

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



**THESE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTORAT EN SCIENCES
DE LA MER**

Spécialité: Environnement marin et littoral

Sujet de thèse :

**ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES BACTERIES
MARINES DEGRADANT LES DIFFERENTES FRACTIONS DU
PETROLE (Cas d'étude : port de Sidi Fredj)**

Présentée par :

DJAHNIT NORA

Soutenue publiquement le 27/ 06 /2019 Devant le jury composé de :

F.HOUMA-BACHARI	Professeur, ENSSMAL	Présidente
A.BADIS	Professeur, Université Saad Dahlab Blida 1	Examineur
S.ALOUACHE	MCA, ENSSMAL	Examinatrice
S.CHERNAI-HAMDI	MCA, ENSSMAL	Directrice de thèse
P.QUATRINI	Professeur, UNIPA Italie	Co-directrice de thèse
B.CHINA	Docteur, Sciencesano Belgique	Invité
B.HAMDI	Professeur, ENSSMAL	Invité

الملخص .

يتعرض الساحل الجزائري لعدة أنواع من التلوث ، بما في ذلك الهيدروكربونات. تهدف هذه الأطروحة لدراسة تحليل الهيدروكربونات بواسطة بكتيريا بحرية معزولة من منطقة ملوثة بالساحل الجزائري (ميناء سيدي فرج) تم عزل مجموعة مكونة من 119 سلالة بكتيرية قادرة على النمو على وسط معدني مكمل بالهيدروكربونات كمصدر وحيد للكربونات والطاقة. تم اختيار 23 سلالة لمزيد من الدراسات. أظهر تسلسل الجين ARNr 16S أن معظم العزلات تنتمي إلى أجناس من البكتيريا الهيدروكربونية المتخصصة (Alcanivorax)، والبكتيريا المحللة العامة (Marinobacter ، Pseudomonas ,Gordonia ،Halomonas ،Erythrobacter ،Brevibacterium) و بكتيريا غير معروفة على قدرتها على تفكيك الهيدروكربون (Xanthomarina)، أظهر استخدام تقنية PCR DGGE تنوع وتباين أعلى بين المحطات في مياه البحر مقارنة بعينات الرواسب.

كانت السلالات المرتبطة بـ Marinobacter و Alcanivorax هي الأكثر فعالية في تحليل النفط الخام بنسبة 61 % و 57 % من النفط المتحلل بعد أسبوع في حين كانت السلالات المرتبطة Halomonas و Labrenzia أقل فعالية مع 8 % و 12 % فقط من النفط الخام المتحلل على التوالي.

وكشف فحص الجينات *alkB* و *xylA* عن وجود جين *alkB* في العديد من السلالات البكتيرية ، حيث احتوت إحدى العزلات كلا من الجينات، بينما لم تحمل بعض العزلات أيًا من الجينات التي تمت دراسته. ومع ذلك ، فقد نمت في وجود النفط الخام مما يعني وجود مسارات أخرى للتحلل الحيوي. كشفت معظم العزلات على قدرتها على إنتاج مخفض توترسطح حيوي مع أنشطة استحلاب مهمة مفيدة في المعالجة الحيوية تم اكتشاف أعلى نشاط استحلاب في *Alcanivorax borkumensis* مع 52% من الاستحلاب. أظهرت نتائجنا أن السلالات المنتجة لمستويات عالية من مخفض توتر سطحي لها القدرة على تحليل النفط الخام بشكل أفضل. تشير نتائجنا الإجمالية إلى أن العزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها قد تشكل مرشحين محتملين للعلاج الحيوي ويمكن أن تكون مفيدة للتطبيقات التكنولوجية الحيوية.

الكلمات المفتاحية. النفط الخام ، البكتيريا البحرية ، المعالجة البيولوجية ، التحلل الحيوي،*alkB*، التنوع البيولوجي ، DGGE، مخفض توتر السطح الحيوي

Résumé.

Le littoral algérien est exposé à plusieurs types de pollutions, notamment d'hydrocarbures. Le but de ce travail était d'étudier les capacités de dégradation des bactéries isolées d'une zone contaminée de la côte algérienne (port de Sidi Fredj). Une collection de 119 souches capables de se développer sur milieu minéral additionné d'hydrocarbures comme unique source de carbone et d'énergie a été obtenue. 23 souches ont été sélectionnées pour des caractérisations plus poussées. Le séquençage du gène de l'ARNr 16S a montré que la plupart des isolats appartenaient à des genres de bactéries hydrocarbonoclastes spécialisées (*Alcanivorax*), à des bactéries dégradantes généralistes (*Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Gordonia*, *Halomonas*, *Erythrobacter* et *Brevibacterium*) et à d'autres bactéries non connues comme capables de dégrader les hydrocarbures (*Xanthomarina*) mais qui ont pu pousser en présence de pétrole brut. L'approche indépendante à la culture (DGGE) a montré qu'une diversité et une variabilité supérieures entre les stations ont été détectées dans les échantillons d'eau de mer que dans les échantillons de sédiments.

Les souches liées à *Marinobacter* et *Alcanivorax* étaient les plus efficaces dans la dégradation du pétrole brut avec 61% et 57% de pétrole dégradé après une semaine d'incubation tandis que les souches affiliées à *Halomonas* et *Labrenzia* étaient les moins performantes avec seulement 8% et 12% de pétrole brut dégradé respectivement. Le criblage des gènes cataboliques *alkB* et *xylA* a révélé la présence du gène *alkB* dans plusieurs souches bactériennes, un isolat hébergeant les deux gènes cataboliques, tandis que certains isolats ne portaient aucun des gènes étudiés. Cependant, ils ont été capables de métaboliser le pétrole brut, ce qui implique l'existence d'autres voies de biodégradation.

La plupart des isolats ont manifesté une production importante de biosurfactants avec d'importantes activités d'émulsification utiles en bioremédiation. L'activité d'émulsification la plus élevée a été détectée chez *Alcanivorax borkumensis* avec 52% d'émulsification. Nos résultats ont montré que les souches produisant de hauts niveaux de biosurfactants peuvent mieux dégrader le pétrole brut.

Nos résultats suggèrent que les isolats bactériens obtenus pourraient constituer des candidats potentiels pour la bioremédiation et pourraient être utiles pour des applications biotechnologiques.

Mots clés: Pétrole brut - Bactéries marines – Biorémediation – Biodégradation – *alkB* – Biodiversité – DGGE - Biosurfactants

Abstract.

The Algerian coastline is exposed to several types of pollutions, including Hydrocarbons. The aim of this work was to study the degradation abilities of bacteria isolated from a contaminated area of the Algerian coast (Sidi Fredj harbour). A collection of 119 strains, capable to grow on mineral medium supplemented with hydrocarbons as the sole source of carbone and energy, was obtained. 23 strains were selected for further studies. Sequencing of the 16S rRNA gene showed that most isolates belong to genera of hydrocarbonoclastic bacteria (*Alcanivorax*), generalist hydrocarbons degraders (*Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Gordonia*, *Halomonas*, *Erythrobacter* and *Brevibacterium*) and other bacteria not known as hydrocarbon degraders (*Xanthomarina*) but were able to degrade Hydrocarbons. Culture independent approach (DGGE) showed that Higher diversity and variability among stations was detected in seawater than in sediment samples

Strains related to *Marinobacter* and *Alcanivorax* were the most effective in degrading crude oil with 61% and 57% of oil degraded after one week of incubation, while strains related to *Halomonas* and *Labrenzia* were the less effective with only 8% and 12% of crude oil degraded respectively. Screening of catabolic genes *alkB* and *xylA*, revealed the presence of *alkB* gene in several bacterial strains, one isolate harboured both catabolic genes while some isolates carried none of the studied genes. However, they grew in the presence of crude oil implying the existence of other biodegradation pathways.

Most of isolates revealed a significant production of biosurfactants with important emulsification activities useful in bioremediation. The highest emulsification activity was detected in *Alcanivorax borkumensis* with 52 % of emulsification. Our results showed that Strains producing high levels of biosurfactant can better degrade crude oil.

Our overall results suggest that the obtained bacterial isolates may constitute potential candidates for bioremediation and can be useful for biotechnological applications.

Keywords : Crude oil - Marine bacteria – Bioremediation – Biodegradation – *alkB* – Biodiversity – DGGE - Biosurfactant.

AVANT PROPOS

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au Laboratoire de Conservation et de Valorisation des Ressources Marines (LCVRM) de l'Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et l'Aménagement du Littoral (ENSSMAL), au Laboratoire de microbiologie environnementale et Ecologie Microbienne du département STEBICEF de l'université de Palermo (Unipa,Italie) et le Centre Nationale de Recherche de Messina (CNR Messina, Italie).

Remerciements

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus vifs et sincères remerciement à ma directrice de thèse, M^{me} Chernai-Hamdi Safia, d'avoir accepté de diriger ce travail, d'avoir cru en mes capacités, pour son temps, sa confiance tout au long de ces années. Qu'elle trouve ici l'expression de mes sincères remerciements pour son soutien attentif et bienveillant.

Je remercie profondément M^{me} Quatrini Paola, d'avoir accepté de co-diriger ce travail de thèse, pour son accueil et hospitalité dans son laboratoire et de m'avoir permis de travailler dans les meilleures conditions. Ce travail n'aurait pu être achevé sans son aide précieuse. Qu'elle trouve ici l'expression de mon entière gratitude et le témoignage de ma grande estime.

J'adresse tous mes remerciements à M^{me} Houma-Bachari Fouzia, Professeur à l'ENSSMAL, de l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider le jury de cette thèse et pour l'intérêt qu'elle a accordé à ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma plus profonde gratitude et mes plus vifs remerciements.

J'exprime ma gratitude à Mr Badis Abdelmalek, Professeur à l'université de Saad Dahlab Blida 1, et à M^{me} Allouache Souhia, Maître conférence à l'ENSSMAL, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'examiner et d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier Mr Hamdi Boualem, Professeur à l'ENSSMAL, d'avoir accepté notre invitation et de nous honorer par sa présence. Je le remercie particulièrement pour ses encouragements et ses conseils qu'il a su me prodiguer durant toute ces années.

Mes remerciements les plus chaleureux s'adressent à Mr China Bernard, Docteur en biologie moléculaire, d'avoir accepté l'invitation. Je le remercie de m'avoir initié à ce domaine qu'est la microbiologie, d'avoir toujours répondu à toute mes interrogations, de m'avoir fait profiter de son expérience dans le domaine et pour ses relectures. Merci pour votre générosité, gentillesse et humilité.

Je tiens aussi vivement à remercier sincèrement toutes les personnes de l'ENSSMAL ainsi que l'ensemble des enseignants qui de près ou de loin m'ont porté leur précieuse aide et leur soutien moral.

Je tiens également à remercier Mr Cappello Simone, docteur chercheur au centre national de recherche de Messina (Italie), pour son chaleureux accueil et de m'avoir permis de mettre au point les analyses de chromatographie.

Un remerciement particulier, à Mr Azzouz Mekki, pour son aide au laboratoire et durant les sorties sur terrain, pour ses précieux conseils et pour son soutien sans faille depuis des années.

Je tiens à remercier profondément, tout le corps technique du laboratoire de l'ENSSMAL, en particulier Mr Maatouk Youcef et M^{me} Refes pour leur aide précieuse, leur bonne humeur, leur gentillesse, leur patience et ceci malgré mon tempérament parfois fatigant.

L'un des côtés agréables du domaine de la recherche est la possibilité de faire de nombreuses rencontres, plus ou moins éphémères, toutes différentes les unes des autres. Durant mes stages effectués à l'université de Palermo, j'ai pu faire la connaissance de plusieurs personnes et en particulier de M^{me} Catania Valentina, Docteur en biologie moléculaire. Je tiens à la remercier pour tous ses efforts déployés pour que je puisse mener à bien mon travail, ses conseils, sa disponibilité, son aide et d'avoir rendu agréable mon séjour. Je remercie également toute les personnes que j'ai rencontré par le biais de cette thèse particulièrement Aya, Motassem et Muntaser, merci pour votre support et vos encouragements. Je remercie, tout mes collègues et amis pour leur agréable compagnie, et aussi de m'avoir aider chacun à sa manière

Mes plus tendres remerciements, s'adressent à mes parents, merci de m'avoir guidé et orienté, pour l'amour et le dévouement par les quels vous m'entourez. La réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible sans votre soutien moral et affectif. Merci de me comprendre même dans les moments les plus difficiles. Je remercie également les membres de ma famille d'avoir consacré leur temps et leur personnes pour mon bien être.

Table des matières

Introduction générale.....	2
-----------------------------------	----------

CHAPITRE I: La pollution du milieu marin par les hydrocarbures et les procédés de remédiation

Introduction.....	7
I.1 Composition du pétrole brut.....	8
I.1.1 Les hydrocarbures Aliphatiques.....	10
I.1.2 Les hydrocarbures Aromatiques.....	11
I.1.2.1 Les hydrocarbures mono-aromatiques.....	11
I.1.2.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....	13
I.1.3 Les asphaltènes et les résines.....	15
I.2 Principales origines des hydrocarbures dans le milieu marin.....	16
I.2.1 Origines naturelles.....	16
I.2.2 Origines anthropiques.....	18
I.3 Toxicité des hydrocarbures pétroliers.....	20
I.4 Devenir des hydrocarbures dans le milieu marin.....	23
I.4.1 Etalement.....	24
I.4.2 Evaporation.....	24
I.4.3 Dissolution.....	25
I.4.4 Dispersion.....	25
I.4.5 Emulsification.....	26
I.4.6 Sédimentation.....	27
I.4.7 Photo-oxydation.....	27
I.4.8 Biodégradation.....	28
I.5 Pollution par les hydrocarbures en mer Méditerranée.....	28
I.6 La pollution par les hydrocarbures en Algérie.....	29
I.7 Méthodes de remédiation et traitement des sites pollués par les hydrocarbures.....	30
I.7.1 Réhabilitation non biologique des sites pollués par les hydrocarbures.....	31
I.7.1.1 La récupération mécanique.....	31
I.7.1.2 Allègement et brûlage.....	31
I.7.1.3 Dispersion.....	32
I.7.1.4 Produits absorbants.....	33
I.7.2 Réhabilitation biologique des sites pollués par les hydrocarbures.....	33
I.7.2.1 La phytoremédiation.....	34
I.7.2.2 La bioremédiation microbienne.....	35
I.7.2.2.1 La bioaugmentation.....	36
I.7.2.2.2 La biostimulation.....	38
Conclusions.....	39

CHAPITRE II : Les bactéries marine hydrocarbonoclastes et leurs mécanismes d'action.

Introduction.....	41
II.1 Les bactéries marines capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers.....	41
II.2 Réponse d'une communauté bactérienne à la pollution par les hydrocarbures.....	44

Table des matières

II.3	Aspects métaboliques de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers.	46
II.4	Facteurs influençant la biodégradation en mer.	47
II.4.1	Effets des facteurs environnementaux.	47
II.4.1.1	Effet de la température.	47
II.4.1.2	Effet de l'oxygène.	49
II.4.1.3	Effet du pH.	50
II.4.1.4	Effet de la salinité.	50
II.4.1.5	Effet de la pression hydrostatique.	50
II.4.1.6	Concentration en sels nutritifs.	51
II.4.2	La composition chimique des hydrocarbures.	52
II.4.3	Biodisponibilité des hydrocarbures.	53
II.5	Accession des microorganismes aux hydrocarbures.	54
II.5.1	L'assimilation des hydrocarbures solubles :	54
II.5.2	L'accession interfaciale.	54
II.5.3	L'accession interfaciale facilitée (émulsification).	55
II.5.4	Le transfert micellaire.	55
II.6	Les biosurfactants.	55
II.7	Études de cas de stratégies de bioremédiation utilisées pour la décontamination des milieux marins pollués	58
II.8	Les Voies de biodégradation des hydrocarbures pétroliers.	60
II.8.1	Biodégradation aérobie.	61
II.8.1.1	Voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures aliphatiques.	61
II.8.1.1.1	Biodégradation des n-alcanes.	61
II.8.1.1.2	Biodégradation des alcanes ramifiés.	63
II.8.1.1.3	Voies métaboliques de dégradation des hydrocarbures saturés cycliques... ..	64
II.8.1.2	Biodégradation des hydrocarbures aromatiques.	65
II.8.2	Biodégradation anaérobie des hydrocarbures.	66
II.9	Gènes impliqués dans la biodégradation.	70
II.10	Méthodes d'étude des communautés microbiennes dégradants les hydrocarbures ..	72
Conclusions.....		73

CHAPITRE III : Zone d'étude et échantillonnage

III.1	Le port de Sidi Fredj.....	75
III.1.1	Situation géographique.....	75
III.1.2	Configuration et infrastructures du port.....	75
III.1.3	Caractéristiques du port.....	76
III.1.3.1	Bathymétrie.	76
III.1.3.2	Topographie.....	77
III.1.3.3	Sédimentologie.....	78
III.1.4	Facteurs hydrodynamiques.....	79
III.1.4.1	Facteurs météorologiques.....	79
III.1.4.1.1	Vents	79
III.1.4.1.2	Température et précipitation.....	79
III.1.4.2	Facteurs océaniques.....	80
III.1.4.2.1	Les courants.....	80
III.1.4.2.2	Les houles.....	80

Table des matières

III.2	Echantillonnage.....	81
-------	----------------------	----

CHAPITRE IV: Matériel et méthodes.

IV.1	Mesure des paramètres physico-chimiques.....	84
IV.1.1	Salinité et température.....	84
IV.1.2	Potentiel hydrogène « pH ».....	84
IV.1.3	Matières en suspension « MES ».....	84
IV.1.4	Demande chimique en oxygène « DCO ».....	84
IV.2	Test d'écotoxicité « Microtox ».....	86
IV.3	Mesure de l'abondance bactérienne.....	87
IV.4	Détermination de la diversité bactérienne dans les échantillons de sédiment et d'eau de mer par DGGE.....	88
IV.4.1	Principe de la DGGE.....	88
IV.4.2	Extraction d'ADN.....	90
IV.4.2.1	Extraction d'ADN des échantillons d'eau de mer.....	90
IV.4.2.2	Extraction d'ADN des échantillons de sédiment.....	90
IV.4.2.3	Contrôle de la qualité et de la taille des ADN.....	91
IV.4.3	Amplification par PCR.....	91
IV.4.4	Préparation du gel polyacrylamide.....	94
IV.4.5	Dépôt des échantillons et système électrophorétique.....	96
IV.5	Isolement et caractérisation des bactéries marines dégradant les hydrocarbures.....	97
IV.5.1	Enrichissement et isolement de bactéries aérobies dégradant les hydrocarbures.....	97
IV.5.2	Criblage des souches bactériennes isolées.....	98
IV.6	Test de croissance sur différentes sources d'hydrocarbures et cinétiques de croissance.....	98
IV.7	Caractérisations morphologiques des bactéries isolées.....	99
IV.8	Caractérisations biochimiques des bactéries isolées.....	99
IV.8.1	Coloration de Gram.....	99
IV.8.2	Test de la catalase.....	100
IV.8.2.1	Principe.....	100
IV.8.2.2	Technique :.....	100
IV.8.3	Test d'oxydase.....	100
IV.8.3.1	Principe.....	100
IV.8.3.2	Technique.....	100
IV.9	Caractérisations moléculaires des bactéries isolées.....	101
IV.9.1	Analyse taxonomique des gènes d'ARNr 16S et séquençage.....	101
IV.9.2	Amplification des gènes d'ADNr 16 S par PCR.....	101
IV.9.3	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	103
IV.9.4	Purification des produits PCR.....	103
IV.9.5	Séquençage.....	103
IV.9.6	Analyse phylogénétique.....	104
IV.10	Détection et amplification des gènes de dégradation en utilisant des amorces spécifiques par PCR.....	104
IV.10.1	Gènes responsables de la dégradation des hydrocarbures aliphatiques.....	105
IV.10.1.1	<i>alkB</i>	105
IV.10.2	Gènes responsables de la dégradation des hydrocarbures mono-aromatiques.....	106
IV.10.2.1	<i>XylM</i>	106
IV.10.2.2	<i>xylA</i>	107

Table des matières

IV.11	Test de biodégradation des souches sélectionnées.....	107
IV.12	Test de production de biosurfactants.....	108
IV.12.1	Drop collapse test.....	108
IV.12.2	Test d'étalement du pétrole.....	109
IV.12.3	Indice d'émulsification E24.....	109

CHAPITRE V: Résultats et discussion.

V.1	Paramètres physico-chimiques des échantillons.....	111
V.2	Test de toxicité « Microtox ».....	113
V.3	Mesure de l'abondance bactérienne.....	114
V.4	Les indices de diversité des échantillons d'eau et de sédiment par DGGE.....	114
V.5	Isolement et criblage des souches cultivables.....	118
V.6	Identification des souches sélectionnées.....	119
V.7	Caractérisation moléculaire des souches sélectionnées.....	121
V.8	Analyses phylogénétiques.....	128
V.9	Profils d'utilisation des hydrocarbures.....	129
V.10	Cinétique de croissance des souches isolées.....	131
V.11	Détection des gènes de dégradation.....	133
V.11.1	Le gène <i>alkB</i>	133
V.11.1.1	Analyses phylogénétiques.....	137
V.11.2	Le gène <i>xylM</i> et <i>xylA</i>	138
V.12	Evaluation des taux de biodégradation des hydrocarbures.....	139
V.12.1	Biodégradation des hydrocarbures totaux.....	140
V.12.2	Biodégradation des hydrocarbures aliphatiques.....	141
V.12.3	Biodégradation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.....	143
V.13	Production de biosurfactants.....	147
Conclusions et perspectives.....		152
Références bibliographiques		

Liste des figures

Figure 1. Composition d'un pétrole brut léger (a) de la mer du Nord et d'un pétrole brut lourd (b) (Head et al., 2006)	8
Figure 2. Les différentes familles d'hydrocarbures contenues dans le pétrole brut (Mahjoubi et al., 2018).....	9
Figure 3. Structure des 16 Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) prioritaires selon l'US EPA (United States Environmental Protection Agency).....	13
Figure 4. Devenir des hydrocarbures pétroliers dans la colonne d'eau et dans les sédiments (Mcgenity et al., 2012).	23
Figure 5. Les émulsions formées par le pétrole dans l'eau de mer (Rouidi, 2014).....	26
Figure 6. Accidents en mer Méditerranée, données de la base de données du REMPEC de 1977 (http://www.rempec.org)	29
Figure 7. Principe de la phytoremédiation. La bioremédiation par les plantes a lieu à travers des interactions complexes entre les végétaux, les microorganismes et le sol par des procédés d'accumulation, de volatilisation, de dégradation et de stabilisation. TCE : trichloréthylène ; PCE : perchloréthylène (Militon, 2012).	35
Figure 8. Description schématique du processus de bioremédiation (bioaugmentation). 1: eau de mer; 2: sédiment marin; 3: pétrole brut. A : Cultivation des bactéries, B : Ajout des bactéries dans un environnement naturel pollué, C : l'attaque des bactéries sélectionnées du polluant, D : développement du processus de biodégradation. (Mahjoubi et al., 2018)	37
Figure 9. Description schématique du processus de bioremédiation (biostimulation). 1: eau de mer; 2: sédiment marin; 3: pétrole brut. A : Ajout de nutriment aux cultures bactériennes, B : l'attaque des bactéries sélectionnées du polluant, C : développement du processus de biodégradation (Mahjoubi et al., 2018).	38
Figure 10. Arbre phylogénétique illustrant la diversité des bactéries hydrocarbonoclastes. Les organismes indiqués en bleu peuvent dégrader les hydrocarbures saturés, alors que ceux en rouge peuvent dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Les organismes en noir, ne sont pas considérés comme hydrocarbonoclastes (Head et al., 2006).....	42
Figure 11. Changements dans la composition des hydrocarbures déversés et les changements correspondants dans l'abondance des principaux organismes clés dans la biodégradation des hydrocarbures (Head et al., 2006)	45
Figure 12. Taux de dégradation des hydrocarbures dans les sols, les eaux douces et les environnements marins (Das et Chandran, 2011).	48
Figure 13. Les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures (Vandecasteele, 2005)	54
Figure 14. Implication du biosurfactant (rhamnolipide) produit par <i>Pseudomonas</i> sp dans l'absorption d'hydrocarbures (Whang et al., 2009).	57
Figure 15. Vue d'ensemble schématique des voies potentielles d'utilisation des hydrocarbures pétroliers par les microorganismes (Varjani, 2017).	60
Figure 16. Trois voies périphériques possibles pour la dégradation de n-alcane (aérobie) par les micro-organismes (Varjani et al., 2017).	62
Figure 17. Voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures ramifiés par <i>Pseudomonas citronellolis</i> suivant la voie "Citronellol".	64

Liste des figures

Figure 18. Biodégradation des cyclo-alcanes non-substitués (Bertrand et Mille, 1989).	64
Figure 19. Voies cataboliques conduisant à la formation de catéchols et de protocatécules (voies périphériques) (a). Principales voies cataboliques pour la dégradation du phénol (b) (voies centrales) (Xue et al., 2015).	66
Figure 20. Voies de dégradation des hydrocarbures en anaérobiose (Ji et al., 2013).	68
Figure 21. Processus cataboliques de la dégradation anaérobies des hydrocarbures aromatiques en milieu métagénique (a) et en présence d'accepteurs finaux d'électrons alternatifs à l'oxygène (b) (Gieg et al., 2014).	69
Figure 22. Les gènes codant pour des protéines impliquées dans la dégradation des alcanes chez <i>A. borkumensis</i> SK2 (Schneiker et al., 2006).	71
Figure 23. Représentation schématique du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S avec les régions conservées (bleu), les régions variables (gris) et hypervariable (rouge).	73
Figure 24. Position géographique de la presqu'île de Sidi Fredj.	75
Figure 25. Agencement des bassins du port de Sidi Fredj	76
Figure 26. Carte bathymétrique du port de Sidi Fredj (DTP, 2009)	77
Figure 27. Topographie de la Baie de Bou-ismail (Leclaire, 1972).	77
Figure 28. Carte sédimentaire de la Baie de Bou-Ismaïl (LEM, 1998).	78
Figure 29. Localisation des stations de prélèvement d'eau de mer et de sédiments du port de Sidi Fredj.	82
Figure 30. Schéma récapitulatif des différentes étapes pour la mesure de la DCO dans les différents échantillons d'eau et de sédiment.	85
Figure 31. Principe du test microtox basé sur la bioluminescence d' <i>Allivibrio fischeri</i> (ISO 11348-3, ISO, 2009) . A. Suite au phénomène de quorum sensing, l'auto-inducteur (HSL) active la production de la luciférase qui transforme le substrat en produit et en lumière. B. Il est possible de mesurer la toxicité de substances sur la viabilité de la bactérie par mesure au luminomètre de l'inhibition de la lumière produite	86
Figure 32. Principe de la technique DGGE. Les ADN des communautés microbiennes sont extraits des échantillons environnementaux (1). Les gènes d'intérêt sont ensuite amplifiés par PCR en utilisant une amorce couplée à un GC-clamp qui est une région riche en GC résistante à la dénaturation (2). Après purification, les produits PCR sont séparés par électrophorèse, en fonction de leur composition, selon un gradient de dénaturation chimique (3). Les fragments, correspondant « théoriquement » à une espèce, peuvent être excisés (4) afin d'être séquencés (5) (Milton, 2012).	89
Figure 33. Positionnement des amorces sur la séquence de l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 16S d' <i>E.coli</i>	92
Figure 34. Principe de l'électrophorèse en gel d'agarose	93
Figure 35. Calcul de la taille de l'amplicon. A. Relation inverse entre le log de la taille et la distance de migration. B. Aspect du 100 bp ladder après électrophorèse en gel d'agarose (les nombres indiquent la taille des bandes en bp).	94
Figure 36. Images représentant le dispositif de préparation du gradient dénaturant (à gauche) et les plaques de verre (A droite)	95

Liste des figures

Figure 37. Cuve d'électrophorèse contenant la plaque en verre avec le gel.	96
Figure 38. Représentation schématique du gène codant pour l'ARN 16S. La position des amorces est indiquée. V1 à V9= régions variables. 1 à 1500 : taille du gène en paires de bases (modifié de Yang et al., 2016).....	102
Figure 39. Schéma de la procédure de purification des produits PCR.....	103
Figure 40. 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).	109
Figure 41. Taux d'inhibition de la luminescence de la bactérie <i>Vibrio fischeri</i> par les échantillons de sédiment du port de Sidi Fredj.	113
Figure 42. Abondance microbienne mesurée par DAPI count, dans les échantillons d'eau.	114
Figure 43. Gel d'électrophorèse des produits PCR de l'amplification de la région V3 à partir de l'ADN métagénomique des échantillons d'eau et de sédiment (Sed=sédiment, SW=seawater, C- : Contrôle négatif, M= marqueur de taille 100 bp)	115
Figure 44: Diversité bactérienne de l'eau de mer et des sédiments du port de Sidi Fredj. (A) Dendrogramme d'analyse en grappes montrant la communauté bactérienne des échantillons d'eau de mer et de sédiment. Le coefficient de Jaccard et l'analyse par 100 bootstrap ont été utilisés pour mesurer la similarité entre les huit profils la DGGE. (B) Profils DGGE de la région V3 de l'ARNr 16S amplifiée par PCR à partir d'échantillons d'eau de mer et de sédiments de surface. Les échantillons Sw5 et sed5 sont manquants.	117
Figure 45. Gel d'électrophorèse des produits PCR d'ADNr16S des souches sélectionnées (C-=Contrôle négatif, M= marqueur de taille 1k bp)	122
Figure 46. Cladogramme basé sur les alignements des séquences 16S des différentes bactéries. Les distances génétiques sont indiquées à droite.	128
Figure 47. Matrice d'identité entre les séquences 16S des bactéries identifiées prises deux à deux. Xg : <i>Xanthomarina gelatinilytica</i> ; Gh : <i>Gordonia Honghongensis</i> ; Bc : <i>Brevibacterium celere</i> ; My : <i>Micrococcus yunnanensis</i> ; Ec : <i>Erythrobacter citreus</i> ; La : <i>Labrenzia aggregata</i> ; Po : <i>Pseudomonas oceani</i> ; Pt : <i>Pseudomonas taiwanensis</i> ; Ab : <i>Alcanivorax burkomensis</i> ; Ax : <i>Alcanivorax xenomutans</i> ; Ad : <i>Alcanivorax dieselolei</i> ; Hv : <i>Halomonas venusta</i> ; Mz : <i>Marinobacter zhanjianfensis</i> ; Mh : <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> ; Mn : <i>Marinobacter nitratreducens</i>	128
Figure 48. Courbes de croissance (DO) des bactéries en présence de pétrole brut pendant 13 jours d'incubation à 30°C.....	132
Figure 49. Gel d'électrophorèse (1%) des produits PCR de l' <i>alkB</i> des souches sélectionnées (C+=Contrôle positif, M= marqueur de taille 1k bp).....	134
Figure 50. Matrice d'identité (%) des gènes <i>alkB</i> pour les différents isolats ayant produit des amplicons <i>alkB</i>	137
Figure 51. Cladogramme de l'alignement des séquences <i>alkB</i> . La distance génétique est indiquée à droite.	137
Figure 52. Histogramme montrant le taux de biodégradation (%) des hydrocarbures totaux par les souches sélectionnées.	140

Liste des figures

Figure 53. Histogramme montrant le taux de biodégradation (%) des n-alcanes (C ₁₀ -C ₃₉) par les souches sélectionnées.	142
Figure 54. Histogramme montrant le taux de biodégradation (%) des n-alcanes par les souches sélectionnées.	143
Figure 55. Histogramme montrant le taux biodégradation (%) des principaux hydrocarbures aromatiques polycycliques par les souches sélectionnées.....	144
Figure 56. Histogramme montrant le taux biodégradation (%) du naphtalène, fluorène et pyrène par les souches sélectionnées.	145
Figure 57. Photos représentant les résultats du drop collapse test (photo à gauche : résultat négatif et la photo à droite représente un résultat positif)	148
Figure 58. Photos représentant les résultats du test d'indice d'émulsification E24 (photo à gauche : résultat négatif et la photo à droite représente un résultat positif).....	149

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques physico-chimiques d'hydrocarbures (HC) aliphatiques. La structure des hydrocarbures influence leurs propriétés physico-chimiques <i>ND : Non défini ; K_{ow} : coefficient de partage octanol/eau.</i> (Stroud et al., 2007).....	11
Tableau 2. Caractéristiques physico-chimiques et structures des BTEX. ; K_{ow} : coefficient de partage	12
Tableau 3. Propriétés physico-chimiques de 16 HAP (Lundstedt, 2003) La constante d'Henry représente la solubilité d'un gaz dans un solvant liquide ; K_{ow} : coefficient de partage octane/eau- K_{oc} : coefficient de partage carbone/eau.....	14
Tableau 4. Accidents pétroliers les plus importants (plus de 100 000 tonne de pétrole déversés) de 1967 à nos jours.....	19
Tableau 5. Concentrations des hydrocarbures pétroliers totaux (HPT) dans les sédiments portuaires en Algérie (www.eea.europa.eu.2006).....	30
Tableau 6. Liste des microorganismes dégradant les différentes classes des hydrocarbures pétroliers.....	43
Tableau 7. Principaux types de tensioactifs biologiques produits par les microorganismes. .	56
Tableau 8. Exemples de stratégies de bioremédiation réussies.....	59
Tableau 9. Exemples de bactéries anaérobies dégradant les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques.....	67
Tableau 10. Pourcentage des vents par direction dans la zone de Sidi Fredj.....	79
Tableau 11. Variation annuelle des températures et précipitations de Sidi Fredj (ONM, 1999-2009).....	80
Tableau 12. Variation du coefficient de réfraction et de la direction de la houle (LEM, 1998)	81
Tableau 13. Composition des deux solutions du gel polyacrylamide (8%).....	95
Tableau 14. Programme PCR pour l'amplification du gène ADNr 16 S.....	102
Tableau 15. Programme PCR pour l'amplification du gène <i>alkB</i>	105
Tableau 16. Programme PCR pour l'amplification du gène <i>xylM</i>	106
Tableau 17. Programme PCR pour l'amplification du gène <i>xylA</i>	107
Tableau 18. Principaux paramètres physico-chimiques des échantillons.	111
Tableau 19. Indices de diversité (PAST software) basés sur les profils DGGE des populations bactériennes présentes dans les échantillons d'eau et de sédiment du port de Sidi Fredj.	116
Tableau 20. Isolats bactériens totaux obtenus à partir des cultures d'enrichissement d'échantillons d'eau de mer et de sédiments sur différents substrats.....	119
Tableau 21. Caractères morphologiques et biochimiques des souches sélectionnées	120
Tableau 22. Identification des souches bactériennes isolées des échantillons de sédiments et d'eau de mer du port de Sidi Fredj (SW: Seawater, Sed: sédiment).....	123
Tableau 23. Profils d'utilisation des hydrocarbures par les isolats sélectionnés (- : OD<0,1, (+) : 0,21<OD<0,4 croissance faible, (++) : 0,41<OD<0,6 croissance modérée, (+++) :	

Liste des tableaux

0,61<OD<0,80 croissance élevée, (++++ OD> 0,80 croissance excellente) Selon le classement de (Rahman et al., 2002)..... 130

Tableau 24. Analyses nucléotidique (BLASTn) comparatives des séquences des gènes 16S et *alkB* des bactéries isolées du port de Sidi Fredj 135

Tableau 25. Analyses nucléotidique (BLASTn) comparatives des séquences des gènes 16S, *alkB* et *xylA* de la souche PSF-43Sw 138

Tableau 26. Mesures de la production de biosurfactant (+ : positif, - : négatif), Activité d'émulsification E24 (%) 148

Liste des abbreviations

HC : Hydrocarbures
C : carbone
COV : carbone organique volatile
GC : Teneur en Guanine et Cytosine
A : Adénine, T : Thymine
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNr 16S : ADN codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal
ADNr : ADN ribosomique
ARN : Acide ribonucléique
ARNr : Acide ribonucléique ribosomique
ARNr 16S : sous unité 16S de l'ARN ribosomal
ATP : Adenosine triphosphate
BET : Bromure d'éthidium
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
BTEX : Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylène
bp : base pair
GC-FID : Chromatographie en phase gazeuse à détection par ionisation de flamme
GC : Gas chromatography
dNTPs : Désoxyribonucléotides triphosphates
DO : Densité optique
EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique
EPA : American Environmental Protection Agency
HAP : Hydrocarbures aromatique polycyclique
M : marqueur de taille
NCBI : National Center for Biotechnology Information
PCR : polymerase Chain Reaction
pH : Potentiel Hydrogène
RDP : Ribosomal Database Project
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
Sp. : Espèce non précise
TBE : Tris-Borate-EDTA
TE : Tris Ethylène Diamine Tétra Acétique
Tris : trishydroxyméthylaminométhane
Tm : Temperature of melting
UV : Ultra Violet
16S : 16 Svedberg
HPT : hydrocarbures pétroliers totaux
DBO : demande biochimique en oxygène
DCO : demande chimique en oxygène

REMPEC : Centre Régional Méditerranéen pour l'Intervention d'Urgence contre la Pollution Marine Accidentelle

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne
AAE : Agence environnementale européenne
DGGE : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
TGGE : Temperature Gradient Gel Electrophoresis
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
NPP : nombre le plus probable
SSCP : Single strand conformation polymorphism

Unités de mesure :

h, min, s : Heure, minute, seconde
l, ml, ul : Litre, milli-litre, microlitre
mM : milli-molaire
rpm : rotation par minute
ppm : partie par million
nm, cm, km : nano mètre, centimètre, kilomètre
ng, mg, g, kg : nanogramme, milligramme, gramme, kilogramme
Pa : pascal
U : unité
v:v volume à volume
°C : degré Celsius
% : pourcentage
Cst : centistokes

Introduction générale

Introduction générale.

Depuis plusieurs décennies, les activités humaines engendrent une production de plus en plus importante de substances polluantes, potentiellement toxiques, pouvant être déversées accidentellement ou non dans l'environnement. Ainsi, les risques pour la santé publique et le bon fonctionnement des écosystèmes sont de plus en plus importants et préoccupants.

Les polluants sont retrouvés dans tous les compartiments de l'environnement (atmosphère, hydrosphère, sol), qui échangent entre eux à travers des interfaces et par différents processus biogéochimiques (évaporation, ruissellement, lessivage des sols, vents) ayant pour conséquence une accumulation élevée de polluants dans les milieux aquatiques et en particulier le milieu marin (Rowe et al., 2007). En effet, quelles que soient les sources de pollution et le compartiment de l'environnement dans lequel les contaminants sont émis, une grande partie de ces substances rejetées passent dans les milieux aquatiques (Kouzayha, 2011).

Parmi les nombreuses substances chimiques rejetées dans l'environnement marin, les hydrocarbures pétroliers générés à partir des activités humaines causent de sérieux problèmes environnementaux dus à leur persistance et à leur caractère toxique et mutagène (Sakari et al., 2008), ils représentent la source la plus récurrente des problèmes de pollutions observés dans les écosystèmes, pouvant même entraîner leur destruction. En effet, le pétrole connu aussi sous le nom d'or noir, est considéré depuis le début du XXe siècle comme l'une des matières premières les plus importantes au monde, Il est utilisé soit directement en tant que source d'énergie ou en tant que matière première facilement transportable dans l'industrie chimique. Il est considéré comme l'un des piliers de l'économie industrielle contemporaine et reste la source d'énergie dominante. La demande actuelle croissante en énergie a entraîné une « course à l'or noir », le pétrole connaît une progression ininterrompue dans son extraction. Pendant plus d'un siècle, sa production mondiale n'a cessé d'augmenter pour atteindre 11 millions de tonnes par jour (11 mT/j) en 2000 et on s'attend à une augmentation de la production de 1,9% par an dans la décennie actuelle. Ainsi le flux des transports maritimes pétroliers a considérablement augmenté entraînant depuis les années soixante des déversements de toutes sortes (collisions/naufrages de navires, rupture de pipelines, fuites diverses) (Milinkovitch, 2011). Il a été estimé que la quantité de pétrole introduite annuellement dans les océans par les diverses voies est à 2,37 millions de tonnes par an (McGenety et al., 2012 ; Zrafi et al., 2013) sachant qu'une tonne de pétrole peut couvrir environ une surface de 12 kilomètres carrés.

