de toute molécule tensioactive avec différents hydrocarbures (Jagtap et al., 2010).

Tableau IV.6. Pourcentage d'émulsification E24

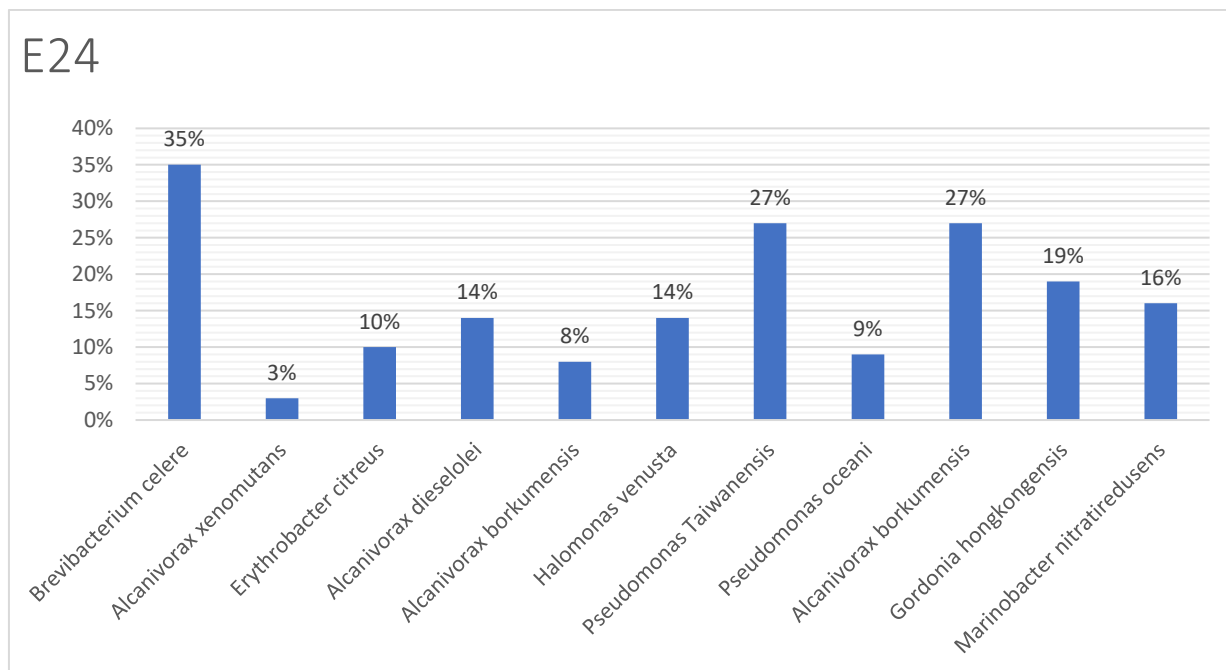
Bactérie	Phase émulsifiée (Cm)	Phase totale (Cm)	Pourcentage d'émulsification
<i>Brevibacterium celere</i>	1.1	3.1	35%
<i>Alcanivorax xenomutans</i>	0.1	3.3	3%
<i>Erythrobacter citreus</i>	0.3	3	10%
<i>Alcanivorax dieselolei</i>	0.5	3.5	14%
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	0.3	3.7	8%
<i>Halomonas venusta</i>	0.5	3.5	14%
<i>Pseudomonas Taiwanensis</i>	1	3.7	27%
<i>Pseudomonas oceani</i>	0.3	3.2	9%
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	0.8	3	27%
<i>Gordonia hongkongensis</i>	0.6	3.1	19%
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	0.5	3.1	16%

Selon les résultats obtenus on s'aperçoit que *Brevibacterium celere* qui appartient au phylum Actinobactérie est la souche la plus active de toutes nos bactéries avec un indice d'émulsification de 35%, dépassant ainsi les bactéries appartenant au phylum Protéobactérie avec ces deux représentants *P. taiwanesis* et *A. borkumensis* qui ont montrées le meilleur pourcentage d'émulsification du phylum avec 27% d'activité.

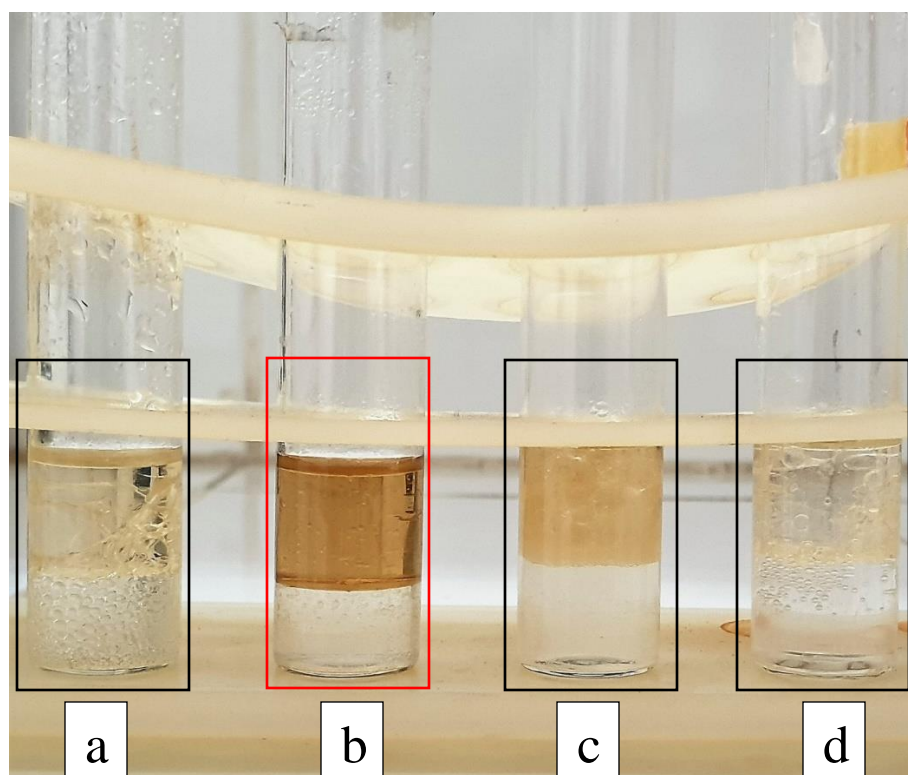
En parallèle on trouve que les bactéries ayant les indices les plus faibles font non seulement partie des Protéobactéries, mais encore plus intéressant ils font partie des mêmes genres en tête du phylum qui sont *Alcanivorax* et *Pseudomonas*. Avec *A. xenomutans* montrant un pourcentage d'émulsification de 3% suivit d'*Alcanivorax borkumensis* et *P.oceani* qui ont montrées une activité de 8% et 9% respectivement.

Cet indice augmente avec le taux de croissance bactérienne et la production de biosurfactant, ce qui représente la capacité de dégradation de la bactérie (Ebadi et al., 2021).

Ces résultats sont compatibles avec ceux de Djahnit et al (2019), qui ont trouvés qu'*A.Borkumensis* était la souche la plus active du phylum Proteobacteria. Et de ceux de Ebadi et al (2021) qui ont montré que parmi 22 bactéries testés *Brevibacterium celere* était la souche la plus active en termes de production de biosurfactants avec l'indice d'émulsification E24 le plus important de l'étude.



**Figure IV.4.** Histogramme représentant l'indice d'émulsification E24

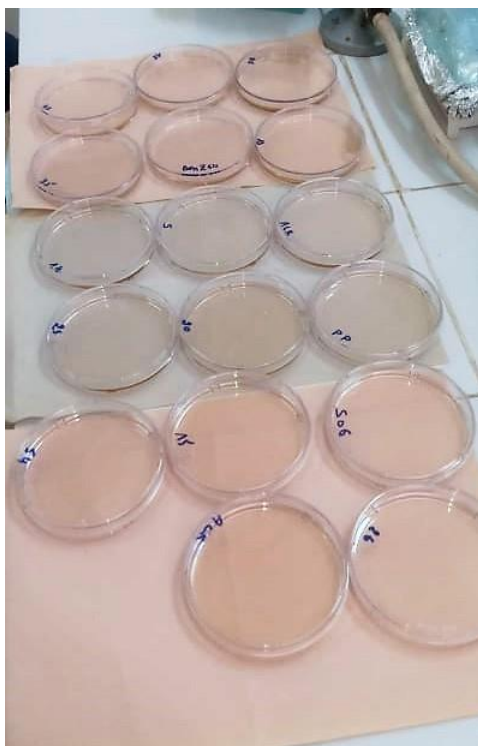


**Figure IV.5.** a, c, d) Résultat positif du test d'émulsification et formation d'une couche émulsifiée. b) Résultat négatif et absence d'une couche émulsifiée

### IV.4.3 Le test de déplacement

Une des méthodes utilisées pour quantifier la production des biosurfactants par les bactéries hydrocarbonoclastes, est la méthode de déplacement du pétrole. Cette méthode ne nécessite pas d'équipement spécialisé ou de produits chimiques, elle est très simple à réaliser, mais elle s'est avérée plus rapide et plus fiable que les autres méthodes (Zhao et al., 2016).

Selon Morikawa et al (2000), la surface de déplacement de l'huile dans le test est directement proportionnelle à la concentration du biosurfactant dans la solution.



**Figure IV.6.** Test de déplacement effectué sur des boîtes de pétries

**Tableau IV.8.** Diamètre du test de déplacement du pétrole

Les bactéries	Le diamètre
Témoin	<b>0 cm</b>
<i>Halomonas venusta</i>	<b>1.5 cm</b>
<i>Alcanivorax dieselolei</i>	<b>2.1 cm</b>
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	<b>0.3 cm</b>
<i>Erythrobacter citreus</i>	<b>0.5 cm</b>
<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	<b>3 cm</b>
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	<b>2.7 cm</b>
<i>Alcanivorax xenomutans</i>	<b>0.2 cm</b>
<i>Brevibacterium celere</i>	<b>1.2 cm</b>
<i>Gordonia hongkongensis</i>	<b>1.6 cm</b>
<i>Pseudomonas oceani</i>	<b>0.3 cm</b>
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	<b>0.3cm</b>

Les résultats obtenus au cours de ce test montrent qu'on a six bactéries qui ont dépassé les 1 cm de diamètre, qu'on considère comme étant de fortes productrices de biosurfactants, ces bactéries sont *H. venusta*, *A. dieselolei*, *P. taiwanensis*, *A. borkumensis*, *Brevibacterium celere* et *G. hongkongensis*.

*P. taiwanensis* et *A. borkumensis* ont de loin étaient les plus performantes avec 3 cm et 2.7 cm de diamètre respectivement.

Les résultats obtenus par ces trois méthodes de détection et quantification des biosurfactants, sont en corroboration les uns avec les autres, on n'a pas eu de résultats contradictoires entre ces tests ce qui est en accord avec les résultats obtenus par [Thavasi et al \(2011\)](#).

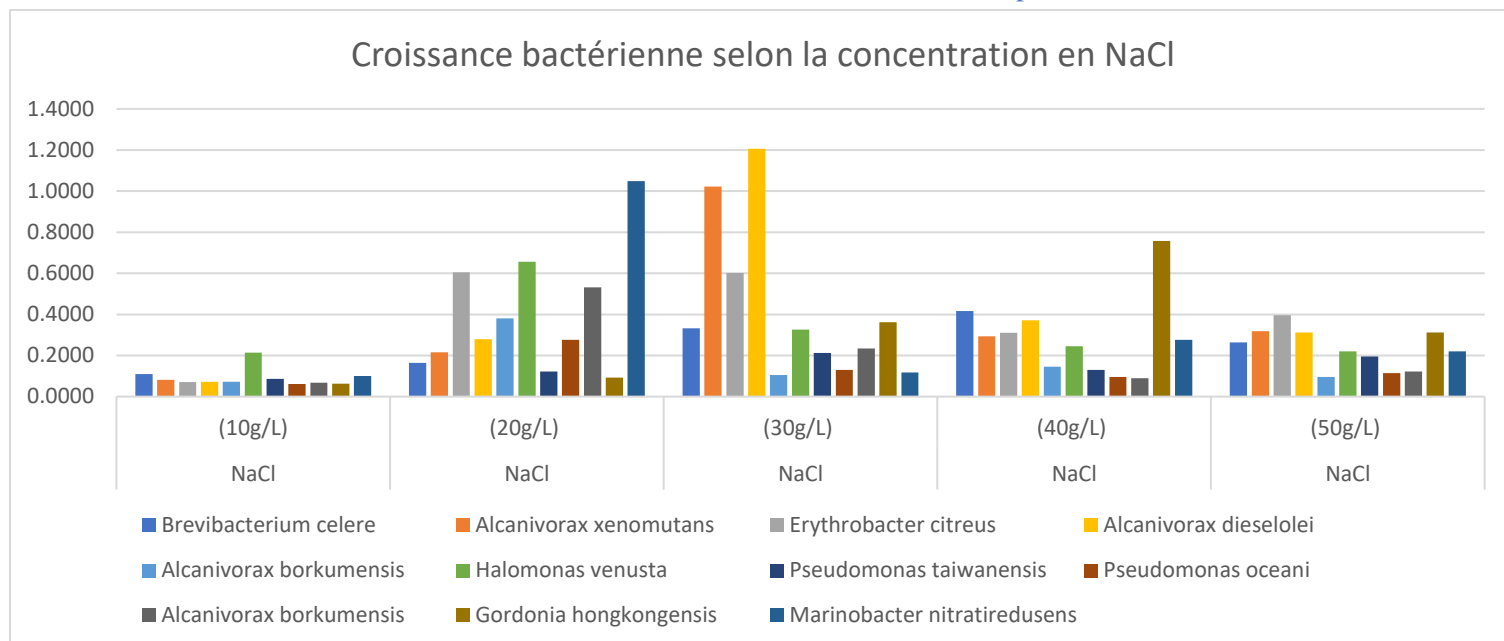
Dans certaines recherches, il a été trouvé que des résultats contradictoires pouvaient être enregistrés entre différentes méthodes de détection et de quantification des biosurfactants. Cela pourrait s'expliquer par le fait que certaines cellules bactériennes agissent elles-mêmes comme des biosurfactants (Hommel, 1994) et présentent une hydrophobie cellulaire élevée, mais ne produisent pas de biosurfactants extracellulaires.

## IV.5 Test de l'halotolérance

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau IV.9.** La Croissance bactérienne en fonction de la concentration en NaCl

Absorbance à une Densité-Optique de 600 nm						
N°	Bactérie	NaCl (10g/L)	NaCl (20g/L)	NaCl (30g/L)	NaCl (40g/L)	NaCl (50g/L)
1	<i>Brevibacterium celere</i>	0.110	0.165	0.333	0.417	0.264
2	<i>Alcanivorax xenomutans</i>	0.082	0.215	1.022	0.293	0.318
3	<i>Erythrobacter citreus</i>	0.071	0.605	0.602	0.310	0.396
4	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	0.072	0.279	1.206	0.372	0.312
5	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	0.072	0.381	0.106	0.146	0.095
6	<i>Halomonas venusta</i>	0.214	0.657	0.326	0.245	0.220
7	<i>Pseudomonas taiwanesis</i>	0.086	0.121	0.212	0.129	0.195
8	<i>Pseudomonas oceani</i>	0.062	0.276	0.130	0.095	0.114
9	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	0.068	0.531	0.235	0.089	0.122
10	<i>Gordonia hongkongensis</i>	0.063	0.093	0.362	0.757	0.312
11	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	0.101	1.049	0.117	0.276	0.221

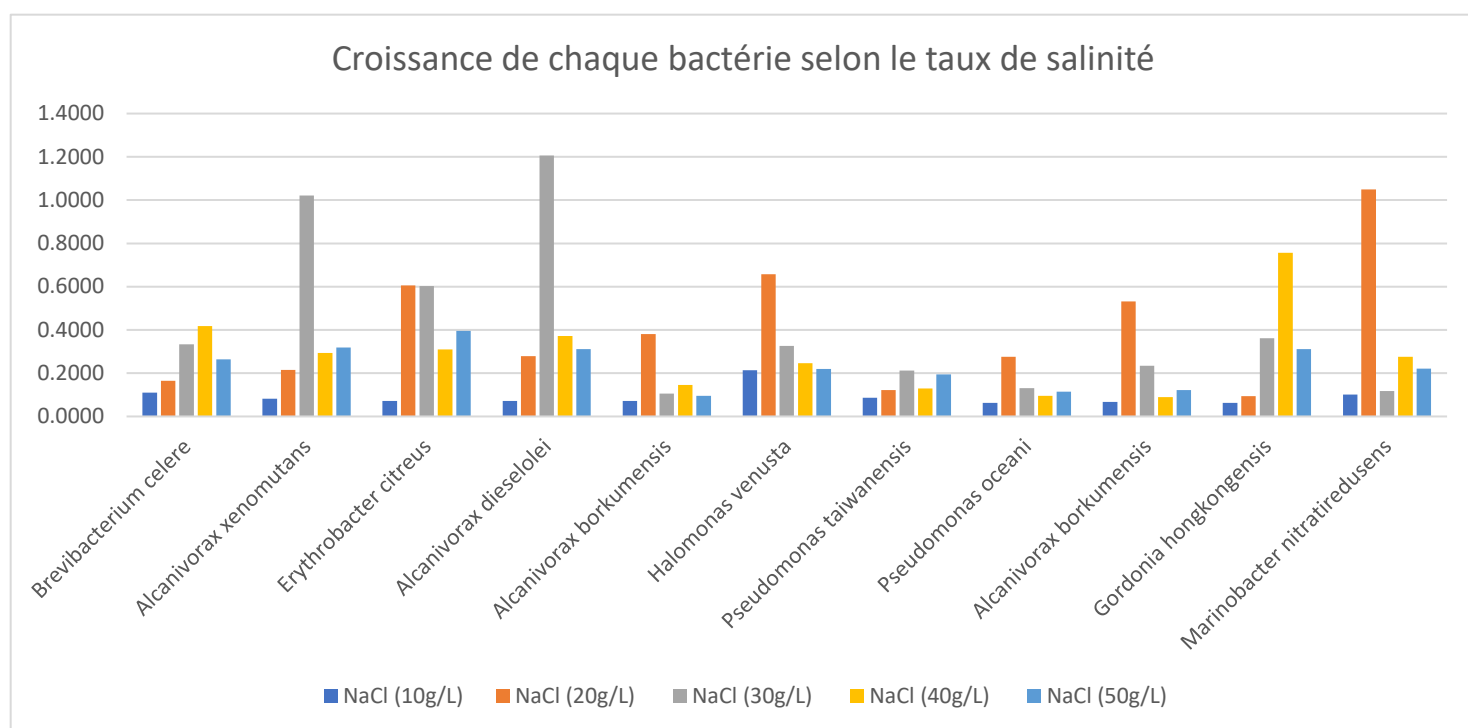


**Figure IV.7.** Histogramme montrant la croissance bactérienne en fonction de la concentration en NaCl

Les résultats obtenus par cette étude, indiquent que différentes bactéries ont différents optimums en ce qui concerne les taux de salinités, et qu'en s'éloignant de ces optimums que ça soit en augmentant ou en réduisant la salinité du milieu, on observe une diminution de la croissance bactérienne.

On arrive à remarquer que la croissance bactérienne est faible dans les milieux supplémentés de 10 g/L de NaCl à travers toutes les bactéries, et à fur et à mesure que la concentration de NaCl augmente dans les milieux, la croissance des bactéries suit en une relation de corrélation jusqu'à ce que l'optimum de salinité est atteint pour chaque bactérie. Cet optimum varie entre 20 g/L et 30 g/L pour la majorité de nos bactéries à l'exception de *Gordonia hongkongensis* pour laquelle, le maximum de croissance a été enregistré à 40 g/L de NaCl. Ces résultats sont logiques, du fait que ces taux de salinité se rapproches le plus de la salinité de l'eau de mer, qui est en moyenne de 35 PSU. Mais trop de NaCl a un effet toxique sur les bactéries, ce qui explique les résultats faibles obtenues dans les milieux dont la concentration en NaCl est de 50 g/L. Néanmoins le fait que ces bactéries ont pu pousser dans les différentes concentrations de salinité, signifie qu'une solution de bioremédiation peut être élaborée quelques soit la salinité du milieu contaminé, en ajustant la composition des bactéries de façon à ce qu'elle correspond à la salinité du milieu. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenues par [Bertrand et al \(1993\)](#) et [Reichelet et Baumann \(1974\)](#).