Le pétrole est un mélange hétérogène d'hydrocarbures avec potentiellement 20 000 composés chimiques principalement représentés par les alcanes linéaires, ramifiés ou cycliques et les hydrocarbures aromatiques mono ou polycycliques (HAP). D'autres composants présents dans le pétrole dans une moindre proportion par rapport aux hydrocarbures sont représentés par des résines et des asphaltènes, qui contiennent de l'azote, du soufre, de l'oxygène, du phosphore et des métaux lourds, tels que le nickel et le vanadium (McGenity et al., 2012). Bon nombre de ces constituants sont difficiles à dégrader et sont hautement toxiques en raison de la présence de composants hémotoxiques, cancérogènes et tératogènes. Ils causent de graves dommages environnementaux pouvant affecter directement ou indirectement la santé humaine et les systèmes écologiques (Chandra et al., 2013).

De nombreux procédés ont été développés afin de réhabiliter les sites pollués par les hydrocarbures pétroliers. Leur réhabilitation peut être réalisée en employant des procédés mécaniques, physiques et/ou chimiques. Ces méthodes aident à immobiliser, extraire ou détruire les polluants. Cependant ces techniques sont coûteuses et peuvent être très invasives pour les écosystèmes en générant des produits plus toxiques pour les formes de vie (Ghoreishi et al., 2017). Le coût et l'efficacité limitée de ces traitements physico-chimiques ont stimulé le développement de technologies alternatives basées sur les capacités de remédiation biologique des plantes et des microorganismes de l'environnement. La bioremédiation utilise des microorganismes pour dégrader des polluants toxiques en produits inoffensifs tels que le CO_2 et l' H_2O , et d'autres composés inorganiques. Ces procédés ne sont pas coûteux et ne présentent pas de dangers pour l'environnement (Fathepure, 2014). La biodégradation par des populations naturelles de micro-organismes est le mécanisme le plus fiable par lequel des milliers de polluants xénobiotiques, y compris les hydrocarbures, sont éliminés de l'environnement (Cappello et al., 2007). Diverses bactéries dégradant le pétrole telles qu'*Alcanivorax* (Yakimov et al., 1998), *Cycloclasticus* (Dyksterhouse et al., 1995), *Marinobacter* (Gauthier et al., 1992), *Neptunomonas* (Hedlund et al., 1999), *Oleiphilus* (Golyshin et al., 2002) et *Oleispira* (Yakimov et al., 2003) ont été isolées de l'environnement marin et se sont avérées capables de jouer un rôle clé dans l'élimination des hydrocarbures des environnements pollués (Yakimov et al., 2007). La présence de ces bactéries dans l'environnement marin dépend directement de la présence d'hydrocarbures (Quatrini et al., 2008). La pollution par les hydrocarbures pétroliers stimule la croissance de ces organismes et provoque des changements dans la structure des communautés microbiennes dans la zone contaminée (Harayama et al., 2004). Ces bactéries ont la propriété d'émulsifier les hydrocarbures en solution en produisant des agents tensioactifs tels que les biosurfactants, qui

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'identification et l'utilisation des bactéries marines dans le processus de bioremédiation semblent être fondamentales pour l'élimination des hydrocarbures de l'environnement. De nombreuses études ont été menées sur les communautés microbiennes participant à la dégradation des polluants en mer Méditerranée, en particulier dans la partie nord du bassin. Le côté sud reste peu étudié, bien que de nombreux pays du Sud soient de grands producteurs et exportateurs de pétrole (Daffonchio et al., 2013). L'Algérie, qui figure parmi les trois premiers producteurs de pétrole en Afrique et dont le littoral est long de 1 622 km le long de la rive sud de la Méditerranée, est un acteur majeur de la pollution par les hydrocarbures en Méditerranée. En 2015, le pays a produit environ 1,7 million de barils par jour de produits pétroliers totaux. En outre, plus de 75% de cette production a été exportée par voie maritime. En termes d'intrants bruts de matière organique, la pollution par les hydrocarbures a été citée comme l'un des principaux problèmes environnementaux rencontrés (Benmecheta et Belkhir, 2016). Peu d'études concernant les bactéries marines dégradant les hydrocarbures ont été menées au niveau du littoral algérien. Citons une étude de 2017 qui a permis d'isoler quatre bactéries (*H. venusta*, *E. aurantiacum*, *V. alginolyticus* et *Dietzia sp*) au niveaux des ports d'Annaba et d'El Kala (Feknous et al., 2017). Ces auteurs ont suggérés que ces bactéries participent à la biodégradation du pétrole. Une autre étude menée au niveau du port de Khemisti (Tipaza) a montré l'utilisation possible du biosurfactant d'une souche de *M. hydrocarbonoclasticus* (SdK644) dans les processus de bioremédiation des milieux marins (Zenati et al., 2018).

Le présent travail vise à apporter des connaissances sur les communautés bactériennes impliquées dans les phénomènes de décontamination naturelle des polluants. L'objectif de cette thèse est d'étudier la capacité de dégradation du pétrole brut et ses différentes fractions par des bactéries isolées à partir de l'eau de mer et des sédiments contaminés par les hydrocarbures en détectant la présence de gènes cataboliques impliqués dans la biodégradation des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques. C'est en effet la microflore native qui détermine les capacités d'auto-épuration du site en l'absence de toute limitation d'ordre physico-chimique. C'est pour cela qu'il est important de connaître les compositions et les performances des bactéries capables de dégrader les polluants (M'rassi, 2014).

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

Les deux premiers chapitres consistent en une synthèse bibliographique. Le premier présentera d'une part la pollution des milieux marins par les hydrocarbures pétroliers et d'autre part les différentes méthodes de remédiation biologiques et non biologiques. Le second chapitre sera consacré à l'étude du rôle des bactéries hydrocarbonoclastes, leurs propriétés, ainsi que les différentes voies métaboliques de dégradation des hydrocarbures employés par ces bactéries.

Le troisième chapitre est réservé à la présentation du site d'étude ainsi que la stratégie d'échantillonnage.

Le quatrième chapitre intitulé « Matériels et méthodes » exposera l'ensemble des méthodes expérimentales et analytiques utilisées pour atteindre nos objectifs. Cette partie concerne la mise au point méthodologique pour :

- L'estimation de la diversité bactérienne dans les échantillons d'eau de mer et des sédiments prélevés dans le port de Sidi Fredj en utilisant une technique indépendante à la culture DGGE « Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant »
- L'enrichissement, l'isolement, sélection et criblage des souches bactériennes aptes à vivre en présence d'hydrocarbures en s'appuyant sur des protocoles standards.
- L'identification moléculaire des souches bactériennes sélectionnées par amplification itérative (PCR) des gènes codant pour les ARN ribosomiaux 16S, le séquençage des amplicons et la recherche bioinformatique des séquences les plus proches dans les banques de séquences (Genbank).
- L'étude du pouvoir de biodégradation des hydrocarbures par les souches bactériennes sélectionnées. L'analyse sera faite par chromatographie gazeuse couplée à une détection par ionisation de flamme (GC-FID). Elle permet de séparer, identifier et quantifier la proportion relative des fractions majeures du pétrole.
- La présence de certains gènes cataboliques d'intérêt ciblant la dégradation des hydrocarbures et la détection des bactéries ayant un potentiel de bioremédiation vis-à-vis de ces composés.
- L'étude du pouvoir de productions de biosurfactants par les souches isolées.

Le cinquième chapitre « résultats et discussion » sera consacré à la présentation et à la discussion de tous les résultats obtenus.

Une conclusion générale ainsi que les perspectives envisagées pour continuer les travaux initiés clôtureront ce manuscrit.

Chapitre I

La pollution du milieu marin
par les hydrocarbures et les
procédés de remédiation.

Introduction.

Les mers et les océans couvrent près des trois quarts de notre planète et abritent une grande variété d'animaux marins, de plantes et de microorganismes. Ils sont reconnus depuis longtemps comme l'une des ressources naturelles les plus importantes de l'humanité. Leur immensité les a fait apparaître comme une source illimitée de nourriture, de transport et de loisir. Ils représentent des enjeux considérables en termes de développement socioéconomique et écologique. L'environnement marin est un réseau dynamique et diversifié d'habitats et d'espèces, liés par des processus écologiques et physiques complexes qui interagissent avec les hommes et leurs activités à plusieurs niveaux.

Les océans sont essentiels au bon fonctionnement de la planète, fournissant la moitié de l'oxygène que nous respirons et absorbant chaque année environ un quart du CO₂ émis dans l'atmosphère par les activités anthropiques (Sabine et al., 2004). Ils contiennent également des quantités considérables de minéraux précieux et de ressources énergétiques, tels que le pétrole, le gaz, le sel, les métaux précieux...etc. De plus l'océan fournit du travail à 140 millions de personnes dans les domaines de la pêche et de l'aquaculture, et encore plus d'emplois indirects dans les secteurs liés à la mer (commerce des produits de la mer, navigation, tourisme, exploitation minière offshore, activités militaire et scientifiques, loisirs nautiques). Cependant, au cours des dernières décennies, les zones côtières et les écosystèmes marins se trouvent soumis à de fortes tensions et sont devenus très vulnérables à cause de l'accroissement des activités humaines qui génèrent de plus en plus de polluants. Le milieu marin se trouve alors bouleversé et ses ressources menacées par les pressions anthropiques en termes d'aménagement du milieu côtier, de pollution et d'exploitation. L'environnement marin est devenu un récepteur privilégié des micropolluants en provenance des zones urbaines, industrielles et agricoles. Leur présence avérée et le manque de connaissances sur leur devenir dans l'environnement, sur leurs impacts potentiels sur la santé humaine et sur les écosystèmes sont devenus un sujet d'actualité pour la communauté scientifique.

Parmi les polluants retrouvés dans l'environnement marin susceptibles d'induire des effets toxiques, on trouve les hydrocarbures pétroliers.

Le pétrole est considéré comme une ressource énergétique vitale dans l'industrie et dans notre vie quotidienne. En même temps, il est le contaminant le plus répandu dans le milieu marin (Hara et al., 2004). Les hydrocarbures pétroliers sont des composés difficiles à dégrader et sont classés en tant que polluants prioritaires (Costa et al., 2012). L'accent a été mis sur l'environnement marin car il est considéré comme le récepteur ultime et le plus important de

la pollution humaine, en particulier la pollution par les hydrocarbures pétroliers (Ron et Rosenberg, 2014). Les hydrocarbures sont une cause de mortalité et de morbidité pour les organismes vivants. Il est donc nécessaire de lutter contre ce problème. Afin de comprendre les stratégies de remédiation de ces polluants, il est essentiel d'abord d'étudier les propriétés du pétrole brut, qui se révèlent être très utiles pour évaluer leurs impacts potentiels dans l'environnement. Elles vont notamment permettre de mieux prévoir leur répartition ainsi que leurs comportements dans les différents compartiments de l'environnement.

I.1 Composition du pétrole brut.

Le pétrole brut (c'est à dire tel qu'il est extrait) contient des milliers de molécules différentes dont seulement quelques centaines ont été séparées et dûment identifiées. Les pétroles sont tous différents selon leur densité, leur fluidité, leur teneur en soufre et en différentes classes d'hydrocarbures. Cependant les composés du pétrole peuvent être divisés en quatre fractions principales : les hydrocarbures aliphatiques, les hydrocarbures aromatiques, les résines et les asphaltènes (figures 1 et 2)

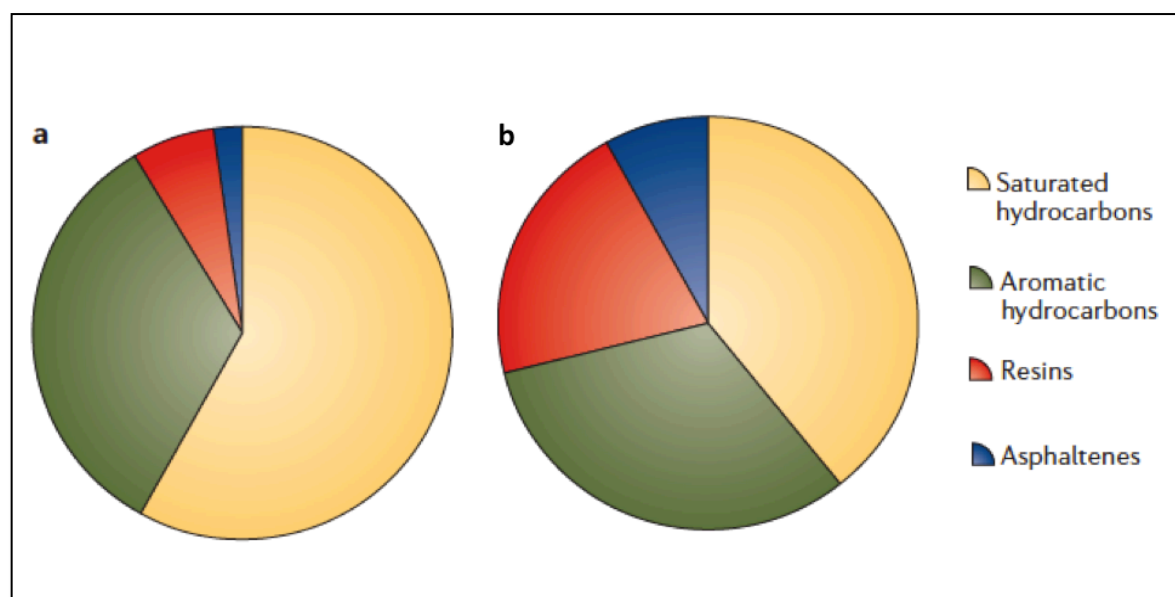


Figure 1. Composition d'un pétrole brut léger (a) de la mer du Nord et d'un pétrole brut lourd (b) (Head et al., 2006)

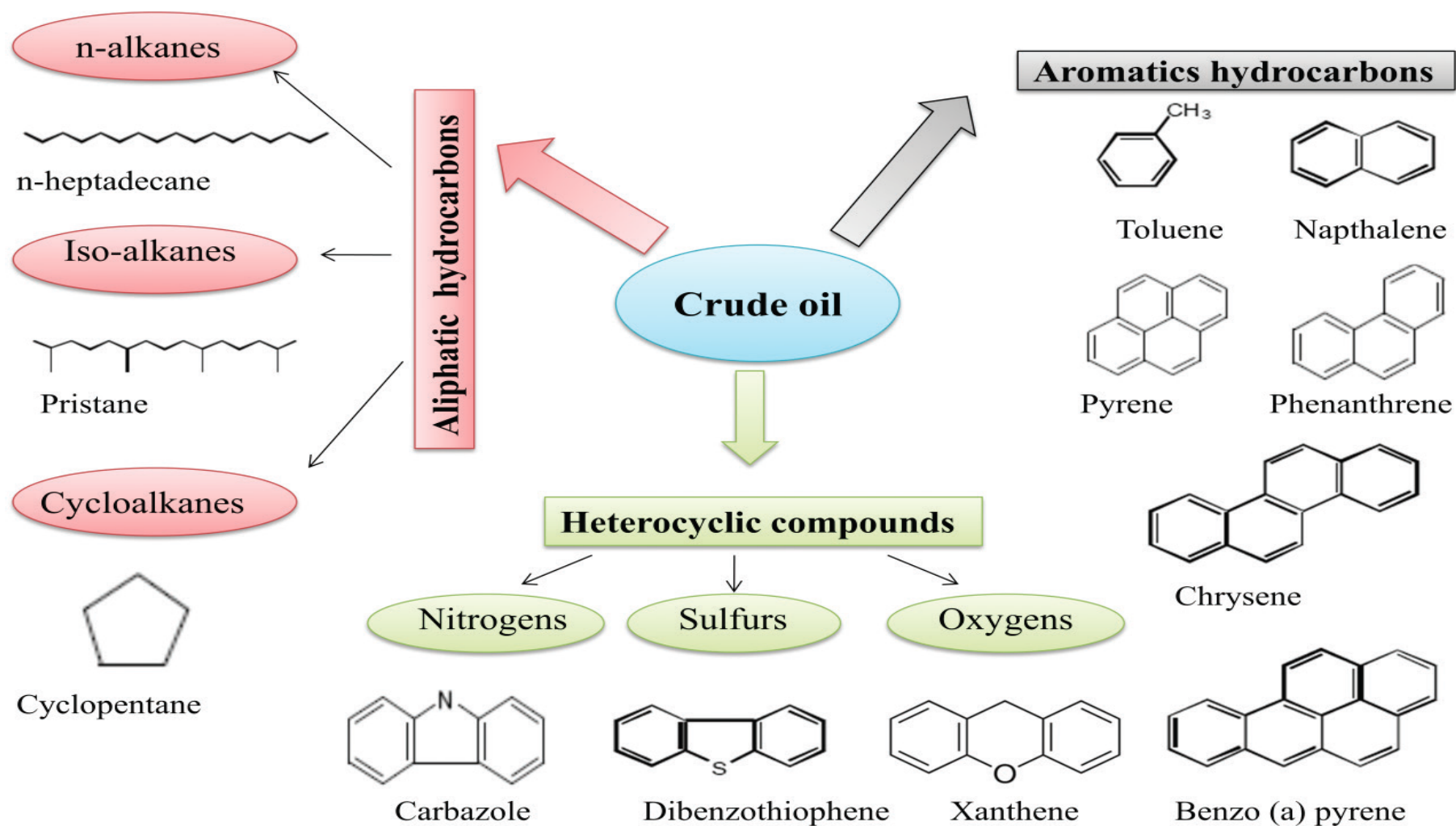


Figure 2. Les différentes familles d'hydrocarbures contenues dans le pétrole brut (Mahjoubi et al., 2018)

Le pétrole brut peut être classé comme pétrole léger, moyen ou lourd. Les pétroles légers sont généralement riches en hydrocarbures saturés et aromatiques avec une faible proportion en résines et asphaltènes. Tandis que les pétroles lourds résultant de la biodégradation du pétrole dans des conditions anoxiques in situ dans les réservoirs de pétrole, ont un contenu plus faible en hydrocarbures saturés et aromatiques et une plus grande proportion des produits les plus polaires, les résines et asphaltènes (Figure 1) (Head et al., 2006).

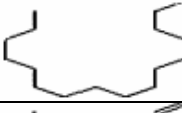
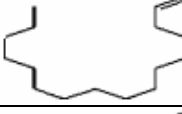
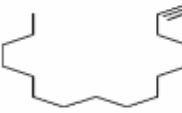
La biodégradabilité des pétroles bruts est très fortement dépendante de leur composition (Atlas, 1981); à une température déterminée, un pétrole léger est plus susceptible d'être biodégradé qu'un pétrole lourd.

I.1.1 Les hydrocarbures Aliphatiques.

Les hydrocarbures aliphatiques représentent le pourcentage le plus élevé des constituants du pétrole. Ces hydrocarbures sont formés de chaînes linéaires d'atomes de carbone, qui peuvent être saturées ou posséder une ou plusieurs insaturations. Les alcanes, de formule brute C_nH_{2n+2} , sont caractérisés par la présence de liaisons simples entre les atomes de carbone. Ils forment deux grands groupes : les hydrocarbures à chaînes ouvertes et les cyclanes dont la chaîne est fermée. Les hydrocarbures saturés sont caractérisés par la présence de double et de triples liaisons entre deux atomes de carbone et sont appelés respectivement les alcènes (C_nH_{2n}) et les alcynes (C_nH_{2n-2}).

Les hydrocarbures aliphatiques sont des composés non polaires et hydrophobes. Comparés aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (Stroud et al., 2007), ils semblent être beaucoup moins solubles dans l'eau de par leurs indices de solubilité moins élevés. Leurs températures de vaporisation peuvent être relativement importantes et sont directement influencées par la longueur de leur chaîne carbonée (tableau 1). En conséquence, ces caractéristiques font que ces polluants organiques sont peu lessivables et volatilisables (Stroud et al., 2007). Les hydrocarbures aliphatiques saturés (alcanes) sont plus sensibles aux phénomènes de biodégradation que les hydrocarbures aliphatiques non saturés (alcènes, alcynes). Il en est de même pour les alcanes à longue chaîne ou non ramifiés comparés aux alcanes à chaînes plus courtes ou ramifiées (Zhang et Bennett, 2005). Ainsi, certains hydrocarbures aliphatiques peuvent être considérés comme des composés récalcitrants à la dégradation et donc peuvent présenter une persistance au niveau des sédiments qui doit être prise en considération (Reid et al., 2000).

Tableau 1. Caractéristiques physico-chimiques d'hydrocarbures (HC) aliphatiques. La structure des hydrocarbures influence leurs propriétés physico-chimiques *ND* : Non défini ; K_{ow} : coefficient de partage octanol/eau. (Stroud et al., 2007)

Type	Nom	Formule	Poids moléculaire (g/mol)	Structure	Point de fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)	Solubilité (mg/l)	Log K_{ow}
Alcane	Tétradécane	$C_{14}H_{30}$	198,38		5,5	253	0,000282	7,2
Alcane	Hexadécane	$C_{16}H_{34}$	226,44		18	287	0,0009	9,1
Alcène	Hexadécène	$C_{16}H_{32}$	224,43		3 à 5	274	ND	ND
Alcyne	Hexadécyne	$C_{16}H_{30}$	222,42		15	148	ND	ND
Cyclane	Cyclohexane	C_6H_{12}	84,16		6,55	80,74	ND	ND

I.1.2 Les hydrocarbures Aromatiques.

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et poly-aromatiques dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans le pétrole brut. En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier (Bertrand et mille, 1989). Les hydrocarbures aromatiques sont séparés en deux groupes distincts: les hydrocarbures mono-aromatiques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques.

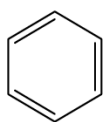
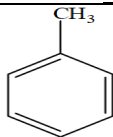
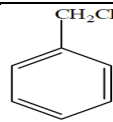
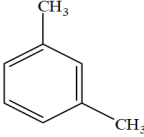
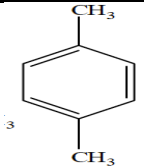
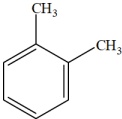
I.1.2.1 Les hydrocarbures mono-aromatiques.

Les hydrocarbures mono-aromatiques forment une des grandes classes de composés présents dans l'environnement avec les hydrocarbures chloro-aromatiques. (Vandecasteele et Ourisson, 2005). La présence des hydrocarbures mono-aromatiques en quantités considérables dans l'environnement est due principalement aux activités humaines, ils sont en grandes majorité d'origine pétrolière ou pétrochimique (Andreoni et Gianfreda, 2007).

Parmi les hydrocarbures mono-aromatiques, le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes, désignés sous le sigle de BTEX, sont particulièrement importants du fait de leur abondance dans les essences, et de leurs utilisations en pétrochimie (Phale et al., 2007). Les

BTEX existent à l'état naturel dans le pétrole brut, le goudron et le charbon. Leurs sources d'émission dans l'environnement sont principalement d'origines industrielles et domestiques. À température ambiante et sous pression atmosphérique normale, les BTEX sont des liquides incolores possédant une forte odeur aromatique caractéristique (Del-Gratta et al., 2000; Zwank et al., 2002). Les principales propriétés physico-chimiques des BTEX sont présentées dans le tableau 2. D'après les données, ces composés sont caractérisés par une solubilité dans l'eau relativement légère, une tension de vapeur élevée et un coefficient de partage du carbone organique faible. Leur hydrophobicité provoque une forte toxicité pour la membrane cytoplasmique (ils vont ainsi modifier la structure de la membrane et diminuer son efficacité). Les hydrocarbures mono-aromatiques sont ainsi toxiques pour les cellules vivantes (Feknous, 2017).

Tableau 2. Caractéristiques physico-chimiques et structures des BTEX. ; K_{ow} : coefficient de partage

Composé	Solubilité g/l	Tension de vapeur (mm Hg)	Masse moléculaire	Structure	Log K_{ow}	Température de vaporisation (°C)
Benzène	1,79	94,8	78		2,2	80
Toluène	0,53	28,4	92		2,4	111
Ethylbenzène	0,17	9,6	106		2,7	136
m-Xylène	0,16	8,3	106		2,6	139
p-Xylène	0,16	8,8	106		2,6	138
o-Xylène	0,11	7,99	106		2,6	139

I.1.2.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des composés organiques hydrophobes issus de la combustion incomplète des matières carbonées. Les HAP sont formés exclusivement d'atomes de carbone et d'hydrogène et sont constitués d'au moins deux noyaux aromatiques fusionnés. Ils diffèrent par le nombre de noyaux accolés ainsi que par leur arrangement qui peut être linéaire (anthracène), angulaire (phénanthrène) ou groupé (pyrène) (figure 3). Ils se présentent le plus souvent sous forme de mélanges complexes. Les HAP sont des polluants ubiquistes détectés dans tous les écosystèmes, des régions polaires aux tropiques (Wilcke, 2007). L'Agence de protection environnementale des Etats-Unis (US EPA) a élaboré une liste indiquant les HAP qui devraient être prioritairement pris en compte. Cette première liste, met en évidence seize hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP)

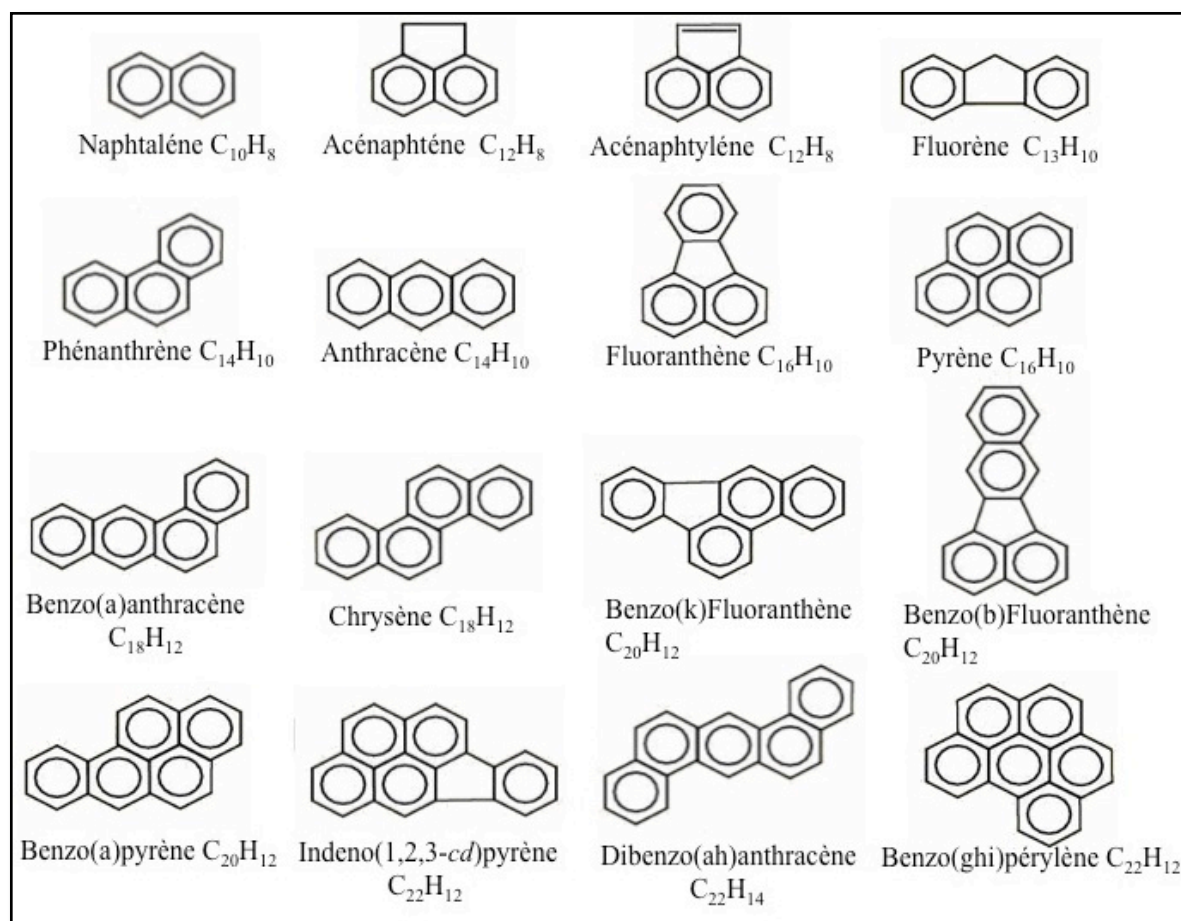


Figure 3. Structure des 16 Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) prioritaires selon l'US EPA (United States Environmental Protection Agency).

Les HAP sont subdivisés en deux groupes d'une part les HAP de faibles poids moléculaires qui comptent 2 à 3 cycles benzéniques fusionnés et d'autre part les HAP de hauts poids moléculaires qui comptent plus de 3 cycles benzéniques (Lafortune, 2007). En raison de leurs caractéristiques physico-chimiques et de la multitude de sources, une fois émis dans l'atmosphère, ces composés vont avoir une tendance à s'accumuler dans les différents compartiments de l'environnement (eau, sol, sédiment).

Tableau 3. Propriétés physico-chimiques de 16 HAP (Lundstedt, 2003) La constante d'Henry représente la solubilité d'un gaz dans un solvant liquide ; K_{ow} : coefficient de partage octane/eau- K_{oc} : coefficient de partage carbone/eau

composés	Poids moléculaire (g.mol ⁻¹)	Solubilité dans l'eau à 25°C (mg.l ⁻¹)	La constante d'Henry (KH) (Pa m ³ /mol)	Log K_{ow}	Log K_{oc}
Naphtalène	128	31,7	48,9	3,37	3,15
Acénaphthylène	150	16,1	8,40	4	1,4
Acénaphène	154	3,8	14,7	3,92	3,6
Fluorène	166	1,9	9,2	4,18	6,2
Phénanthrène	178	1,1	3,24	4,57	4,15
Anthracène	178	0,05	3,96	4,54	4,15
Fluranthène	202	0,26	1,037	5,22	4,58
Pyrène	202	0,13	0,92	5,18	4,58
Benzo(a)anthracène	228	0,011	0,581	5,91	5,3
Chrysène	228	0,002	0,065	5,6	5,3
Benzo(b)Fluoranthène	252	0,0015	0,05	5,8	5,74
Benzo(k)Fluoranthène	252	0,0008	0,016	6	5,74
Benzo(a)Pyrène	252	0,0038	0,046	6,06	6,74
Dibenzo(a,h)anthracène	278	0,0006	0,0005	6,75	6,52
Dibenzo(g,h,i) pérylène	268	0,00026	0,002	6,5	6,2
Indéno(1,2,3-c,d) pyrène	276	0,062	0,0008	6,6	6,2

Les propriétés physico-chimiques des HAP varient surtout selon le nombre de cycles benzéniques qu'ils contiennent et aussi selon l'arrangement de ces cycles (Kanaly et Harayama, 2000). Généralement lorsque le nombre de cycles benzéniques et l'angularité de la molécule augmentent, on observe une augmentation de l'hydrophobicité et de la stabilité

électrochimique de l'HAP. La stabilité moléculaire et l'hydrophobicité sont les deux plus importants facteurs qui contribuent à la persistance des HAP dans l'environnement. Ceci les rend aussi relativement résistants à la biodégradation naturelle. De façon générale, les HAP sont très peu solubles dans l'eau, leur solubilité dépend du nombre de cycles benzéniques.

Le transport et la répartition des HAP dans l'environnement marin dépendent notamment de leurs propriétés physico-chimiques (tableau 3).

De façon générale, les HAP sont des composés chimiquement très stables, hydrophobes et ayant une faible volatilité, donc peu solubles dans l'eau. Ils ont tendance à s'adsorber sur les matrices solides et notamment les matières organiques (Zhou et al., 2004). Les HAP absorbent la lumière dans le spectre du visible (400-700 nm) et des ultraviolets (290-400 nm). Ces molécules peuvent induire une photo-toxicité sous lumière UV.

Ils peuvent être facilement transférés dans les différents maillons de la chaîne alimentaire aquatique à cause de leur caractère lipophile, c'est à dire qu'ils peuvent s'accumuler dans les graisses. Il peut donc avoir un danger d'accumulation tout au long de la chaîne alimentaire et peuvent atteindre l'homme suivant des cycles de complexités variables.

Le comportement des HAP dans la chaîne alimentaire joue un rôle majeur dans l'étude de l'exposition de l'homme, de la faune et de la flore à ces contaminants (Grova et al., 2002). Ainsi de nombreuses études ont montré l'aptitude des HAP les plus lipophiles à se concentrer au niveau des tissus gras, ce qui favorise leur insertion dans la chaîne trophique avec des phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification (Fent, 2004). Ce dernier phénomène dépend de deux caractéristiques physico-chimiques des HAP :

- Leur stabilité chimique et métabolique, qui explique à la fois leur faible dégradation dans le milieu, et leur accumulation dans les organismes vivants ;
- Leur caractère lipophile qui entraîne leur passage facilité par diffusion passive à travers les membranes biologiques des êtres vivants.

I.1.3 Les asphaltènes et les résines.

Les résines et les asphaltènes, sont constituées de composés chimiquement complexes et mal connus (Harayama et al., 1999). Ces deux fractions contiennent la plupart des hétéro-éléments présents dans le pétrole. Les asphaltènes et les résines constituent une faible partie du pétrole brut, 1 à 5% du pétrole léger alors qu'un pétrole lourd peut contenir plus de 25% d'asphaltènes et 20% de résines (Soltani, 2004).

Les résines contiennent de nombreux groupes fonctionnels polaires formés avec l'azote, le soufre, l'oxygène et des métaux en traces (nickel, vanadium). Les résines sont des solides amorphes dissoutes dans l'huile (Balba et al., 1998; Speight, 2014). Les résines contiennent des composés aromatiques à longue chaîne alkyle et sont solubles dans le n-heptane et le n-pentane (Parra-Barraza et al., 2003; Chandra et al., 2013). Ils sont structurellement similaires aux molécules tensio-actives du pétrole brut et agissent en tant qu'agents de peptisation (Jada et Salou, 2002). Les asphaltènes, comme les résines, contiennent de nombreux groupes polaires fonctionnels. Ce sont des molécules brunes foncées, grandes et complexes, dispersées colloïdalement dans des hydrocarbures saturés et aromatiques (Balba et al., 1998; Speight, 2014). Ils sont solubles dans les hydrocarbures aromatiques légers tels que le benzène et le toluène (Parra-Barraza et al., 2003). Les asphaltènes sont des composés visqueux et de haut poids moléculaire composés d'amas polycycliques, substitués de manière variable par des groupes alkyle, ce qui contribue à leur résistance à la biodégradation. Les agents peptisants, à savoir les résines, maintiennent les asphaltènes en suspension, favorisant ainsi la stabilité du pétrole brut (Parra-Barraza et al., 2003; Chandra et al., 2013).

I.2 Principales origines des hydrocarbures dans le milieu marin.

Les hydrocarbures pétroliers arrivent dans l'environnement à partir de diverses sources naturelles et anthropiques.

I.2.1 Origines naturelles.

Origine biogénique : L'introduction des hydrocarbures pétroliers dans le milieu marin peut avoir une origine naturelle. Des hydrocarbures aliphatiques, aromatiques et polyaromatiques condensés, sont biosynthétisés par les organismes vivants terrestres et aquatiques (Soltani, 2004). Les espèces phytoplanctoniques et les macro-algues par exemple synthétisent des n-alcanes dont les longueurs de chaînes varient respectivement de n-C₁₄ à n-C₃₂ et de n-C₂₀ à n-C₃₀ (Saliot, 1981). La destruction de ces espèces, libère des consistances visqueuses dans le fond et dans les sédiments.

Suintements naturels : Certaines zones des mers côtières (côte de l'Alaska, de la Californie, du golfe du Mexique, Venezuela, Mer Rouge, Mer Caspienne, île de Bornéo) sont exposées aux suintements sous-marins, ce sont des phénomènes naturels dû à la remontée d'hydrocarbures fossiles du contenu de certains gisement situés sous le plateau continental dans les zones à activités sismiques importantes. Les suintements naturels ont été estimés

autour de 250 000 tonnes par an sur la période de 1999-2000, ce qui laisse à l'homme la responsabilité de plus de 90% du total des déversements à travers le monde (Al Bakjaji, 2011). En milieu marin, ces hydrocarbures remontent à la surface de l'océan, formant des "marées noires" naturelles. Le suintement naturel le plus important à ce jour est celui situé à Santa Barbara Chanel, Californie, USA, qui libère quotidiennement 170 000 m³ de gaz naturel (CH₄) et 16 000 l de pétrole (Kim et al., 2003 ; Mau et al., 2007).

Origine pyrolytique : Cette origine est dite naturelle quand des hydrocarbures sont générés sous l'action de la chaleur naturelle. Certains hydrocarbures comme les HAP considérés comme des polluants cancérigènes et mutagènes, proviennent de la combustion incomplète de la matière organique et en particulier les combustibles fossiles (Suess, 1976 ; Abd el shafy et Mansour, 2015). Ces hydrocarbures peuvent être également dégagés en grandes quantités dans l'atmosphère lors des feux de forêts. Ce sont principalement des hydrocarbures légers qui sont libérés dans l'atmosphère lors de ces incendies, ou ils peuvent être transportés sur de très longues distances (Kim et al., 2003).

Origine diagénétique : De nombreux hydrocarbures saturés et aromatiques se sont formés durant des périodes de temps géologiques par transformation de la matière organique enfouie dans les sédiments (Widdel et Rabus, 2001).

La diagenèse précoce de la matière organique dans les gisements sous-marins est le résultat de la combinaison de plusieurs processus biologiques, chimiques et physiques (bioturbation, décomposition de la matière organique par l'activité bactérienne et des phénomènes de recristallisation/dissolution) (Cojan et Renard, 1997) qui peuvent accélérer la maturation de la matière organique déposée à la surface des sédiments sous forme de pétrole. Les HAP peuvent dériver de la modification chimique lors de la diagenèse précoce des précurseurs biogéniques tels que les di- et tri-terpènes, stéroïdes, pigments, quinones, accumulés dans les sédiments ou sols récents et dans une période géologique relativement courte (Wakeham et al., 1980). Ces précurseurs peuvent provenir de tissus biologiques terrestres ou aquatiques (plantes, animaux, bactéries, macro- et micro-algues) (Wang et al., 2004). La source diagénétique est toutefois minoritaire par rapport aux deux autres sources (Budzinski et al., 1997).

I.2.2 Origines anthropiques.

Les hydrocarbures pétroliers peuvent avoir comme sources des processus naturels, mais l'activité anthropique est généralement considérée comme la source majeure d'introduction des hydrocarbures dans l'environnement.

Les activités industrielles en général: L'utilisation et la combustion de cette énergie fossile sur les continents, dans les mers et l'atmosphère constitue une importante source d'hydrocarbures, qui seront apportés au milieu marin directement ou indirectement via les rivières, les eaux de ruissellement, les particules aérosols contaminées, les rejets industriels et urbains, de fumées industrielles, gaz d'échappement des moteurs (Lipiatou et Saliot, 1991).

Les rejets industriels et domestiques des stations d'épuration contiennent des quantités non négligeables en hydrocarbures suites à leurs utilisations en tant que sources d'énergie et de matière primaire pour divers produits tout au long de la chaîne industrielle.