Reichelet et Baumann (1974), ajoutent aussi que l'effet du NaCl sur le taux de croissance et le rendement varie selon la source de carbone utilisée, ce qui signifie que les optimums de salinités obtenues au cours de cette étude, peuvent être relatifs à la constitution et le type d'hydrocarbure utilisé.



**Figure IV.8.** Histogramme représentant la croissance de chaque bactérie en fonction du taux de salinité

## IV.6 Croissance sur différentes sources de carbone

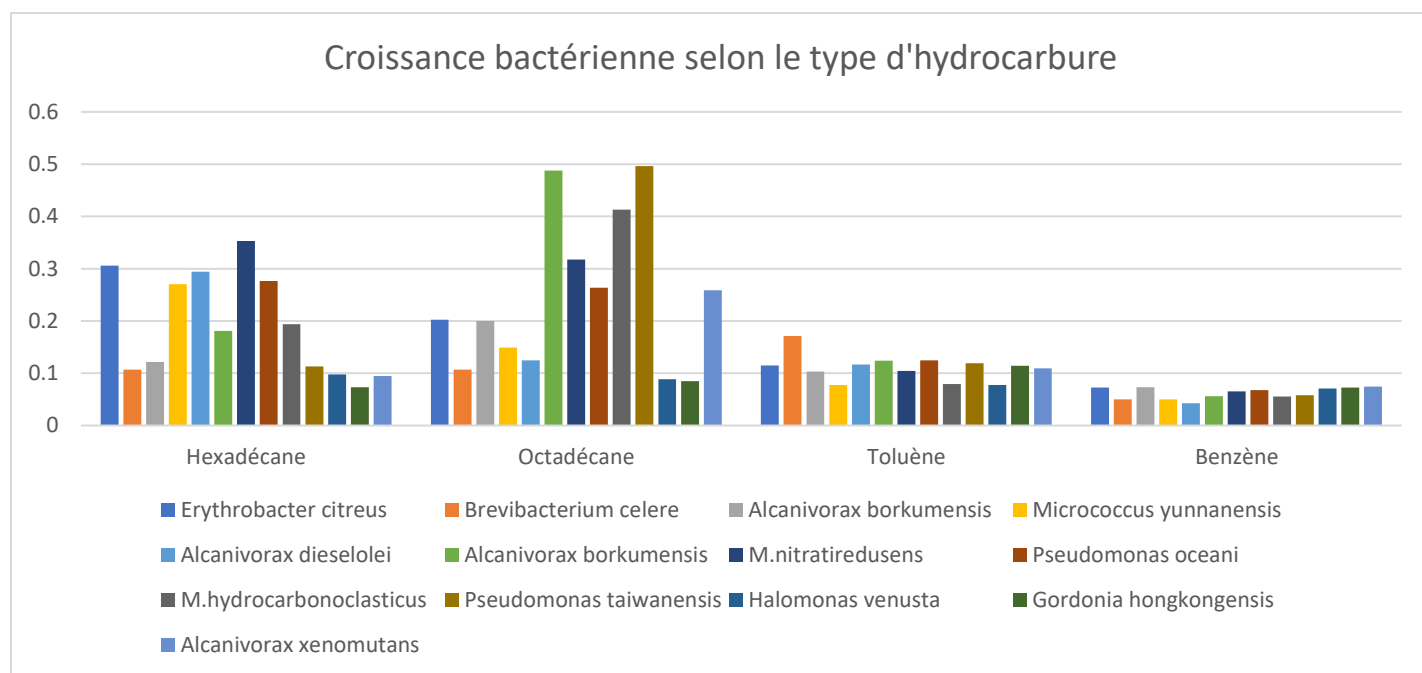
Dans le but d'identifier si la composition des hydrocarbures avait un effet sur la croissance et le rendement des bactéries hydrocarbonoclastes, on a inoculé les bactéries dans des tubes à essais contenant un de ces 4 hydrocarbures comme unique source de carbone : l'hexadécane, l'octadécane, le toluène et le benzène.

L'hexadécane et l'octadécane étant des alcanes à chaîne linéaire, ils sont définis en tant qu'hydrocarbures aliphatique, leurs formules chimiques sont respectivement  $C_{16}H_{34}$  et  $C_{18}H_{38}$ .

Alors que le benzène et le toluène sont des hydrocarbures aromatiques, ces derniers ont un cycle benzène, qui est aussi appelé un anneau aromatique. Leurs formules chimiques sont respectivement  $C_6H_6$  et  $C_7H_8$ .

**Tableau IV.10.** Croissance bactérienne selon le type d'hydrocarbure (D.O = 600 nm)

N°	Bactérie	Hexadécane	Octadécane	Toluène	Benzène
1	<i>Brevibacterium celere</i>	0.107	0.107	0.171	0.050
2	<i>Alcanivorax xenomutans</i>	0.095	0.259	0.110	0.075
3	<i>Erythrobacter citreus</i>	0.306	0.203	0.115	0.072
4	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	0.294	0.125	0.117	0.043
5	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	0.181	0.488	0.124	0.056
6	<i>Halomonas venusta</i>	0.098	0.089	0.078	0.071
7	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	0.113	0.496	0.119	0.058
8	<i>Pseudomonas oceani</i>	0.276	0.264	0.125	0.068
9	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	0.122	0.200	0.103	0.073
10	<i>Gordonia hongkongensis</i>	0.074	0.085	0.114	0.072
11	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	0.353	0.318	0.105	0.065
12	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	0.271	0.149	0.078	0.050
13	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	0.194	0.413	0.079	0.056



**Figure IV.9.** Histogramme représentant la croissance bactérienne selon l'hydrocarbure

En regardant ce graphe, il est assez clair que chacune des bactéries montre une croissance spécifique au type d'hydrocarbure utilisé en tant que source de carbone unique.

Les bactéries *Erythrobacter citreus*, *Micrococcus yunnanensis* et *Alcanivorax dieselolei* montrent une croissance accrue dans les milieux où la source de carbone est l'hexadécane.

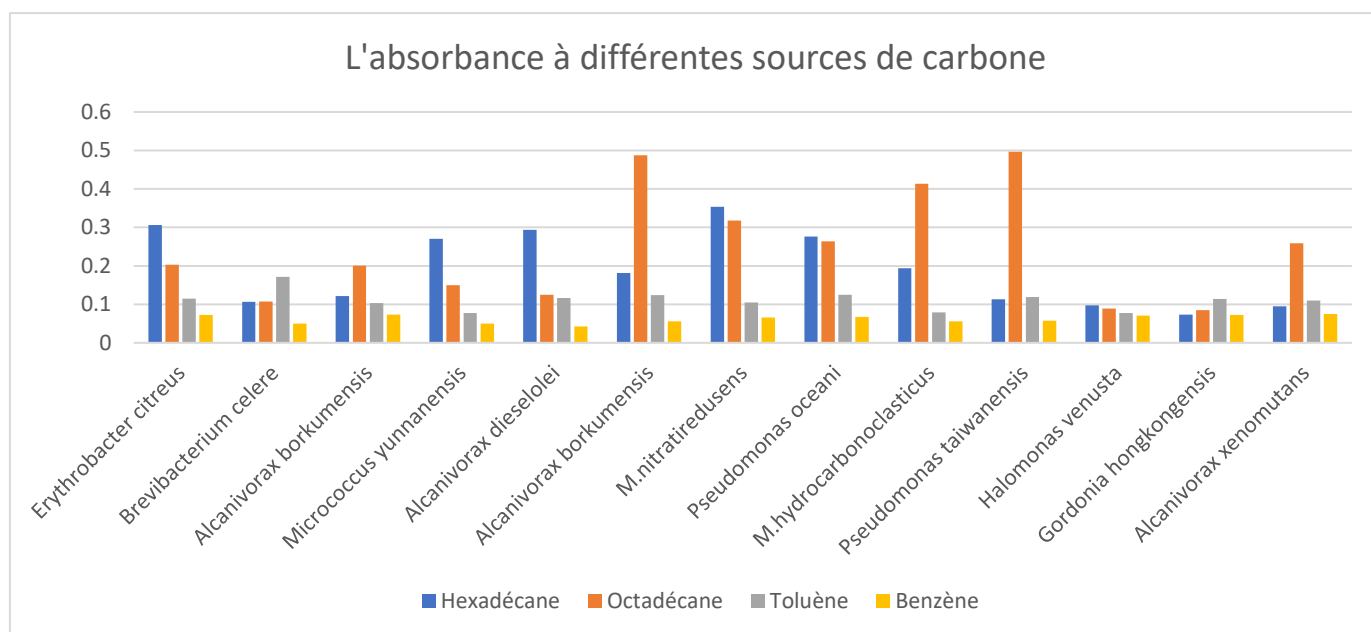
Alors que les bactéries *Alcanivorax borkumensis*, *Alcanivorax xenomutans*, *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* et *Pseudomonas taiwanensis* semblent préférer l'octadécane comme source de carbone.

Par contre *Brevibacterium celere* et *Gordonia hongkongensis* ont montrées une croissance accrue dans les milieux contenant du toluène comme hydrocarbure.

On a d'autres bactéries comme *Marinobacter nitratireducens* et *Pseudomonas oceani* qui montrent le même degré de croissance à la fois dans les milieux supplémentés par l'hexadécane et ceux supplémentés par l'octadécane, en plus de *Halomonas venusta* qui montre une croissance stable sur les 4 différentes sources d'hydrocarbures même si cette croissance est en quelques sortes faible.

Par contre on a observé une croissance réduite de toutes les bactéries sur les milieux ayant du benzène comme unique source de carbone.

Ces résultats sont compatibles avec ceux trouvés par [Rajaei et al \(2013\)](#), qui indiquent que la majorité des bactéries hydrocarbonoclastes, sont capables d'utiliser les hydrocarbures aliphatiques comme source de carbone et d'énergie, alors que les hydrocarbures aromatiques posent souvent des problèmes lors de la bioremédiation car ils sont beaucoup plus résistants à la biodégradation. Ceci peut être due à l'expression de gènes spécifiques responsables de la dégradation des alcanes, et l'absence des gènes responsables de la dégradation des Hydrocarbures polycycliques chez ces bactéries.



**Figure IV.10.** Histogramme représentant la croissance de chaque bactérie en fonction des différentes sources de carbone

## IV.7 Production de biofilms

On a testé ces onze bactéries pour voir si elles sont capables de produire un biofilm bactérien, 3 réplicas ont été effectués pour avoir des résultats statistiquement quantifiables.

Pour faciliter la mise en évidence à l'œil nu on a comparé le degré de couleur à celui obtenu du blanc.

Tableau IV.11. Résultats du test de production des biosurfactants

Bactérie	Numéro des puits			Production de biofilm
	A-1	A-2	A-3	
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	A-1	A-2	A-3	++
<i>Alcanivorax dieselolei</i>	A-4	A-5	A-6	+++
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	A-7	A-8	A-9	++
<i>Halomonas venusta</i>	A-10	A-11	A-12	+++
<i>Erythrobacter citreus</i>	B-1	B-2	B-3	++
<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	B-4	B-5	B-6	++
<i>Alcanivorax xenomutans</i>	B-7	B-8	B-9	+++
<i>Brevibacterium celere</i>	B-10	B-11	B-12	++
<i>Gordonia hongkongensis</i>	C-1	C-2	C-3	+++
<i>Pseudomonas oceani</i>	C-4	C-5	C-6	+++
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	C-7	C-8	C-9	+++
Témoin	C-10	C-11	C-12	-

Pas de production (-) // Faible (+) // Modérée (++) // Elevée (+++)

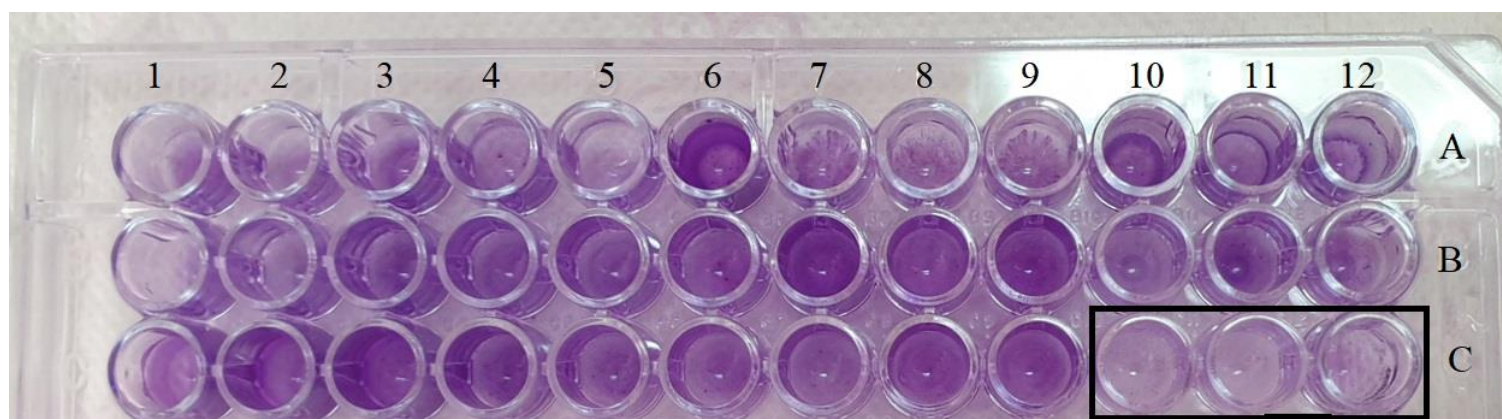


Figure IV.11. Coloration et mise en évidence de la formation des biofilms par le violet de gentiane

Blanc

On a eu des résultats positifs en ce qui concerne toutes les bactéries, cela signifie que ces bactéries sont capables de former des biofilms qui leurs permettent un meilleur accès aux hydrocarbures pour pouvoir facilement les dégrader et les utiliser comme source de carbone et d'énergie. Ceci est en accord avec les recherches précédentes qui ont trouvés, que les espèces d'*Alcanivorax* possèdent une multitude d'adaptations pour dégrader le pétrole à diverses températures et salinités (synthèse de biosurfactants et formation de biofilms sur les gouttelettes de pétrole (Schneiker et al., 2006)).

## IV.8 Test de dégradation

**Tableau IV.12.** Résultat de la biodégradation des hydrocarbures aliphatique et aromatiques

Provenance	Bactérie	% de dégradation aliphatique (C10-C39)	% de dégradation aromatique
Eau de mer	<i>Brevibacterium celere</i>	45%	13%
Sédiment	<i>Alcanivorax xenomutans</i>	56%	33%
Eau de mer	<i>Erythrobacter citreus</i>	55%	57%
Sédiment	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	52%	67%
Eau de mer	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	39%	19%
Eau de mer	<i>Halomonas venusta</i>	20%	25%
Eau de mer	<i>Pseudomonas taiwanesis</i>	35%	21%
Eau de mer	<i>Pseudomonas oceani</i>	35%	23%
Eau de mer	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	42%	39%
Sédiment	<i>Gordonia hongkongensis</i>	45%	26%
Sédiment	<i>Marinobacter nitratireducens</i>	40%	21%

Pour les % de dégradation des aliphatiques ça part de C10 à C39

Pour les % de dégradation des aromatiques ça concerne le Naphtalene, phenantrene, pyrene, benzo(a)pyrene

On a trouvé que les bactéries *Alcanivorax xenomutans*, *Erythrobacter citreus* et *Alcanivorax dieselolei* ont étaient les plus performantes en termes de biodégradation des hydrocarbures aliphatique. Suivit du reste des bactéries avec des taux de dégradations compris entre 35% et 45% à l'exception de *Halomonas venusta* qui était la plus faible avec uniquement 20% de dégradation aliphatique, ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par [Gao et al \(2015\)](#) qui ont trouvé des taux similaires avec environs 50% de dégradation du pétrole pour la bactérie *Erythrobacter citreus*, et avec ceux de [Abraham et al \(1998\)](#) qui ont trouvés que les bactéries du genre *Alcanivorax* ont été confirmées comme étant d'importants dégradateurs d'alcanes marins.

En ce qui concerne les taux de dégradation des hydrocarbures aromatiques on a observé que les deux bactéries *Erythrobacter citreus* et *Alcanivorax dieselolei* ont eu d'aussi bons pourcentages, que ceux qu'on a eu pour la dégradation aliphatique avec des taux de 57% et 67% respectivement, alors que 73% des bactéries ont montrés des difficultés à dégrader les hydrocarbures aromatique par rapport aux aliphatique avec *Brevibacterium celere* montrant le taux le plus faible avec seulement 13% de dégradation aromatique par rapport à 45% de dégradation aliphatique.

On constate aussi que le genre *Alcanivorax* est le plus performant en termes de dégradation des HAPs avec des taux allant de 33% jusqu'à 67% en excluant une des souches *Alcanivorax borkumensis* qui a montré un résultat plus ou moins faible avec 19% de dégradation. Cela explique la raison pour laquelle des souches du genre *Alcanivorax* sont considérés comme étant parmi les bactéries prédominantes dans la dégradation des HAPs dans l'eau de mer ([Cui et Shao, 2009](#)).

La capacité de ces bactéries à dégrader les hydrocarbures dépends d'un nombre de gènes, qui codent pour différentes protéines qui vont métaboliser les hydrocarbures en carbone et en énergie.

Ces résultats ont montré qu'une solution de bioremédiation qui s'appuie sur l'utilisation de consortiums bactériens pour la dépollution des eaux de mers contaminés par les hydrocarbures

n'est pas à sous-estimé, car non seulement c'est une solution écologique et naturelle, elle est très efficace.

Si on devait spéculer à partir de nos résultats sur une formation d'un consortium efficace formé à partir des bactéries étudiées dans ce travail, on pense qu'il est important d'avoir des bactéries performantes en termes de dégradation des hydrocarbures tel que *Enythrobacter citreus* et *Alcanivorax dieselolei* qui ont montrés d'importants taux de dégradation à la fois des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques. Mais il est aussi important d'avoir des bactéries performantes en termes de production des biosurfactants dans ce consortium tel que *Brévibacterium celere*, *pseudomonas taiwanensis* et *Alcanivorax borkumensis*, mais ceci n'est que spéculative et une étude convenable reste à être effectuer avec les bactéries mentionnées pour aboutir une affirmation de l'hypothèse avancée.

# Conclusion

## Conclusion et perspectives

La dépollution biologique des milieux aqueux contaminés par les hydrocarbures pétroliers nécessite des microorganismes efficaces dans la remédiation biologique. Les bactéries hydrocarbonoclastes sont des microorganismes qui se nourrissent typiquement des hydrocarbures, ils ont la capacité de produire des surfactants naturels qui stimulent l'accès à la source de carbone complexe pour un bon processus de bioremédiation de l'écosystème pollué.

À ce titre, l'objectif de notre travail consiste à déterminer des critères que possèdent ces bactéries. Les 13 souches utilisées dans le cadre de notre travail ont été isolées à partir d'eau de mer et sédiment du port de Sidi Fredj (Alger), qui est soumis à une pollution chronique par les hydrocarbures et constitue donc un milieu propice à la croissance des bactéries hydrocarbonoclastes elles ont été identifiées par la suite dans un travail précédent (Djahnit et al., 2019). Les bactéries isolées et identifiées dans le présent travail pourraient servir à constituer des consortiums de microorganismes utilisables dans la bioremédiation de tels milieux.