Les activités pétrolières : Les activités pétrolières engendrent une contamination continue et chronique des points de rejets souvent marins et aussi peuvent causer des déversements accidentels au cours des différentes étapes des activités pétrolières: les fuites des oléoducs, les opérations de vidange réalisées par les pétroliers en mer, les opérations offshore (rejet des eaux de gisement), rejet urbain (Raffineries et industries pétrochimiques installées dans des zones portuaires). En Méditerranée, 9000 trajets de pétroliers, transportant plus de 400 millions de tonnes de pétrole brut, ont été enregistrés en 2006. D'après certaines études, environ 0,1% du pétrole brut transporté est délibérément déversé dans la mer chaque année à la suite d'opérations de nettoyage des citernes (Kluser et al., 2006).

Le déballastage : Une fois sa cargaison déchargée, un pétrolier doit ballaster c'est-à-dire remplir d'eau de mer ses cuves pour assurer la stabilité du navire lorsqu'il fait route. Le ballast représente en volume environ 1/5 du navire. Lorsqu'il se prépare de nouveau à charger, le pétrolier doit donc vider ses cuves de l'eau de mer qu'elles contiennent. Cette opération de déballastage théoriquement réalisée dans les installations portuaires prévues à cet effet, a lieu en réalité souvent en mer de façon illégale, à l'approche des ports (Laurent et Castellanet, 2003).

Le dégazage : Correspond aux rejets d'huiles de vidange et de résidus de fuel générés par les moteurs de l'ensemble des navires. Les pollutions dues aux vidanges des moteurs, aux huiles et résidus de fuel concernent en effet tous les types de navires : transport de cargaison

(tankers, vraquiers, portes-containers..), transport de passagers (bateaux de croisières, ferry..) et bateaux de pêche. Compte tenu de l'utilisation d'un fuel brut de bas de gamme pour la propulsion du navire, seule une partie du fuel peut être consommée par les machineries lorsqu'un navire fait route. Outre ces résidus de fuel, un navire consomme une importante quantité d'huiles de graissage, qui fuient des machineries et s'accumulent dans les fonds de cales des navires (Laurent et Castellonet, 2003).

Les accidents pétroliers : Le tableau 4, montre les catastrophes les plus importantes dépassant les 100 000 tonnes de pétrole déversé ainsi que les zones affectées, depuis 1967 à nos jours. Le premier accident couvert médiatiquement a été celui du pétrolier Torrey Canyon (1967) qui déversa 119 000 tonnes de pétrole brut qui souillèrent 180 km de côtes anglaises et françaises. De nombreuses catastrophes pétrolières s'en suivirent, issues à la fois du transport et de la prospection du pétrole. En 1978, l'Amoco Cadiz déversa 227 000 tonnes de pétrole au large des côtes françaises. Le puits sous-marin Ixtoc one, dans le golfe du Mexique déversa plus 350 000 tonnes de pétrole brut dans l'océan entre juin 1979 et mars 1980.

Tableau 4. Accidents pétroliers les plus importants (plus de 100 000 tonne de pétrole déversés) de 1967 à nos jours.

Période	Nom du pétrolier	Quantité de pétrole déversé (tonnes)	Zones affectées
3 mars 1967	Torrey canyon	119 000	Côtes britanniques et françaises
7 décembre 1971	Texaco Denmark	106 300	Mer du nord, au large de la Belgique
12 décembre 1972	Sea star	115 000	Iran, golfe d'Oman
12 mai 1976	Urquiola	101 000	La Corogne (Espagne)
19 mars 1978	Amoco Cadiz	227 000	Portsall, Finistère (France)
Du 3 juin 1979 au 23 mars 1980	Plateforme Ixtoc 1	470 000	Golfe du Mexique
19 Juillet 1979	Atlantic Empress	287 000	Trinité et Tobago
23 Février 1980	Irenes Serenade	102 660	Grèce
Novembre 1987	Fortuneship	260 000	Iran
6 août 1983	Castillo de Bellver	252 000	Afrique du Sud
10 Novembre 1988	Odyssey	132 000	1300 km au large du Canada
11 Avril 1991	Haven	145 000	Gênes (Italie)
28 Mai 1991	ABT Summer	260 000	Large de l'Angola
20 avril 2010 au Juillet 2010	Deep water horizon	678 000	Golfe du Mexique
6 Janvier 2018	MT Sanchi	136 000	Mer de Chine orientale

La plus grande catastrophe fut celle de la plateforme Deep Water Horizon qui déversa 678000 tonnes de pétrole brut dans le golfe du Mexique atteignant les littoraux de 4 états américains

(Louisiane, Mississippi, Alabama, Floride) sur plusieurs centaines de kilomètres de côtes (Milinkovitch, 2011).

Les guerres : D'autres sources viennent alourdir le bilan, citons l'exemple de la première guerre du Golfe, où la fin du conflit en 1991 a révélé la catastrophe des champs de puits de pétrole en flamme et le naufrage de pétroliers bombardés, déversant des quantités importantes de brut. Le bilan total a été estimé à 800 000 tonnes déversées, 40 millions de tonnes de sols saturés de pétrole et 700 km de côtes polluées (Soltani, 2004).

I.3 Toxicité des hydrocarbures pétroliers.

Les déversements des hydrocarbures pétroliers par les diverses sources naturelles et anthropiques telles que : ruissellements terrestres, déversements de pétrole brut, ordures des raffineries de pétrole, production de pétrole en mer, activités de transport et déversement accidentel de combustibles et autres, peuvent avoir des répercussions sérieuses sur l'environnement marin, tant par engluement physique que par toxicité (Yakimov et al., 1998). La sévérité de l'impact dépend généralement de la quantité et du type d'hydrocarbure déversé, des conditions ambiantes, ainsi que de la sensibilité aux hydrocarbures des organismes touchés et de leur habitats.

Les hydrocarbures pétroliers sont des polluants organiques persistants, pouvant détruire l'équilibre écologique qui peut prendre des années, voir des décennies pour se rétablir (Zhang et al., 2011). Ils sont retrouvés à différents niveaux (surface, colonne d'eau, sédiment) et sous différentes formes (intacts ou biotransformés, solubles, particuliers).

Fellenberg (1980) a rapporté qu'au contact de l'eau, le pétrole et ses sous-produits s'étalent et forment un film à la surface de l'eau qui interfère avec la pénétration de la lumière dans la colonne d'eau ainsi qu'avec les échanges gazeux entre l'air et l'eau. Ils sont aussi connus pour avoir un effet inhibiteur sur de nombreuses réactions enzymatiques et peuvent obstruer les ouvertures stomatales chez les macrophytes interférant ainsi avec le processus de photosynthèse (Kaiser, 2001). Des études effectuées dans la mer du Nord ont démontré que la pollution par les hydrocarbures diminue la richesse spécifique et nuit à la dispersion des organismes marins. Ce phénomène a aussi été observé par Gesteira et Dauvin (2000) lors de leurs études de deux communautés infralittorales d'amphipodes de la côte ouest de la Manche et du nord de la péninsule Ibérique. Dans les deux cas, il a été remarqué la disparition du genre *Ampelisca* ainsi qu'un très faible taux de recolonisation des autres espèces

d'amphipodes durant les quatre années ayant suivi les déversements des pétroliers Amoco Cadiz en 1978 et Aegean Sea en 1992 (Bélanger, 2009).

Dans l'environnement, les hydrocarbures aliphatiques peuvent être présents sous différentes formes augmentant ainsi les risques d'exposition. En effet, à température ambiante, les hydrocarbures aliphatiques sont gazeux jusqu'à C₄, puis liquides et enfin solides à partir de C₁₆ (excepté pour les alcynes qui se solidifient à partir de C₁₅). Ces formes induisent des modes de contamination différents. Par ordre d'importance, on notera l'inhalation, la pénétration à travers la peau puis l'ingestion (Baudouin et al., 2002). Une fois dans l'organisme, ces composés hautement liposolubles rejoignent la circulation sanguine puis sont répartis vers un spectre très large de tissus avec une localisation préférentielle au niveau des tissus adipeux. Du fait de leur caractère lipophile, ces polluants ont une tendance à la bioaccumulation via les réseaux trophiques (Fent, 2004).

De nombreux hydrocarbures aliphatiques présentent des risques toxicologiques, mutagènes voir même cancérogènes pour de nombreux organismes dont l'homme (Spencer et al., 2002).

Les hydrocarbures aliphatiques chlorés (méthanes, éthanes et éthènes chlorés) sont les plus étudiés car ce sont des composés chimiques qui sont largement utilisés pour leurs propriétés de solvants et dont la toxicité est avérée (Ruder, 2006). En effet, le contact avec ces contaminants peut entraîner des dommages, pouvant aller jusqu'au développement de cancers, au niveau de nombreux organes (foie, reins, système cardio-vasculaire, système reproductif, système nerveux, etc).

Pettigrove et Hoffmann. (2005) ont étudié l'impact d'une contamination par des hydrocarbures aliphatiques de haut poids moléculaire dans les sédiments d'un cours d'eau et ont mis en évidence une diminution du nombre total de taxons et de leur abondance pour des concentrations totales en hydrocarbures pétroliers comprises entre 1858 et 14266 mg.kg⁻¹.

Des études ont montré que ces hydrocarbures contribuent avec les hydrocarbures aromatiques à la toxicité globale et a une incidence sur la croissance et la reproduction d'un amphipode vivant dans le sédiment (*Corophium volutator*). Les hydrocarbures aliphatiques ayant une faible solubilité dans l'eau peuvent devenir disponibles pour ces organismes aquatiques via le dépôt de nourriture à la surface du sédiment. La toxicité des hydrocarbures dépend de plusieurs facteurs environnementaux (température, lumière) mais aussi de paramètres propres à l'organisme (espèce, stade de développement, voie de contamination). Ainsi, il a été observé une toxicité plus importante des HAP pour les organismes à leurs premiers stades de développement et en présence de lumière (IPCS, 1998).

Les hydrocarbures aromatiques tels les BTEX et les HAP sont les composés les plus toxiques de par leur caractère mutagène, carcinogène et récalcitrant (Phale et al., 2007). Leur seuil de toxicité aiguë chez plusieurs organismes marins côtiers peut être atteint à des concentrations se situant entre 10 et 100 ppm. En présence de concentrations plus faibles, les produits pétroliers peuvent engendrer une toxicité dite chronique pour la faune et la flore. En effet, le comportement des espèces peut être altéré, les activités psychologiques de la faune peuvent être perturbées et une modification du taux de croissance ou encore du taux de reproduction peut être observée (Lougheed et al., 2002). Les hydrocarbures aromatiques constituent une classe de composés hydrophobes, donnant une stabilité thermodynamique non négligeable. Les HAP se trouvent dans l'environnement à des doses relativement faibles, mais leur caractère hydrophobe entraîne leur bioconcentration dans la chaîne alimentaire.

Les HAP présentent un potentiel mutagène et cancérigène important. Par conséquent, ils sont considérés comme étant dangereux pour la santé humaine et l'environnement (Soclo et al., 2000 ; Notar et al., 2001). Ils présentent des effets directs ou indirects tels que La suffocation, l'anoxie, le retard de croissance, les perturbations des réactions métaboliques et le déséquilibre hormonal des formes de vie (Walker, 2005 ; Souza et al., 2014).

La mortalité par nécrose aiguë, l'hypothermie, l'étouffement, la noyade et l'ingestion de composés toxiques au cours du lissage sont quelques-uns des impacts à court terme (Desforges et al., 2016). Les impacts à long terme comprennent les anomalies de développement des animaux marins telles que la réduction de la mâchoire, le manque de pigmentation et les crânes non fusionnés (Van Meter et al., 2006; Alonso-Alvarez et al., 2007). Ces effets entraînent des changements dans la population ou la communauté d'une espèce et, par conséquent, dans tout un écosystème (Walker, 2005). Les composés organiques volatils (COV) du pétrole brut sont extrêmement nocifs pour l'homme (Costa et al., 2012; Souza et al., 2014). Les composants du pétrole brut, en particulier les HAP, peuvent provoquer des tumeurs malignes affectant principalement la peau et les autres tissus épithéliaux car ils ont une grande affinité pour le centre nucléophile des macromolécules telles que l'ARN, les protéines et l'ADN (Perez-Cadahia et al., 2007; Costa et al., 2012; Desforges et al., 2016).

Les HAP sont en effet des molécules biologiquement actives qui, une fois absorbées par les organismes, se prêtent à des réactions de transformation sous l'action d'enzymes conduisant à la formation d'époxydes et/ou de dérivés hydroxylés. Les métabolites ainsi formés peuvent avoir un effet toxique plus ou moins marqué en se liant à des molécules biologiques

fondamentales telles que les protéines, l'ARN, l'ADN et peuvent provoquer des dysfonctionnements cellulaires. Outre leurs propriétés cancérigènes, les HAP présentent également un caractère mutagène dépendant de la structure chimique des métabolites formés. Ils peuvent aussi entraîner une diminution de la réponse du système immunitaire augmentant ainsi les risques d'infection (Gasper, 2006).

I.4 Devenir des hydrocarbures dans le milieu marin.

Il est essentiel de connaître le sort des hydrocarbures dans l'environnement afin de contrôler et combattre la pollution (Walker, 2005). Dès son déversement dans l'environnement marin, l'hydrocarbure est soumis à de nombreux processus naturels, connus sous le nom de « vieillissement », qui modifient rapidement et progressivement ses propriétés et redistribuent la plupart de ses composés dans les autres compartiments de l'environnement (figure 4).

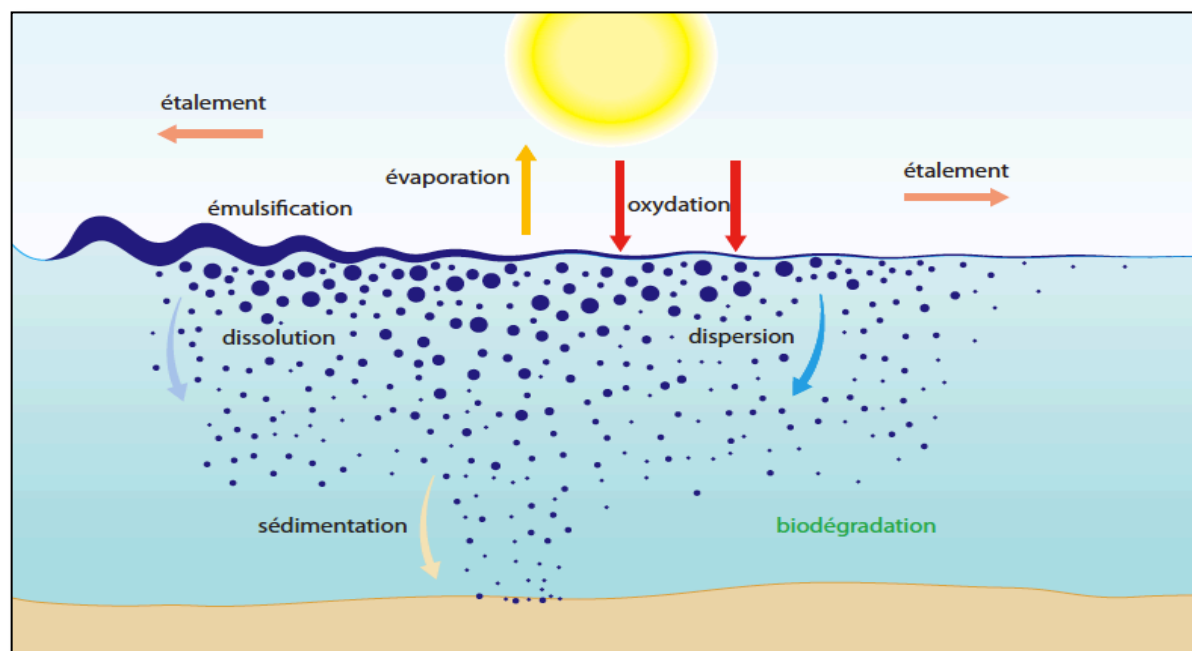


Figure 4. Devenir des hydrocarbures pétroliers dans la colonne d'eau et dans les sédiments (Mcgenity et al., 2012).

Le devenir du pétrole déversé en mer, dépend de plusieurs facteurs dont les plus importants sont : les caractéristiques physico-chimiques des hydrocarbures déversés (composition, densité, solubilité, viscosité, quantité), des facteurs environnementaux (température, vents, précipitation) et l'état physique de la mer (turbulence, vagues, courants marins) (Atlas, 1981; Widdel et Rabus, 2001). Le mécanisme et l'amplitude des effets écologiques sont influencés de manière significative par le devenir de l'hydrocarbure.

Suite à cette pollution, trois phases principales se déroulent successivement :

- Une phase initiale d'extension ou étalement de la pollution en surface et en profondeur avec une forte mortalité des organismes vivants. Sa durée est en général le double de celle du déversement des produits pétroliers,
- Une phase de stabilisation du niveau de contamination des différents ensembles touchés (eau de mer, roche en place, organismes vivants), qui peut durer quelques mois à plus d'un an,
- Une phase de recolonisation et de restructuration des peuplements, aux rythmes variables suivant les ensembles bioclimatiques. Les hydrocarbures déversés dans l'environnement, sont progressivement décomposés par des processus physiques, chimiques et biologiques.

Les principaux processus de vieillissement sont :

I.4.1 Etalement.

Un hydrocarbure déversé à la surface de la mer s'étalera, même sans aucun mouvement résultant des marées ou du vent. La vitesse d'étalement dépend du point d'écoulement et de la viscosité : les hydrocarbures légers s'étaleront très rapidement, quelle que soit la température de la mer, alors que les hydrocarbures lourds s'étaleront plus lentement et resteront épais plus longtemps, notamment dans les mers froides, qui constituent des environnements réduisant la vitesse de dispersion. Les organismes vivants en surface ou les animaux remontant à la surface pour respirer sont particulièrement vulnérables à l'égard d'un déversement d'hydrocarbures ; en outre, la vitesse et la direction des vents et des marées auront une incidence sur l'étendue de la nappe d'hydrocarbures. Si la plupart des hydrocarbures ont tendance à s'étaler et à se déplacer, ils se fragmentent également très rapidement, entraînant un morcellement et la formation de nombreuses nappes. L'épaisseur d'une nappe d'hydrocarbure est souvent très irrégulière, avec des fragments recouverts de couches épaisses d'hydrocarbures séparées par des zones plus grandes recouvertes par une fine couche d'hydrocarbure (irisation) ou des eaux propres ([Dalemont, 1998](#)).

I.4.2 Evaporation.

La plupart des hydrocarbures frais, non vieillis, contiennent une part d'hydrocarbures de faible poids moléculaire qui possèdent un point d'ébullition bas (par ex. les alcanes de moins de 12 atomes de carbone et les composés BTEX). Lorsque déversés en mer ou sur la côte, l'évaporation de ces hydrocarbures dans l'atmosphère sera immédiate, sous l'effet de la

température ambiante et des circulations d'air. Ces processus augmentent progressivement la viscosité de l'hydrocarbure déversé, mais réduisent aussi le volume et la toxicité aiguë de l'hydrocarbure résiduel. Dans le cas où l'hydrocarbure demeurerait à la surface pendant plusieurs heures ou plusieurs jours, le processus de vieillissement pourrait laisser un résidu collant dont la toxicité serait relativement faible. La proportion de l'hydrocarbure résiduel varie d'une absence totale d'hydrocarbure à la quantité initiale d'hydrocarbure déversée. Par exemple, 10 tonnes d'essence déversée dans une mer tropicale pendant un paisible jour d'été (25°C) s'évaporeront complètement en moins de trois heures ; en mer arctique, elles s'évaporeront en l'espace de six heures lors d'une paisible journée d'hiver (5°C) ; cependant, dans les mêmes conditions, un carburant lourd perdra respectivement seulement 20 % et 15 % de son volume, après quatre jours d'évaporation ([NOAA, 2010](#)).

I.4.3 Dissolution.

Alors que la plupart des hydrocarbures présentent une faible solubilité dans l'eau (y compris les eaux de mer) et peuvent ainsi être définis comme insolubles, certains des hydrocarbures aromatiques les plus légers, comme le benzène et le toluène, sont un peu plus solubles. Ainsi, lorsque l'hydrocarbure est déversé en mer, une faible proportion est dissoute ; la quantité et la vitesse de dissolution dépendent de la composition et de la viscosité de l'hydrocarbure. La fraction soluble dans l'eau a un impact sur les organismes marins, dans la mesure où elle est plus biodisponible que la fraction insoluble, et souvent sa toxicité aiguë est plus élevée. Des concentrations élevées en hydrocarbures de ce type sont généralement limitées aux eaux à proximité immédiate du déversement, la dilution rapide intervenant de manière horizontale et verticale. La biodégradation des hydrocarbures solubles dans l'eau est généralement rapide ([Soltani, 2004](#)).

I.4.4 Dispersion.

L'action des vagues ou les autres formes d'agitation de l'hydrocarbure sur l'eau, entraînera la formation de gouttelettes d'hydrocarbures qui se mélangeront à la colonne d'eau; plus l'agitation sera importante, plus la probabilité de mélange sera élevée. Dans la plupart des cas, que les hydrocarbures soient déversés en surface au fond ou sur la côte, la majeure partie sera au final dispersée. Les plus grosses gouttelettes mélangées à la colonne d'eau remontent rapidement à la surface ; alors que les petites gouttelettes, moins dynamiques, ne remontent pas à la surface ; elles se dispersent horizontalement et verticalement dans la colonne d'eau. L'étendue et la profondeur du mélange dépendent de l'action des vagues et des courants

existants. Ce processus peut éventuellement exposer les organismes vivants en profondeur à la contamination. Cependant, comme pour les hydrocarbures dissous, les concentrations en hydrocarbures dispersés sont plus élevées à proximité immédiate du déversement, qu'il s'agisse d'une nappe en surface ou d'un panache dans les fonds marins, et diminuent rapidement alors que l'hydrocarbure se disperse au loin de la source. Dans le cas d'une nappe en surface, la flottabilité des gouttelettes d'hydrocarbures implique que la dispersion verticale vers les eaux profondes sera plus lente que la dispersion horizontale, et les concentrations élevées seront généralement limitées à quelques mètres en deçà de la surface de l'eau. Les gouttelettes d'hydrocarbures dispersées ont une grande surface de contact ce qui facilite la biodégradation par l'action des microbes. L'efficacité de la biodégradation des gouttelettes d'hydrocarbures constitue un des avantages essentiels de l'utilisation des dispersants chimiques qui favorisent le processus de dispersion naturelle (Soltani, 2004).

I.4.5 Emulsification.

Deux types d'émulsions peuvent se former : eau-dans-huile appelée "mousse au chocolat" et huile-dans-eau. Les émulsions eau-dans-huile sont constituées par des hydrocarbures de haut poids moléculaires. Ces émulsions difficilement dégradables sont les précurseurs des résidus goudronneux retrouvés sur les plages. Leur formation et leur stabilisation dépendent essentiellement de la composition chimique du pétrole et en particulier d'une teneur élevée en composés polaires, en résines et en asphaltènes.

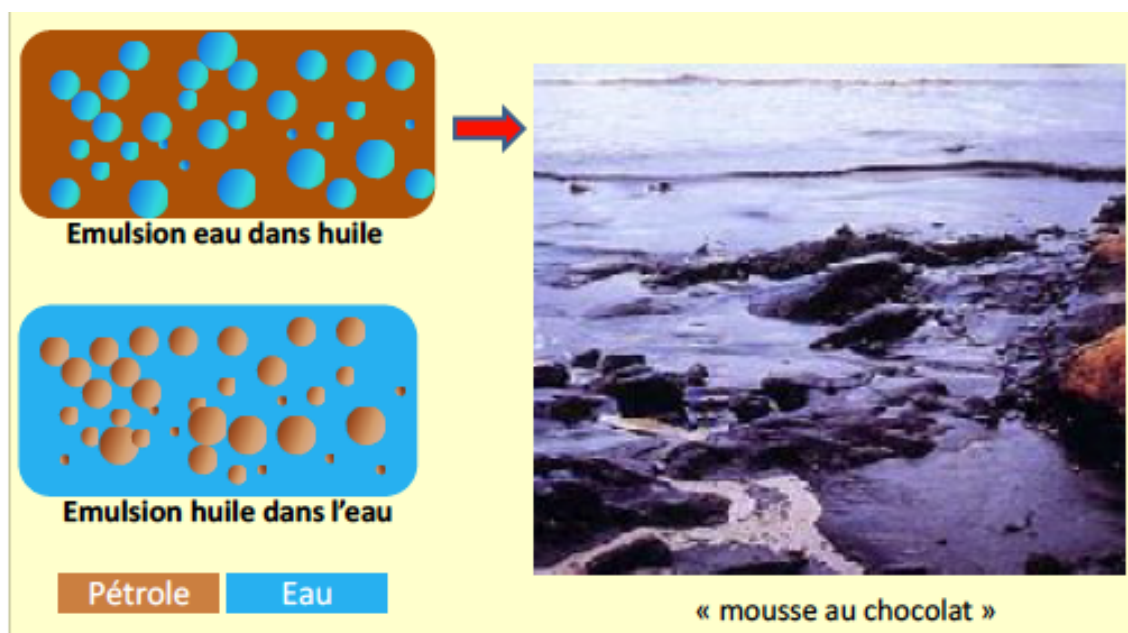


Figure 5. Les émulsions formées par le pétrole dans l'eau de mer (Rouidi, 2014).

Elles sont très stables, leur dégradation est alors considérablement ralentie et elles sont

extrêmement dommageables pour les zones côtières qui sont impactées (Soltani, 2004). Les émulsions huile dans eau, quant à elles facilitent l'élimination des hydrocarbures, leur formation est favorisée par la présence de substances tensioactives naturelles. Parallèlement, la biodégradation s'accompagne d'une production de substances émulsifiantes (biosurfactants) qui vont favoriser la dispersion/dissolution (Asia, 2012) (figure 5).

I.4.6 Sédimentation.

La sédimentation est le passage du pétrole de la surface vers le fond. Ce phénomène concerne les résidus goudronneux constitués de la fraction pétrolière la plus lourde et dont la densité est supérieure à celle de l'eau de mer. Les hydrocarbures adsorbés préférentiellement sur les particules en suspension sont entraînés gravitairement vers le sédiment marin. Ce phénomène est d'ailleurs capital en termes d'exportation de la surface vers le fond, notamment en eau océanique profonde (Dachs et al., 2002 ; Deyme, 2011). La sédimentation conduit à la constitution d'agrégats de haute densité difficilement dégradables par voie naturelle.

I.4.7 Photo-oxydation.

La photo-oxydation décrit des réactions d'oxydation déclenchées par la lumière. La photo-oxydation est observée au niveau de la surface de l'eau où l'air (oxygène) et la lumière (radiations solaires) sont présents pour la transformation des hydrocarbures (Payne et Phillips, 1985). L'efficacité de ce phénomène dépend de la nature des hydrocarbures et de la présence de composés non hydrocarbonés. Ainsi, la photooxydation touche plus particulièrement les composés aromatiques qui sont plus photosensibles que les composés aliphatiques (Soltani, 2004). Parmi ces derniers, les composés ramifiés sont plus facilement photo-oxydés que les n-alcanes. Ce phénomène est d'ailleurs favorisé par la présence de photo-sensibilisateurs naturels dans l'eau de mer (Boukir et al., 2001 ; Asia, 2012). La photo-oxydation conduit à la formation de composés solubles dans l'eau (acides, alcools, cétones, peroxydes et sulfoxydes) et certains travaux de recherche ont montré leur toxicité pour les communautés microbiennes (Payne et Phillips, 1985; Maki et al., 2001) alors que Rontani et Giusti. (1987) ont montré l'existence d'interactions entre la photo-oxydation et la biodégradation pour l'élimination des alkylbenzènes et de l'anthracène. L'action simultanée de ces deux phénomènes permet une élimination plus rapide de ces deux familles de composés.

I.4.8 Biodégradation.

La biodégradation est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement marin. Les microorganismes en sont responsables, en particulier les bactéries. La capacité de se développer sur les hydrocarbures ne se limite pas uniquement aux bactéries, certains sites contaminés contiennent également de nombreux champignons et levures capables de dégrader les hydrocarbures (Yamada- Onodera et al., 2002 ; Soltani, 2004).

Walker et collaborateurs. (1975) signalent que certaines micro-algues sont capables d'attaquer les hydrocarbures, dont l'exemple de *Protathecacozopsis* qui dégrade 40 % du pétrole brut. L'importance de la biodégradation dans l'élimination du pétrole, les voies métaboliques d'oxydation des hydrocarbures par les bactéries et les paramètres qui peuvent influencer la biodégradation seront traités plus loin.

I.5 Pollution par les hydrocarbures en mer Méditerranée.

La mer Méditerranée est fortement exposée à la pollution par les hydrocarbures en raison de sa situation géographique et compte tenu de la localisation de la plupart des pays producteurs et consommateurs de pétrole, placés respectivement sur les côtés sud et nord du bassin (Amer et al., 2015). C'est une route maritime très stratégique qui héberge environ 20% du trafic mondial de pétroliers, et ses côtes abritent environ 80 ports pétroliers. La mer Méditerranée est fortement exposée à plusieurs sources de pollution par les hydrocarbures, en particulier liés au trafic maritime ainsi qu'aux activités d'extraction et de raffinage qui peuvent affecter la santé humaine et perturber l'équilibre écologique. De plus, cette pollution menace sérieusement la vie marine (Coll et al., 2010). Une très grande diversité microbienne a été détectée et estimée à 17 000 différentes espèces de la mer Méditerranée constituant un habitat et un réservoir de nouveaux microorganismes (Coll et al., 2010).

Le centre régional d'intervention d'urgence en cas de pollution marine pour la mer Méditerranée (REMPEC) a été créé en 1989. Il vise la protection des zones et de la diversité biologique dans la mer Méditerranée contre la pollution par les hydrocarbures et autres substances nocives. Selon le Base de données du REMPEC sur les alertes et les accidents en mer Méditerranée, un grand nombre d'accidents provoquant une pollution de la mer Méditerranée par les hydrocarbures a été enregistrés depuis 1977. Il est estimé à 659 accidents (figure 6) ayant entraîné le déversement d'environ 310 000 tonnes de pétrole depuis 1977 et d'au moins 120 000 tonnes de substances nocives depuis 1988 (REMPEC).

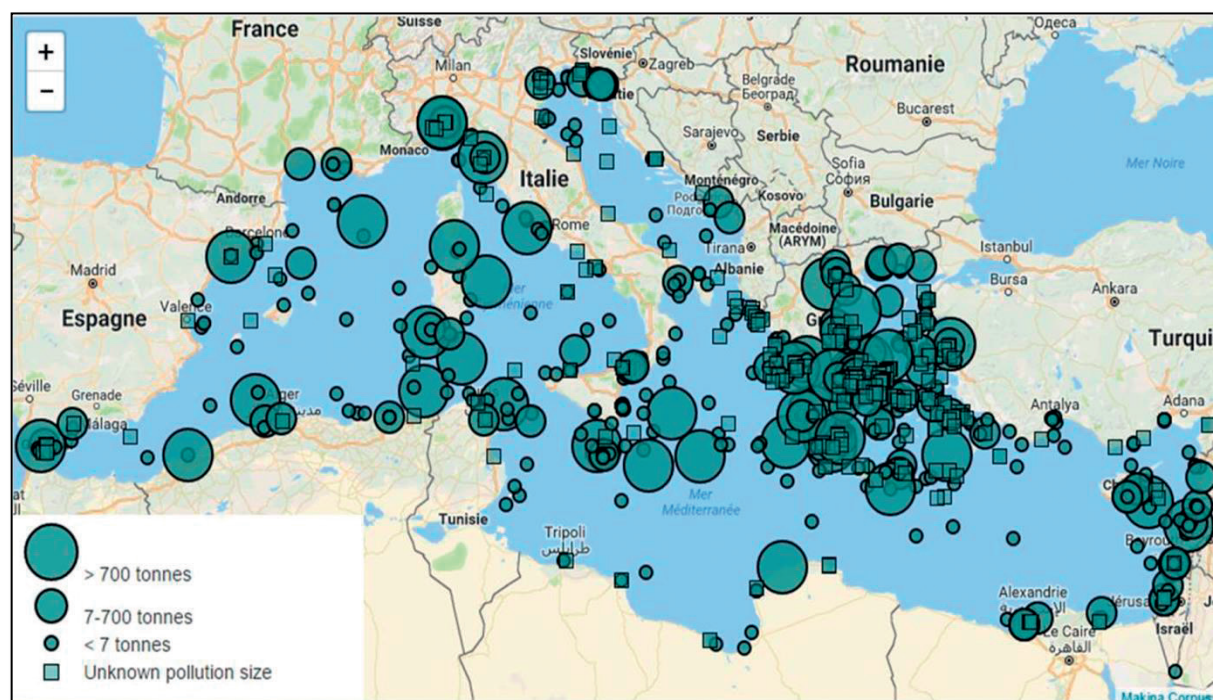


Figure 6. Accidents en mer Méditerranée, données de la base de données du REMPEC de 1977 (<http://www.rempec.org>)

I.6 La pollution par les hydrocarbures en Algérie.

Avec un volume initial en place de 16 milliards de mètres cubes équivalent-pétrole découvert depuis 1948, date de la première découverte commerciale à Oued Guétérini, près de Sidi Aïssa, en pleine zone des nappes, l'Algérie occupe le troisième rang parmi les pays producteurs de pétrole en Afrique, et le 12ème rang dans le monde (Attar et Hammat, 2000). Les hydrocarbures en Algérie ont été nationalisés juste après l'indépendance (24 Février 1971), ils occupent une place importante dans l'économie nationale.

La pollution par les hydrocarbures de pétrole est très courante le long du littoral algérien, compte tenu des voies du trafic maritime pétrolier qui passent à proximité, selon le rapport réalisé par l'AAE (Agence environnementale européenne) en 2006 (www.eea.europa.eu.2006) 150 millions de tonnes d'hydrocarbures y sont transportées chaque année sur les 500 millions de tonnes/an d'hydrocarbures transportées au total en mer méditerranée, ce qui correspond au transit de 1800 pétroliers par an. En outre, plus de 50 millions de tonnes d'hydrocarbures empruntent chaque année les terminaux pétroliers des principaux ports algériens (Arzew, Bethioua, Bejaia et Skikda), avec d'importantes fuites en mer (10 000 tonnes/an). Selon le Journal Officiel de la République Algérienne du 08 Octobre

2006 (JORA n°63) la méditerranée restera une route importante pour le transport d'hydrocarbures et de gaz.

Tableau 5. Concentrations des hydrocarbures pétroliers totaux (HPT) dans les sédiments portuaires en Algérie (www.eea.europa.eu.2006)

Principaux ports d'Algérie	Concentrations d'hydrocarbures pétroliers totaux (HPT en mg/kg)
Oran	1500-17000
Arzew	930-8600
Bethioua	67-940
Mostaganem	1600-8800
Ténès	680-990
Alger	1900-31000
Bejaia	140-260
Jijel	180-430
Ancien port de Skikda	450-2000
Nouveau port de Skikda	79-120
Annaba	130-6200

Par ailleurs d'importantes quantités d'hydrocarbures sont exportées à partir des ports algériens et tunisiens. Les opérations de déballastage sont également responsables de déversement de quelques 12 000 tonnes supplémentaires d'hydrocarbures par an dans les eaux côtières du fait que les installations de réception disponibles ne peuvent pas répondre aux quantités de ballast. De plus, une pollution par les hydrocarbures est imputable aux rejets d'eaux usées industrielles et urbaines de boues toxiques provenant de raffineries de pétrole à Alger, Oran et Skikda et de la production de gaz naturel. En raison de la présence d'activités pétrolières en Algérie, les sédiments portuaires et côtiers présentent de fortes concentrations en hydrocarbures pétroliers totaux ainsi qu'en hydrocarbures aromatiques polycycliques «HAP» (tableau 5) (www.eea.europa.eu.2006).

I.7 Méthodes de remédiation et traitement des sites pollués par les hydrocarbures.

Comme nous l'avons mentionné avant, les hydrocarbures peuvent avoir des impacts très néfastes. La pollution par les hydrocarbures provoque des dommages très importants qui affectent aussi bien les écosystèmes que les activités économiques. Il est donc nécessaire

d'éliminer ces polluants ou de les rendre moins toxiques. C'est pourquoi de nombreuses méthodes et techniques ont vu le jour afin de tenter de réhabiliter les sites pollués par les hydrocarbures. L'intérêt d'une méthode se mesure à son efficacité, à son coût, à la facilité de sa mise en œuvre, à la qualité des effluents obtenus après traitement ainsi qu'à la facilité de retraitement des sous-produits générés (Vogel et Ballerini, 2001). La dépollution peut être mise en œuvre à travers plusieurs méthodes associant éventuellement de plusieurs techniques de manière séquentielle (Miyasaka et al., 2006). Ces traitements peuvent être physiques, chimiques ou biologiques.

I.7.1 Réhabilitation non biologique des sites pollués par les hydrocarbures.

I.7.1.1 La récupération mécanique.

La récupération mécanique des hydrocarbures est essentiellement fondée sur l'écémage de la couche huileuse étalée à la surface de l'eau. Pour cela, les hydrocarbures peuvent être d'abord déviés et confinés par des barrages flottants avant d'être récupérés par divers systèmes mécaniques qui, passant à l'interface eau/huile, écrèment les hydrocarbures surnageant. Cette récupération nécessite des écrèmeurs, des pompes, des techniques de collecte manuelle ainsi que du matériel non spécialisé tel que des citernes à dépression. Dans ce domaine, plusieurs systèmes de récupération mécanique et de confinement ont été développés. Malheureusement, ces équipements, quelle que soit leur valeur, atteignent trop rapidement leurs limites lorsque les conditions de mer deviennent difficiles. Lorsque les conditions d'agitation de la surface de la mer sont supérieures à 2 Beaufort le confinement de la nappe devient impossible du fait d'une dispersion naturelle de la nappe de pétrole (Merlin, 2005 ; Milinkovitch, 2011).

I.7.1.2 Allègement et brûlage.

La récupération en mer et sur le littoral est toujours difficile et très partielle. L'allègement consiste à transférer vers un autre navire ou une barge la cargaison de pétrole d'un navire. Il peut être nécessaire de faire appel, pour cela aux moyens de navires supplémentaires ou à des moyens mobiles, hélitreuillés sur les navires en difficulté.

Le brûlage sur site est une solution complémentaire à l'allègement pour réduire les quantités de pétrole susceptibles de polluer les eaux. Il peut intervenir quand l'accident lui-même résulte d'une explosion, ou quand une étincelle a produit un incendie au moment du déversement. Le brûlage ou « in situ burning », permet la combustion quasi-complète de la nappe de pétrole. Employée lors des catastrophes du Torrey Canyon et de l'Exxon Valdez, cette technique est néanmoins rarement utilisée, sa mise en œuvre se heurtant à de nombreux

facteurs limitants : (i) la nappe de pétrole doit être d'une épaisseur minimum de 2 mm et d'une viscosité faible (<500 Cst) pour être enflammée (Faiferlick, 1997), (ii) les conditions météorologiques doivent être appropriées (moins de 20 noeuds de vent, une houle inférieure à 1 mètre) pour permettre la combustion de la nappe (Faiferlick, 1997), et (iii) une distance vis-à-vis des habitations est à respecter puisque 1 à 3% du pétrole brûlé forme un nuage composé de dioxyde d'azote, de dioxyde de soufre, de monoxyde de carbone, d'hydrocarbures aromatiques polycycliques et d'autres produits de combustion toxiques (Ferek et al., 1997). De plus, comparée à la technique de récupération mécanique, l'importante toxicité des déchets de combustion (Gunderson et al., 1996; Cohen et al., 2001), impose aux cellules d'intervention de grandes précautions et une connaissance de la sensibilité des écosystèmes environnant. Ainsi cette technique très controversée reste peu souvent employée.

I.7.1.3 Dispersion.