Les résultats obtenus ont montré que :

- La majorité des souches utilisées sont des bacilles à Gram négatif appartenant au phylum des protéobactéries à l'exception de PSF-23 qui est cocci à Gram positif ;
- La croissance bactérienne en présence de différent type d'hydrocarbure, montre que la majorité des bactéries sont capables d'utiliser ces hydrocarbures comme unique source de carbone. Les hydrocarbures aliphatiques sont rapidement et facilement biodégradés par rapport aux hydrocarbures aromatiques ;
- Selon les trois méthodes de mise en évidence et quantification des biosurfactants, les résultats montrent que toutes les souches bactériennes utilisées possèdent le pouvoir de production de biosurfactant. La quantité de ce dernier diffère d'une bactérie à une autre ;
- La mise évidence de la formation des biofilms par le violet de gentiane montre que toutes les souches utilisées sont capables de former des biofilms ce qui facilite la dégradation des hydrocarbures.
- L'étude de la biodégradation des hydrocarbures a montré que l'efficacité de ce processus dépend de la souche utilisée et son affinité vis-à-vis l'hydrocarbure dominant dans la zone de pollution.

A la lumière des résultats synthétisés il est souhaitable de compléter ce travail par des approches plus approfondies, à savoir :

- L'étude de la cinétique de la croissance bactérienne en présence d'hydrocarbures pour optimiser les temps d'incubation par rapport aux bactéries utilisés pour une éventuelle utilisation dans la bioremédiation à grande échelle.
- Etudier le pouvoir de biodégradation de consortiums bactériens au lieu d'une étude qui vise des bactéries individuellement isolées, car ceci est beaucoup plus représentatif d'une situation de remédiation naturelle dans le milieu marin, et elle peut s'avérer beaucoup plus efficace aussi.
- Et pour compléter le point précédent il serait intéressant de combiner entre différentes souches bactériennes pour aboutir aux meilleures combinaisons possibles pour la biodégradation des hydrocarbures
- Il serait préférable aussi de compléter ce travail avec des études plus approfondies des paramètres physico-chimiques influençant la croissance et le rendement des bactéries hydrocarbonoclastes tel que la température, le pH, la pression, l'agitation...etc.
- Une étude des propriétés physico-chimiques des biosurfactants pour mieux comprendre leur nature et leur structure.
- Une quantification réelle de la quantité de biofilm produite par les bactéries hydrocarbonoclastes.
- L'application d'une extraction plus efficace et fiable.
- Tester le pouvoir dégradant des souches avec d'autres rejets industriels.
- Étudier la composition des communautés microbiennes aptes à dégrader le polluant pour comprendre le mode de fonctionnement de leur métabolisme afin de dégrader le pétrole.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

- **Abraham, W. R., Meyer, H., & Yakimov, M. (1998).** Novel glycine containing glucolipids from the alkane using bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1393(1), p.p. 57-62.
- **Afi, A. (2010).** Étude de la structure des communautés bactériennes du sédiment et de l'écologie de *Vibrio aestuarianus* pathogène de l'huître creuse *Crassostrea gigas* dans deux sites ostréicoles. Thèse de doctorat. Microbiologie. Université de Bretagne occidentale : École doctorale des sciences de la mer. p. 271
- **Ahimou, F., Paquot, M., Jacques, P., Thonart, P., & Rouxhet, P. G. (2001).** Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*. *Journal of microbiological methods*, 45(2), p.p. 119-126.
- **Aissat, N., Cheikh.O. (2013).** Évaluation de la qualité (microbiologie, métaux lourds, granulométrie et hydrocarbures) des sédiments de dragage du port de Sidi Fredj en vue d'une immersion. Mémoire d'ingénieur. Environnement marin. Alger : ENSSMAL. p. 77
- **Al-ArajiL., Abd Rahman R. N. Z. R., Basri, Salleh M. A. B. (2007).** Minireview: Microbial Surfactant. (*AsPac*) *J. Mol. Biol. Biotechnol.*, Vol. 15, p.p. 99-105.
- **Alexandre, G. (2010).** Coupling metabolism and chemotaxis-dependent behaviours by energy taxis receptors. *Microbiology*, 156(8), p.p. 2283-2293.
- **Alisi, C., Musella, R., Tasso, F., Ubaldi, C., Manzo, S., Cremisini, C., & Sprocati, A. R. (2009).** Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Science of the Total Environment*, 407(8), p.p. 3024-3032.
- **Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A., & Maier, R. M. (2000).** Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), p.p. 3262-3268.
- **Appanna, V. D., Finn, H., & Pierre, M. S. (1995).** Exocellular phosphatidylethanolamine production and multiple-metal tolerance in *Pseudomonas fluorescens*. *FEMS Microbiology letters*, 131(1), p.p. 53-56.
- **Asia, L. (2012).** Analyse des hydrocarbures dans des sédiments superficiels de zones côtières Méditerranéennes (Golfe de Fos, Rade de Marseille et Massif des Calanques). Thèse de Doctorat. Chimie Analytique. Aix-Marseille : 'Université d'Aix-Marseille.175 p.

- **Atlas, R. M. (1991).** Microbial hydrocarbon degradation—bioremediation of oil spills. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 52(2), p.p. 149-156.
- **Awasthi, N., Kumar, A., Makkar, R., & Cameotra, S. S. (1999).** Biodegradation of soil-applied endosulfan in the presence of a biosurfactant. *Journal of Environmental Science & Health Part B*, 34(5), p.p. 793-803.
- **Azubuike, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016).** Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(11), p.p. 1-18.
- **Bakke, R., Trulear, M. G., Robinson, J. A., & Characklis, W. G. (1984).** Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: steady state. *Biotechnology and bioengineering*, 26(12), p.p. 1418-1424.
- **Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000).** Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(5), p.p. 495-508.
- **Batista, S. B., Mounter, A. H., Amorim, F. R., & Totola, M. R. (2006).** Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource technology*, 97(6), p.p. 868-875.
- **BEKENNICHE, N. (2014).** Caractérisation des activités de biodégradation des hydrocarbures par différents genres microbiens isolés de sites contaminés. Mémoire de magister. Biologie moléculaires et génétique des microorganismes. Oran : université d’Oran, faculté des sciences de la nature et e la vie. p. 129
- **Bertrand, J. C., Bianchi, M., Al Mallah, M., Acquaviva, M., & Mille, G. (1993).** Hydrocarbon biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 168(1), p.p. 125-138.
- **Bodour, A.A. and Miller-Maier, R.M. (1998).** Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 32(3), p.p. 273-280.
- **Boudoune, M, Boualem Y. (2018).** Étude de la production des biosurfactants par des bactéries hydrocarbonoclastes. Mémoire de master. Biologie moléculaire des microorganismes. Constantine : université des frères Mentouri, faculté des sciences de la nature et de la vie. p. 63
- **Cameotra, S. S., & Makkar, R. S. (2004).** Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current opinion in microbiology*, 7(3), p.p. 262-266.

- **Cameron, D. R., Cooper, D. G., & Neufeld, R. J. (1988).** The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6), p.p. 1420-1425.
- **Cappello, S., Volta, A., Santisi, S., Morici, C., Mancini, G., Quatrini, P., Genovese, M., Yakimov, M.M. and Torregrossa, M. (2016).** Oil-degrading bacteria from a membrane bioreactor (BF-MBR) system for treatment of saline oily waste: Isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 110, p.p. 235-244
- **CHALGHMI, H. (2015).** Étude de la pollution marine par les hydrocarbures et caractérisation de leurs effets biochimiques et moléculaires sur la PALOURDE *Ruditaps* sp. These de doctorat. Géochimie et écotoxicologie. Bordeaux : École doctorale des sciences biologiques, biotechnologie et santé. p. 318
- **Chen, M. J., Zhang, Z., & Bott, T. R. (1998).** Direct measurement of the adhesive strength of biofilms in pipes by micromanipulation. *Biotechnology Techniques*, 12(12), p.p. 875-880.
- **Cheng, G., Zhang, Z., Chen, S., Bryers, J. D., & Jiang, S. (2007).** Inhibition of bacterial adhesion and biofilm formation on zwitterionic surfaces. *Biomaterials*, 28(29), p.p. 4192-4199.
- **China, B., Pirson, V., & Mainil, J. (1996).** Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9), p.p. 3462-3465.
- **Cirigliano, M. C., & Carman, G. M. (1985).** Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and environmental microbiology*, 50(4), p.p. 0846-850.
- **Coffey, B. M., & Anderson, G. G. (2014).** Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. In *Pseudomonas methods and protocols*. New York : Humana Press, p.p. 631-641.
- **Cui, Z., & Shao, Z. (2009).** Predominant strains of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading consortia from deep sea of the Middle Atlantic Ridge. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica*, 49(7), p.p. 902-909.
- **De Domenico, M., Lo Giudice, A., Michaud, L., Saitta, M., & Bruni, V. (2004).** Diesel oil and PCB-degrading psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawaters (Terra Nova Bay, Ross Sea). *Polar Research*, 23(2), p.p. 141-146.
- **De Vasconcellos, S. P., Crespim, E., da Cruz, G. F., Senatore, D. B., Simioni, K. C. M., dos Santos Neto, E. V., ... & de Oliveira, V. M. (2009).** Isolation, biodegradation ability and molecular detection of hydrocarbon degrading bacteria in petroleum samples from a Brazilian offshore basin. *Organic Geochemistry*, 40(5), p.p. 574-588.

- **Desai, J. D., & Banat, I. M (1997).** Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular biology reviews*, 61(1), p.p. 47-64.
- **DJAHNIT, N. (2019).** Isolement et caractérisation des bactéries marines dégradant les différentes fractions du pétrole. Thèse de doctorat. Environnement marin. Alger : ENSSMAL. p.241
- **Djahnit, N., Chernai, S., Catania, V., Hamdi, B., China, B., Cappello, S., & Quatrini, P. (2019).** Isolation, characterization and determination of biotechnological potential of oil-degrading bacteria from Algerian centre coast. *Journal of applied microbiology*, 126(3), p.p. 780-795.
- **Dubeau, D., Déziel, E., Woods, D. E., & Lépine, F. (2009).** Burkholderia thailandensis harbors two identical rhl gene clusters responsible for the biosynthesis of rhamnolipids. *BMC microbiology*, 9(1), p.p. 1-12.
- **Duran, R., & Cravo-Laureau, C. (2016).** Role of environmental factors and microorganisms in determining the fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment. *FEMS microbiology reviews*, 40(6), p.p. 814-830.
- **Ebadi, K., Zarei, M., & Sanati, A. M. (2021).** Optimization of Crude Oil Biodegradation by *Brevibacterium* sp. Isolated from the Native Sponges of the Persian Gulf. *Iranian Journal of Biotechnology*, 19(2), 2690.
- **Elad, Y., & Stewart, A. (2007).** Microbial control of Botrytis spp. Botrytis: biology, pathology and control, p.p. 223-241.
- **Éric, L. (2009).** Pollution par les hydrocarbures en Manche et golfe de GascogneRisques. Thèse de doctorat. Géographie. Université de Bretagne occidentale : École doctorale des sciences de la mer. p. 309
- **FEKNOUS, N. (2017).** Essais d'isolement et d'identification des souches bactériennes à pouvoir auto-épurateur vis-à-vis des hydrocarbures. Thèse de doctorat. Microbiologie appliquée. Annaba : université Badji Mokhtar. p. 159
- **Feng, B. W., Li, X. R., Wang, J. H., Hu, Z. Y., Meng, H., Xiang, L. Y., & Quan, Z. X. (2009).** Bacterial diversity of water and sediment in the Changjiang estuary and coastal area of the East China Sea. *FEMS microbiology ecology*, 70(2), p.p. 236-248.
- **Fingas, M., & Fieldhouse, B. (2012).** Studies on water-in-oil products from crude oils and petroleum products. *Marine pollution bulletin*, 64(2), p.p. 272-283.
- **Fong, J. C., Syed, K. A., Klose, K. E., & Yildiz, F. H. (2010).** Role of *Vibrio polysaccharide* (vps) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology*, 156(Pt 9), 2757.

- **Frank, J. A., Reich, C. I., Sharma, S., Weisbaum, J. S., Wilson, B. A., & Olsen, G. J. (2008).** Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*, 74(8), p.p. 2461-2470.
- **Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Smyth, T. J., & Banat, I. M. (2010).** Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(6), p.p. 617-627.
- **Froehner, S., Machado, K. S., Dombroski, L. F., Nunes, A. C., Kishi, R. T., Bleninger, T., & Sanez, J. (2012).** Natural biofilms in freshwater ecosystem: indicators of the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(7), p.p. 3965-3973.
- **Gao, X., Gao, W., Cui, Z., Han, B., Yang, P., Sun, C., & Zheng, L. (2015).** Biodiversity and degradation potential of oil-degrading bacteria isolated from deep-sea sediments of South Mid-Atlantic Ridge. *Marine pollution bulletin*, 97(1-2), p.p. 373-380
- **Gerson, D. F., & Zajic, J. E. (1978).** Effects of oxygenation and mixing on surfactant production by *Corynebacterium lepus*. In *Proc Can Fed Biol Soc* (Vol. 21, p. 212).
- **Ghribi, D., Abdelkefi-Mesrati, L., Mnif, I., Kammoun, R., Ayadi, I., Saadaoui, I., ... & Chaabouni-Ellouze, S. (2012).** Investigation of antimicrobial activity and statistical optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant production in solid-state fermentation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- **Goldberg, J. (2002).** Biofilms and antibiotic resistance: a genetic linkage. *TRENDS in Microbiology*, 10(6), 264.
- **Greer, C. W. (2010).** Bacterial diversity in hydrocarbon-polluted rivers, estuaries and sediments. In *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*.
- **Guiraud, J.P. (1998).** *Microbiologie Alimentaire*. Paris : Dunod.
- **Haras, D. (2005).** Biofilms et altérations des matériaux: de l'analyse du phénomène aux stratégies de prévention. *Matériaux & Techniques*, 93, s-27.
- **Hassanshahian, M., Emtiazi, G. (2008).** Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(2), pp.170-178.
- **Head, I. M., Jones, D. M., & Röling, W. F. (2006).** Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), p.p. 173-182.
- **Hentati, D. (2018).** Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production des biosurfactants et étude de la diversité microbienne au sein de trois ports de Sfax,

Tunisie. Thèse de doctorat. Biotechnologie et microbiologie. Montpellier : université de Montpellier. p. 349

- **Herman, D. C., Artiola, J. F., & Miller, R. M. (1995).** Removal of cadmium, lead, and zinc from soil by a rhamnolipid biosurfactant. *Environmental science & technology*, 29(9), p.p. 2280-2285.
- **Hommel, R. K. (1994).** Formation and function of biosurfactants for degradation of water-insoluble substrates. In *Biochemistry of microbial degradation* (pp. 63-87). Dordrecht : Springer, p.p. 63-87.
- **Hong, J. J., Yang, S. M., Lee, C. H., Choi, Y. K., & Kajiuchi, T. (1998).** Ultrafiltration of divalent metal cations from aqueous solution using polycarboxylic acid type biosurfactant. *Journal of colloid and interface science*, 202(1), p.p. 63-73.
- **Hörmann, B., Müller, M. M., Syldatk, C., & Hausmann, R. (2010).** Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509T. *European journal of lipid science and technology*, 112(6), p.p. 674-680.
- **Ishigami, Y., Zhang, Y., & Ji, F. (2000).** Spiculisporic acid. Functional development of biosurfactant. *Chimica oggi*, 18(7-8), p.p. 32-34.
- **Jagtap, S., Yavankar, S., Pardesi, K., & Chopade, B. (2010).** Production of bioemulsifier by *Acinetobacter* sp. from healthy human skin of tribal population. *Ind. J. Expt. Biol*, 48, p.p. 70-76.
- **Jiménez, V., Bravo, V., & Gutierrez, L. G. (2011).** Integral approach for improving the degradation of recalcitrant petrohydrocarbons in a fixed-film reactor. *Water, Air, & Soil Pollution*, 220(1), p.p. 301-312.
- **Johnsen, A. R., Wick, L. Y., & Harms, H. (2005).** Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental pollution*, 133(1), p.p. 71-84.
- **Julie, M. (2013).** Caractérisation fonctionnelle de gènes *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* lors de développement de biofilms sur composés organiques hydrophobes. Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. Thèse de doctorat. Université de Pau et des Pays de l'Adour – UPPA : École doctorale des sciences exactes et leurs applications. P. 290
- **Kaplan, N. A. C. H. U. M., Zosim, Z. I. N. A. I. D. A., & Rosenberg, E. U. G. E. N. E. (1987).** Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 emulsan by using pure polysaccharide and protein. *Applied and environmental microbiology*, 53(2), p.p. 440-446.
- **Karanth, N. G. K., Deo, P. G., & Veenanadig, N. K (1999).** Microbial production of biosurfactants and their importance. *Current Science*, p.p. 116-126.

- **Karsa, D. R., Bailey, R. M., Shelmerdine, B., McCann, S. A., & Karsa, D. R. (1999).** Overview: a decade of change in the surfactant industry. Special Publications of the Royal Society of Chemistry, p.p. 230, 1-22.
- **Klein, B., Bouriat, P., Goulas, P. and Grimaud, R. (2010).** Behavior of *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17 cells during initiation of biofilm formation at the alkane-water interface. Biotechnol. Bioeng. 105, p.p. 461–468.
- **Kostka, J. E., Prakash, O., Overholt, W. A., Green, S. J., Freyer, G., Canion, A., ... & Huettel, M. (2011).** Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in Gulf of Mexico beach sands impacted by the Deepwater Horizon oil spill. Applied and environmental microbiology, 77(22), p.p. 7962-7974.
- **Krepesky, N., Da Silva, F. S., Fontana, L. F., & Crapez, M. A. C. (2007).** Alternative methodology for isolation of biosurfactant-producing bacteria. Brazilian Journal of Biology, 67, p.p. 117-124.
- **Kretschmer, A., Bock, H. & Wagner, E. (1982).** Chemical and physical characterization of interfacial-active lipids from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. Appl. Environ. Microbiol., 44, p.p. 864-70.
- **Lai, Q., Li, W., & Shao, Z. (2012).** Complete genome sequence of *Alcanivorax dieselolei* type strain B5.
- **Lane, D. J. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. Nucleic acid techniques in bacterial systematics, p.p. 115-175.
- **Lanfranconi, M. P., Alvarez, H. M., & Studdert, C. A. (2003).** A strain isolated from gas oil contaminated soil displays chemotaxis towards gas oil and hexadecane. Environmental microbiology, 5(10), p.p. 1002-1008.
- **Ławniczak, Ł., Kaczorek, E., & Olszanowski, A. (2011).** The influence of cell immobilization by biofilm forming on the biodegradation capabilities of bacterial consortia. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(5), p.p. 1183-1188.
- **LE GOFF-BUCAS, G. (2002).** Le comportement des polluants flottants en cas de déversement accidentel en eau de mer. thèse de doctorat. Océanologie. Paris : Université de Paris 6. p. 262
- **Liu, Y. C., Li, L. Z., Wu, Y., Tian, W., Zhang, L. P., Xu, L., ... & Shen, B. (2010).** Isolation of an alkane degrading *Alcanivorax* sp. strain 2B5 and cloning of the *alkB* gene. Bioresource technology, 101(1), p.p. 310-316.
- **Mahjoubi, M., Jaouani, A., Guesmi, A., Amor, S.B., Jouini, A., Cherif, H., Najjari, A., Boudabous, A., Koubaa, N. and Cherif, A. (2013).** Hydrocarbonoclastic bacteria isolated

from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *New biotechnology*, 30(6), p.p. 723- 733.

- **Maier, R. M., & Soberon-Chavez, G. (2000).** *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(5), p.p. 625-633.
- **Marchal, R., Penet, S., Solano-Serena, F., & Vandecasteele, J. P. (2003).** Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil & gas science and technology*, 58(4), p.p. 441-448.
- **Mason, O. U., Scott, N. M., Gonzalez, A., Robbins-Pianka, A., Bælum, J., Kimbrel, J., ... & Jansson, J. K. (2014).** Metagenomics reveals sediment microbial community response to Deepwater Horizon oil spill. *The ISME journal*, 8(7), p.p. 1464-1475.
- **Mohanty, G., & Mukherji, S. (2008).** Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(3), p.p. 240-250.
- **Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000).** A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), p.p. 211-218.
- **Mounier, J. (2013).** Caractérisation fonctionnelle de gènes de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* lors du développement de biofilms sur composés organiques hydrophobes (Doctoral dissertation, Pau).
- **Muangchinda, C., Rungsihiranrut, A., Prombutara, P., Soonglerdsongpha, S., & Pinyakong, O. (2018).** 16S metagenomic analysis reveals adaptability of a mixed-PAH-degrading consortium isolated from crude oil-contaminated seawater to changing environmental conditions. *Journal of hazardous materials*, 357, p.p. 119-127.
- **Mukherjee, S., Juottonen, H., Siivonen, P., Quesada, C. L., Tuomi, P., Pulkkinen, P., & Yrjälä, K. (2014).** Spatial patterns of microbial diversity and activity in an aged creosote-contaminated site. *The ISME journal*, 8(10), p.p. 2131-2142.
- **Nikitha, T., Satyaprakash, M., Vani, S. S., Sadhana, B., & Padal, S. B. (2017).** A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Their transport, fate and biodegradation in the environment. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci*, 6(4), p.p. 1627-1639.
- **O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998).** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular microbiology*, 28(3), p.p. 449-461.