Cette méthode est complémentaire de la récupération mécanique ; son efficacité étant optimale pour un état de la mer entre 2 et 4 Beaufort (Merlin, 2005). Le dispersant est un solvant contenant des surfactants (surface active agents), molécules à propriété tensioactive. Le dispersant permet le transfert de la nappe de pétrole de la surface de la mer vers la colonne d'eau, sous forme de gouttelettes d'hydrocarbures. Judicieusement appliqué, les avantages environnementaux du dispersant sont nombreux. L'utilisation de dispersant permet, en premier lieu, d'éliminer la nappe en surface et par là supprime le risque de mazoutage des oiseaux et mammifères marins ainsi que sa dérive vers la côte, et donc, la contamination des écosystèmes côtiers. De plus, la formation de gouttelettes d'hydrocarbures, en augmentant le ratio surface/volume, permet de potentialiser l'attaque microbienne et par là, la dégradation de ces hydrocarbures (Tiehm, 1994; Churchill et al., 1995; Swannell et Daniel, 1999).

Les principales caractéristiques de ces produits sont essentiellement : de très hautes performances, une faible toxicité garantissant la préservation du milieu marin, une efficacité sur des hydrocarbures visqueux et émulsionnés. L'obtention d'une bonne dispersion d'une nappe d'hydrocarbures, nécessite, d'une part, d'intervenir rapidement, avant que le vieillissement ne soit trop avancé, et, d'autre part, que les conditions énergétiques (état de la mer et vitesse du vent) soient suffisamment importantes pour s'opposer à une remontée rapide des gouttelettes de pétrole. La mise en œuvre des produits dispersants peut être effectuée par épandage à l'aide de rampes de pulvérisation, à partir de navires, avions ou hélicoptères.

L'utilisation des produits dispersants peut présenter des risques pour l'environnement marin, la transformation du pétrole flottant à la surface en une multitude de fines gouttelettes de

pétrole dispersées dans la colonne d'eau favorise le contact entre la vie marine (organismes vivants) et le pétrole. En fait la dispersion potentialise la toxicité du pétrole, et cet effet ne s'estompe que lorsque l'agitation naturelle de la mer a suffisamment disséminé les gouttes de pétrole dispersé. De ce fait, la dispersion n'est pas applicable trop près des côtes ou des zones écologiquement sensibles, et lorsque les conditions de dilution sont insuffisantes (manque d'agitation, faible profondeur...) (IMO/UNEP, 1995). De plus la technique de dispersion est loin d'être facile à mettre en œuvre et ses performances dépendent des qualités des pétroles, dont les propriétés physico-chimiques diffèrent suivant leur provenance. Par exemple plus les pétroles sont lourds, plus ils sont difficiles à disperser. En outre, un pétrole déversé en mer vieillit et change de composition : ses fractions légères s'évaporant, il devient progressivement de plus en plus lourd. De ce fait au fil du temps, il devient plus difficile à traiter par dispersion. Enfin d'un point de vue pratique, la dispersion est une technique délicate à utiliser, il faut arriver à appliquer correctement les bonnes quantités de dispersant pulvérisées sur les nappes de pétrole plus ou moins fractionnées dans des conditions difficiles (vents, vagues), mais de surcroît il faut la mettre en œuvre dans délai dans les premiers temps de la lutte, avant que le pétrole ne devienne résistant au traitement (IMO/UNEP, 1995).

I.7.1.4 Produits absorbants.

Les absorbants d'hydrocarbures sont des produits d'origine végétale, animale, minérale ou synthétique très divers, conçus pour une récupération sélective des hydrocarbures et non de l'eau. En règle générale, l'emploi d'absorbants est plus efficace aux derniers stades d'une opération de nettoyage du littoral et dans le cas de petites flaques d'hydrocarbure difficile à récupérer au moyen d'autres techniques de dépollution. Les absorbants ne sont pas appropriés en haute mer et sont généralement moins efficaces en présence d'hydrocarbures à plus forte viscosité, tels que les fiouls lourds et les hydrocarbures vieillis et émulsionnés. Les absorbants agissent par phénomènes d'adsorption (en surface) et d'absorption (en masse). Ils sont disponibles en vrac, sous formes de poudres, fibres, copeaux, fines particules et conditionnés sous forme de tapis, feuilles, rouleaux, barrages.

I.7.2 Réhabilitation biologique des sites pollués par les hydrocarbures.

Les coûts croissants et l'efficacité limitée des traitements physico-chimiques traditionnels mentionnés ci-dessus ont incité au développement de technologies alternatives pour les applications *in situ*, basées notamment sur les capacités de remédiation biologique des plantes et des micro-organismes (Farhadian et al., 2008). Les technologies vertes pour le nettoyage

biologique des polluants sont utilisées pour la biorestauration des sites pollués par le pétrole (Varjani et al., 2015). La bioremédiation peut être définie comme l'application d'organismes vivants pour dégrader ou détoxifier des polluants (Ron et Rosenberg, 2014; Varjani et Upasani, 2016). Cette technologie est une technique efficace, économique, polyvalente et respectueuse de l'environnement (Chandra et al., 2013).

I.7.2.1 La phytoremédiation.

La phytoremédiation est l'ensemble des technologies utilisant les plantes pour réduire, dégrader ou immobiliser naturellement les polluants des écosystèmes terrestres, aquatiques ou aériens (figure 7). La bioremédiation assistée par les plantes implique l'interaction des racines et des microorganismes associés aux systèmes racinaires. Bien que cette méthode soit principalement utilisée pour les métaux lourds (plomb, cadmium, arsenic, chrome, mercure, cuivre et zinc) et les radionucléides (uranium, strontium, césium et plutonium), elle peut également s'appliquer au traitement des polluants organiques (Salt et al., 1998 ; Milton, 2012). Les plantes adsorbent, accumulent ou volatilisent ces composés.

Les principaux mécanismes de phyto-dépollution sont la phyto-extraction, la phyto-dégradation et la phyto-stabilisation (Vila, 2006). Elle peut être utilisée sur des substrats solides (sols pollués), liquides (eaux contaminées) ou gazeux (filtration d'air chargé en composés nocifs volatils) (Pilon-Smits, 2005).

La phytoremédiation peut se faire à l'aide de diverses espèces végétales : *Avena fatua*, *avena sterilis subsp.ludoviciana*, *Brassica naspus* (Liste et Alexander, 2000). Ballerini et collaborateurs. (1998) indiquent que le système fibreux racinaire des plantes facilite à la fois l'accessibilité des contaminants et le métabolisme microbien. En terme de biodégradation, les plantes possèdent également des enzymes capables de métaboliser certains HAP (Chroma et al., 2002). Liste et Alexander. (2000) ont obtenu en 8 semaines 74% d'élimination du pyrène sur un sol avec des plantes. Les rendements chutent à moins de 40% pour un sol sans plantes. Les rendements d'élimination varient avec le nombre de cycles des HAP. Binet et collaborateurs. (2000) ont observé une augmentation de la dissipation ou de la biotransformation de plusieurs HAP, incluant ceux de cinq et six noyaux aromatiques. Cependant, ces auteurs indiquent que les meilleurs taux d'élimination sont obtenus pour les HAP de trois cycles, comme le phénanthrène ou l'anthracène.

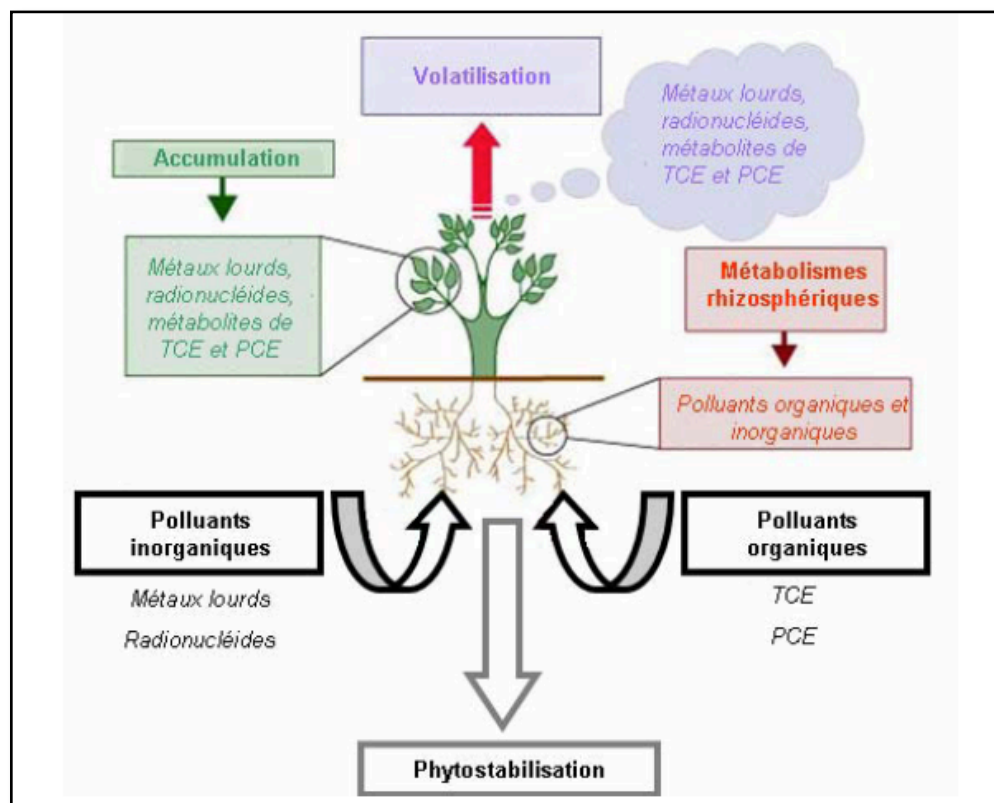


Figure 7. Principe de la phytoremédiation. La bioremédiation par les plantes a lieu à travers des interactions complexes entre les végétaux, les microorganismes et le sol par des procédés d'accumulation, de volatilisation, de dégradation et de stabilisation. TCE : trichloréthylène ; PCE : perchloréthylène (Milton, 2012).

Quelques recherches ont aussi démontré la dégradation de certains HAP par des algues. En effet, *Selenastrum capricornutum*, une algue verte peut dégrader le fluoranthène, le pyrène (Lei et al., 2007) et le Benzo(a)Pyrène (Cerniglia, 1993 ; Juhasz et Naidu, 2000). D'autres espèces comme *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus* et *Scenedesmus quadricauda* ont aussi montré une certaine capacité de dégradation des HAP (Lei et al., 2007).

I.7.2.2 La bioremédiation microbienne.

Les microorganismes jouent un rôle crucial dans le maintien de l'écosystème et de la biosphère, ils peuvent être utilisés pour la bioremédiation des écosystèmes, c'est à dire le nettoyage des polluants de l'environnement ainsi que l'atténuation de leur effets néfastes (Widdel et Rabus, 2001 ; Varjani et Srivastava, 2015).

La bioremédiation microbienne est largement utilisée pour traiter la pollution par les hydrocarbures pétroliers dans les écosystèmes terrestres et aquatiques (Varjani et Upasani,

2012; Abbasian et al., 2015). C'est une technique innovante dans laquelle les microorganismes atténuent, dégradent ou réduisent les polluants organiques dangereux en composés inoffensifs tels que CO₂, H₂O et biomasse sans nuire à l'environnement (Ron et Rosenberg, 2014). De nombreuses études de recherche concernant la biodégradation des polluants d'hydrocarbures ont été réalisées au cours de la dernière décennie (Farhadian et al., 2008; Sajna et al., 2015; Varjani et al., 2017). Des microorganismes tels que des bactéries ou des champignons sont connus pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures (Hendrickx et al., 2006; Varjani et Upasani, 2013; Wilkes et al., 2016). Les bactéries sont considérées comme des dégradants primaires et des agents actifs dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers (Varjani et Upasani, 2012; Abbasian et al., 2015).

Les bactéries prennent une part importante dans cette décontamination naturelle, du fait de leurs capacités à évoluer très rapidement en présence d'une pression de sélection. En effet, grâce aux mutations ponctuelles, aux réarrangements endogènes et aux transferts horizontaux, elles peuvent s'adapter à la présence de polluants en développant une machinerie enzymatique permettant de dégrader et/ou d'utiliser les polluants pour leur survie et leur développement. Ainsi, quelque temps après l'apparition de molécules xénobiotiques ne possédant aucun équivalent dans la nature, on peut voir l'apparition de nouvelles voies métaboliques permettant la dégradation de ce composé. Ainsi, les microorganismes, grâce à la plasticité du génome, la rapidité d'évolution et à la sélection naturelle, peuvent s'adapter à un large spectre de polluants. Ils constituent, par conséquent, une voie intéressante dans le développement de techniques naturelles d'élimination des polluants (Milton, 2012).

En règle générale, la bioremédiation repose sur la stimulation *in situ* des communautés microbiennes « **biostimulation** » ou sur l'amendement de la communauté microbienne avec un inoculum de bactéries dégradants les hydrocarbures « **bioaugmentation** ».

I.7.2.2.1 La bioaugmentation.

Parfois, les populations microbiennes endogènes d'un écosystème pollué ne présentent pas tous les outils métaboliques permettant de réaliser une dégradation complète des polluants. La bioaugmentation permet de remédier à ce manque (El Fantroussi et Agathos, 2005). La bioaugmentation consiste en l'ajout d'espèces microbiennes abritant des capacités cataboliques, dans un environnement contaminé. Cependant, cette technique implique l'application de microorganismes allochtones ou autochtones. La bioaugmentation autochtone consiste en l'introduction exclusive de microorganismes indigènes dans le site à décontaminer

(Nikolopoulou et al., 2013a, 2013b). La figure 8 décrit le traitement par bioaugmentation : Les bactéries ou le consortium bactérien sont cultivés en grande quantité dans une unité de production (A).

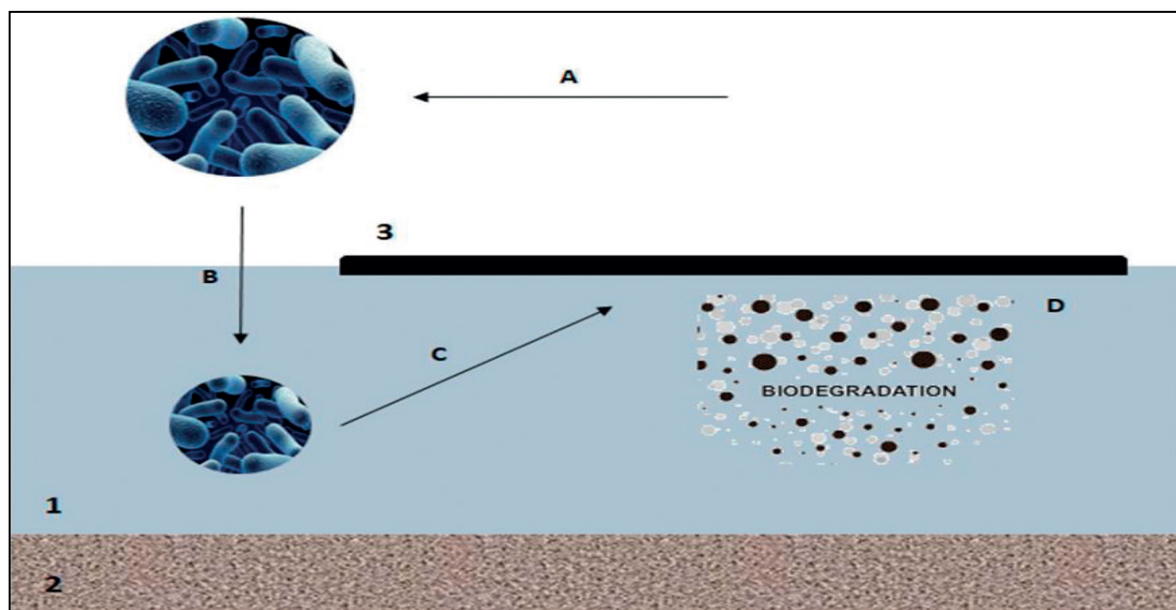


Figure 8. Description schématique du processus de bioremédiation (bioaugmentation). 1: eau de mer; 2: sédiment marin; 3: pétrole brut. A : Cultivation des bactéries, B : Ajout des bactéries dans un environnement naturel pollué, C : l'attaque des bactéries sélectionnées du polluant, D : développement du processus de biodégradation. (Mahjoubi et al., 2018) .

Les bactéries sont choisies pour leur forte capacité de biodégradation des hydrocarbures. Ces bactéries sont ensuite ajoutées à l'environnement pollué (B). Les bactéries qui utilisent les hydrocarbures comme source de carbone vont se lier naturellement aux polluants (C) et entraîner leur biodégradation (D) en composés inoffensifs. La bioaugmentation autochtone est une approche qui consiste à ajouter des isolats ou des consortiums microbiens autochtones adaptés aux environnements contaminés (Hosokawa et al., 2009). Différentes études ont confirmé l'efficacité des microorganismes autochtones dans la décontamination de sites pollués par des hydrocarbures dû au fait que les conditions environnementales conviennent à leur croissance et à leur métabolisme (Nikolopoulou et al., 2013a ; Fodelianakis et al., 2015). Les microorganismes allochtones sont définis comme non indigènes et proviennent d'un autre site. Quand ils sont ajoutés dans les sites contaminés, ils ne peuvent pas facilement s'intégrer et s'adapter aux activités des communautés autochtones. Fodelianakis et collaborateurs. (2015) ont confirmé que la bioaugmentation avec des consortiums bactériens allochtones dégradant les hydrocarbures n'a pas amélioré le processus de dépollution des sédiments

contaminés par des hydrocarbures. Ainsi, l'application de microorganisme autochtone est plus efficace (Nikolopoulou et al., 2013a). Généralement, la bioaugmentation est réalisée en utilisant des consortiums mixtes (Head et al., 2006).

Pour un traitement de bioaugmentation réussi, les conditions environnementales, sélectionnées et les micro-organismes indigènes doivent être bien contrôlés et caractérisés.

I.7.2.2.2 La biostimulation.

La biostimulation consiste à ajouter différentes substances aux environnements pollués afin de stimuler la biodégradation naturelle par les microorganismes indigènes. La biodégradation d'hydrocarbures en milieu marin est limitée par le manque de disponibilité d'oxygène et de nutriments, plus spécifiquement de l'azote et du phosphore (Chandra et al., 2013).

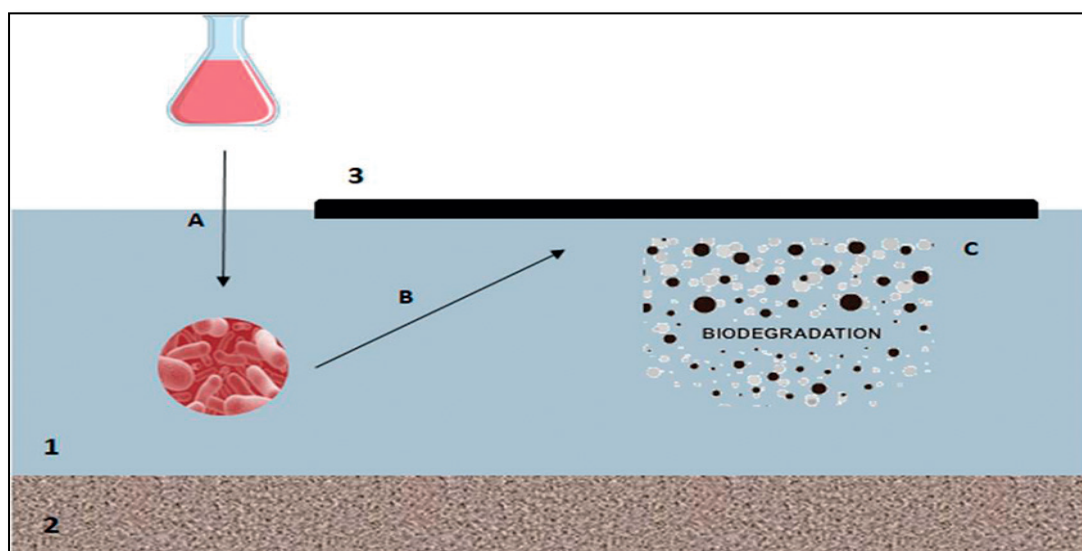


Figure 9. Description schématique du processus de bioremédiation (biostimulation). 1: eau de mer; 2: sédiment marin; 3: pétrole brut. A : Ajout de nutriment aux cultures bactériennes, B : l'attaque des bactéries sélectionnées du polluant, C : développement du processus de biodégradation (Mahjoubi et al., 2018).

La faible biodisponibilité des polluants est également considéré comme un facteur limitant (Chandra et al., 2013). La biostimulation augmente la croissance des agents indigènes de dégradation des hydrocarbures par l'ajout de nutriments limitant la croissance ce qui favorise et stimule la dégradation du polluant (Nikolopoulou et al., 2009) (figure 9).

Adams et collaborateurs. (2015) ont montré l'efficacité de la biostimulation avec l'ajout de nutriments organiques dans un sol contaminé contenant plus de 38 000 mg / kg de TPH (Total petroleum hydrocarbons), et les résultats ont montré une élimination de 100% des HAP à 2 ou 3 yles dans les trois premiers mois.

Conclusions.

Les hydrocarbures sont des polluants ubiquitaires. Ils sont hydrophobes dont la persistance dans les écosystèmes est principalement due à leur faible solubilité aqueuse. En raison de leurs potentialités toxiques, mutagènes et cancérigènes, certains d'entre eux sont considérés comme des substances dangereuses. Leur présence au niveau des composantes des différents maillons de la chaîne alimentaire constitue un risque important pour l'environnement et la santé humaine. Les procédés de bioremédiation sont envisagés comme d'intéressantes alternatives aux techniques physico-chimiques et mécaniques classiques de dépollution. En effet, ils offrent la possibilité de réaliser une décontamination d'environnements pollués en diminuant les impacts sur les écosystèmes traités. La bioremédiation utilise le pouvoir épurateur des microorganismes de l'environnement et présente l'avantage d'être peu invasive et moins onéreuse. La grande diversité bactérienne et la versalité métabolique liée aux gènes de dégradation a permis à des microorganismes de coloniser l'ensemble des niches écologiques de la planète en s'adaptant aux changements environnementaux.

La voie biologique est actuellement en plein essor et suscite de très nombreux travaux dans le monde. A l'heure où se développe une large « sensibilité écologique » dans notre société, la connaissance des propriétés de biodégradabilité des produits pétroliers apparaît comme un enjeu essentiel pour légitimer l'utilisation de ces produits. Afin d'améliorer encore ces procédés de dépollution, il est cependant nécessaire de comprendre le mode de fonctionnement de ces communautés microbiennes vis à vis du polluant.

Chapitre II

Les bactéries marines
hydrocarbonoclastes et leurs
mécanismes d'action.

Introduction

Chaque année, des centaines de millions de litres de pétrole pénètrent dans l'environnement à partir de différentes sources naturelles et anthropiques. Les apports des suintements naturels d'hydrocarbures marins suffiraient à couvrir l'ensemble des océans d'une couche d'huile épaisse de 20 molécules. Le fait que le globe ne soit pas inondé de pétrole témoigne de l'efficacité et de la polyvalence des réseaux de microorganismes dégradant les hydrocarbures, dont certains ont récemment commencé à révéler les secrets de quand et comment ils exploitent les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie (Head et al., 2006)

La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes a été mise en évidence dès les années 1940 (Novelli et ZoBell, 1943). Depuis cette date le nombre de microorganismes identifiés possédant cette propriété n'a cessé d'augmenter (Soltani, 2004). À ce jour, de nombreuses bactéries, levures, champignons et algues provenant d'écosystèmes terrestres et aquatiques sont décrits pour leur capacités à dégrader les hydrocarbures (Boonchan et al., 2000; Hendrickx et al., 2006; Varjani et Upasani, 2013; Wilkes et al., 2006). Prince en 2005 a répertorié une liste de 9 genres de cyanobactéries, 103 genres de champignons, 14 genres d'algues qui sont connus pour dégrader ou de transformer les hydrocarbures et 75 genres bactériens qui utilisent les hydrocarbures exclusivement comme source de carbone et d'énergie. L'efficacité de la biodégradation varie de 6% à 82% pour les champignons, de 0,13% à 70% pour les bactéries du sol (Quatrini et al., 2008) et de 0,003% à 100% pour les bactéries marines (Das et Chandran, 2011).

Parmi tous les micro-organismes, les bactéries sont des dégradateurs primaires et les agents les plus actifs en biodégradation. Elles sont capables de dégrader une large gamme de substrats hydrocarbonés par des voies aérobies et anaérobies (Catania, 2018).

II.1 Les bactéries marines capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers.

Les hydrocarbures sont des molécules inertes du point de vue chimique et doivent être activées par les bactéries en conditions oxiques qu'anoxiques. Divers genres bactériens dégradant le pétrole habitent les milieux marins. Ces bactéries ont souvent été isolées par leur capacité à dégrader des alcanes ou des composés aromatiques tels que le toluène, naphthalène et phénanthrène. Au cours des dernières années, un nouveau groupe écophysiologique de bactéries marines dégradant les hydrocarbures appelé « les bactéries hydrocarbonoblastes » a

été reconnu et joue un rôle significatif dans l'élimination biologique des hydrocarbures pétroliers des eaux marines polluées (Yakimov et al., 2007).

Ce sont des bactéries du genre *Alcanivorax*, *Cycloclasticus*, *Marinobacter*, *Neptunomonas*, *Oleiphilus* et *Oleispira* appartenant au γ -Protéobactéries, et du genre *Planococcus* au sein des bactéries à Gram positif. Ces bactéries utilisent exclusivement les hydrocarbures comme source d'énergie et de carbone et ont un métabolisme hautement spécialisé et sont donc considérées comme des bactéries « hydrocarbonoclastes professionnelles » ou spécialisées dans la dégradation des hydrocarbures. Par exemple, *Alcanivorax* peut croître sur les n-alcanes et les alcanes ramifiés mais ne peut pas utiliser tous les sucres ou des acides aminés comme source de carbone. De même, les souches de *Cycloclasticus* poussent sur des milieux contenant des hydrocarbures aromatiques, le naphthalène, le phénanthrène et anthracène, alors que les souches d' *Oleispira* et *Oleiphilus* poussent sur les hydrocarbures aliphatiques, alcanols et alcanates (figure 10) (Harayama et al., 2004).

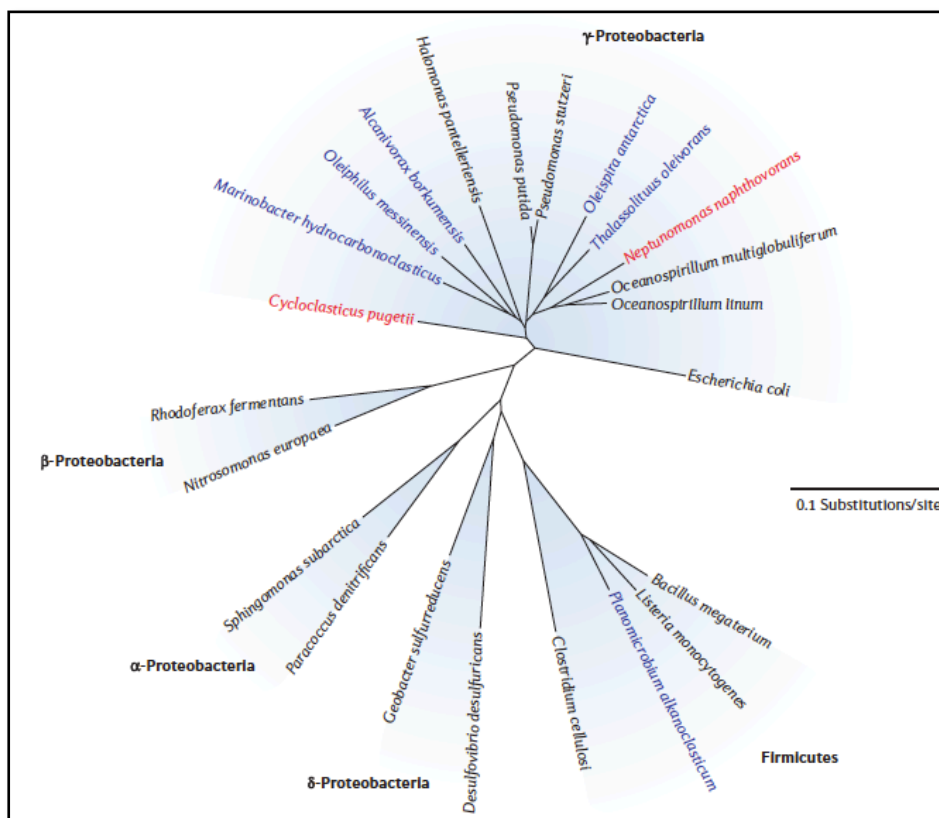


Figure 10. Arbre phylogénétique illustrant la diversité des bactéries hydrocarbonoclastes. Les organismes indiqués en bleu peuvent dégrader les hydrocarbures saturés, alors que ceux en rouge peuvent dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Les organismes en noir, ne sont pas considérés comme hydrocarbonoclastes (Head et al., 2006).

De nombreuses bactéries dégradant les hydrocarbures sont décrites comme «non professionnelles» ou généralistes. Ces bactéries ont un métabolisme capable d'utiliser, en plus des hydrocarbures, d'autres substrats de croissance. Il existe dans cette catégorie de nombreuses espèces appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Marinomonas*, *Vibrio* et *Pseudoalteromonas*.

Tableau 6. Liste des microorganismes dégradant les différentes classes des hydrocarbures pétroliers

Hydrocarbures pétroliers	Microorganismes	Références
Aliphatiques	<i>Acinetobacter</i> sp.	(Mittal et Singh, 2009) ; (Foght, 2008)
	<i>Alcanivorax</i> sp.	(Harayama et al., 2004) ; (Brooijmans et al., 2009)
	<i>Azoarcus</i> sp.	(Widdel et Rabus, 2001)
	<i>Bacillus</i> sp.	(Ghazali et al., 2004) ; (Das et Mukherjee, 2007a)
	<i>Brevibacterium</i>	(Leahy et Colwell, 1990)
	<i>Desulfosarcina</i> sp.	(Jaekel et al., 2013)
	<i>Desulfococcus</i> sp.	(Jaekel et al., 2013)
	<i>Gordonia</i> sp.	(Quatrini et al., 2008)
	<i>Marinobacter</i> sp.	(Yakimov et al., 2007)
	<i>Micrococcus</i> sp.	(Roy et al., 2002) ; (Ghazali et al., 2004)
	<i>Streptomyces</i> sp.	(Ferradji et al., 2014)
	<i>Ochrobactrum</i> sp.	(Varjani et al., 2015)
	<i>Oleispira</i> sp.	(Harayama et al., 2004) ; (Brooijmans et al., 2009)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Mittal et Singh, 2009) ; (Rocha et al., 2011) ; (Sajna et al., 2015) ; (Varjani et al., 2015) ; (Varjani et Upasani, 2016)
	<i>Rhodococcus</i> sp.	(Abbasian et al., 2015)
	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	(Varjani et al., 2015)
	<i>Thalassolituus</i> sp.	(Brooijmans et al., 2009)
Monoaromatiques	<i>Acinetobacter</i> sp.	(Batista et al., 2006)
	<i>Bacillus</i> sp.	(Janbandhu et Fulekar, 2011)
	<i>Halomonas</i> sp.	(Widdel et Rabus, 2001)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Mittal et Singh, 2009) ; (Meckenstock et al., 2016)
	<i>Rhodococcus</i> sp.	(Leahy et Colwell, 1990) ; (Salleh et al., 2003)
	<i>Sphingobacterium</i> sp.	(Janbandhu et Fulekar, 2011)
	<i>Streptomyces</i> sp.	(Chikhi et al., 2015)
Polyaromatiques	<i>Achromobacter</i> sp.	(Janbandhu et Fulekar, 2011)
	<i>Bacillus</i> sp.	(Mittal et Singh, 2009)
	<i>Cycloclasticus</i> sp.	(Harayama et al., 2004)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Widdel et Rabus, 2001) ; (Meckenstock et al., 2016)
	<i>Vibrio</i> sp.	(Widdel et Rabus, 2001)
Résines	<i>Pseudomonas</i> sp.	(Leahy et Colwell, 1990)
	Membres des familles Vibrionaceae, Enterobacteriaceae	(Chandra et al., 2013)

Certains de ces micro-organismes peuvent dégrader les aliphatiques, d'autres les mono-aromatiques ou les poly-aromatiques alors que d'autres sont capables de dégrader les résines (tableau 6). Pour la plupart, ce sont des bactéries appartenant au phylum des Protéobactéries (Protéobactéries α , β , γ) et à l'ordre des Actinomycétales (Gram positif élevé en G + C) (Van Beilen et al., 2003 ; Quatrini et al., 2008). Plus récemment, des bactéries appartenant au phylum des Firmicutes (*Bacillus*, *Geobacillus*) et au phylum de Deinococcus-Thermus (*Thermus*) ont été isolées. D'autres souches bactériennes appartenant au phylum Bacteroidetes-Chlorobi (Flavobacteria et Sphingobacteria) ont été découvertes dans des environnements contaminés par du pétrole, suggérant leur rôle possible dans la biodégradation. (Brakstad et Lodeng 2005 ; catania, 2018).

Les mycobactéries, qui font partie du phylum des actinobactéries, sont capables de se développer en utilisant le phénanthrène, l'anthracène ou le pyrène comme uniques sources de carbone et sont aussi impliquées dans la dégradation d'HAP de haut poids moléculaire, comme le fluoranthène et le benzo[a]pyrène. Ces microorganismes ont été détectés dans des environnements à pollution diffuse, avec une faible concentration et une faible biodisponibilité en HAP. Ils produisent dans leur paroi externe des acides mycoliques, acides gras alkylés et hydroxylés, qui forment une couche quasi cristalline protégeant la cellule de la toxicité des polluants. La présence de cette barrière de protection associée à la fluidité de leur bicouche lipidique sert aussi à l'internalisation des HAP (Leys et al., 2005 ; Jouanneau et al., 2011).

II.2 Réponse d'une communauté bactérienne à la pollution par les hydrocarbures.

L'introduction du pétrole ou de ses constituants dans l'eau de mer entraîne la prolifération des bactéries hydrocarbonoclastes présentes à des niveaux bas ou indétectables avant l'événement polluant. Atlas (1991) a établi que les microorganismes dégradant les hydrocarbures dans les écosystèmes non pollués constituent moins de 0,1% de la communauté bactérienne, mais ce nombre peut augmenter de 1 à 10% de la population totale dans un environnement pollué par des hydrocarbures pétroliers. La réponse microbienne aux déversements d'hydrocarbures consiste donc à une modification de la communauté microbienne présente dans l'environnement affecté, constitué de plusieurs espèces dégradant les hydrocarbures co-existantes entre elles et partageant la même ressource (figure 11) (Yakimov et al., 2004, 2005). De nombreuses études effectuées autant en microcosmes (Rolling et al., 2002, Sei et

al., 2003 , Cappello et al., 2007) que sur des échantillons naturels (Peterson et al., 2003 , Yakimov et al., 2004, Mascarelli, 2010) ont confirmé qu'après un apport soudain de pétrole, le ratio entre les bactéries hydrocarbonoclastes et les bactéries totales augmentait fortement. On assiste en générale à une baisse de la diversité totale des communautés bactériennes au profit de certaines espèces avantagées sélectivement par la nouvelle source de matière organique et particulièrement bien adaptées à la présence de certains hydrocarbures.

L'élimination conjointe des bactéries sensibles au pétrole et la stimulation des bactéries hydrocarbonoclastes conduit souvent à une augmentation de l'abondance bactérienne et à un regain d'activité globale de la communauté dans les premiers jours après la pollution (Atlas, 1981).

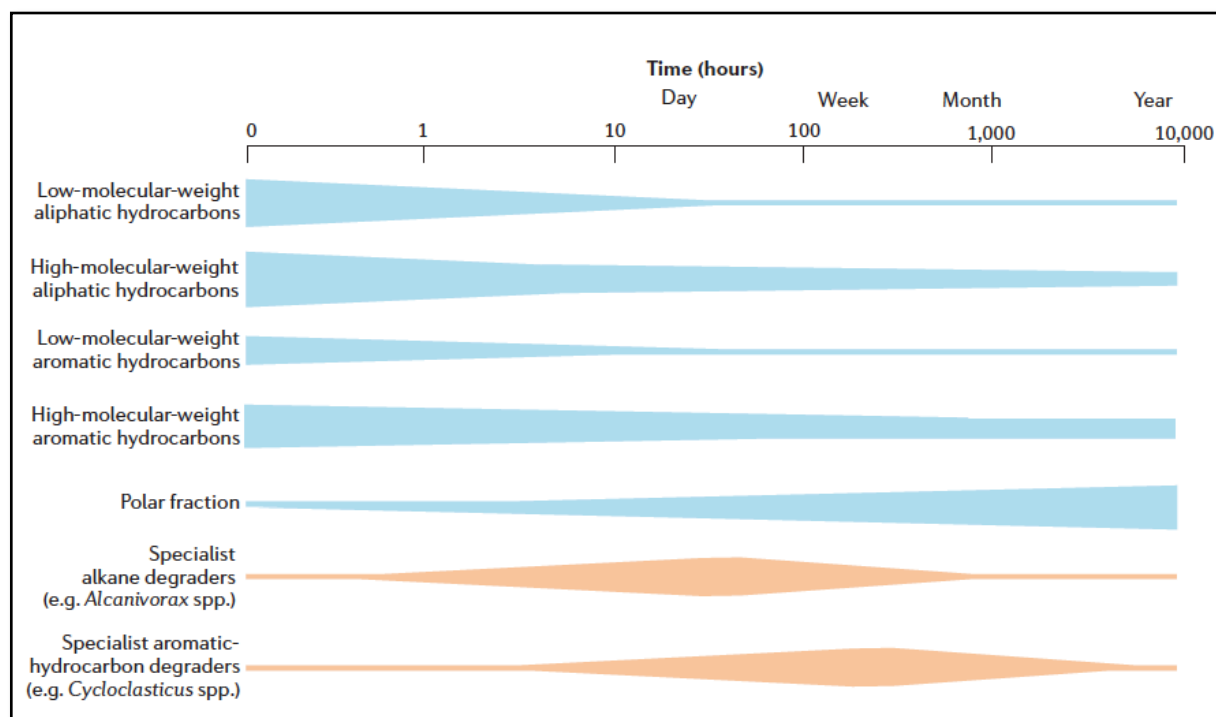


Figure 11. Changements dans la composition des hydrocarbures déversés et les changements correspondants dans l'abondance des principaux organismes clés dans la biodégradation des hydrocarbures (Head et al., 2006)

Rapidement un consortium de biodégradation se met en place. Les bactéries capables de métaboliser les molécules les plus simples sont sélectionnées en premier. Lorsque ces composés viennent à disparaître, d'autres bactéries ayant eu le temps de s'acclimater aux molécules les plus complexes (les HAP par exemple) prolifèrent à leur tour et prennent l'ascendant sur le reste de la communauté. Cela se traduit par une alternance de différents groupes qui se poursuit jusqu'à l'élimination quasi-complète des hydrocarbures (Head et al.,

2006). Toutes les espèces bactériennes ne présentant pas un taux similaire de dégradation des hydrocarbures, la biodégradation des différents composés entraîne une variation des sources de carbone disponibles dans le milieu au fur et à mesure du processus de biodégradation (Head et al., 2006 ; Coulon et al., 2007 ; Dubinsky et al., 2013). Cette évolution constante des sources de carbone disponibles entraîne elle aussi une modification de la diversité au sein de la communauté microbienne indigène au cours du temps. Il existe donc une réelle écologie bactérienne du site pollué.

II.3 Aspects métaboliques de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers.

La biodégradation exploite la diversité génétique et le caractère versatile du métabolisme des micro-organismes pour la transformation des contaminants en produits moins dangereux, qui sont ensuite intégrés dans les cycles géochimiques naturels. Elle exploite le potentiel métabolique des micro-organismes existants par l'utilisation de nouvelles fonctions cataboliques issues soit de la sélection, soit de l'introduction de gènes codant pour ces fonctions (Van der Meer et al., 1992 ; Gottschalk and Knackmuss, 1993).

La biodégradation d'un polluant implique une série d'étapes utilisant différentes enzymes (Abbasian et al., 2015). Les hydrocarbures peuvent sélectivement être métabolisés par une souche individuelle de microorganisme ou par un consortium de souches microbiennes appartenant au même genre ou à différents genres (Boopathy, 2000; Varjani et al., 2015; Varjani et Upasani, 2016). Cependant, le consortium s'est avéré plus efficace que les cultures individuelles pour métaboliser et dégrader un assortiment complexe d'hydrocarbures (Deziel et al., 1996; Deppe et al., 2005; Varjani et al., 2013, 2015). La biodégradation totale d'un pétrole n'est donc possible que grâce à la mise en place d'un consortium bactérien comprenant des groupes dont les équipements enzymatiques complémentaires permettent la biodégradation quasi-totale de ces différents types d'hydrocarbures (Head et al., 2006).

Il a été rapporté que pour la biodégradation par les bactéries, les n-alcanes sont préférables aux HAP (Sugiura et al., 1997; Widdel et Rabus, 2001; Das et Mukherjee, 2007b). Ceci pourrait être dû à la disponibilité de composés d'hydrocarbures pétroliers (source unique de carbone et d'énergie) soumis à la décomposition bactérienne, à l'adaptation des dégradeurs d'hydrocarbures aux environnements pollués et à la présence d'enzymes qui contribuent aux diverses voies de biodégradation (Boopathy, 2000; Thamer et al., 2013; Meckenstock et al., 2016). Les composés les plus simples du pétrole brut peuvent être dégradés par une grande variété de bactéries alors que la capacité à dégrader des composés complexes (tels que les

HAP, les résines et les asphaltènes) est présente dans très peu d'espèces. Une espèce bactérienne se spécialise dans l'utilisation de quelques hydrocarbures en tant que source alimentaire préférée et en consortium, un effet synergique se produit (Sugiura et al., 1997; Peressutti et al., 2003; Varjani et al., 2013, 2015). La dégradation des hydrocarbures pétroliers peut être réalisée par un système enzymatique spécifique (Widdel et Rabus, 2001; Das et Chandran, 2011). L'attaque initiale est généralement obtenue par divers mécanismes: (a) fixation des cellules microbiennes aux substrats et (b) production de biosurfactants / bio-émulsifiants, biopolymères, solvants, gaz et acides (Banat, 1995; Pornsunthorntawee et al., 2008; Saeki et al., 2009; Varjani et Upasani, 2016). Le pétrole brut est un mélange d'hydrocarbures simples et complexes dégradés par plusieurs microorganismes indigènes, chacun étant capable de décomposer un groupe spécifique de molécules (Zanaroli et al., 2010; Varjani et al., 2014).

II.4 Facteurs influençant la biodégradation en mer.

Les microorganismes répondent aux changements de leur environnement, et l'efficacité de la biodégradation dépend de divers facteurs, à savoir :

- Les conditions environnementales, telles que le pH, la température, la salinité, disponibilité en oxygène et facteurs nutritionnels (source de carbone et d'azote et d'autres nutriments) (Chandra et al., 2013; Varjani et al., 2015).
- Les caractéristiques des polluants : Composition chimiques, type, disponibilité, longueur des hydrocarbures, dispersion en phase aqueuse et volatilisation (Chandra et al., 2013).

II.4.1 Effets des facteurs environnementaux.

II.4.1.1 Effet de la température.

La température joue un rôle très important car elle affecte à la fois les propriétés chimiques du polluant (solubilité, viscosité) et l'activité des micro-organismes (Das et Chandran, 2011). À basse température, la viscosité du pétrole augmente rendant l'émulsification plus difficile, tandis que la volatilisation des composés toxiques pour les microorganismes tels que les alcanes de faibles poids moléculaires est réduite faisant augmenter leur solubilité dans l'eau et donc entraînant un ralentissement du métabolisme des microorganismes (Atlas, 1998).

En général, une diminution de la température est accompagnée par une diminution de la vitesse de biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de l'activité

enzymatique. Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation (Song et al., 1990 ; Walworth et al., 2001).

À haute température, les taux de solubilité, biodisponibilité, distribution et diffusion des hydrocarbures augmentent, ce qui favorise la capacité de biodégradation microbienne et améliore le taux de biodégradation. D'autre part, une température très élevée diminue la solubilité de l'oxygène et limite la biodégradation microbienne aérobie (Leahy et Colwell., 1990 ; Margesin et schinner, 2001). Le maximum de l'activité métabolique des microorganismes est généralement observé à une température comprise entre 30 et 40 °C (Bossard et Bartha, 1984) (figure 12). Au-delà de la température optimale de croissance et de biodégradation on assiste à une augmentation de la toxicité des hydrocarbures et une diminution de l'activité métabolique. Røling et al. (2003) mentionnent une inhibition totale de la biodégradation au-delà de 80-90°C malgré l'isolement de bactéries thermophiles (Thermotoga, Thermoanaerobacter, Thermodesulfobacterium) et d'Archae hyperthermophiles (Thermococcus, Archaeoglobus) dans des puits de pétrole où la température peut atteindre 100°C.

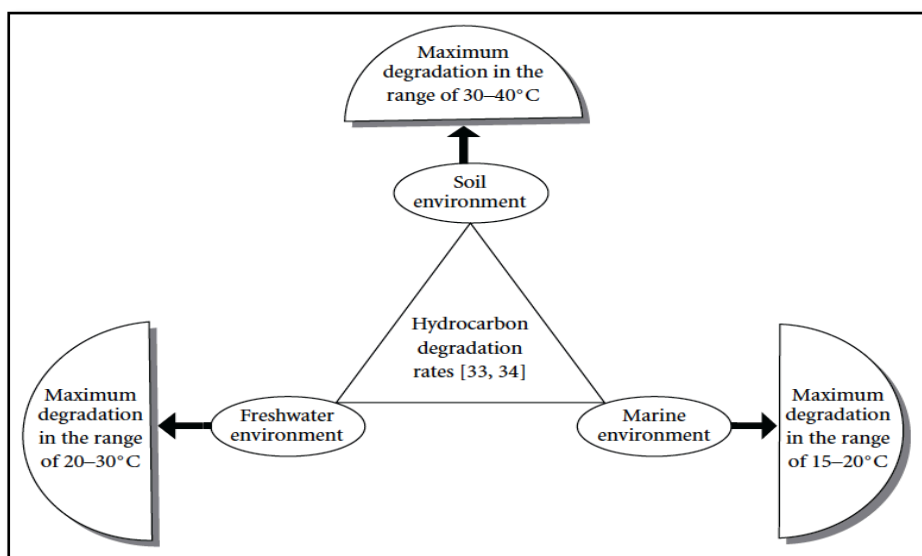


Figure 12. Taux de dégradation des hydrocarbures dans les sols, les eaux douces et les environnements marins (Das et Chandran, 2011).

Boopathy (2000) a également confirmé que la dégradation des polluants aux températures mésophiles est meilleure et plus efficace que la dégradation à très basse ou haute température. Cependant, il a été signalé que les microorganismes sont capables de métaboliser les HAP à des températures extrêmes: Par exemple, un taux de dégradation élevé des HAP s'est produit dans l'eau de mer à basses températures (0 ° C) et à 50 ° C (Sihag et al., 2014). Bargiela et

collaborateurs. (2015) ont confirmé la corrélation entre le pourcentage relatif de gènes codant pour des enzymes participant à la biodégradation et à la température dans les sites pollués par les hydrocarbures situés le long des côtes de la mer Méditerranée. Les auteurs ont prouvé que les faibles températures augmentent la richesse bactérienne avec la diminution de la diversité catabolique. Le pourcentage relatif des séquences de gènes codant pour des enzymes de biodégradation vont de 0,56 à 1,30% à basses températures ($<3^{\circ}\text{C}$), alors que ce nombre augmente de 5,6 fois dans les sites modérément chauds (de 13 à $26,5^{\circ}\text{C}$) (Bargiela et al., 2015).

II.4.1.2 Effet de l'oxygène.

Les ressources en oxygène constituent un facteur particulièrement important dans la biodégradation des hydrocarbures (Cerniglia, 1992). En effet l'étape initiale du catabolisme des hydrocarbures aliphatiques, cycliques et aromatiques par les bactéries et les champignons inclut l'oxydation de ces substrats par l'intermédiaire d'hydroxylases et d'oxygénases, pour lesquelles l'oxygène moléculaire est indispensable (Atlas, 1981; Bertrand et Mille, 1989 ; Leahy et Colwell, 1990). Les conditions aérobies sont, par suite, nécessaires pour cette voie d'oxydation microbienne des hydrocarbures dans l'environnement. Le problème de la limitation de l'oxygène moléculaire dans les couches superficielles des colonnes d'eau est inexistant, en effet la concentration en oxygène est suffisamment élevée pour assurer l'activité des microorganismes hydrocarbonoclastes. Théoriquement, 3,5 g d'oxygène sont nécessaires pour l'oxydation complète de 1 g de pétrole (Soltani, 2004). Marin et collaborateurs. (1996), en étudiant les facteurs influençant la biodégradation des hydrocarbures par la bactérie *Acinetobacter calcoaceticus*, ont constaté une augmentation de la dégradation des hydrocarbures totaux et des n-alcanes de 10 % après un apport supplémentaire d'oxygène par agitation. Les sédiments aquatiques, sont par contre généralement anoxiques, à l'exception de la fine couche superficielle (Leahy et Colwell, 1990). Bertrand et collaborateurs. (1986) ont étudié dans des systèmes à flux continu, l'évolution des différents hydrocarbures en fonction de la concentration en oxygène. Ils ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures a lieu essentiellement dans la partie superficielle des sédiments (0-1 cm), où la concentration en oxygène est de 8 ppm, alors qu'elle est plus faible en profondeur. Par contre aucune dégradation n'a été observée dans des conditions anaérobies (0,2-0,3 ppm), en dépit d'une activité sulfato-réductrice très élevée dans les sédiments. La dégradation anaérobie des hydrocarbures par les microorganismes peut se produire mais à des vitesses négligeables et son importance écologique est considérée comme moindre.

II.4.1.3 Effet du pH.

Le pH varie moins dans les milieux aquatiques et la plupart des bactéries et des champignons capables de dégrader les hydrocarbures nécessitent un pH neutre (Leahy et Colwell, 1990 ; Margesin et schinner, 2001). En général, l'activité microbienne est influencée par un pH extrêmement bas ou élevé (Leahy et Colwell., 1990). Selon Bamforth et Singleton (2005), 40% de dégradation du phénanthrène a été observée pour Burkholderia cocovenenans à pH 5,5. Cependant, la dégradation à pH neutre dans les mêmes conditions était de 80%. De plus, Leahy et Colwell (1990) ont rapporté que la dégradation microbienne du naphthalène diminuait à pH 5,0 par rapport au taux de dégradation le plus élevé observé à pH 7. De plus, d'autres rapports ont décrit l'efficacité de certains microorganismes, tels que Pseudomonas, qui dégradent les hydrocarbures à pH alcalin (Bamforth et Singleton, 2005). Une dégradation des HAP dans un environnement contaminé par un acide (pH 2) par des microorganismes indigènes a été rapportée (Sihag et al., 2014). Le pH adéquat dépend des microorganismes à utiliser pour la bioremédiation.

II.4.1.4 Effet de la salinité.

La salinité moyenne des milieux océaniques est de l'ordre de 3,5 ‰ et l'intervalle de variation se situe en général entre les limites de 3,3‰ et 3,7‰. Ces concentrations en sels sont compatibles avec la croissance des microorganismes hydrocarbonoclastes (Bertrand et Mille, 1989). Bertrand et collaborateurs (1993) ont étudié l'influence de la concentration en chlorure de sodium sur la biodégradation des hydrocarbures par deux communautés microbiennes, ils ont trouvé que la biodégradation est maximale pour une concentration de 0,4 M et diminue lentement pour des valeurs supérieures et inférieures à celle-ci.

L'effet de la concentration en NaCl sur la biodégradation dépend de la nature du substrat utilisé comme source de carbone. Fernandez et collaborateurs. (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 chlorure de sodium comprises entre 0,2 et 2,5 M.

II.4.1.5 Effet de la pression hydrostatique.

La pression n'est considérée comme une variable dans la biodégradation des hydrocarbures que dans les profondeurs des océans (Atlas, 1981 ; Bertrand et Mille 1989; Leahy et Colwell, 1990). En effet, le pétrole qui n'est pas dégradé dans les eaux de surface va progressivement

s'enfoncer, en subissant une lente transformation, et ce sont les molécules difficilement dégradables qui atteindront le fond des océans. La profondeur moyenne de ceux-ci est de 3800 m (ce qui correspond à une pression de 380 bars) et la température est inférieure à 5 °C (Bertrand et Mille, 1989). Schwarz et collaborateurs. (1975) ont étudié la croissance et l'utilisation des hydrocarbures par les bactéries isolées de sédiments marins profonds, en fonction de la pression. Ils ont trouvé que la vitesse d'utilisation des hydrocarbures est fortement diminuée à hautes pressions. Sous une pression de 1 bar (pression atmosphérique), ces bactéries dégradent 94 % de l'hexadécane en 8 semaines alors qu'il leur faut 40 semaines pour arriver au même résultat à 500 bars. Il apparaît donc, que les hydrocarbures qui parviennent aux grandes profondeurs océaniques sont très lentement dégradés par les microorganismes et par conséquent peuvent persister pendant de longues périodes.

II.4.1.6 Concentration en sels nutritifs.

Les nutriments sont des éléments très importants pour la biodégradation des hydrocarbures, en particulier de l'azote, le phosphore et dans certains cas le fer (Golyshin et al., 2002). Une partie de ces nutriments pourraient devenir un facteur limitant affectant ainsi les processus de biodégradation. Yakimov et collaborateurs. (2003) ont rapporté que lorsqu'un important déversement d'hydrocarbures s'est produit dans des environnements marins et d'eau douce, l'offre de carbone a été considérablement accrue et la disponibilité d'azote et de phosphore en général est devenu le facteur limitant de la dégradation du pétrole. En milieu marin, ceci s'avère plus prononcé en raison des faibles concentrations d'azote et de phosphore dans l'eau de mer (Engelhardt et al., 2001). Il se crée alors un déséquilibre entre les sources de carbone, azote et phosphore, les rapports stoechiométriques classiques entre les différents éléments sont donc bouleversés ($C : N : P = 106 : 16 : 1$). Le développement des bactéries hydrocarbonoclastes est alors drastiquement limité par les ressources en nutriments inorganiques. La biodisponibilité des nutriments est un facteur limitant pour la croissance et la biomasse, en particulier l'azote et le phosphore, qui sont des éléments clés dans le processus de bioremédiation naturelle des hydrocarbures. Il semblerait que la disponibilité des nutriments puisse avoir un rôle important dans la structuration des communautés dégradant le pétrole. De plus, en milieu limité les bactéries hydrocarbonoclastes seraient en compétition pour les nutriments avec les bactéries non dégradantes et le phytoplancton (Sauret, 2011). Roling et collaborateurs. (2002) ont construit un microcosme contenant du sédiment auquel de l'eau de mer synthétique fraîche a été fournie avec deux cycles de marée par jour. Les populations microbiennes dans ce microcosme ont été étudiées après l'ajout de pétrole brut

avec ou sans supplément de nutriments (azote et phosphore). Il a été constaté que la supplémentation en nutriments a stimulée la dégradation du pétrole. D'autre part, des concentrations excessives de nutriments peuvent également inhiber l'activité des bactéries (Ouverney et al., 1999). Plusieurs auteurs ont signalé les effets négatifs de niveaux élevés de NPK sur la biodégradation des hydrocarbures (Radajewski et al., 2000 ; Jeon et al., 2003) en particulier sur les hydrocarbures aromatiques (Wilkes et al., 2003).

II.4.2 La composition chimique des hydrocarbures.

La spécificité des substrats à l'attaque microbienne a été largement étudiée. Atlas (1981) et Leahy et Colwell (1990), ont classé les composés du pétrole en quatre familles : les hydrocarbures saturés, les aromatiques, les asphaltènes (phénols, acides gras, cétones, esters et porphyrines) et les résines (pyridines, quinolines, carbazoles, sulfoxides, et amides). Ces composés diffèrent par leur susceptibilité à l'attaque microbienne. Ainsi la vitesse de biodégradation est plus élevée pour les saturés, viennent ensuite les aromatiques légers, les aromatiques à haut poids moléculaire, les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible.

Les hydrocarbures saturés incluent les *n*-alcane, les alcanes ramifiés et les cycloalcane (naphtène). Les alcanes normaux ou à chaînes linéaires sont les plus abondants et les plus rapidement dégradables: les *n*-alcane à nombre de carbone supérieur à 44 peuvent être métabolisés par les microorganismes mais ceux ayant de 10 à 24 atomes de carbone (C₁₀-C₂₄) sont généralement les plus facilement dégradables. Les alcanes ramifiés sont plus récalcitrants à la biodégradation que les *n*-alcane et plus le nombre de ramifications augmente, moins ces composés sont susceptibles à la dégradation microbienne. Les hydrocarbures cycliques constituent une fraction importante des hydrocarbures dans la plupart des bruts pétroliers, ils sont plus difficilement dégradables que les deux séries précédentes à cause de leur toxicité suite à l'interaction avec la membrane cellulaire des microorganismes (Sikkema et al., 1995).

Les expériences montrent de façon non équivoque que la biodégradation des cycloalcane est très limitée (Atlas, 1981). La non accumulation des hydrocarbures cycliques dans l'environnement, implique des phénomènes non conventionnels de dégradation tel que l'intervention des phénomènes de co-oxydations impliquant plusieurs souches microbiennes dont l'équipement enzymatique est complémentaire (Bertrand et al., 1983; Leahy et Colwell, 1990). Des études sur la transformation des hydrocarbures aromatiques par les microorganismes ont montré leur toxicité cellulaire (Sikkema et al., 1995). Des hydrocarbures tels que les alkyl-benzène légers qui sont les plus toxiques à cause de leur solubilité dans

l'eau, mais peuvent cependant être métabolisés par les microorganismes quand ils sont présents en faibles concentrations. La structure moléculaire de ces substrats détermine la vitesse de leur dégradation: un grand nombre de groupements méthyles empêche l'oxydation. Les hydrocarbures poly-aromatiques sont moins toxiques pour les microorganismes, mais ils sont rarement métabolisés et quand ils le sont leur biodégradation est lente: c'est ce qui explique leur accumulation dans l'environnement.

Les asphaltènes et les résines constituent une faible partie du pétrole brut, cette classe de composés pétroliers n'est pas biodégradable ou peu dégradable

[Ratlidge \(1978\)](#), a rassemblé des règles qui ont une application générale à l'ensemble des microorganismes :

- 1- Les hydrocarbures aliphatiques sont assimilés par une grande variété de microorganismes, les composés aromatiques peuvent être oxydés mais sont assimilés par quelques bactéries seulement.
- 2- Les *n*-alcanes 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 que le *n*-octane. Quand la longueur de chaîne augmente au-delà de C₉, le facteur de production augmente, mais la vitesse d'oxydation décroît.
- 3- Les composés saturés sont plus rapidement dégradés que les insaturés.
- 4- Les composés ramifiés sont moins rapidement dégradés que les composés non substitués

II.4.3 Biodisponibilité des hydrocarbures.

La biodisponibilité est définie comme le taux de transfert de masse du substrat dans les cellules microbiennes. Il est considéré comme l'un des paramètres les plus déterminants de la dégradation des hydrocarbures. Les HAP se caractérisent par une faible biodisponibilité en raison de leur faible solubilité dans l'eau. C'est ce qui explique leur résistance au processus de dégradation et leur persistance dans l'environnement ([Ghosal et al., 2016](#)). Les hydrocarbures et en particulier les HAP deviennent plus biodisponibles lorsqu'ils sont dissous ou évaporé ([Abdel-shafy et Mansour, 2016](#)). La biodisponibilité du polluant dans un environnement contaminé peut être augmenté par l'application de tensioactifs. Pour surmonter la faible biodisponibilité de ces contaminants hydrophobes, les microorganismes adoptent des stratégies qui réduisent la tension superficielle par la production des surfactants qui agissent comme des agents émulsifiants, favorisant ainsi la formation de micelles.

II.5 Accession des microorganismes aux hydrocarbures.

Certains microorganismes utilisent les hydrocarbures comme source de carbone pour leur croissance. De ce fait, ils se sont adaptés en termes de résistance et d'équipement enzymatique pour utiliser ce type de substrat. Les hydrocarbures sont des composés hydrophobes dont la solubilité diminue à mesure que la masse moléculaire des composés augmente. Pour les hydrocarbures dont la solubilité est faible ($<0,1$ g/l), les microorganismes ont développé des stratégies pour venir au contact du substrat. Quatre mode d'accension illustrés dans la figure 13, ont été avancés pour expliquer l'assimilation des hydrocarbures par les microorganismes (Bouchez-Naitali et al., 1999; Hommel et al., 1994).

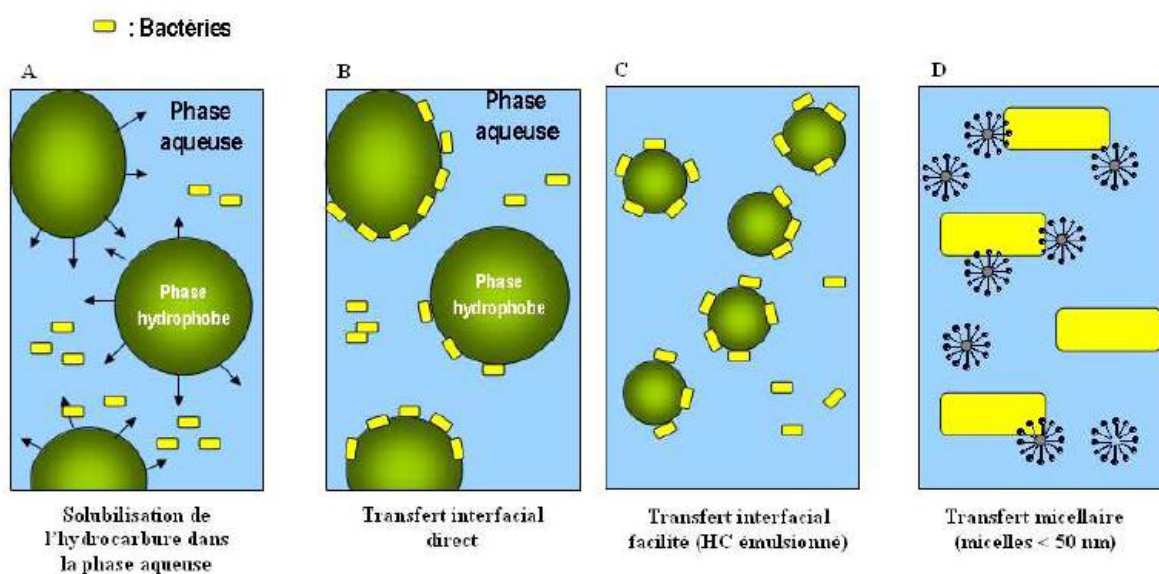


Figure 13. Les mécanismes d'accension des microorganismes aux hydrocarbures (Vandecasteele, 2005)

II.5.1 L'assimilation des hydrocarbures solubles :

L'assimilation en phase aqueuse a surtout été rapportée pour les hydrocarbures aromatiques suffisamment solubles et les alcanes légers (Bouchez et al., 1995 ; Goswami et Singh, 1991). C'est sous forme solubilisée que le substrat pénètre dans la cellule.

II.5.2 L'accension interfaciale.

Les microorganismes utilisant les alcanes peu solubles possèdent fréquemment une membrane extra hydrophobe (Rosenberg, 1986). L'hydrophobicité élevée de cette enveloppe permet l'adhésion du microorganisme aux gouttelettes de substrat présentes dans le milieu aqueux, souvent de taille très supérieure à celle des bactéries. Le substrat pénètre directement dans la cellule par diffusion ou transport actif sans dissolution préalable dans la phase aqueuse.

L'hydrophobicité des microorganismes concernés entraîne souvent une forte tendance à l'agrégation.

II.5.3 L'accession interfaciale facilitée (émulsification).

Dans ce cas, l'intervention de biosurfactants produits par les microorganismes accélère le transfert des hydrocarbures en augmentant l'aire interfaciale entre les phases hydrophobe et hydrophile. On parle de transfert interfacial assisté. L'action des biosurfactants est souvent complexe. Ils participent au pseudo solubilisation des alcanes nécessaires à la croissance tout en restant associés aux cellules bactériennes pendant la croissance, puis sont libérés massivement lorsque le microorganisme a cessé toute croissance ([Singer, 1984](#)).

II.5.4 Le transfert micellaire.

Différents auteurs ont montré que la solubilité apparente des *n*-alcanes était très largement supérieure à celle mesurée dans l'eau dans les cultures de levures sur *n*-alcanes ([Roy et al., 1978](#)) ou sur HAP ([Kim et al., 2001](#)). Cette augmentation de la solubilité apparente est liée à la formation d'une microémulsion résultant de la pseudo solubilisation des hydrocarbures par des biosurfactants produits par le microorganisme. Les micelles ainsi formées, de taille très inférieure aux bactéries, entrent en contact avec la cellule. Le mécanisme de transfert à travers l'enveloppe cellulaire n'est en réalité pas connu. Une protéine de transport membranaire AlkL a été cependant mise en évidence ([Van Beilen et al., 1992](#)).

Hommel (1994) a formulé une hypothèse sur l'existence des pores hydrophobes au niveau de l'enveloppe bactérienne. Il faut noter que la surface externe d'une micelle est majoritairement hydrophile et le transfert micellaire apparaît privilégié chez les microorganismes dont l'hydrophobicité de l'enveloppe micellaire est faible ([Bouchez-Naitali et al., 1999](#)). Les interactions hydrophobes entre substrat et cellule microbienne sont d'ailleurs complexes car les biosurfactants sont susceptibles d'affecter l'hydrophobicité cellulaire. En effet, le rôle physiologique des biosurfactants est multiple. Ils interviennent dans la formation de micro colonies, ils facilitent l'association en surface des bactéries et de part ce fait la formation d'agrégats, ils assurent la formation d'une structure de type filamenteuse et jouent un rôle dans la dispersion des biofilms ([Pamp et Tolker-Nielsen, 2007](#)).

II.6 Les biosurfactants.

La biodisponibilité des contaminants est considérée comme une limite majeure de la bioremédiation des sites contaminés. Cette limite peut être récupérée en utilisant des

biosurfactants produit par des bactéries. De nombreuses études ont rapporté l'effet des biosurfactants sur la biodégradation des hydrocarbures et de leurs potentiels industriels et commerciaux (Banat et al., 2000 ; Bento et al., 2005 ; Batista et al., 2006).

Tableau 7. Principaux types de tensioactifs biologiques produits par les microorganismes.

Types	biosurfactants	microorganismes	Références
Glycolipides	Rhamnolipides	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ,	(Bordoloi et Konwar, 2009)
		<i>Pseudomonas putida</i> ,	(Banat et al., 2000)
		<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ,	
		<i>Renibacterium salmoninarum</i>	
	Trehalolipides	<i>Rhodococcus</i> , <i>Mycobacterium</i> ,	(Banat et al., 2000)
		<i>Gordonia</i> , <i>arthrobacter</i> ,	
		<i>corynebacterium</i>	
	Sophorolipides	<i>Candida bombicola</i>	(Whang et al., 2009)
		<i>Candida apicola</i>	
		<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> strain SdK644	(Zenati et al., 2018)
Lipopeptides	Surfactine	<i>Bacillus subtilis</i>	(Banat et al., 2000)
	Viscosine	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	(Banat et al., 2000)
	Rhodofactine	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	(Banat et al., 2000)
		<i>Staphylococcus</i> sp. strain 1E	(Eddouaouda et al., 2012)
Acides gras	Acides gras	<i>Corynebacterium lepus</i>	(Banat et al., 2000)
Phospholipides	phospholipides	<i>Corynebacterium insidiosum</i>	(Banat et al., 2000)

Les biosurfactants présentent un grand intérêt car ces composés sont largement utilisés dans divers domaines, y compris les applications industrielles, l'agriculture, la récupération du pétrole brut, les cosmétiques, les produits pharmaceutiques, les détergents, le traitement des produits alimentaires et les textiles, ainsi que dans divers domaines de la biomédecine. Par conséquent, ces composés présentent des avantages par rapport aux surfactants chimiques car ces molécules sont non toxiques, biodégradables et peuvent être utilisées dans des conditions extrêmes de température, de pH et de salinité (Banat et al., 2000 ; Owsianiak et al., 2009).

Les études portant sur l'utilisation biotechnologique des biosurfactants ont considérablement augmenté dans les dernières années. De nos jours, avec les progrès de la recherche, l'utilisation de biosurfactants est en train de devenir une alternative potentielle et un outil prometteur pour la bioremédiation.

Les biosurfactants sont des composés amphiphiles produits par les bactéries, les champignons et les levures qui vont faciliter la solubilisation des hydrocarbures. Ils appartiennent à différentes classes y compris les glycolipides, les lipopeptides, les acides gras, des phospholipides, des lipides neutres et des lipopolysaccharides (Rosenberg, 1986). La croissance des micro-organismes présents sur les hydrocarbures pose des problèmes particuliers, car les hydrocarbures ne sont pas miscibles dans l'eau, de nombreuses bactéries sont capables d'émulsionner les hydrocarbures en solution en produisant des agents tensio-actifs biologiques qui augmentent l'adhérence des cellules au substrat. Les biosurfactants réduisent la tension superficielle, ce qui augmente la surface des composés insolubles et conduit à l'augmentation de la biodisponibilité et la biodégradation subséquente des hydrocarbures (Batista et al., 2006).

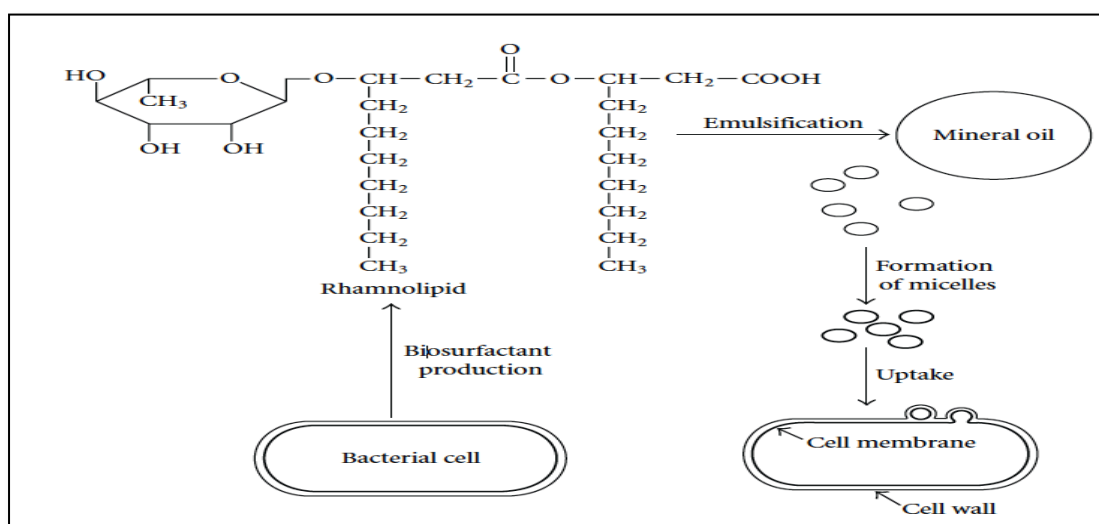


Figure 14. Implication du biosurfactant (rhamnolipide) produit par *Pseudomonas* sp dans l'absorption d'hydrocarbures (Whang et al., 2009).

Des bactéries telles que *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Koccuria* et *Bacillus*, isolées à partir de sites contaminés par les hydrocarbures en Tunisie, ont montré une production importante de biosurfactants et une activité d'émulsification significative (Mahjoubi et al., 2013). Plusieurs genres de microorganismes, dont *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter* et *Ochrobactrum* ont été identifiés comme producteurs efficaces de biosurfactants (tableau 7) (Huang et al., 2010).

Par conséquent, ces bactéries peuvent constituer des candidats potentiels pour la bioremédiation.

Pseudomonas a été largement étudiée pour sa capacité à produire des biosurfactants à structure glycolipidique. Rhamnolipides (figure 14). *Bacillus subtilis* est connu pour sa capacité à produire un biosurfactant lipopeptidique connu sous le nom de surfactine, qui est utilisé dans des applications commerciales (Desai et Banat, 1997 ; Whang et al., 2009). En outre, la capacité de *Brevibacillus* sp. à produire un biosurfactant pendant la dégradation du phénanthrène et une importante association entre la biodégradation et la production de biosurfactants a été montrée (Reddy et al., 2010).

II.7 Études de cas de stratégies de bioremédiation utilisées pour la décontamination des milieux marins pollués

De nombreuses études des différentes applications du processus de bioremédiation ont été réalisées. Nous prendrons pour exemples des travaux réalisés en Méditerranée (Cappello et al. (2015, Genovese et al. 2014, Fodelianakis et al. (2015).

Dans les travaux de Cappello et collaborateurs (2015) et Genovese et collaborateurs (2014), un système modulaire visant à optimiser le processus de biodégradation a été mis en œuvre et testé pour la dépollution des sédiments contaminés par les hydrocarbures recueillis dans le port de Messine (Sicile, Italie). Le système a été conçu directement sur le terrain, tout en conservant les avantages des méthodes contrôlées qui n'ont pas d'impacts sur le milieu environnant. Les effets de l'ajout d'air et / ou la libération lente d'engrais, régulation de la température et ajout d'absorbants sur l'efficacité du système ont été évalués. L'abondance des communautés microbiennes autochtones a été surveillée pendant 30 jours de traitement. Les mesures de l'activité microbienne, la demande biochimique en oxygène (DBO), criblage de gènes fonctionnels, quantification de la dégradation des hydrocarbures pétroliers et analyse écotoxicologique ont été effectués.

Les résultats ont montré une augmentation de la population bactérienne dans les échantillons où l'air a été insufflé comparé au contrôle (sédiments non traités). Ce qui montre l'effet de l'injection d'air dans le développement de la biomasse bactérienne.

L'ajout de nutriments et la régulation de la température ont amélioré le taux de dégradation pour atteindre une forte dégradation dans les plus brefs délais. Dans le système du mésocosme, environ 70% de pétrole totale et d'hydrocarbures linéaires ont été dégradés avec le développement de bactéries mésophiles. De plus, l'ajout d'engrais a favorisé la dégradation du pétrole brut améliorant l'efficacité de la dégradation dans les 30 jours de traitement ou plus de 90% des n-alcanes (C₁₅ à C₃₀) et plus 60% des naphthalènes ont été dégradés.

Tableau 8. Exemples de stratégies de bioremédiation réussies.

Type de traitement	Microorganismes/nutriments ajoutés	Type de contaminant	% d'élimination	Durée (jours)	Références
Bioaugmentation	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Pétrole brut	43	35	(Adams et al., 2015)
	<i>Candida tropicalis</i>	Diesel	83	120	(Adams et al., 2015)
	<i>Pseudomonas arthrobacter</i>	Diesel	32	32	(Adams et al., 2015)
	<i>Alcanivorax</i> , <i>Marinobacter</i> , <i>Cycloclasticus</i> et <i>Thalassolituus</i>	TERHC	79	14	(Crisafi et al., 2016)
	<i>Acinetobacter</i>	TPH	34	42	(Wu et al., 2016)
	<i>Alcanovorax</i> et <i>Thalassolituus</i>	Pétrole brut	70	20	(Hassanshahian et al., 2014)
	<i>Absidia</i> , <i>Cylindrospora</i>	Fluorene	90	12	(Garon et al., 2004)
	Consortium bactérien	Diesel	72	84	(Adams et al., 2015)
	<i>Enterobacter</i> sp.	TPH	76		(Benzina-Tihar, 2017)
	Azote et phosphore	TPH	60	42	(Wu et al., 2016)
Biostimulation	KH ₂ PO ₄ , NH ₄ Cl et NaNO ₃	Pétrole brut	80	20	(Hassanshahian et al., 2014)
	Mélange de (NH ₄) ₂ SO ₄ et K ₂ HPO ₄	Diesel	45	84	(Adams et al., 2015)
	Engrais	Pétrole brut	90 de n-alcanes (C ₁₅ -C ₃₀) et 60% de HAP	30	(Nikolopoulou et al., 2009)
	KNO ₃ et K ₂ HPO ₄	Pétrole brut	97% de n-alcanes C ₁₂ -C ₃₅ et 45% de HAP	45	(Nikolopoulou et al., 2009)
	<i>Rhodococcus</i> sp et Tween 80	TPH	50	46	(Adams et al., 2015)
Bioaugmentation et biostimulation	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> et des engrais	TPH	75	70	(Adams et al., 2015)
	Nutriments inorganiques+ rhamnolipids et consortium de bactéries autochtones	Pétrole brut	80	30	(Nikolopoulou et al., 2013b)

Cependant, les auteurs ont constaté que le traitement par biostimulation par amendement de nutriments aux sédiments contaminés par des hydrocarbures ont renforcé l'activité de biodégradation des populations microbiennes indigènes et en particulier les bactéries hydrocarbonoclastes telles qu'*Alcanivorax*, *Marinobacter* et *Cycloclasticus*. En effet, la toxicité des sédiments a été évaluée par des études écotoxicologiques, méthode utilisant *Corophium orientale*, un amphipode méditerranéen endémique et répandu, utilisé comme espèce indicatrice dans la toxicité des sédiments du port une diminution de la toxicité dans les sédiments traités a été observés (~ 30%) par rapport au système non traité (95%) (Mahjoubi et al., 2018).

Autre exemple de stratégie de bioremédiation permettant d'évaluer l'efficacité de la bioaugmentation avec des consortiums de bactéries allochtones dans le cadre de la bioremédiation des sédiments collectés sur une côte adjacente à une raffinerie de pétrole (baie Elefsina, Grèce) traitée ex situ par élevage. Pour le traitement de la bioaugmentation, un consortium bactérien composé de souches hydrocarbonoclastes isolées à partir de différents sédiments contaminés par les hydrocarbures collectés d'Afrique du Nord (Maroc, Tunisie, Égypte) et de Mer Rouge (Jordanie) ont été utilisés. En outre, la biostimulation a été réalisée avec l'ajout de N / P sous forme de KNO_3 / KH_2PO_4 à un rapport final de C: N: P (100: 10: 1). Les expériences ont été effectuées pendant 56 jours. Les résultats ont montré que la biodégradation était principalement effectuée par les dégradants autochtones, tandis que la bioaugmentation n'a pas amélioré le processus d'assainissement.

II.8 Les Voies de biodégradation des hydrocarbures pétroliers.

Les microorganismes catabolisent les polluants des hydrocarbures pétroliers pour obtenir de l'énergie ou pour les assimiler à la biomasse cellulaire (Leahy et Colwell, 1990). La figure 15 représente un aperçu schématique des voies d'utilisation des hydrocarbures pétroliers par les microorganismes dégradant les hydrocarbures. Il y a trois manières possibles d'utiliser les hydrocarbures pétroliers: (a) phototrophe anoxique; (b) Chimiotrophe aérobie; et (c) chimiotrophe anaérobie.

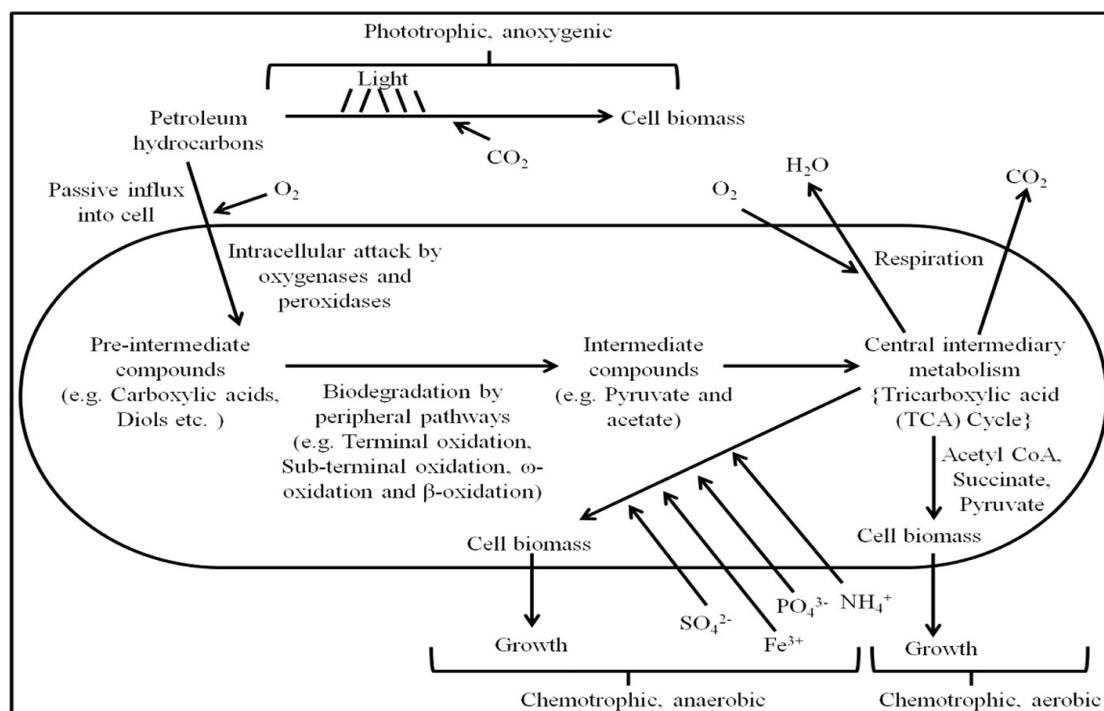


Figure 15. Vue d'ensemble schématique des voies potentielles d'utilisation des hydrocarbures pétroliers par les microorganismes (Varjani, 2017).

La dégradation des hydrocarbures pétroliers par des espèces bactériennes a été bien documenté et les voies métaboliques ont été élucidé (Leahy et Colwell, 1990; Hendrickx et al., 2006; Abbasian et al., 2015; Meckenstock et al., 2016; Wilkes et al., 2016).

Le catabolisme des hydrocarbures a longtemps été considéré comme un processus strictement aérobie; cependant, certains microorganismes sont signalés pour la dégradation anaérobie des hydrocarbures (Widdel et Rabus, 2001; Abbasian et al., 2015; Meckenstock et al., 2016). Diverses réactions à savoir : l'oxydation, la réduction, l'hydroxylation et la déshydrogénation sont courantes pour les processus aérobies et anaérobies de la dégradation microbienne des hydrocarbures pétroliers (Abbasian et al., 2015; Wilkes et al., 2016).

II.8.1 Biodégradation aérobie.

II.8.1.1 Voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures aliphatiques.

II.8.1.1.1 Biodégradation des n-alcanes.

Les alcanes sont les composés les plus rapidement et plus complètement dégradés du pétrole brut, surtout dans des conditions aérobies. Sur la base de leur poids moléculaire, bien que les microorganismes dégradent plus facilement les alcanes de poids moléculaire faible et moyen, différentes souches bactériennes sont capables de dégrader les hydrocarbures aliphatiques jusqu'à C₃₆ et au-delà (Lo piccolo et al., 2012). Le mécanisme de dégradation des alcanes par des micro-organismes est illustré dans la figure 16 et peut suivre différentes voies telles que l'oxydation terminale, l'oxydation sub-terminale, l'oxydation β et (Ji et al., 2013).

La dégradation aérobie des alcanes utilise l'oxygène moléculaire pour activer et rendre ainsi réactif le composé hydrocarboné, caractérisé par ailleurs par une stabilité chimique élevée. La première étape consiste en l'oxydation d'un méthyle terminal conduisant à la formation d'un alcool primaire, cette réaction peut avoir lieu par des enzymes (mono-oxygénase) catalysant l'incorporation dans la molécule organique d'un seul atome d'oxygène en position terminale ou sub-terminal sous la forme d'un groupe hydroxyle OH (on parle également d'hydroxylase). L'alcool primaire est oxydé en aldéhyde puis en acide gras, à partir de deux déshydrogénases spécifiques. L'acide gras est conjugué au CoA puis traité par bêta-oxydation pour générer de l'acétyl-CoA (Rojo et al., 2009), les produits finaux de la minéralisation d'hydrocarbures sont l'ATP, le CO₂ et le H₂O.

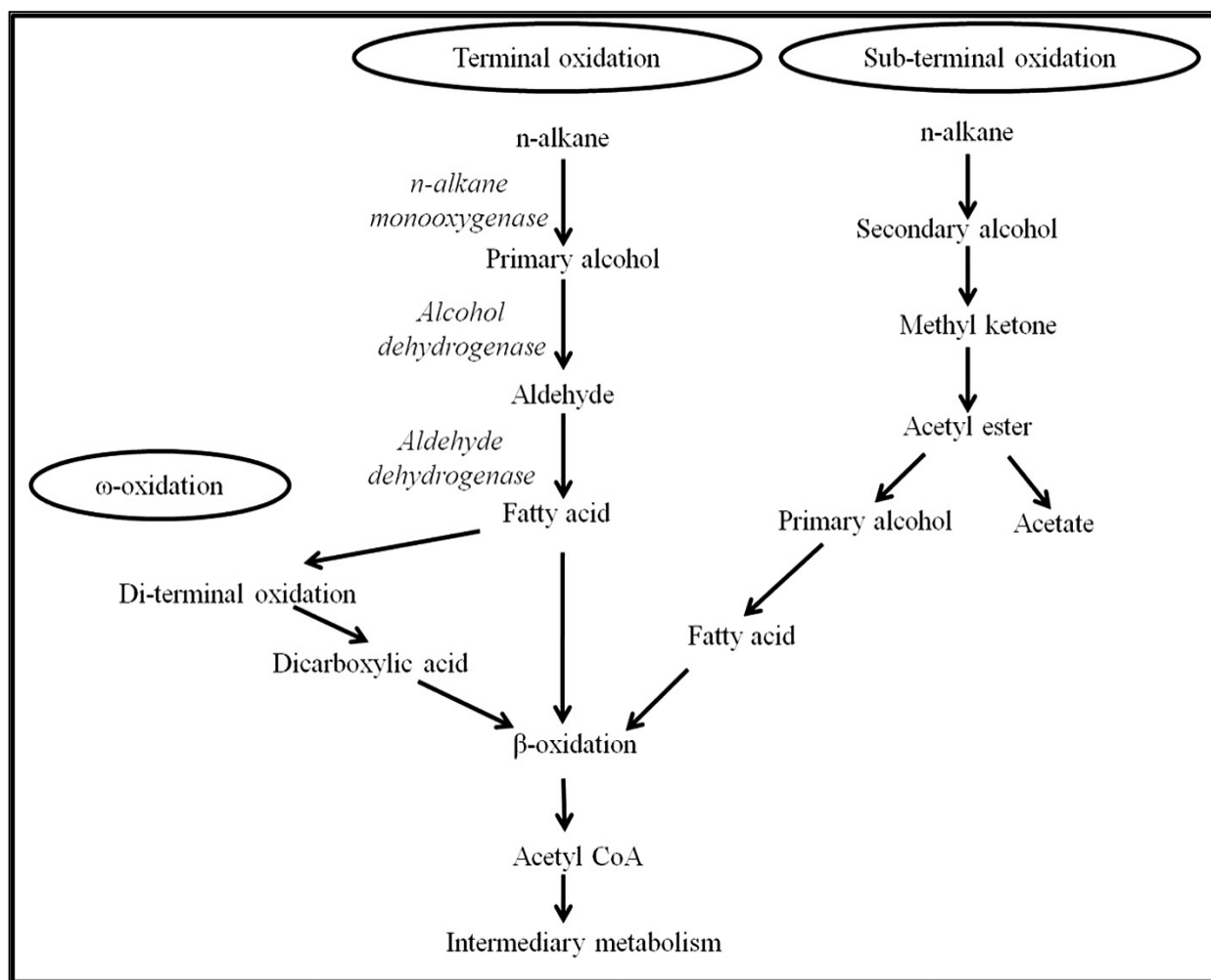
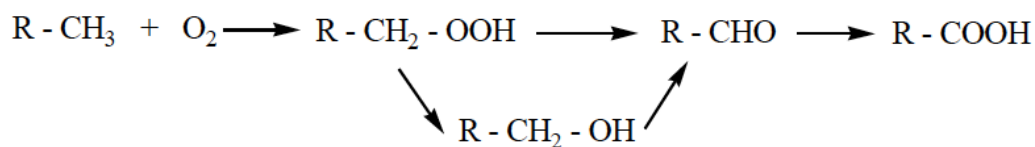


Figure 16. Trois voies périphériques possibles pour la dégradation de n-alcane (aérobie) par les micro-organismes (Varjani et al., 2017).

Oxydation mono-terminale : L'oxydation monoterminale est le principal processus utilisé par la plupart des bactéries, conduisant à la formation de l'alcool primaire puis de l'aldéhyde et de l'acide gras correspondant. Les acides gras formés peuvent être oxydés par α , β ou ω -oxydation; les composés formés pourront par la suite être incorporés aux lipides cellulaires. Une élévation de la chaîne carbonée est alors possible. Cette oxydation monoterminale pour donner l'alcool primaire est catalysée par un mécanisme complexe d'hydroxylase qui peut être relié à un système de transport d'électrons permettant l'incorporation de l'atome d'oxygène. Les deux meilleurs systèmes décrits sont: le Cytochrome P450 et la Rubredoxine.

Oxydation des n-alcane par le système de dioxygénase : Cette voie métabolique d'oxydation des n-alcane a été proposée pour la première fois par Finnerty (1977, 1988) pour les bactéries du genre *Acinetobacter*. Les n-alcane sont oxydés par une dioxygénase conduisant à la

formation d'un n-alkyl-hydroperoxyde, qui sera à son tour oxydé en aldéhyde puis en acide. Chez d'autres souches, une étape supplémentaire dans la voie métabolique d'oxydation des n-alcane a été mise en évidence: il s'agit de la formation d'un alcool à partir du n-alkyl-hydroperoxyde, qui est ensuite oxydé en aldéhyde (Finnerty, 1990).



Oxydation subterminale : Dans certains cas, l'oxydation peut être subterminale, ce qui conduit à la formation d'un alcool secondaire puis à une cétone. La dégradation ultérieure de la cétone par incorporation d'un atome d'oxygène conduit à la formation d'un ester (réaction de type Bayer-Villiger) qui est hydrolysé en alcool et en acide.

Oxydation diterminale : Après formation de l'acide gras, une deuxième oxydation peut se produire au niveau du groupement méthyl- ω pour donner un di-acide. La formation de 1- ω -alcane-diol et de dialdéhyde n'a pas été observée (Rehm et Reiff, 1981). L'oxydation subterminale de l'acide gras peut également se produire pour donner le (ω -1)-hydroxy acide de même longueur de chaîne que le n-alcane.

II.8.1.1.2 Biodégradation des alcanes ramifiés.

Les alcanes ramifiés sont généralement moins sensibles à la biodégradation, ce qui peut provoquer leur accumulation dans l'environnement. La présence d'un groupement méthyle en position β , va empêcher la β -oxydation, ce qui nécessite l'intervention d'un autre mécanisme comme l' α -oxydation ou une oxydation à l'autre extrémité. Chez certaines bactéries, la voie métabolique passe alors par la voie dite de "citronelleol"; c'est le cas de *Pseudomonas citronellolis* capable de dégrader le 2-octène, le 3,6-diméthyl-octane et le 2,6-diméthyl-décane (figure 17) (Fall et al., 1978), ainsi que chez plusieurs autres espèces *Pseudomonas* (Cantwell et al., 1978). Généralement, le groupement méthyle terminal de la chaîne n-alkyl de ces composés est initialement oxydé en acide carboxylique ; un processus de dégradation par β -oxydation conduit ensuite à l'acide cyclohexylcarboxylique ou à l'acide cyclohexyl-acétique suivant que le nombre d'atomes de la chaîne alkyle est impair ou pair (Dutta et Harayama, 2001). Ces derniers métabolites peuvent être dégradés par un mécanisme d'hydroxylation, aromatisation et une ouverture du cycle selon plusieurs mécanismes dépendant de la parité de la chaîne alkyle.

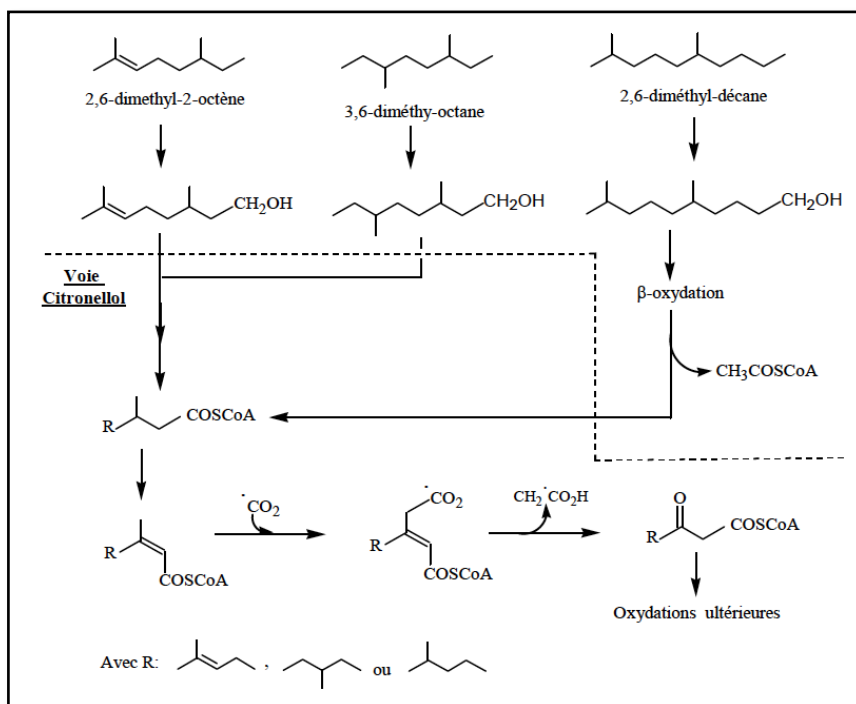


Figure 17. Voies métaboliques de la dégradation des hydrocarbures ramifiés par *Pseudomonas citronellolis* suivant la voie "Citronellol".

L'oxydation des alcanes ramifiés commence généralement par le groupement méthyle terminal le plus éloigné de la ramification et l'acide gras formé est ensuite incorporé dans les lipides cellulaires. Par β -oxydation, la dégradation peut se poursuivre jusqu'à la ramification où une ω -oxydation sera alors nécessaire pour une minéralisation complète de l'alcane.

II.8.1.1.3 Voies métaboliques de dégradation des hydrocarbures saturés cycliques.

Les cycloalkanes non substitués peuvent être oxydés et transformés en lactones hydrolysables, conduisant ultérieurement à un diacide (figure 18) (Trudgill, 1978).

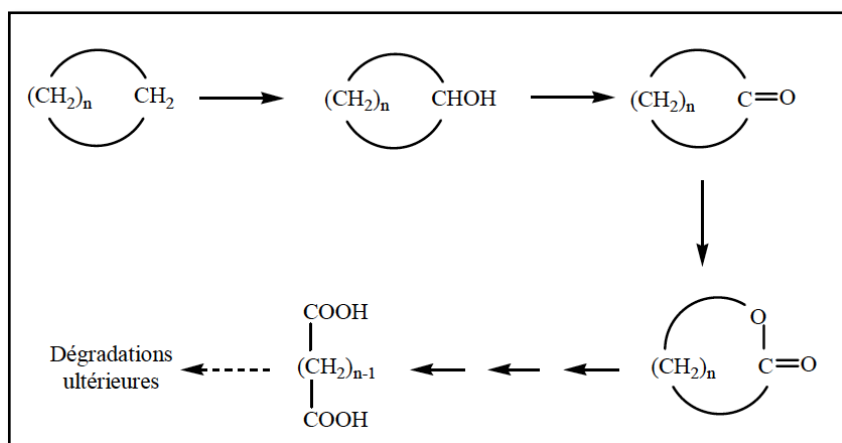


Figure 18. Biodégradation des cyclo-alcanes non-substitués (Bertrand et Mille, 1989).

Les dérivés substitués des cycloalcanes sont plus facilement dégradés que les molécules parentales homologues. La dégradation des cyclohexanes n-alkyl substitués a été largement étudiée du fait de leur présence dans le pétrole brut et leur accumulation dans l'environnement.

II.8.1.2 Biodégradation des hydrocarbures aromatiques.

Les hydrocarbures aromatiques sont des polluants ubiquistes dans l'environnement. Plusieurs sortes d'hydrocarbures aromatiques et polycycliques aromatiques existent avec une grande variété de substituants alkyles en certaines positions, dépendant de leurs origines. En plus de leur présence dans le pétrole (10 à 30 % des hydrocarbures totaux), les hydrocarbures aromatiques sont produits en quantité importante par l'activité humaine, et notamment dans les processus de pyrolyse et de combustion mis en oeuvre dans l'industrie, le transport et le chauffage. La dégradation des hydrocarbures aromatiques par les microorganismes est très importante pour l'élimination de ces composés des systèmes aquatiques et terrestres. Les procaryotes et les eucaryotes ont des capacités enzymatiques qui leur permettent d'oxyder les composés aromatiques et poly-aromatiques dont la taille peut varier du benzène au benzo(a)-pyrène (Cerniglia, 1984).

Les composés aromatiques (benzène, toluène, éthylbenzène, xylène, naphtalène, par exemple) se caractérisent par une stabilité thermodynamique supérieure à celle des composés aliphatiques; Cependant, ils peuvent être biodégradés par diverses bactéries. L'efficacité de la dégradation dépend de la solubilité du composé, du nombre de cycles benzéniques, du type et du nombre de substituants et des propriétés des atomes hétérocycliques (Xue et al., 2015). La polyvalence catabolique des bactéries vis-à-vis des composés aromatiques repose, comme pour les composés aliphatiques, sur l'existence de gènes cataboliques codant pour des monooxygénases directement hydroxylées du noyau aromatique ou du substituant alkyle lié au cycle. Les voies cataboliques subséquentes, par l'activité enzymatique de certaines déshydrogénases, conduisent à la formation de catéchols et de protocatécules.

Les catéchols sont des intermédiaires métaboliques dérivés du catabolisme des composés aromatiques non alkylés, tels que le benzène ou le phénanthrène, ou de composés aromatiques comportant un groupe fonctionnel tel que le toluène ou le phénol. Suite à la formation des intermédiaires catécholiques, le cycle aromatique est rompu par une ouverture dans l'ortho ou dans une méta-catalysée respectivement par l'intradiol (type I) ou l'extradiol-dioxygénase (type II) (figure 19).

Une série de réactions conduit ensuite à la formation d'intermédiaires métaboliques, tels que l'acétyl-CoA, le succinate, le formiate, l'acétaldéhyde, le pyruvate, susceptibles d'entrer dans le métabolisme central pour la production d'énergie et de biomasse. Les métabolites finaux sont le dioxyde de carbone et l'eau (Catania, 2018).

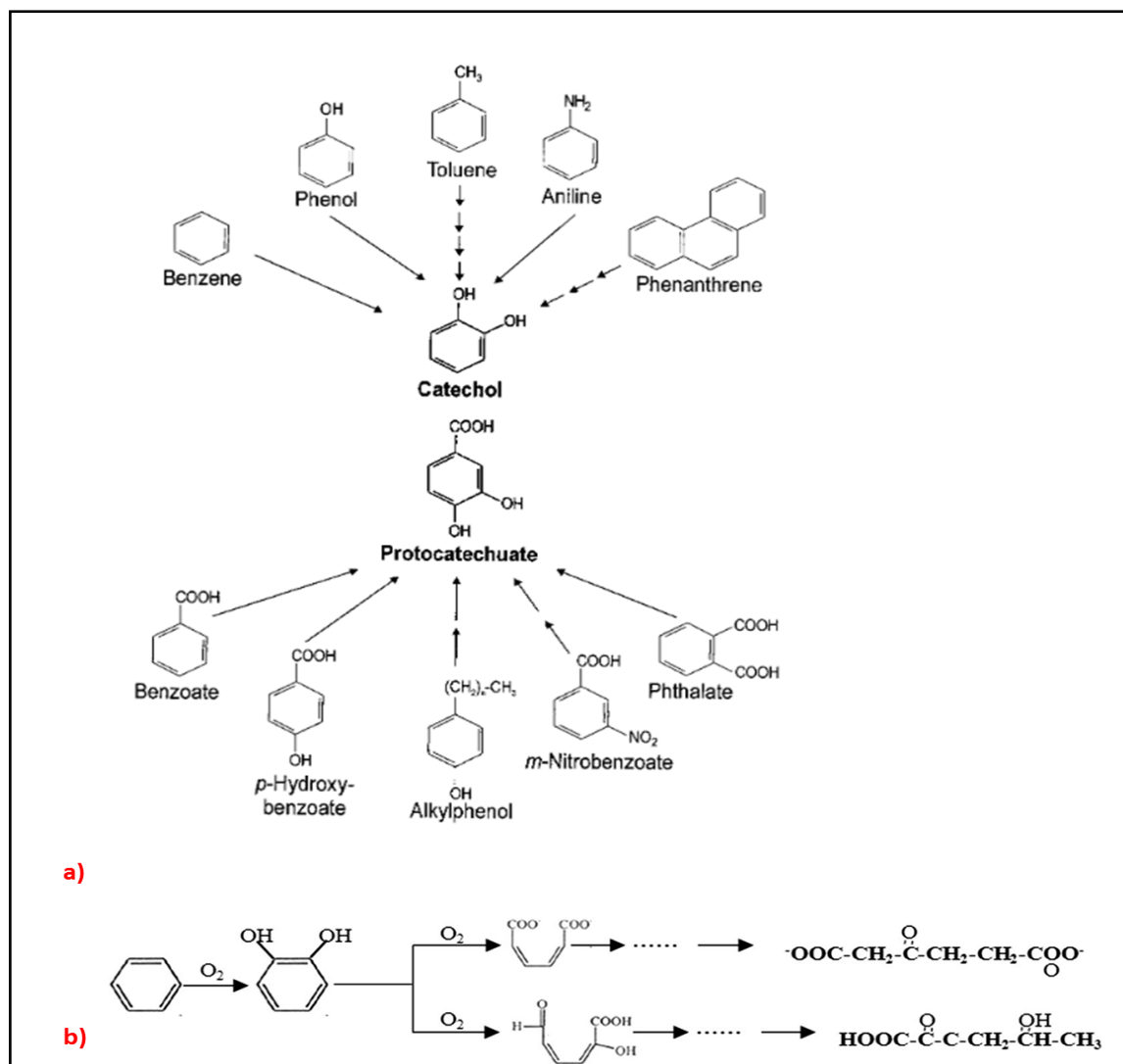


Figure 19. Voies cataboliques conduisant à la formation de catéchols et de protocatéculs (voies périphériques) (a). Principales voies cataboliques pour la dégradation du phénol (b) (voies centrales) (Xue et al., 2015).

II.8.2 Biodégradation anaérobie des hydrocarbures.

De nombreux microorganismes ont développé des capacités métaboliques leur permettant d'utiliser les hydrocarbures comme donneurs d'électrons et comme sources de carbone pour la synthèse cellulaire. La dégradation des hydrocarbures par les microorganismes dans des conditions aérobies est bien connue depuis plus d'un siècle, alors que l'utilisation de ces composés dans des conditions anoxiques (sédiments profonds et réservoirs de pétrole) n'a été

étudiée que durant la dernière décennie. En effet, il a été largement admis que pour les bactéries dégradant les hydrocarbures en aérobiose, la présence d'oxygène moléculaire est indispensable pour l'activation enzymatique initiale des hydrocarbures (Britton, 1984; Gibson et Subramanian, 1984).

Cette activation se traduit par l'introduction d'un ou plusieurs groupements hydroxyles dans la molécule apolaire. L'absence de l'oxygène moléculaire dans les environnements anoxiques nécessite un nouveau mode d'activation biochimique pour convertir les hydrocarbures apolaires en des composés comportant des groupements fonctionnels: la présence de groupements fonctionnels (hydroxyle, carbonyle ou carboxyle) dans les composés organiques est indispensable pour toute réaction d'oxydation ultérieure (Spormann et Widdel, 2000; Widdel et Rabus, 2001).

Dans les matrices anoxiques environnementales, la biodégradation se produit plus lentement que dans les zones oxiques supérieures, où elle se déroule avec des rythmes plus intenses (Diaz et al., 2013). Les bactéries anaérobies utilisent des accepteurs finaux d'électrons à la place de l'oxygène tels que les sulfates, manganèse, les nitrates ou fer ferreux, et présentent différents mécanismes d'activation et de dégradation des hydrocarbures (tableau 9) (Widdel et al., 2010 ; Abbasian et al., 2015). Un mécanisme de dégradation par méthanogénèse peut avoir lieu dans des environnement où l'oxygène, le nitrate, le fer (III) et le sulphate sont totalement absents (Zengler et al., 1999).

Tableau 9. Exemples de bactéries anaérobies dégradant les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques.

Bactéries	Hydrocarbures métabolisés	Références
Bactéries dénitrifiantes :		
<i>Thauera aromatica</i> T1	Toluène	(Evans et al., 1991)
<i>Azoarcus tolulyticus</i> Td15	Toluène, m-xylène	(Fries et al., 1994)
<i>Azoarcus</i> sp. Souche EB1	Ethylbenzène	(Ball et al., 1996)
Bactéries réduisant le fer :		
<i>Geobacter metallireducens</i> GS15	Toluène	(Loveley et Lonergan, 1990)
Bactéries réduisant le sulfate :		
<i>Desulfobacula toluolica</i>	Toluène	(Rabus et al., 1993)
<i>Desulfobacterium cetonicum</i>	Toluène	(Harms et al., 1999)
Souche AK-01	Alcanes (C ₁₃ -C ₁₈)	(So et Young, 1999)

Les BTEX (benzène, toluène, éthyl benzène, Les composés de xylène) sont généralement éliminés à peu près au même taux par les métabolisme aérobie et anaérobie (Abbasian et al., 2015). Sous métabolisme anaérobie, ces composés aromatiques sont d'abord oxydés en phénols ou en acides organiques, puis transformés en acides gras volatils à longue chaîne, qui sont finalement métabolisés en CH_4 et CO_2 (Heider et al., 1999; Abbasian et al., 2015; Wilkes et al., 2016).

Le mécanisme initial le plus connu est l'addition de fumarate en position sub-terminale pour former un dérivé d'alkylsuccinate, qui est ensuite lié au CoA avec la formation d'acyl-CoA qui entre dans la voie de la bêta-oxydation. Dans le mécanisme de carboxylation sous-terminale, il y a formation de bicarbonate inorganique et élimination de deux atomes de carbone de l'alcane conduisant à la formation d'un acide gras plus court qu'un carbone par rapport à l'alcane de départ (figure 20).

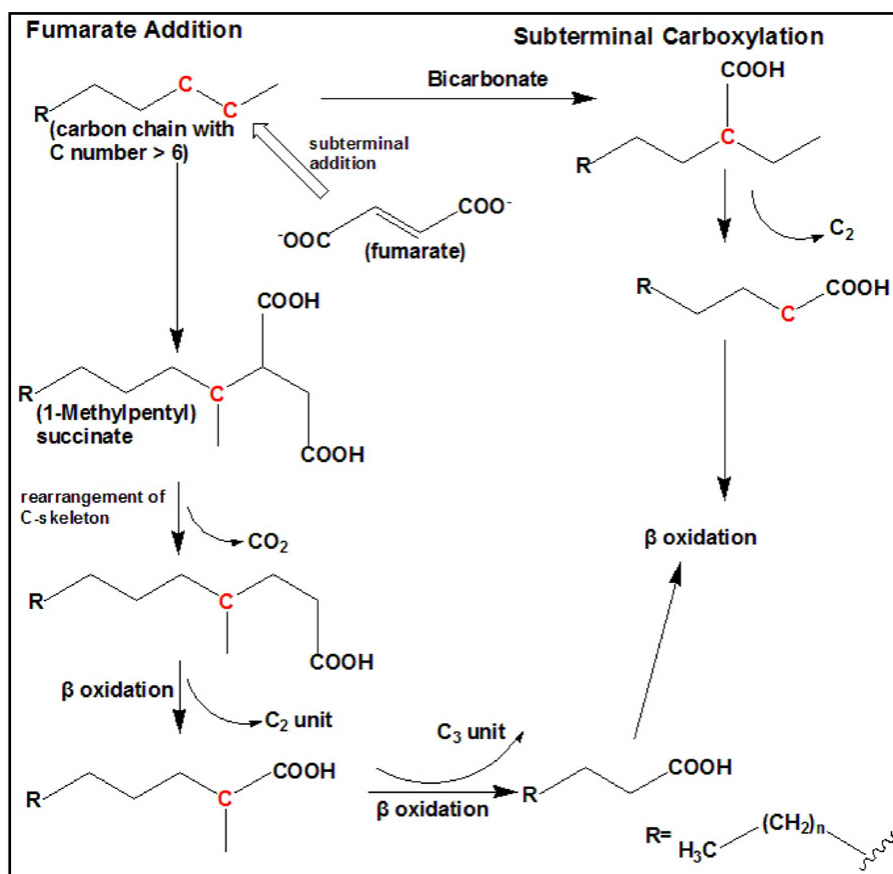


Figure 20. Voies de dégradation des hydrocarbures en anaérobiose (Ji et al., 2013).

La dégradation des hydrocarbures en l'absence d'oxygène peut également se produire par une interaction syntrophique entre les bactéries en fermentation et les archaea méthanogènes qui sont fréquemment présentes dans les écosystèmes hautement anoxiques, où les accepteurs

d'électrons finaux sont limités ou absents (Sieber et al., 2012; Kleinsteuber et al., 2012). D'autres interactions syntrophiques peuvent également se produire en l'absence de méthanogènes, dans des systèmes caractérisés par un potentiel réducteur d'oxydation élevée où il existe des accepteurs finaux d'électrons alternatifs à l'oxygène, tels que les nitrates, les sulfates et le ferIII. Les mécanismes syntrophiques reposent sur un mécanisme de transfert électronique entre les espèces concernées, qui consiste en un échange de composés réduits dérivés de la fermentation d'hydrocarbures, tels que H₂, acétate et formiate (Gieg et al., 2014). Les protagonistes initiaux des processus syntrophiques sont un groupe important de bactéries en fermentation qui, avec des mécanismes d'activation encore inconnus et des voies métaboliques inconnues, parviennent à dégrader les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques en libérant les déchets issus de la fermentation dans l'environnement, tels que les acides gras, alcool, acétate, formiate, H₂ et CO₂ (Sieber et al., 2012).

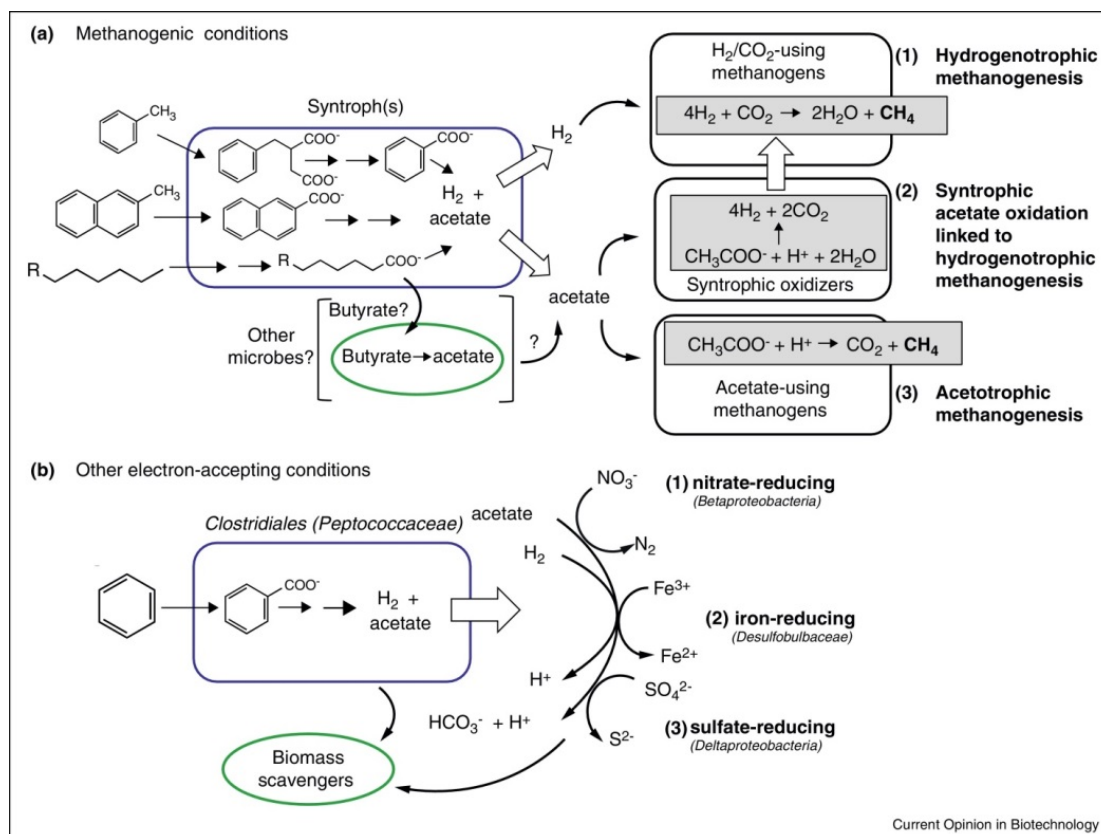


Figure 21. Processus cataboliques de la dégradation anaérobies des hydrocarbures aromatiques en milieu métagénique (a) et en présence d'accepteurs finaux d'électrons alternatifs à l'oxygène (b) (Gieg et al., 2014).

Les acides gras sont ensuite fermentés par des fermenteurs secondaires, qui produisent de l'acétate, du formiate et de l'H₂. Dans les écosystèmes dépourvus d'accepteurs d'électrons finaux, une grande partie de l'hydrogène moléculaire et du dioxyde de carbone produits sont

maintenus à de faibles concentrations par la consommation de méthanogènes hydrogénotropes archaïques, qui les utilisent pour la croissance et comme source d'énergie; produisant de l'eau et du méthane. L'acétate produit peut également être utilisé par les archaea méthanogènes acétotrophes, qui produisent du CO₂ et du méthane (Gieg et al., 2014). Dans les écosystèmes, en revanche, où il existe des accepteurs d'électrons finaux, l'acétate et l'hydrogène produits par les fermentations primaires et / ou secondaires sont utilisés pour la croissance organochimio-biologique de diverses espèces bactériennes anaérobies (figure 21).

II.9 Gènes impliqués dans la biodégradation.

Diverses voies de dégradation et des gènes cataboliques pour la biodégradation de chaque groupe d'hydrocarbures ont été rapportées dans la littérature (Hendrickx et al., 2006). Selon la longueur de la chaîne et le type de l'hydrocarbure pétrolier, différentes enzymes sont nécessaires pour introduire de l'oxygène dans le substrat afin de commencer la biodégradation (Zenati, 2018).

Plusieurs systèmes d'alcane hydroxylase ont été isolés, caractérisés et analysés, et ces enzymes appartiennent à différentes familles.

Sur la base du type de substrats dégradés, ils sont classés en: méthane et propane monooxygénase (MMOs), butane oxygénase (BMOs), alkane-hydroxylase AlkB, cytochrome p450 alkane hydroxylase oxydant des alcanes de C₅ à C₁₂ et alcanes monooxygénase pour les alcanes de longue chaîne (LadA) qui oxydent les alcanes avec plus de 20 atomes de carbone (Catania, 2018).

Les microorganismes capables d'utiliser des alcanes non gazeux ont souvent en commun le système enzymatique Alk. Ce système a fait l'objet d'une étude approfondie chez *Alcanivorax burkumensis*, un système modèle des bactéries marines hydrocarbonoclastes. Ce système utilise une gamme assez large d'hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie (hydrocarbures à chaîne linéaire jusqu'à C₃₂; isoprénoïdes; alkyl-cycloalcanes) (Hara et al., 2003 ; Yakimov et al., 2007). En 2006, son génome a été séquencé, révélant que la capacité d'*Alcanivorax* à dégrader davantage de substrats hydrocarbonés est donnée par la présence de différentes voies cataboliques impliquant deux systèmes d'alcane-hydroxylase (*alkB1* et *alkB2*) et trois alcane monooxygénases du cytochrome P450. L'expression de ces systèmes cataboliques est régulée par la présence et de la nature des polluants.

Les gènes *Alk* sont présents dans de nombreuses espèces bactériennes responsables de la dégradation des n-alcanes.

Plus de 60 gènes homologues à *AlkB* sont connus et ont été retrouvés à la fois chez les bactéries Gram négatif et Gram positif (Kuhn et al., 2009). Certaines espèces contiennent plus d'une copie du gène *alkB* dans leur génome, jusqu'à cinq dans certaines souches appartenant au genre *Rhodococcus*, deux chez *Pseudomonas aeruginosa*. La présence de systèmes de dégradation multiples suggère l'implication de différentes voies cataboliques en fonction de la gamme de n-alcanes à dégrader (Catania, 2018).

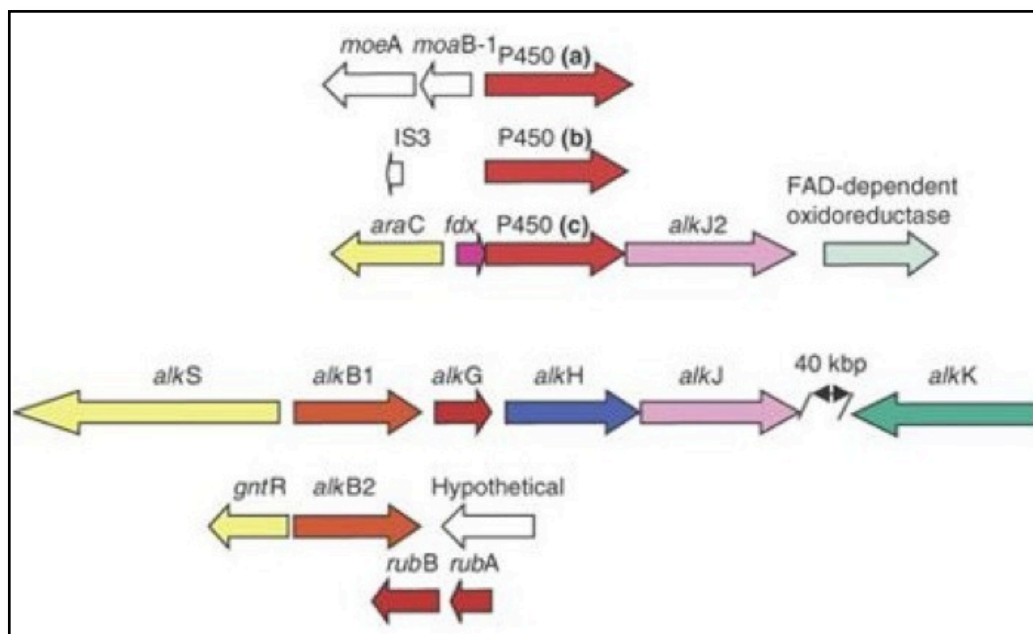


Figure 22. Les gènes codant pour des protéines impliquées dans la dégradation des alcanes chez *A. borkumensis* SK2 (Schneiker et al., 2006).

Des souches appartenant au genre *Pseudomonas* dégradent les composés aromatiques, grâce aux activités enzymatiques exprimées par un ou plusieurs opérons cataboliques situés sur de grands plasmides à faible nombre de copies. Le plasmide pWW0 (environ 117 kb) de *Pseudomonas putida* mt-2 a été le premier plasmide TOL à être identifié et représente le système modèle pour la dégradation des hydrocarbures aromatiques. Les gènes cataboliques et régulateurs, les gènes *xyl* du plasmide pWW0, sont organisés en quatre unités de transcription et sont cartographiés dans une région d'environ 40 kb. Le premier est l'opéron (*xylCMABN*), qui code pour toutes les enzymes impliquées dans la voie supérieure qui convertissent le toluène et le xylène (isomères méta et para) en dérivés benzoate et méthyle, et en une protéine membranaire codée par le gène *xylN*. Le second opéron (*xylXYZLTEGFJQKIH*) est composé de 11 gènes, qui codent pour les enzymes de la voie

inférieure qui convertissent le benzoate en acétaldéhyde et en pyruvate qui entrent dans le cycle de l'acide tricarboxylique. Le gène *xyIE* code pour la catéchol-2,3-dioxygénase, qui catalyse l'ouverture du cycle aromatique du catéchol en semi-aldéhyde 2-hydroxymuconique et constitue l'enzyme clé de la voie inférieure. En aval de la voie inférieure, il existe deux gènes régulateurs, *xyIS* et *xyIR*, impliqués dans le contrôle de la transcription des opérons cataboliques du plasmide TOL de *P. putida* mt-2 (Hendrickx et al., 2006 ; Catania, 2018).

II.10 Méthodes d'étude des communautés microbiennes dégradants les hydrocarbures

L'isolation des bactéries en culture pure est un élément fondamental dans l'étude des communautés microbiennes, car elle permet d'analyser les caractéristiques génétiques, biochimiques, métaboliques et physiologiques des souches isolées, en aidant à élucider les voies métaboliques et les bases génétiques de la dégradation des hydrocarbures par les souches et leurs interactions in situ. Pour l'isolement des bactéries pouvant dégrader les hydrocarbures, la stratégie utilisée consiste à établir des cultures d'enrichissement en inoculant des échantillons environnementaux dans des milieux minéraux, additionnés d'hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie. Le résultat sera la prolifération sélective de toutes les espèces bactériennes capables de survivre en présence d'hydrocarbures et de les utiliser pour la croissance. L'une des principales limites des méthodes de culture réside dans le fait que seulement un faible pourcentage des bactéries présentes à l'état naturel peut être cultivé, parce que les conditions artificielles reconstituées en laboratoire ne leur permettent pas de se développer (Amann et al., 1995).

De nouvelles techniques moléculaires indépendantes à la culture permettant d'étudier la fraction non cultivable des bactéries, et ainsi une caractérisation et une vérification plus larges des communautés microbiennes et des bactéries de dégradation des sites contaminés ont été développés. Les techniques de biologie moléculaire (par exemple, les banques de gènes) et les techniques d'empreintes digitales telles que la PCR-DGGE (électrophorèse sur gel en gradient dénaturant) permettent d'étudier la fraction non cultivable des bactéries tant en termes de diversité phylogénétique que de diversité métabolique et fonctionnelle (Catania, 2018).

Le marqueur phylogénétique procaryote par excellence est représenté par le gène qui code pour la sous-unité ribosomale 16S de l'ARNr (Woese et al., 1983). Le gène de l'ARNr 16S est utilisé comme une horloge moléculaire pour identifier et classer les bactéries, à la fois en culture pure et dans des analyses métagénomiques réalisées sur l'ADN total extrait d'une

matrice environnementale ou d'une culture d'enrichissement. Sa structure principale est une alternance de séquences de gènes hautement conservés, de séquences variables et hypervariables (figure 23). L'amplification par PCR du gène entier ou de régions spécifiques, et son séquençage ultérieur, permettent l'identification de souches bactériennes telles que le genre et l'espèce et d'évaluer les relations phylogénétiques entre les souches bactériennes sur la base du pourcentage de similarité.

Si, d'une part, les techniques moléculaires de culture indépendantes ont permis d'accroître les connaissances sur l'ensemble de la communauté microbienne responsables de la dégradation des hydrocarbures, d'autre part, l'isolement de ces souches bactériennes reste d'une importance fondamentale pour l'étude des mécanismes de dégradation (Daffonchio et al., 2013).

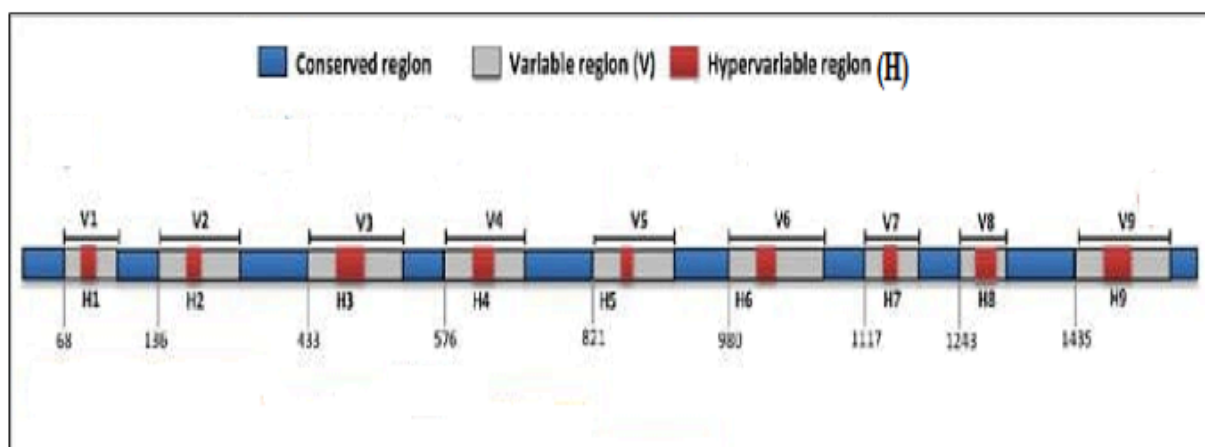


Figure 23. Représentation schématique du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S avec les régions conservées (bleu), les régions variables (gris) et hypervariable (rouge).

Conclusions.

La remédiation de la pollution par les hydrocarbures dans l'environnement et en particulier le milieu marin est un problème du monde réel. Une meilleure compréhension du mécanisme de biodégradation a une haute importance écologique. La biodégradation dépend de la capacité des microorganismes indigènes à transformer et minéraliser les contaminants organiques. Le processus microbien de dégradation facilite l'élimination des hydrocarbures déversés de l'environnement après le retrait critique de grandes quantités de pétrole par diverses méthodes physiques et chimiques. Ceci est possible du fait que certains micro-organismes spécialisés possèdent des systèmes enzymatiques leur permettant de dégrader et d'utiliser les différents hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie.

Chapitre III

Zone d'étude et
échantillonnage

III.1 Le port de Sidi Fredj.

III.1.1 Situation géographique.

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 24. Position géographique de la presqu'île de Sidi Fredj.

III.1.2 Configuration et infrastructures du port.

Le port qui couvre une superficie de 38 000m² est protégé par des ouvrages contre la houle qui servent aussi de délimitation. Ces derniers sont protégés à leur tour par des enrochements naturels. Le port est subdivisé en cinq (5) bassins aménagés pour permettre l'accostage des petits bateaux ou embarcation (figure 25) (Aissat et Cheikh, 2013).

Bassin I : C'est le bassin le plus éloigné de l'entrée du port, et c'est lui qui accueille le déversement des eaux usées par égout provenant des restaurants qui se trouvent au niveau du site.

Bassin II : Délimité par l'épi de la tour mauresque et l'épi de la station d'essence.

Bassin III : C'est le bassin de l'hivernage, délimité par la grande jetée.

Bassin IV : Délimité par l'apponement trois (3) à l'intérieur et la jetée sud à l'extérieur

Bassin V : Situé à la sortie du port et communique avec le large.

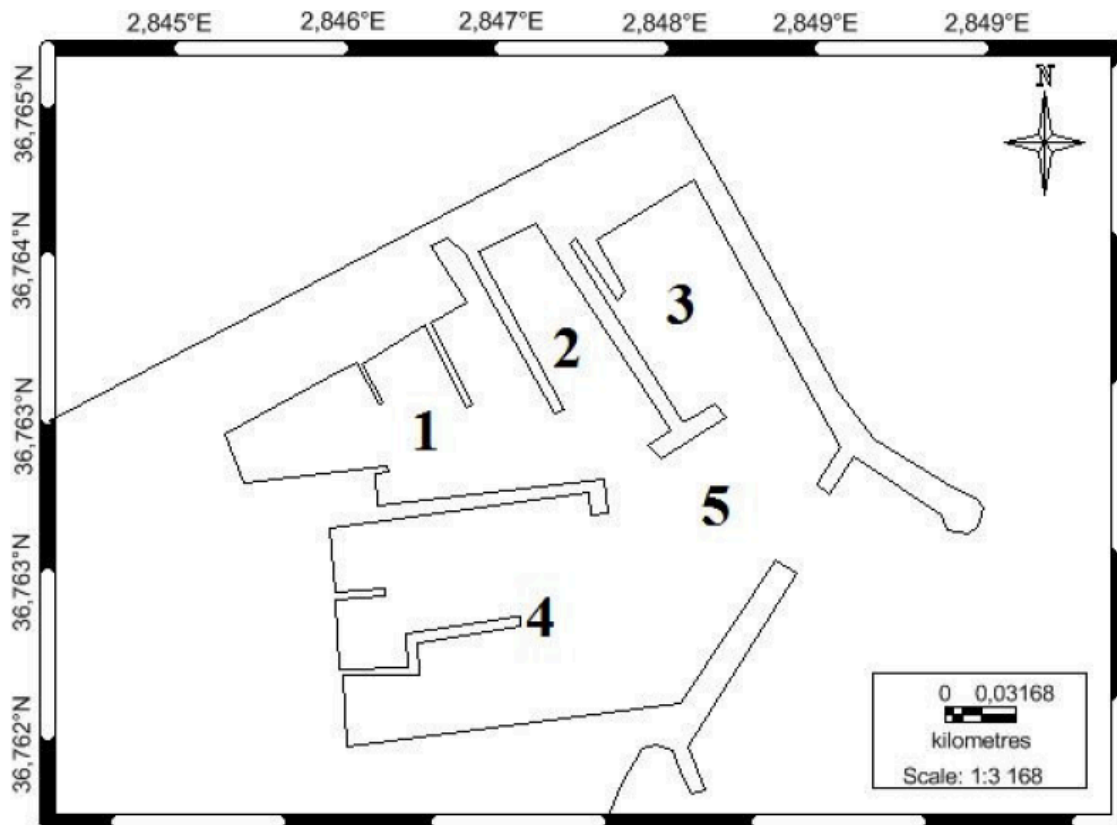


Figure 25. Agencement des bassins du port de Sidi Fredj

Les deux jetées du port sont de type à talus faites d'enrochements naturels.

- Une jetée nord principale, longue de 230 m se termine par un musoir, servant de barrière de protection contre les vents, et un phare,
- Une jetée Sud, secondaire de 215 m.

III.1.3 Caractéristiques du port.

III.1.3.1 Bathymétrie.

La figure 26 qui représente la bathymétrie du port de Sidi Fredj montre des isobathes régulières espacées et parallèles à la côte de part et d'autres de la presqu'île de Sidi Fredj. Face à celle-ci, les isobathes sont serrées montrant une forte pente.

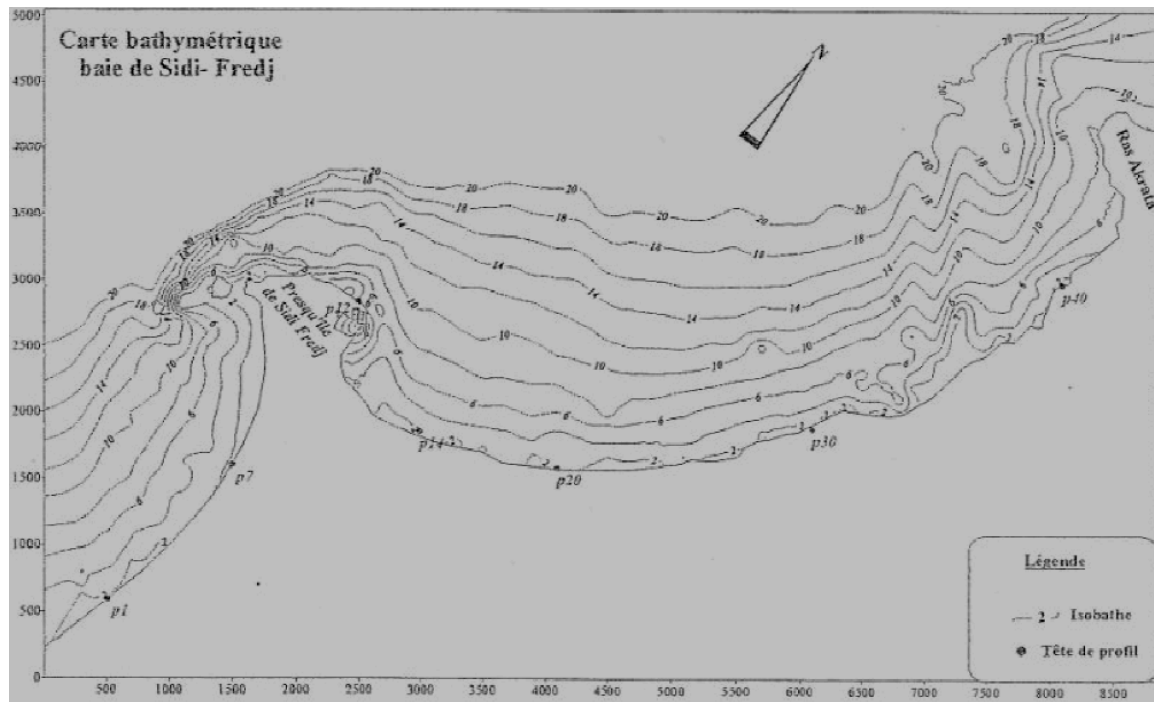


Figure 26. Carte bathymétrique du port de Sidi Fredj (DTP, 2009)

III.1.3.2 Topographie.

Les traits généraux de la morphologie des bordures marines algériennes sont dus essentiellement à un diastrophisme post-pliocène. Par ailleurs, la marge continentale forme, dans la baie de Bou-Ismaïl, un vaste feston qui s'arc-boute sur les massifs du Chenoua et de Bouzareah. (Leclaire, 1972).

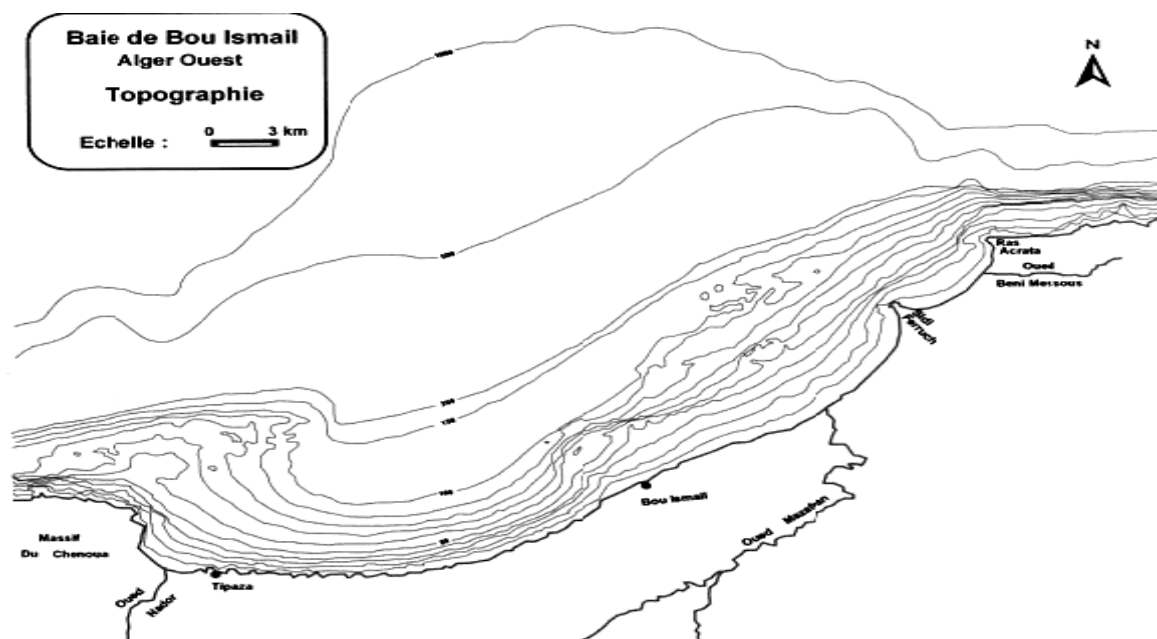


Figure 27. Topographie de la Baie de Bou-ismail (Leclaire, 1972).

De la presqu'île de Sidi Fredj au Ras Acrata, la plate-forme continentale se rétrécit considérablement comme son inclinaison augmente ; plus à l'Est, elle disparaît complètement et les reliefs cristallins de Bouzareah se prolongent sans interruption jusqu'aux molles ondulations des grands fonds. Dès la fin de la construction du port de plaisance en 1971, le littoral a subi des modifications topographiques engendrées par un déséquilibre sédimentaire. (Caulet, 1972).

III.1.3.3 Sédimentologie.

La carte sédimentologique (figure 28) de la baie de Bou-Ismaïl ci-dessous, montre une prédominance de deux faciès : Vases pures à l'Ouest et graviers envasés à l'Est de la baie. A l'extrême Est, dans le large de Sidi Fredj, on retrouve une succession de gisements de graviers envasés et de sables grossiers. Plus près de la côte, le fond marin est plutôt constitué de sables fins. Quant à la presqu'île, elle est entourée par un affleurement de roches appartenant au massif paléozoïque et métamorphique de Bouzareah.

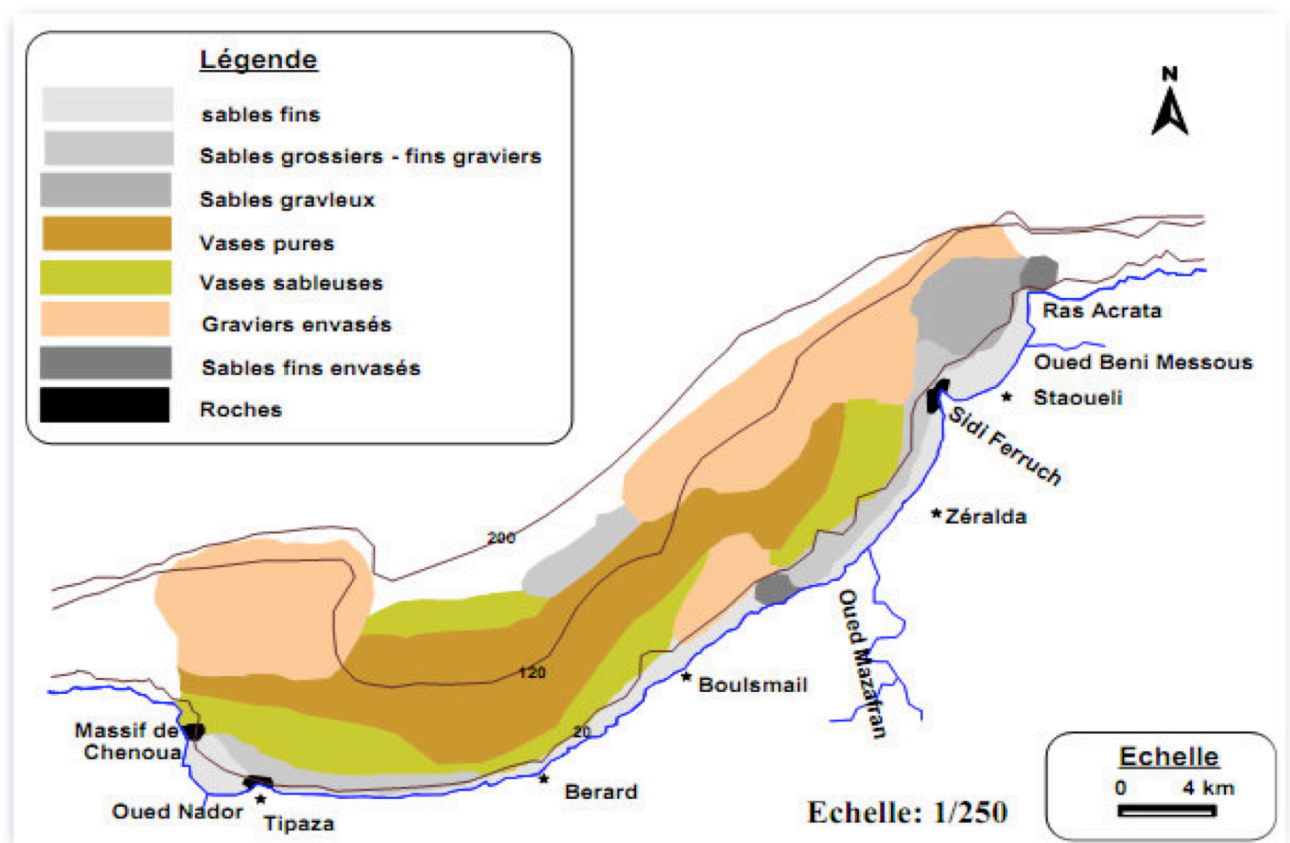


Figure 28. Carte sédimentaire de la Baie de Bou-Ismaïl (LEM, 1998).

La baie de Sidi Fredj est caractérisée par une hyper sédimentation résultant de l'orientation de la presqu'île qui joue le rôle d'un épi.

III.1.4 Facteurs hydrodynamiques.

Le Nord de l'Algérie tire la clémence de ses hivers et la douceur de ses étés de sa position privilégiée. A un climat méditerranéen, il se situe à une latitude à cheval entre les régions tempérées et celles désertiques, et se caractérise par la présence de la chaîne montagneuse de l'Atlas tellien sur son flanc sud et de la mer méditerranée au Nord dont les eaux restent plus au moins chaudes toute l'année. L'Atlas tellien protège la région du littoral des remontées d'air sec et chaud du Sahara. (Aissat et Cheikh, 2013). Les caractéristiques des vents, de la houle et des courants doivent être connues avec autant de détails que possible. (Larid, 1992).

III.1.4.1 Facteurs météorologiques.

III.1.4.1.1 Vents

Dans la région de Sidi Fredj, la répartition des vents est globalement concordante avec le régime des houles le long de l'année. Les mesures anémométriques de la station météorologique de Dar EL Beida représentées dans le tableau 10 nous indiquent que le vent souffle à environ 58% du temps avec une prédominance du secteur Sud-ouest.

Tableau 10. Pourcentage des vents par direction dans la zone de Sidi Fredj.

Secteurs	N	NE	E	SE	S	SW	W	NW	Calme
% par direction	11,8	11,9	4	1,3	5,3	13,5	10,1	4,9	37,1

III.1.4.1.2 Température et précipitation.

Sidi Fredj est caractérisée par un climat Méditerranéen tempéré : relativement froid et humide en hiver, chaud en été.

Selon le tableau. Les températures et les précipitations dans cette zone sont inversement proportionnelles. Le taux de ces dernières augmente quand la température baisse et vis versa.

Les valeurs mensuelles des précipitations mettent en évidence deux saisons :

- Une saison humide qui s'étale du mois de Septembre au mois de Mai avec des précipitations entre 35,1 et 115,5 mm.
- Une saison sèche nettement plus courte que la précédente qui s'étale du mois de Juin au mois d'Aout avec des précipitations entre 1,6 et 10,2 mm.

Tableau 11. Variation annuelle des températures et précipitations de Sidi Fredj (ONM, 1999-2009)

Saisons	Mois	T°(C) Max	T°(C) Max	Précipitations (mm)
Hiver	Décembre	19,4	7,43	71,9-115,5
	Janvier	18,5	5,3	
	Février	19,1	5,35	
Printemps	Mars	22,1	8,04	41,2-58,8
	Avril	23,7	9,94	
	Mai	28,9	14,1	
Eté	Juin	32,7	18,1	2,5-10,2
	Juillet	35,5	21,3	
	Aout	36,1	22,2	
Automne	Septembre	32,6	19,3	35,1-115
	Octobre	29,6	16,7	
	Novembre	23,3	10,08	

III.1.4.2 Facteurs océaniques.

III.1.4.2.1 Les courants.

La côte algérienne est traversée par un courant général dénommé courant algérien, résultant d'un écoulement d'eau atlantique à travers le détroit de Gibraltar. Le courant algérien pénètre sous forme de veine et circule de l'Ouest à l'Est, et de 1° à 2° Est, il donne naissance à des méandres et des tourbillons côtiers associés à des upwellings. (Milot et al, 1990).

III.1.4.2.2 Les houles.

Le principal agent d'évolution de la bordure littorale est la houle dont l'action sur les matériaux constitutifs des plages et des fonds marins se traduit par des mouvements dans le profil ou parallèlement à la côte. Le coefficient de réfraction K et la direction de la houle après réfraction ont été mesurés par le LEM à une profondeur d'environ 15m (tableau 12).

L'analyse des résultats de la réfraction de la houle faite par le LEM a montré que du fait que cette dernière est peu réfractée, elle aborde la côte en conservant la presque totalité de son énergie du large. Ces houles sont donc à prendre en considération lors du dimensionnement des ouvrages maritimes portuaires et/ou de protection ainsi que lors de l'analyse de l'évolution du trait de côte (Aissat et Cheikh, 2013).

Tableau 12. Variation du coefficient de réfraction et de la direction de la houle (LEM, 1998)

Direction (°)	Période (s)	Coefficient de réfraction (K)	Direction de la houle
Nord 330°	6	0,90	N 329
Nord 330°	8	0,90	N 329
Nord 330°	10	0,92	N 329
Nord 360°	6	0,90	N 356
Nord 360°	8	0,89	N 354
Nord 360°	10	0,86	N 352
Nord 020°	6	0,83	N 009
Nord 020°	8	0,75	N 007
Nord 020°	10	0,79	N 004

III.2 Echantillonnage.

Le choix de la zone d'échantillonnage s'est porté sur le port de Sidi Fredj, 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.

Le prélèvement des échantillons d'eau et de sédiment, ainsi que la mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau (la salinité, le pH, et la température) ont été effectuées depuis une embarcation durant le mois de mars 2016. Cinq différentes stations ont été choisies pour les prélèvements d'eau et de sédiments (figure 29).

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). Tout les échantillonnage 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 ou ont été conservés à -20 ° C pour des analyses plus poussées.

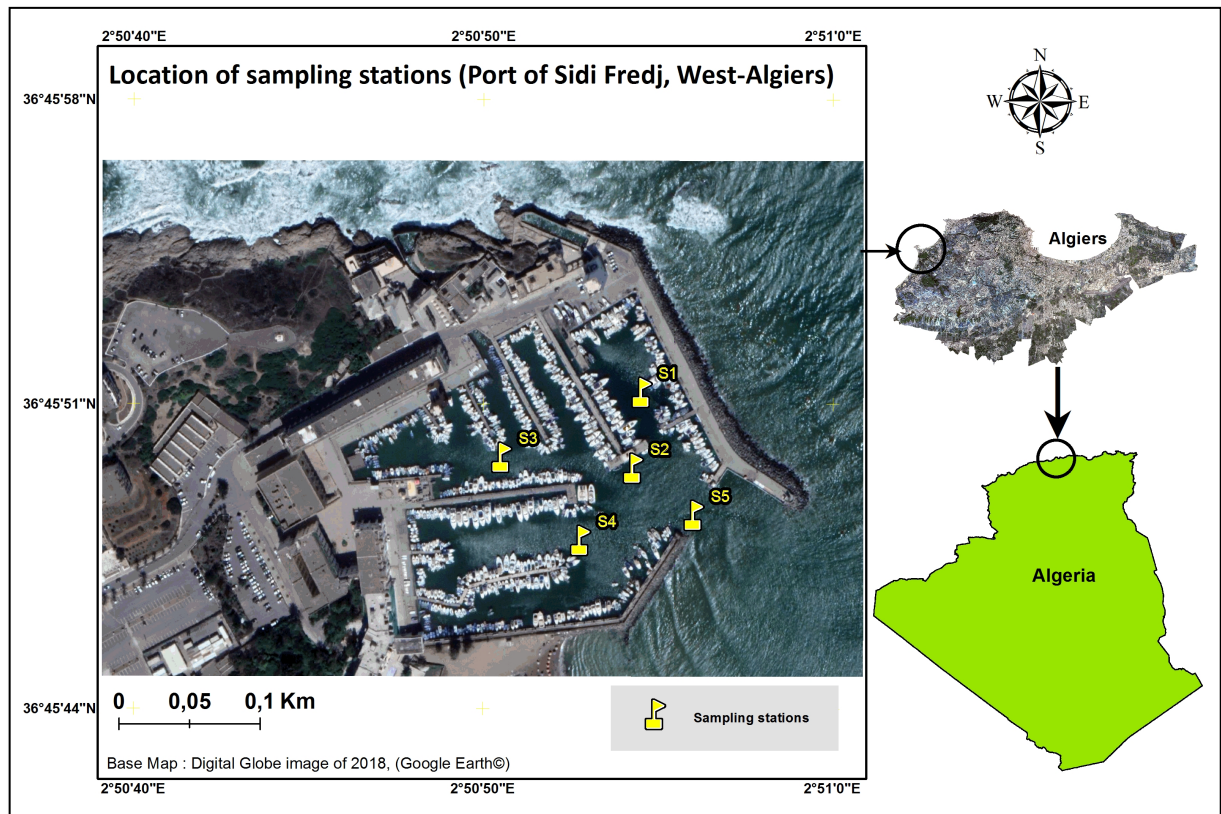


Figure 29. Localisation des stations de prélèvement d'eau de mer et de sédiments du port de Sidi Fredj.

Chapitre IV

Matériel et méthodes.

IV Matériel et méthodes

IV.1 Mesure des paramètres physico-chimiques.

IV.1.1 Salinité et température.

La salinité représente la proportion des sels minéraux dissous dans l'eau de mer, elle n'est pas accessible par une méthode de mesure directe, mais elle est déduite de la chlorinité ou de la conductimétrie ([Aminaut et Chausspied, 1983](#)). L'appareil utilisé est un conductimètre de marque Wissenschaftlich Technische Werkstätten « WTW pH315i », qui est réglé pour donner la conductivité correspondant à la chlorinité de l'eau de mer normale. Les résultats sont exprimés en psu. La température, un des descripteurs de base pour la connaissance du milieu marin, a été mesurée en parallèle avec la mesure de salinité.

IV.1.2 Potentiel hydrogène « pH ».

Le pH est mesuré par la méthode électrochimique avec électrode en verre, en utilisant un pH-mètre portable de marque WTW pH315i/SET doté d'une deuxième électrode pour la mesure de la température. L'électrode en verre est immédiatement plongée dans le flacon d'échantillon.

IV.1.3 Matières en suspension « MES ».

La méthode consiste à faire passer de l'eau à travers un filtre afin de retenir toutes les particules de taille supérieure à 0,45 µm. Le filtre est séché et pesé avant et après filtration sous faible pression. La différence de poids entre les deux pesées permet de connaître la masse sèche totale des MES dans le volume d'eau correspondant ([Aminaut et Chaussepied, 1983](#)). Le dispositif de filtration est composé d'un erlenmayer, d'un support filtre, d'un entonnoir gradué et d'une pompe à vide. Pour chaque station, on a filtré un volume de 100 ml d'eau de mer à travers un filtre Wattman de porosité 0,45µm. Le poids des matières retenues est déterminé par la pesée différentielle du filtre avant et après passage à l'étuve à 105°C pendant 2 heures ([Rodier et al., 2009](#) ; [Kada, 2012](#)).

IV.1.4 Demande chimique en oxygène « DCO ».

Les matières organiques peuvent être considérées comme indicatrices de pollution puisqu'elles accompagnent normalement les effluents urbains et la plupart des effluents industriels. Lors de l'examen physicochimique du milieu, il est donc intéressant de procéder à

leur dosage. La demande chimique en oxygène (DCO) correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour la dégradation par voie chimique, effectuée à l'aide d'un oxydant puissant, des composés organiques présents dans l'eau. Elle permet de mesurer la teneur en matières organiques totales (excepté quelques composés qui ne sont pas dégradés), y compris celles qui ne sont pas dégradables par les bactéries. Il s'agit donc d'un paramètre important permettant de caractériser la pollution globale d'une eau par des composés organiques (Michel, 1972).

La demande chimique en oxygène (DCO) a été mesurée à l'aide d'un kit LCK (LCK 1014, HACH Lange SRL, Lennate, Italie) en suivant les instructions du fabricant (Figure 30) et l'analyse a été effectuée par spectrophotométrie à l'aide d'un spectrophotomètre HACH LANGE DR 3900 (HACH Lange SRL, Italie). Il s'agit d'une analyse automatique des matières organiques dans l'eau. Il suffit d'introduire un microéchantillon (2 ml) dans des cuves déjà prêtes qui contiennent chacune 82% d'acide sulfurique, dichromate de potassium et sulfates de mercure. Les matières organiques sont alors oxydées par l'oxygène à très haute température. Les substances oxydables réagissent avec le bichromate de potassium sulfurique. Le chlorure est masqué avec du sulfate de mercure. La diminution de la coloration jaune du Cr^{6+} est mesurée par photométrie. La DCO s'exprime en mg d'O_2 par litre.

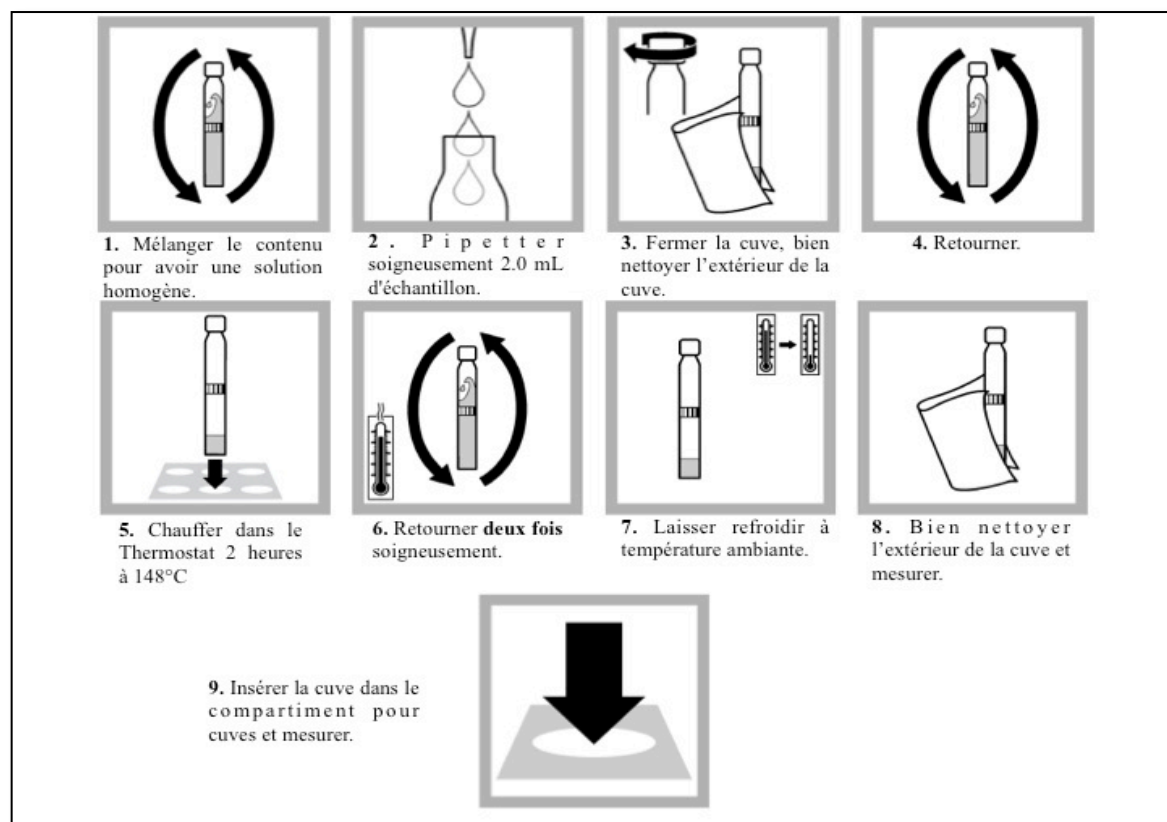


Figure 30. Schéma récapitulatif des différentes étapes pour la mesure de la DCO dans les différents échantillons d'eau et de sédiment.

IV.2 Test d'écotoxicité « Microtox ».

Microtox est un système de test *in vitro* utilisant des bactéries bioluminescentes (*Allivibrio fischeri*, anciennement *Vibrio fischeri*) pour détecter des substances toxiques dans différents substrats tels que l'eau, l'air, les sols et les sédiments. Les *Allivibrio fischeri* sont des bactéries marines non pathogènes dont la luminescence fait partie intégrante de leur métabolisme. (Lorsque exposée à une substance toxique, le processus respiratoire de la bactérie est perturbé, ce qui réduit le flux lumineux. *Allivibrio fischeri* ont fait preuve d'une grande sensibilité vis-à-vis d'une grande variété de substances toxiques. La réponse à la toxicité est observée sous la forme d'une modification de la luminescence, qui est un sous-produit de la respiration cellulaire. Ce changement peut être utilisé pour calculer un pourcentage d'inhibition d'*Allivibrio fischeri* qui est directement corrélé à la toxicité (figure 31).

Allivibrio fischeri ont été spécifiquement choisis, car ces bactéries pourraient être préservées par lyophilisation pour augmenter la durée de conservation et l'utilisation. Cette technologie permet de réaliser des essais de toxicité aiguë en phase solide (sols et sédiments) et aqueuse.

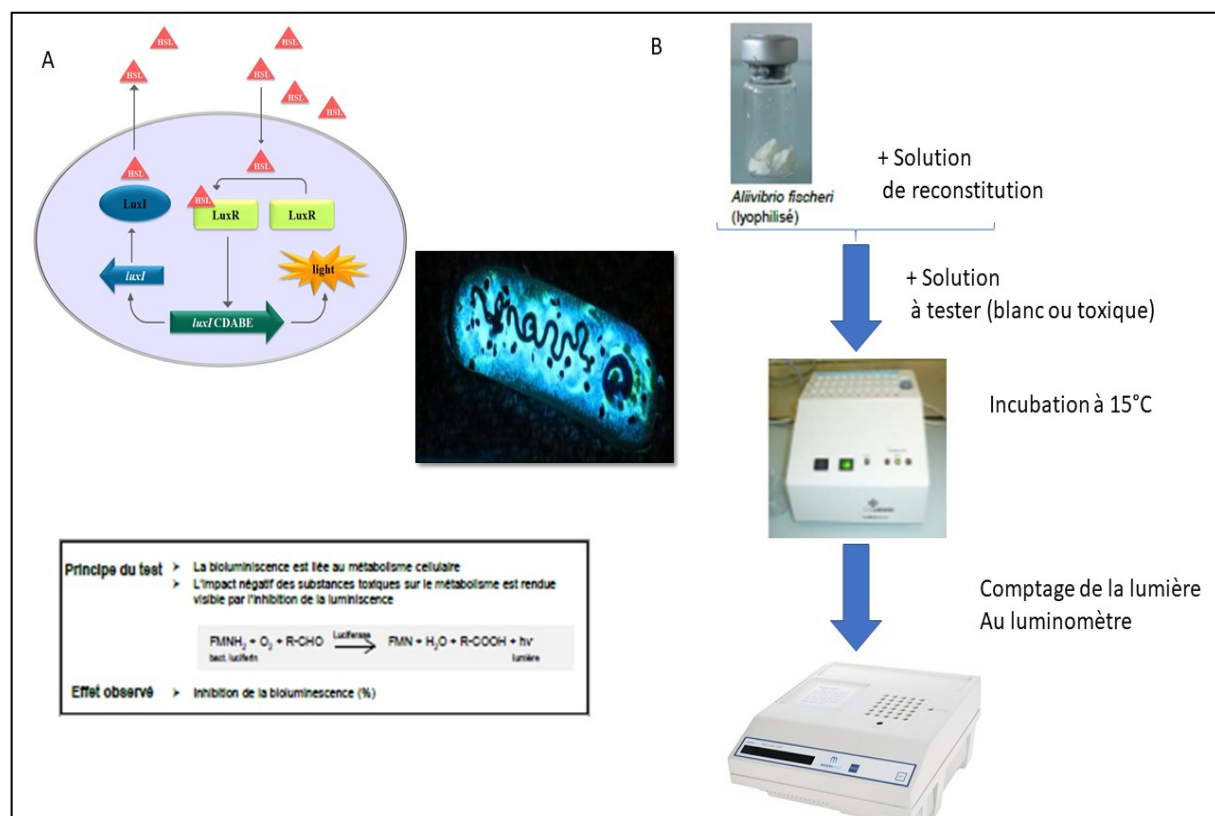


Figure 31. Principe du test microtox basé sur la bioluminescence d' *Allivibrio fischeri* (ISO 11348-3, ISO,2009) . A. Suite au phénomène de quorum sensing, l'auto-inducteur (HSL) active la production de la luciférase qui transforme le substrat en produit et en lumière. B. Il est possible de mesurer la toxicité de substances sur la viabilité de la bactérie par mesure au luminomètre de l'inhibition de la lumière produite

Les tests ont été effectués conformément aux procédures standards; la toxicité (inhibition de la bioluminescence) a été exprimée en pourcentage de l'inhibition de la bioluminescence

Le Microtox Modèle 500 est un photomètre de laboratoire qui mesure la toxicité aiguë. Cet analyseur est un système de mesure de biocapteur à étalonnage automatique, à température contrôlée, qui utilise la bioluminescence d'*Allivibrio fischeri* pour déterminer la toxicité de l'eau contaminée ou des éluviats de sols et de sédiments contaminés. Le biodétecteur considère qu'une pollution toxique est présente quand on atteint une inhibition de luminescence supérieure à 20 %.

Procédure :

- Préparation des échantillons de sédiment : Des échantillons de sédiments ont été mis en suspension dans de l'eau de mer artificielle stérile (1/4; p/v). Après sonication (30 min) et une agitation vigoureuse ($200 \times g$ pendant 24 h), la phase aqueuse a été séparée du sédiment par filtrations successives et a été utilisée comme matrice pour les tests de toxicité. Ensuite ; des dilutions sériées ont été préparées (10 fois) avec une solution de NaCl à 2%. Les échantillons ont été maintenus à 4 ± 1 ° C jusqu'à leur utilisation dans le test.
- Préparation de la suspension bactérienne : dissoudre la bactérie lyophilisée avec 1 ml de solution reconstituante, puis préparer des dilution (10 fois) avec une solution de NaCl à 2%
- Préparer un blanc de contrôle (solution de NaCl à 2%)
- Transférer la suspension bactérienne (100 µl) dans 5 flacons de mesure.
- Mesurer la bioluminescence initiale de la suspension bactérienne.
- Transférer le blanc ainsi que toutes les dilutions préparées d'échantillons (900 µl) dans les flacons de mesure contenant la suspension bactérienne diluée
- Incuber pendant 30 min à une température de 15 ° C.
- Mesurer la bioluminescence du blanc et des échantillons.
- Détermination des pourcentages d'inhibition par le logiciel MicrotoxOmni™
- Pourcentage d'inhibition = $100 - ((\text{luminescence test} / \text{luminescence blanc}) * 100)$

IV.3 Mesure de l'abondance bactérienne.

L'abondance bactérienne a été mesurée pour les échantillons d'eau de mer par comptage direct sous épifluorescence. Le principe consiste à colorer les bactéries au moyen d'un marqueur fluorescent, les recueillir sur une membrane montée entre lame et lamelle ce qui permettra

d'énumérer les bactéries par microscopie optique. Le marqueur utilisé pour cette étude est le DAPI (4'-diamidino-2-phenylindole), il se fixe sur l'ADN. Quand le complexe ADN-DAPI est excité avec une lumière d'une longueur d'onde comprise entre 330 et 380 nm il fluoresce dans le bleu. Le DAPI fixé sur du matériel non ADN peut fluorescer en jaune pâle. Cette méthode améliore la visualisation des bactéries et leur distinction des cyanobactéries de taille inférieure à 1 μm (Porter et Feig, 1980).

Procédure :

- Fixer les échantillons d'eau avec du formaldéhyde (2% v/v) (54 μl pour chaque millilitre d'échantillon) et conserver à 4°C ;
- Ajouter 100 μl de DAPI pour chaque millilitre d'échantillon fixé ;
- Dans l'appareil à filtration, filtrer d'abord 10 ml d'eau distillée stérilisée pour équilibrer le filtre (filtre noir, 25 mm de diamètre et 0,22 μm de porosité) ;
- Bien mélanger l'échantillon fixé avec du formaldéhyde, puis le filtrer (en gardant le même filtre) ;
- Le filtre est ensuite monté entre lame et lamelle avec de l'huile à immersion non fluorescente (Olympus). Il est préférable d'observer les lames de suite, sinon les conserver à 4°C mais pas plus de 72h ;
- Les lames ont été examinées au microscope à épifluorescence Zeiss Axioplan 2 Imaging (Zeiss; Carl Zeiss Inc., Thornwood, N.Y.). Les résultats ont été exprimés en nombre de cellules par millilitre d'eau de mer (Cappello et al., 2007).

IV.4 Détermination de la diversité bactérienne dans les échantillons de sédiment et d'eau de mer par DGGE.

Afin d'estimer la diversité bactérienne dans l'eau de mer et des échantillons de sédiments prélevés dans le port de Sidi Fredj, Une technique de culture indépendante DGGE « Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant » a été réalisée.

IV.4.1 Principe de la DGGE.

La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) est une technique d'électrophorèse d'ADN permettant de discriminer des fragments d'ADN sur base de leurs séquences et qui donne une image de la diversité des communautés microbiennes. Elle permet d'évaluer et de comparer la diversité microbienne sur la base du génotype. Elle appartient à une famille de techniques d'analyse moléculaire comme la TGGE (Temperature Gradient Gel

Electrophoresis), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), TRFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) qui nécessite l'amplification préalable de gènes spécifiques par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) qui permet d'amplifier une région cible du génome. La taxonomie bactérienne moderne étant basée sur la séquence de l'ARN ribosomal 16S, il suffit d'amplifier les gènes codant pour ces ARN 16S à partir de la communauté bactérienne et de les séparer par une électrophorèse adaptée et les fragments de séquences différentes auront une mobilité électrophorétique différente (figure 32).

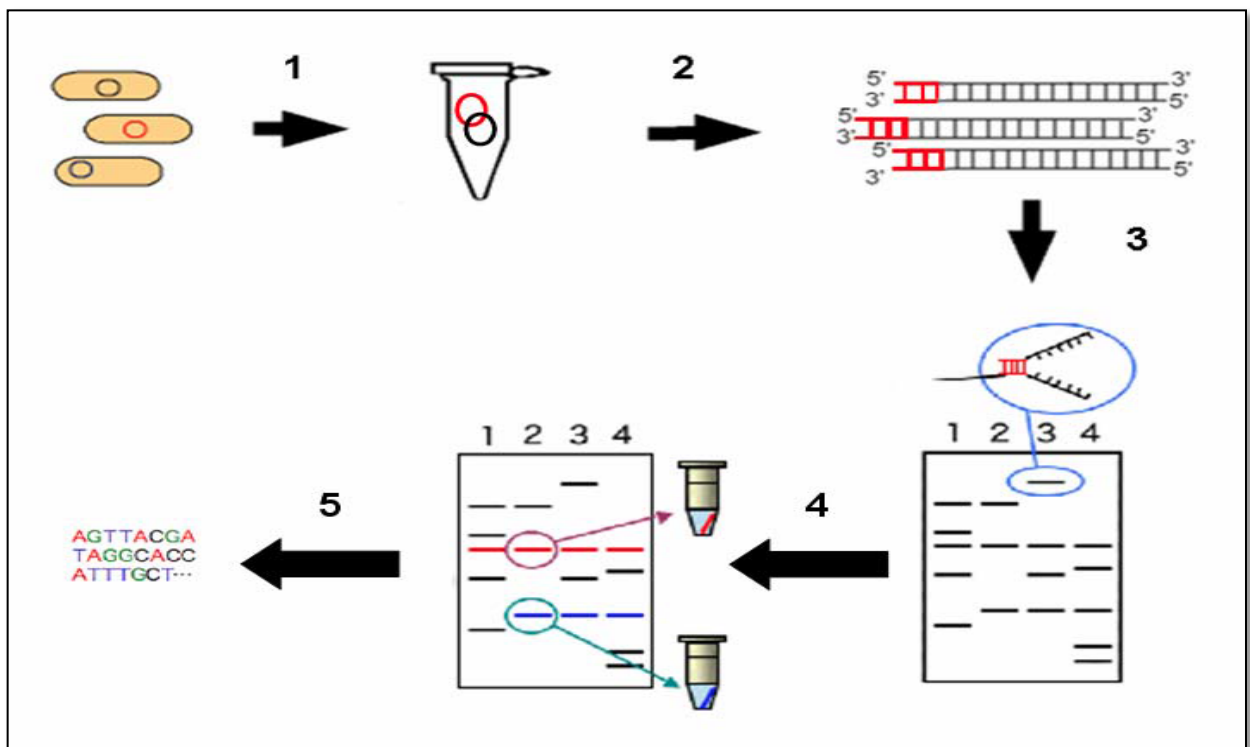


Figure 32. Principe de la technique DGGE. Les ADN des communautés microbiennes sont extraits des échantillons environnementaux (1). Les gènes d'intérêt sont ensuite amplifiés par PCR en utilisant une amorce couplée à un GC-clamp qui est une région riche en GC résistante à la dénaturation (2). Après purification, les produits PCR sont séparés par électrophorèse, en fonction de leur composition, selon un gradient de dénaturation chimique (3). Les fragments, correspondant « théoriquement » à une espèce, peuvent être excisés (4) afin d'être séquencés (5) (Militon, 2012)

La technique consiste à séparer des fragments d'ADN de taille identique mais de séquences variables selon leurs propriétés de fusion sur un gel de polyacrylamide contenant un agent dénaturant. Au cours d'une étape préalable de PCR, les fragments d'ADN sont flanqués d'une amorce riche en GC qui permettra au fragment de ne pas se dénaturer totalement. Les fragments ainsi obtenus sont soumis à une électrophorèse contenant un gradient d'agent

dénaturant (urée) qui va entraîner leur dénaturation progressive au fur et à mesure de la migration en fonction de leur richesse en GC. Cette dénaturation entraîne un encombrement stérique qui ne permet plus au fragment de migrer dans le gel d'acrylamide. Le fragment en question se retrouve ainsi « piégé dans les mailles du filet ».

Pour une même teneur en agent dénaturant, un fragment riche en GC se dénaturera moins vite qu'un fragment riche en liaisons AT (du fait du nombre de liaisons hydrogène inter brin) et migrera donc plus loin sur le gel. D'un point de vue théorique, chaque bande visualisée sur le gel correspond à une espèce bactérienne. La DGGE permet en effet de séparer les fragments d'ADN ne se différenciant que par une seule paire de bases (Casamayor et al., 2000).

A travers la comparaison des empreintes obtenues pour chaque échantillon, la DGGE permet donc d'évaluer la diversité et l'abondance relative des bactéries d'un échantillon. L'analyse du gel se fait en notant le nombre de bandes par piste, leurs positions mais aussi l'intensité de chaque bande.

IV.4.2 Extraction d'ADN.

IV.4.2.1 Extraction d'ADN des échantillons d'eau de mer.

L'extraction d'ADN des échantillons d'eau a été réalisée en utilisant le kit d'extraction d'ADN et d'ARN MasterPure™ (Epicenter, Madison, WI). La précipitation des acides nucléiques totaux a été réalisée conformément aux instructions du fabricant.

Des filtres 0,2 µm de porosité (Millipore, Milan, Italie) ont été utilisés pour l'extraction de l'ADN, 100 ml d'échantillons ont été filtrés, puis 300 µl de solution de lyse (Tissue and cell lysis solution, fournie avec le kit) et 1 µl de Protéinase K (20 µg/ml) ont été ajoutés. Les filtres ont été transférés dans des tubes de 1,5 ml. Les échantillons ont été incubés à 65 °C pendant 15 minutes, transférés sur de la glace pendant 5 minutes et le filtre a été retiré. La précipitation des acides nucléiques totaux a été réalisée conformément aux instructions du fabricant. Les acides nucléiques totaux ont été mis en suspension dans 50 µl de tampon TE préchauffé à 45 °C. le protocole détaillé est décrit en Annexe 1

IV.4.2.2 Extraction d'ADN des échantillons de sédiment.

L'ADN total des échantillons de sédiments a été extrait à l'aide du kit pour sol FastDNA™ SPIN (MP Bio medicals, Santa Ana, Californie).

500 mg d'échantillon de sédiment de chaque station ont été transférés dans une matrice de lyse

aux quels 978 µl de tampon phosphate de sodium et 122 µl de MT Buffer ont été ajoutés. Puis les échantillons ont été homogénéisés à l'aide de l'instrument FastPrep pendant 40 secondes à une vitesse 6.0.

L'extraction a été réalisée conformément aux spécifications du fournisseur, sauf dans la dernière étape, où les acides nucléiques ont été élués avec 50 µl d'eau. (ADN / ARN free GIBCO). Le protocole détaillé est décrit en Annexe 1.

IV.4.2.3 Contrôle de la qualité et de la taille des ADN.

Après extraction, la qualité et la taille des ADN extraits ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose (1%). Les gels contenaient 1% (m/v) d'agarose dans un tampon TBE 1X (Acide borique 90 mM, Tris-base 90 mM, EDTA 2,5 mM, pH 8,3). La migration des différents échantillons a été réalisée sous une tension de 100 volts pendant 30 minutes environ. Le gel est ensuite coloré au bromure d'éthidium et l'ADN est mis en évidence sous UV (302 nm). Cette technique permet de vérifier l'intégrité de l'ADN. La présence d'une trainée (smear) témoigne d'une ADN dégradé.

La concentration et la pureté de l'ADN total extrait des échantillons (eau et sédiment) ont été déterminées également à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDROPO ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Les ADN sont conservés à -20 ° C jusqu'à analyse ultérieure. L'ADN des échantillons d'eau et de sédiment de la station 5 n'ont pas été extrait par manque d'échantillon.

L'ADN absorbe la lumière à une longueur d'onde optimale de 260 nm alors que les protéines absorbent l'ADN à 280 nm. 1 DO à 260 nm équivaut à une concentration en ADN double brin de 50 µg/ml. Le rapport A260 nm/A 280 nm doit être >1.8 pour garantir une pureté suffisante.

IV.4.3 Amplification par PCR.

La région variable V3 correspondant aux positions 341 à 534 de la séquence d'ARNr 16S d'*Escherichia coli* a été amplifiée par PCR à partir d'ADN génomique total en utilisant les amorces 341f-GC (5' –CCT ACG GGA GGC AGC AG-3') et 534r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (figure 33) (Muyzer et al., 1993).

L'amplification par PCR a été réalisée dans un volume final de 30 µl contenant 0,48 µl d'ADN polymérase Phire Hot Start II (Thermo Scientific, Monza, Italie), un tampon PCR 1X, 0,5 µM de chaque amorce, 0,3 mM de dNTP et 1 µl d'ADN (entre 10 et 100 ng).

AGTTTGATCA	TGGCTCAGAT	TGAACGCTGG	CGGCAGGCCT	AACACATGCA	AGTCGAACGG	61
TCAAACCTAGT	ACCGAGTCTA	ACTTGCGACC	GCCGTCCGGA	TTGTGTACGT	TCAGCTTGCC	
TAACAGGAAG	CAGCTTGCTG	CTTTGCTGAC	GAGTGGCGGA	CGGGTGAGTA	ATGTCTGGGA	121
ATTGTCCTTC	GTCGAACGAC	GAAACGACTG	CTCACC GCCT	GCCCACTCAT	TACAGACCCCT	
AACTGCCTGA	TGGAGGGGGA	TAAC TACTGG	AAACGGTAGC	TAATACCGCA	TAACGTCGCA	181
TTGACGGACT	ACCTCCCCCT	ATTGATGACC	TTTGCCATCG	ATTATGGCGT	ATTGCAGCGT	
AGCACAAAGA	GGGGGACCTT	AGGGCCTCTT	GCCATCGGAT	GTGCCCAGAT	GGGATTAGCT	241
TCGTGTTTCT	CCCCCTGGAA	TCCCGGAGAA	CGGTAGCCTA	CACGGGTCTA	CCCTAATCGA	
AGTAGGTGGG	GTAACGGCTC	ACCTAGGCGA	CGATCCCTAG	CTGGTCTGAG	AGGATGACCA	301
TCATCCACCC	CATTGCCGAG	TGGATCCGCT	GCTAGGGATC	GACGAGACTC	TCCTACTGGT	
GCAACACTGG	AACTGAGACA	CGGTCCAGAC	TCCTACGGGA	GGCAGCAGTG	GGGAATATTG	361
CGTTGTGACC	TTGACTCTGT	GCCAGGTCTG	AGGATGCCCT	CCGTGCTCAC	CCCTTATAAC	
CACAATGGGC	GCAAGCCTGA	TGCAGCCATG	CNGCGTGTAT	GAAGAAGGCC	TTCGGGTTGT	421
GTGTTACCCG	CGTTCCGACT	ACGTCGGTAC	GNCGCACATA	CTTCTTCCGG	AAGCCCAACA	
AAAGTACTTT	CAGCGGGGAG	GAAGGGAGTA	AAGTTAATAC	CTTTGCTCAT	TGACGTTACC	481
TTTCATGAAA	GTCGCCCCCTC	CTTCCCTCAT	TTCAATTATG	GAAACGAGTA	ACTGCAATGG	
CGCAGAAGAA	GCACCGGCTA	ACTCCGTGCC	AGCAGCCGCG	GTAATACGGA	GGGTGCAAGC	541
GCGTCTTCTT	CGTGGCCGAT	TGAGGCACGG	TCGTGCGGCG	CATTATGCCT	CCCACGTTTCG	

Figure 33. Positionnement des amorces sur la séquence de l'ADN codant pour l'ARN ribosomal 16S d'*E.coli*.

Les ADN sont soumis à 35 cycles d'amplification dans un thermocycleur qui est programmé au préalable pour la réalisation de cycles comprenant: une dénaturation initiale à 98°C pendant 30 secondes, suivi de 35 cycles comprenant chacun une dénaturation à 98°C pendant 15 secondes, une hybridation à 66°C pendant 10 secondes et une élongation à 72°C pendant 10 secondes et enfin une élongation finale à 72°C pendant une minute.

Après la PCR, les produits de la réaction sont soumis à la migration électrophorétique en gel d'agarose 1,5% (figure 34).

- Peser 1,5 gr dans 100 ml de tampon TBE (Tris Borate EDTA) 1X et porter à ébullition ;
- Laisser refroidir ;
- Ajouter 10 µl de bromure d'éthidium (mettre des gants) ;
- Couler le gel dans le moule contenant un peigne pour former des puits ;
- Laisser solidifier ;
- Retirer délicatement le peigne ;
- Plonger le gel dans la cuve d'électrophorèse contenant du TBE 1X ;
- Charger les puits avec l'ADN à analyser (5µl) additionné de tampon de charge (1 µl) (Glycerol 30%, Bleu de bromphénol et xylène cyanol). Le tampon de charge permet de maintenir l'ADN dans le fond du puits et de visualiser le front de migration ;

- Charger 5 μ l de marqueur de poids moléculaires (100 pb DNA ladder, Thermo Fisher Scientific, Milan, Italie) ;
- Appliquer une différence de potentiel (100V pendant 30 min) ;
- L'ADN chargé négativement à pH basique va migrer vers l'électrode positive.

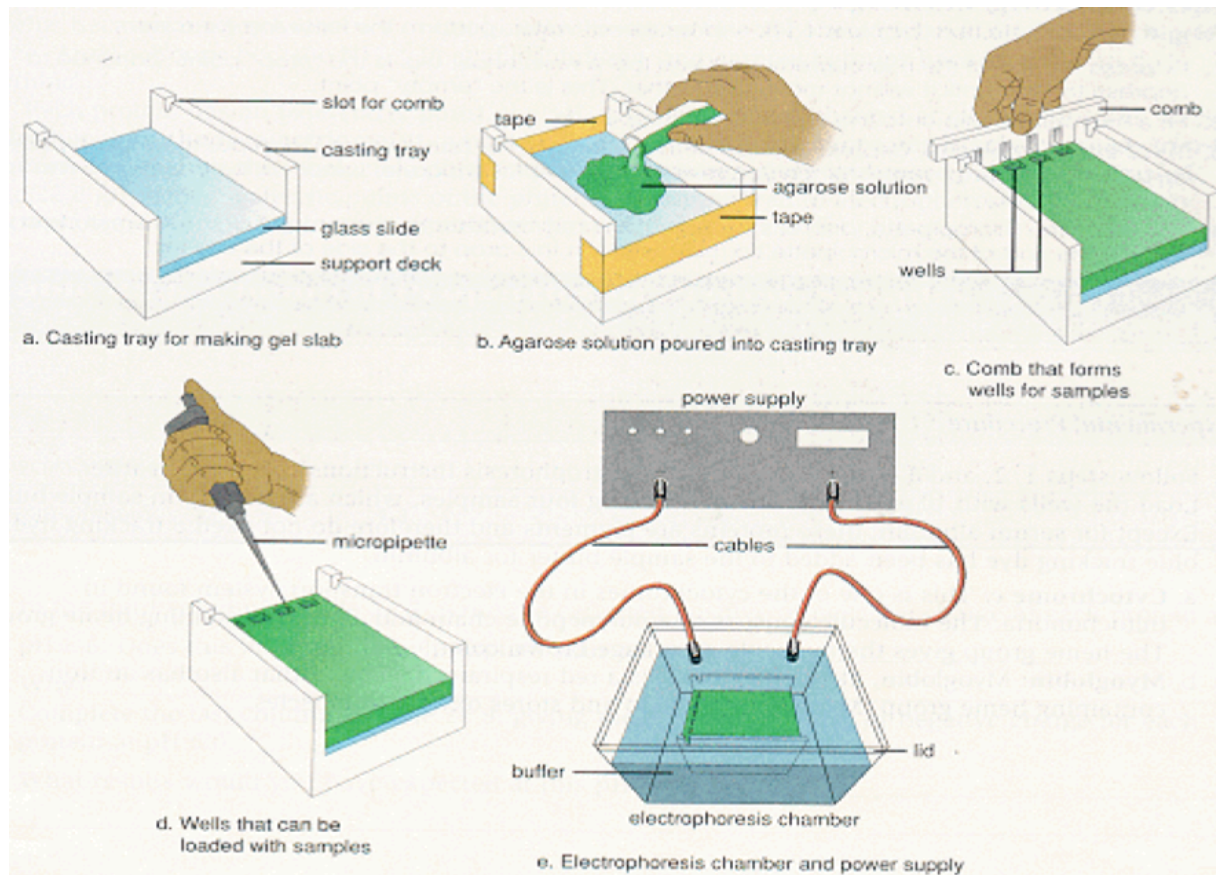


Figure 34. Principe de l'électrophorèse en gel d'agarose

Après électrophorèse l'ADN est visualisé par transillumination aux U.V. (312 nm). Le bromure d'éthidium qui s'est intercalé entre les bases de l'ADN absorbe la lumière dans les UV et la réémet dans l'orange. Les produits de PCR apparaissent donc sous UV et le marqueur de poids moléculaire permet de déterminer la taille des fragments. En effet, il existe une relation inverse entre la distance de migration et le logarithme de la taille des fragments. Un fragment de 190 pb est attendu (figure 35).

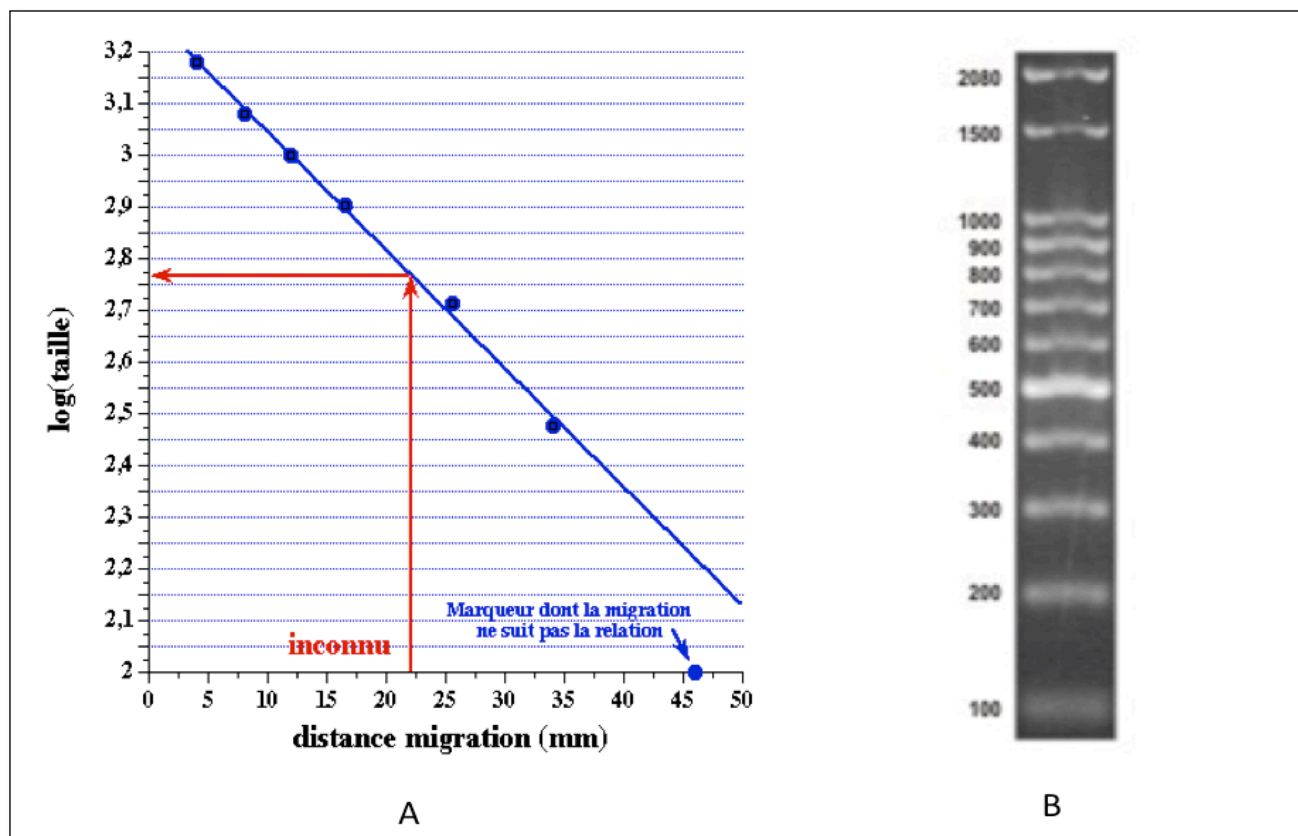


Figure 35. Calcul de la taille de l'amplicon. A. Relation inverse entre le log de la taille et la distance de migration. B. Aspect du 100 bp ladder après électrophorèse en gel d'agarose (les nombres indiquent la taille des bandes en bp)

IV.4.4 Préparation du gel polyacrylamide.

Pour la DGGE, les amplicons ont été analysés directement dans un gel de polyacrylamide à 8% préparé à partir d'une solution mère de 30 %. Ce gel résulte de la polymérisation d'une solution d'acrylamide bisacrylamide (37,5:1) dans un tampon TAE 1× (Tris 40 mM, acide acétique 20 mM et EDTA 1 M (pH 8,0)) avec un gradient de dénaturation constitué de 35 à 70% d'urée-formamide (100% dénaturant correspondant à 7M d'urée et 40% (v / v) de formamide désionisé) (tableau 13) (Catania et al., 2016 ; 2018). La solution est coulée entre deux plaques de verre parfaitement dégraissées par l'éthanol, séparées par deux espaceurs de 1mm d'épaisseur.

Le gradient de dénaturant est réalisé grâce à un préparateur de gradient (formeur de gradient). Ce dispositif est constitué de deux chambres cylindriques munies chacune à l'intérieur de barreaux magnétiques, qui assureront l'homogénéité des solutions. Ces réservoirs présentent à leur base un orifice de communication commandé par une vanne.

Tableau 13. Composition des deux solutions du gel polyacrylamide (8%)

Réactifs	Solution A (70%)	Solution B (35%)
Acril/Bis (30%)	6,13 ml	6,13 ml
TAE 50X (Tris 2M, Acetate 1M, EDTA 50 mM)	0,46 ml	0,46 ml
Formamide	6,44 ml	3,22 ml
Urée	6,76 g	3,38 g
Glycérol	0,46 ml	0,46 ml
Eau distillée	Compléter jusqu'à 23 ml	Compléter jusqu'à 23 ml
APS (10%)	83,63 μ l	83,63 μ l
TEMED	15,68 μ l	15,68 μ l

L'une de ces chambres (cylindre droit) est munie d'une deuxième vanne qui est reliée aux plaques de verre par l'intermédiaire d'un robinet connecté à une tubulure. Celle-ci est engagée dans les galets d'une pompe péristaltique qui assurera le pompage de la solution d'acrylamide jusqu'aux plaques. Après avoir initié la polymérisation dans chaque cuve, on actionne simultanément le robinet et la pompe ; les solutions d'acrylamide de concentration différentes en dénaturant se mélangent dans la cuve droite. Le liquide progresse à une vitesse d'environ 4 ml/mn qui, sans perturber le gradient, est suffisamment rapide pour éviter une polymérisation complète dans la tubulure. Le gel est prêt à l'emploi une heure environ après avoir été coulé (figure 36).

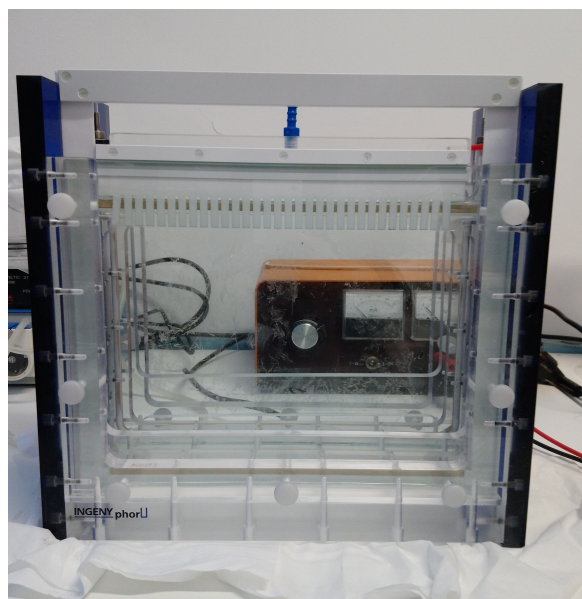


Figure 36. Images représentant le dispositif de préparation du gradient dénaturant (à gauche) et les plaques de verre (A droite)

IV.4.5 Dépôt des échantillons et système électrophorétique.

L'électrophorèse a été réalisée avec le système pPhor-U2 (Ingeny, Leiden, Pays-Bas). La cuve à électrophorèse est semblable à un aquarium rectangulaire. Elle contient 17 litres de tampon TAE (1×) (TRIS 40 mM, Acétate 20 mM, EDTA 1 mM).

Un thermostat régule la température du tampon brassé en permanence par une turbine. L'anode est fixée au fond de la cuve. Après une heure de polymérisation de l'acrylamide, le gel coulé est installé sur un support vertical. Les puits du gel sont rincés abondamment avec du TAE 1×, et le dépôt des échantillons constitué par 20 µl de produit de PCR et de 5 µl de solution de dépôt (bleu de DGGE: bleu de bromophénol- xylène- cyanol) est effectué.

L'ensemble plaque et support est immergé dans la cuve préalablement chauffée à 60°C. La migration est d'abord conduite utilisée à basse tension (20V), puis à 80V. La température de 60°C est maintenue jusqu'à la fin de la migration par l'intermédiaire d'un bain thermostaté. Elle contribue au maintien de l'effet dénaturant (figure 37).

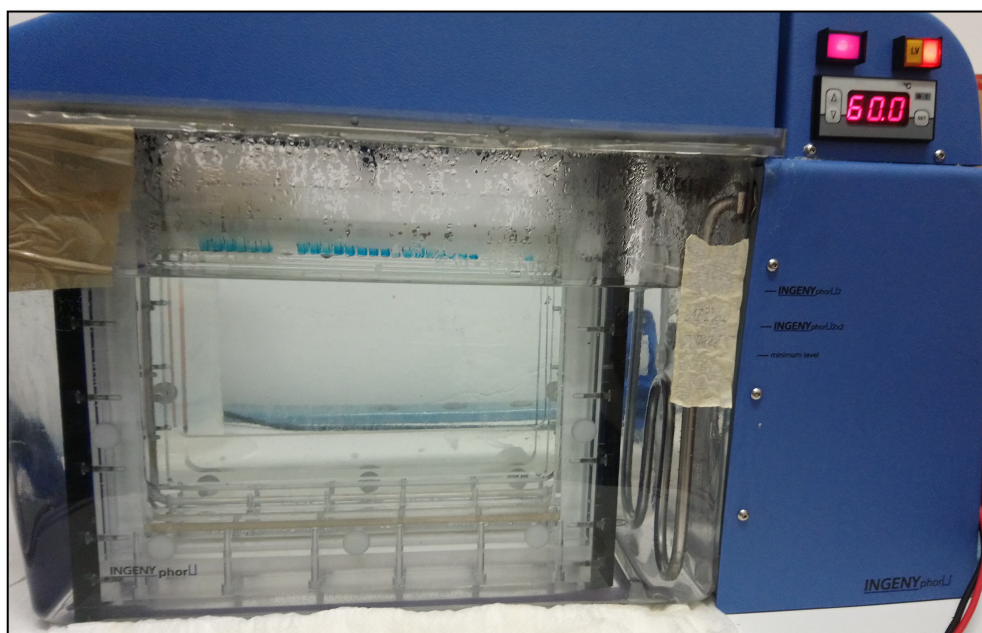


Figure 37. Cuve d'électrophorèse contenant la plaque en verre avec le gel.

Après 17h de migration, le gel a été coloré pendant 40 minutes dans un bain de SYBR_Gold I 1X (Invitrogen CA, USA), puis l'image est capturée avec un gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Les profils DGGE ont été analysés visuellement et la position relative de chaque bande a été enregistrée dans une matrice 0-1 qui a été entrée dans le logiciel PAST et analysée à l'aide d'une analyse en grappes à plusieurs variables basée sur la dissimilarité de Jaccard.

Indice de Jaccard $J = \frac{M_{11}}{M_{11} + M_{10} + M_{01}}$

M₁₁ : bandes présentes dans les deux échantillons

M₁₀ : bandes présentes dans l'échantillon 1 et pas dans l'échantillon 2

M₀₁ : bandes présentes dans l'échantillon 2 et pas dans l'échantillon 1

Certaines bandes DGGE dominantes ont été excisées avec un embout de pipette stérile et remises en suspension toute la nuit dans 20 µl d'eau dénaturée ADN / ARN free (GIBCO) à 4 ° C, puis congelées à -20 ° C ([Catania et al., 2015](#))

IV.5 Isolement et caractérisation des bactéries marines dégradant les hydrocarbures.

IV.5.1 Enrichissement et isolement de bactéries aérobies dégradant les hydrocarbures.

Des cultures d'enrichissement ont été mises en place afin d'isoler les bactéries autochtones ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures et d'étudier leur potentiel de dégradation. Ceci a été réalisé en inoculant les échantillons de sédiments et d'eau de mer dans le milieu ONR7a additionné d'hydrocarbures comme unique source de carbone et d'énergie. 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](#)). La composition détaillée de ce milieu ainsi que la méthode de préparation sont décrites dans l'annexe 2.

Des aliquotes de sédiments (1 g) ou d'eau de mer (1 ml) ont été inoculés dans des erlenmeyers contenant 100 ml d'ONR7a additionnés respectivement de 0,1% (v/v) de pétrole brut, d'un mélange de n-alcanes (C₁₄ + C₁₆ + C₁₈, 1: 1: 1) ou d'un mélange de benzène /toluène/xylène (pures) (1:1:1) comme uniques sources de carbone et d'énergie. Des témoins contenant les mêmes quantités de milieu et d'hydrocarbures mais sans échantillons ont été également préparés. Tous les flacons ont été incubés pendant 10 jours à 30 ° C sous agitation (180 tr/min) ([Hassanshahian et al., 2012](#)).

Ensuite, des aliquotes ont été prélevées et placées dans du milieu frais contenant la même concentration d'hydrocarbures et incubées dans les mêmes conditions et des dilutions ont été préparées. Un volume (100 µl) de chaque dilution est étalé sur la surface des boîtes de pétri contenant du milieu ONR7a solide (ONR7a Agar) avec les mêmes hydrocarbures imbibant un papier filtre stérile placé sur le couvercle de la boîte. Les boîtes ont été incubées à 30 ° C. Des colonies phénotypiquement différentes obtenues à partir des boîtes ont fait l'objet de purification par repiquages successives sur milieu ONR7a Agar, jusqu'à l'obtention de colonies pures.

Les isolats purifiés ont ensuite été conservés en ajoutant du glycérol préalablement stérilisé à la suspension bactérienne (1:1, v/v). Le mélange est agité au vortex et conservé à -20 ° C.

IV.5.2 Criblage des souches bactériennes isolées.

Les bactéries purifiées obtenues à partir des boîtes de pétri, ont fait l'objet d'un criblage pour confirmer leur capacité à dégrader les hydrocarbures et à les utiliser comme source de carbone et d'énergie. Ceci a été réalisé par la cultivation de chaque isolat dans le milieu ONR7a additionné de pétrole brut (1%, v/v) comme unique source de carbone et d'énergie. Les cultures ont été incubées à 30°C avec agitation (180 rpm). La consommation des hydrocarbures est indiquée par la variation de la turbidité. La densité optique (600 nm) de la culture a été mesurée après une semaine d'incubation. Les isolats manifestant une croissance prononcée sur le pétrole brut ont été sélectionnés pour des caractérisations plus poussées.

IV.6 Test de croissance sur différentes sources d'hydrocarbures et cinétiques de croissance.

Les bactéries isolées ont été caractérisées en fonction des différents hydrocarbures qu'elles sont capables de métaboliser.

Pour déterminer le pouvoir d'utilisation des différents hydrocarbures (individuellement) comme uniques sources de