- **Pang, C. M., Hong, P., Guo, H., & Liu, W. T. (2005).** Biofilm formation characteristics of bacterial isolates retrieved from a reverse osmosis membrane. *Environmental science & technology*, 39(19), p.p. 7541-7550.
- **Parales, R. E., & Ditty, J. L. (2010).** Chemotaxis. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*.
- **Parales, R. E., & Harwood, C. S. (2002).** Bacterial chemotaxis to pollutants and plant-derived aromatic molecules. *Current opinion in microbiology*, 5(3), p.p. 266-273.
- **Parales, R. E., Ju, K. S., Rollefson, J., & Ditty, J. L. (2008).** Bioavailability, transport and chemotaxis of organic pollutants. *Microbial Bioremediation*, p.p. 145-187.
- **Peng, J. S., Tsai, W. C., & Chou, C. C. (2002).** Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *International journal of food microbiology*, 77(1-2), p.p. 11-18.
- **Pini, F., Grossi, C., Nereo, S., Michaud, L., Giudice, A. L., Bruni, V., ... & Fani, R. (2007).** Molecular and physiological characterisation of psychrotrophic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Terra Nova Bay (Antarctica). *European Journal of Soil Biology*, 43(5-6), p.p. 368-379.
- **Plociniczak, T., Kukla, M., Wątroba, R., & Piotrowska-Seget, Z. (2013).** The effect of soil bioaugmentation with strains of *Pseudomonas* on Cd, Zn and Cu uptake by *Sinapis alba* L. *Chemosphere*, 91(9), p.p. 1332-1337.
- **Pradel, E., Zhang, Y., Pujol, N., Matsuyama, T., Bargmann, C. I., & Ewbank, J. J. (2007).** Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(7), p.p. 2295-2300.
- **Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2018).** *Microbiologie*. De Boeck Supérieur.
- **Pruthi, V., & Cameotra, S. S. (1995).** Rapid method for monitoring maximum biosurfactant production obtained by acetone precipitation. *Biotechnology techniques*, 9(4), p.p. 271-276.
- **Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., McClean, S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2002).** Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnology progress*, 18(6), p.p. 1277-1281.
- **Rahman, P. K., & Gakpe, E. (2008).** Production, characterisation and applications of biosurfactants-Review. *Biotechnology*.
- **Rajaei, S., Seyedi, S. M., Raiesi, F., Shiran, B., & Raheb, J. (2013).** Characterization and Potentials of Indigenous Oil-Degrading Bacteria Inhabiting the Rhizosphere of Wild Oat (*Avena Fatua* L.) in South West of Iran. *Iranian Journal of Biotechnology*, 11(1), p.p. 32-40.

- **Raza, Z. A., Khan, M. S., & Khalid, Z. M. (2007).** Physicochemical and surface-active properties of biosurfactant produced using molasses by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 42(1), p.p. 73-80.
- **Reichelt, J. L., & Baumann, P. (1974).** Effect of sodium chloride on growth of heterotrophic marine bacteria. *Archives of microbiology*, 97(4), p.p. 329–345.
- **Rosenberg, E., & Ron, E. Z. (1999).** High-and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 52(2), p.p. 154-162.
- **Rosenberg, E., Rubinovitz, C., Gottlieb, A., Rosenhak, S., & Ron, E. Z. (1988).** Production of biodispersan by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. *Applied and environmental microbiology*, 54(2), p.p. 317-322.
- **S.E., Gray, J.P., Herwig, R.P., Lara, J.C. and Staley, J.T. (1995).** *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(1), p.p.116-123.
- **Saini, H. S., Barragán-Huerta, B. E., Lebrón-Paler, A., Pemberton, J. E., Vázquez, R. R., Burns, A. M., ... & Maier, R. M. (2008).** Efficient purification of the biosurfactant viscosin from *Pseudomonas libanensis* strain M9-3 and its physicochemical and biological properties. *Journal of Natural Products*, 71(6), p.p. 1011-1015.
- **Schneiker, S., Dos Santos, V. A. M., Bartels, D., Bekel, T., Brecht, M., Buhrmester, J., ... & Golyshin, P. N. (2006).** Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nature biotechnology*, 24(8), p.p. 997-1004.
- **Sen, R. (2008).** Biotechnology in petroleum recovery: the microbial EOR. *Progress in energy and combustion Science*, 34(6), p.p. 714-724.
- **Sifour, M., Al-Jilawi, M. H., & Aziz, G. M. (2007).** Emulsification properties of biosurfactant produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 10(8), p.p. 1331-1335.
- **Singh A, Van Hamme JD, Ward OP. (2007).** Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2: Application aspects. *Biotechnol Adv* 25:99–121.
- **Singleton, P. (1999).** *Bactériologie*. Paris : Dunod, p.356.
- **Singleton, P., & Sainsbury, D. (1984).** *Abrégés de bactériologie*. Edition Masson, Paris, France.
- **Smits, T. H., Witholt, B., & van Beilen, J. B. (2003).** Functional characterization of genes involved in alkane oxidation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 84(3), p.p 193-200.

- **Sourjik, V., & Armitage, J. P. (2010).** Spatial organization in bacterial chemotaxis. *The EMBO journal*, 29(16), 2724-2733.
- **Spain, A. M., Krumholz, L. R., & Elshahed, M. S. (2009).** Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. *The ISME journal*, 3(8), p.p 992-1000.
- **Tanaka, Y., Tojo, T., Uchida, K., Uno, J., Uchida, Y., & Shida, O. (1997).** Method of producing iturin A and antifungal agent for profound mycosis. *Biotechnology Advances*, 15(1), p.p 234-235.
- **Thavasi, R., Sharma, S., & Jayalakshmi, S. (2011).** Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. *J Pet Environ Biotechnol S*, 1(2).
- **Toren, A., Navon-Venezia, S., Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2001).** Emulsifying activities of purified alphas proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3), p.p 1102-1106.
- **Tribelli, P. M., Di Martino, C., López, N. I., & Iustman, L. J. R. (2012).** Biofilm lifestyle enhances diesel bioremediation and biosurfactant production in the Antarctic polyhydroxyalkanoate producer *Pseudomonas extremaustralis*. *Biodegradation*, 23(5), p.p 645-651.
- **Upadhyayula, V. K., & Gadhamshetty, V. (2010).** Appreciating the role of carbon nanotube composites in preventing biofouling and promoting biofilms on material surfaces in environmental engineering: a review. *Biotechnology advances*, 28(6), p.p 802-816.
- **van Beilen, J. B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A. G., Röthlisberger, M., & Witholt, B. (2001).** Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. The EMBL accession numbers for the sequences reported in this paper are AJ245436 [*P. putida* (oleovorans) GPo1 alk gene clusters and flanking DNA], AJ233397 [*P. putida* P1 alk gene clusters and flanking DNA], AJ249793 [*P. putida* P1 nahKJ genes], AJ249825 [*P. putida* (oleovorans) GPo1 16S RNA gene] and AJ271219 [*P. putida* P1 16S RNA gene]. *Microbiology*, 147(6), p.p 1621-1630.
- **Van Hamme, J. D., & Ward, O. P. (2001).** Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas* sp. strain JA5-B45 and *Rhodococcus* sp. strain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them. *Applied and environmental microbiology*, 67(10), p.p 4874-4879.
- **Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2006).** Physiological aspects: Part 1 in a series of papers devoted to surfactants in microbiology and biotechnology. *Biotechnology advances*, 24(6), p.p 604-620.
- **Vandecasteele J. P. (2008).** *Petroleum Microbiology*, Editions TECHNIP, Paris, p.816.

- **Vladimirov, N., & Sourjik, V. (2009).** Chemotaxis: how bacteria use memory.
- **Wadhams, G. H., & Armitage, J. P. (2004).** Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(12), p.p 1024-1037.
- **Wakamatsu, Y., Zhao, X., Jin, C., Day, N., Shibahara, M., Nomura, N., ... & Yokoyama, K. K. (2001).** Mannosylerythritol lipid induces characteristics of neuronal differentiation in PC12 cells through an ERK related signal cascade. *European Journal of Biochemistry*, 268(2), p.p 374-383.
- **Wang, X. B., Chi, C. Q., Nie, Y., Tang, Y. Q., Tan, Y., Wu, G., & Wu, X. L. (2011).** Degradation of petroleum hydrocarbons (C6–C40) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. *Bioresource technology*, 102(17), p.p 7755-7761.
- **Whang, L. M., Liu, P. W. G., Ma, C. C., & Cheng, S. S. (2008).** Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of hazardous materials*, 151(1), p.p 155-163.
- **Xiao, Y., Gerth, K., Müller, R., & Wall, D. (2012).** Myxobacterium-produced antibiotic TA (myxovirescin) inhibits type II signal peptidase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(4), p.p 2014-2021.
- **Yakimov, M. M., Gentile, G., Bruni, V., Cappello, S., D'Auria, G., Golyshin, P. N., & Giuliano, L. (2004).** Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(3), p.p 419-432.
- **Yakimov, M. M., Giuliano, L., Bruni, V., Scarfi, S., & Golyshin, P. N. (1999).** Characterization of antarctic hydrocarbon-degrading bacteria capable of producing bioemulsifiers. *The new microbiologica*, 22(3), p.p 249-256.
- **Yakimov, M. M., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2007).** Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current opinion in biotechnology*, 18(3), p.p 257-266.
- **Zenati, B. (2018).** Étude de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers par des bactéries marine : Application en traitement des eaux contaminées par le pétrole. *Chimie industrielle*. Blida : université Saad Dahlab Belida 1, p. 187
- **Zhang, W., Wang, H., Zhang, R., Yu, X. Z., Qian, P. Y., & Wong, M. H. (2010).** Bacterial communities in PAH contaminated soils at an electronic-waste processing center in China. *Ecotoxicology*, 19(1), p.p 96-104.
- **Zhang, Y., Wang, F., Yang, X., Gu, C., Kengara, F. O., Hong, Q., ... & Jiang, X. (2011).** Extracellular polymeric substances enhanced mass transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons

in the two-liquid-phase system for biodegradation. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(3), p.p 1063-1071.

- **Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F., & Xu, P. (2011).** Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology*, 102(5), 4111-4116.
- **Zhao, F., Liang, X., Ban, Y., Han, S., Zhang, J., Zhang, Y., & Ma, F. (2016).** Comparison of methods to quantify rhamnolipid and optimization of oil spreading method. *Tenside Surfactants Detergents*, 53(3), p.p 243-248.
- **Zosim, Z., Gutnick, D., & Rosenberg, E. (1982).** Properties of hydrocarbon-in-water emulsions stabilized by *Acinetobacter* RAG-1 emulsan. *Biotechnology and bioengineering*, 24(2), p.p 281-29

# Annexes

## Annex 1 : Forme Fasta des séquences des souches sélectionnées (16S)

>PSF---6S

```
TGGCAATACAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATC
TCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTACACCAACCACAA
GGGAACGACTATCTCTAGCCGCGTCTGGTGTATGTCAAACCCAGGTAAGG
TTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGC
CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTIONCCCCAGGCGG
GG
```

>PSF---14Sw

```
GGGTGAATCCAACCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACTAGGCCTGGG
AACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGCCTT
CATGCTCTCGAGTTGCAGAGAACAATCCGAACTGAGACATCTTTTGGAGA
TTAGCTAACCTCGCGGGATCGCTGCTCACTGTAGATGCCATTGTAGCAC
GTGTGTAGCCCAGCCTGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACC
TTCTCCGGCTTATCACCGGCAGTTTCCTTAAAGTGCCCAACTAAATGAT
GGCAACTAAGGACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT
CACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCACTAGGTCCCCGA
AGGGAAGGAATCTGTCTCCAGAAACCGTCCTAGGATGTCAAAGGCTGGTA
AGGTTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCA
GGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTIONCCCCAGG
CGGATAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCCAAGCTCCATGAGCCCGGAC
AGCTAGTTATCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAACCTGT
TTGCTCCCCACGCTTTTCGCACCTCAGCGTCAATAACTGTCCAGTGAGTCG
```

CCTTCGCCACTGGTGTTCCTCC

>PSF---18S

GTTAGACTAACTACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGGCGG  
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGCGATT  
ACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACT  
ACGATTGGCTTTGAGAGATTAGCTCCGCCTCGCGACTTCGCAACCCTCTG  
TACCAACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGA  
CTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCAATTTGTCACCGGCAGTCTCCCTAG  
AGTTCCCACCCGAAGTGCTGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTAC  
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA  
CCTGTCACTGCGCTCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTAGAAAGTTCGCAG  
GATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACACCAT  
GCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCATTTGAGTTTTAACCTTG  
CGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACCAA  
GTCACTAAGGACCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTAC  
CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAG  
TGTCAGTCCAGGAGGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCGATCTCTAC  
GCATTCACCGCTACACCGGAAATTCCACCTCCCTCTACTGCACTCTAGC  
GTGCCAGTATCGGATGCAATTCCAAGGTTGAGCCCTGGGCTTTCACATCC  
GACTTAACACACCGCCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCGGATTAAC  
GCTCGCACCTTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAATTAGCCGGTGC  
TTCTTCTGTAGGTAACGTCAAGTACTCCAGGGTATTAGCCCAAAGCCTTC  
CTCCCTACTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCA

>PSF---35Sw

GTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGGGG  
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATT

ACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACT  
ACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTG  
TACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGA  
CTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAG  
AGTGCCACCATAACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTA  
CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC  
ACCTGTGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCT  
GCATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACA  
TGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAATCTT  
GCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAGTGCGTTAGCTGCGCCACTAA  
AATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTAC  
CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAG  
TATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGG

>PSF---42S

CTAACCACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTA  
CAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAACATTCTGATTTGCGATTACTAGC  
GATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATA  
CGTTTTATGAGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTTGCAGCCCTCTGTACGCA  
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACCTGAC  
GTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCCTAGAGTTCT  
CA

>PSF---54S

TTGTCACCGGCAGTCTCCCTAGAGTTCCCACCCGAAGTGCTGGCAACTAA  
GGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACG  
AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCACTGCGCTCCCGAAGGCACCAA  
TCTATCTCTAGAAAGTTCGCAGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGC

GTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCA  
ATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTA  
TCGCGTTAGCTGCGCCACCAAAGTCACTAAGGACCCCAACGGCTAGTAGA  
CATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCA  
CGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTGTGTCAGTCCAGGAGGCCGCCTTCGCCAC  
TGGTGTTCCCTCCGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCGGAAATTCCA  
CCTCCCTCTACTGCACTCTAGCGTGCCAGTATCGGATGCAATTCCAAGGT  
TGAGCCCTGGGCTTTCACATCCGACTTAACACACCGCCTACGCGCGCTTT  
ACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCTTTCGTATTACCGCGGGCTG  
CTGGCACGAAATTAGCCGGTGCTTCTTCTGTAGGTAACGTCAAGTACTCC  
AGGGTATTAGCCCAAAGCCTTCCTCCCTACTGAAAGTGCTTTACAACCCG

PSF---90Sw

GTTAGACTATCCACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGGCGG  
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGCGATT  
ACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACT  
ACGAACAGTTTTAAAGGGATTTGCTTGGCCTCGCGACTTTGCTGCCCTCTG  
TACTGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGA  
CTTGACGTCGTCCCCGCCTTCCTCAAGTTTGTACCGGCAGTCTCCCTAG  
AGTTCCCACCATTATGTGCTGGCAACTAGGGACAAGGGTTGCGCTCGTTA  
CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC  
ACCTGTCACTTGGCTCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTAGAAAGTTCCAA  
GGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACA  
TGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTT  
GCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAACTTCGTCACCAA  
GAATACTAAGATTCCCAACGACTAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTA  
CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCA  
ATGTCAGTCCAGGAGGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCGGATCTCTA

CGCATTTACCGCTACACCGGAAATTCCACCTCCCTCTACTGCATTCTAG  
CCTGCCAGTTTCAAATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATC  
TGACTTAGCAAACCGCCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAA  
CGCTCGCACCTTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAATTAGCCGGTG  
CTTCTTCTGTAGGTAACGTCAAGTACTCATCCGTATTAAGGATAAGCCTT  
CCTCCCTACTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCA

>PSF---5Sw

TAGTCGAATTGCAGACTACGATCCGAACTGAGACTGGCTTTAAGGGATTG  
GCTGACCCTCACGGGTTTCGCTTCTCTTTGTACCAGCCATTGTAGCATGCG  
TGAAGCCCAAGACATAAAGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTC  
CTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTATGAGTTCCCACCATCACGTGCTG  
GCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC  
ACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTACACCAACCCCAAAG  
GGGAAGACCTGTTTCCAGGCCGGTCTGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGG  
TTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGC  
CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCACCGTACTCCCCAGGCGG  
GGCACTTAATGCGTTAGCTACGGCGCGGAGAACGTGGAATGTCCCCACA  
CCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT  
CGCTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGTGTACAGTTACAGCCCAGAGTCCCGC  
CTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCA  
GGAATTCCAGACTCCCCTACTGCACTCTAGTCAGCCCGTACCCACTGCAC  
GCGCAACGTTAAGCGTTGCGTTTCCACAGCAGACGTGACCAACCACCTAC  
GAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTCGTACCCTACGTATTA  
CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTACTTCTTCTGCAGGTACCGTC  
ACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGCGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCAT  
CCCGCA

>PSF---12Sw

ACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCAC  
CGCGGCATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGA  
GTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGAACAGTTTTAAGGGATTTGCTTGGC  
CTCGCGACCTCGCTGCCCTCTGTAAGTGGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCC  
CAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCCTCCGGT  
TTGTCACCGGCAGTCTCCCTAGAGTTCCCACCATTATGTGCTGGCAACTA  
GGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAC  
GAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCACTTGGCTCCCGAAGGCACCA  
ATCTATCTCTAGAAAGTTCCAAGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCG  
CGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTC  
AATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTT  
ATCGCGTTAACTTCGTCACCAAGAATACTAAGATTCCCAACGACTAGTAG  
ACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCC  
ACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAATGTCAGTCCAGGAGGCCCGCCTTCGCCA  
CTGGTGTTCCTTCCGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCGGAAATTCC  
ACCTCCCTCTACTGCATTCTAGCCTGCCAGTTTCAAATGCAGTTCCCAGG  
TTGAGCCCGGGGCTTTCACATCTGACTTAGCAAACCGCCTACGCGCGCTT  
TACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCTTTCGTATTACCGCGGCT  
GCTGGCACGAAATTAGCCGGTGCTTCTTCTGTAGGTAACGTCAAGTACTC  
ATCCGTATTAAGGATAAGCCTTCCCTACTGAAAGTGCTTTACAACCC  
GAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCT

>PSF---21Sw

CGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCG  
ACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTG  
TGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGT  
AGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCC

CCACCTTCCTCCGGTTTGTACACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCACCATA  
ACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCC  
AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAG  
TTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCC  
TGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTT  
GTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCC  
CCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATT  
CCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT  
CCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGT  
GGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCT  
ACACAGGAAATTCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCCAGTTTTGG  
ATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTAACAAACC  
ACCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCT  
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTCGGT  
AACGTCAAAACAGCAAGGTATTAACCTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAA  
GTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCA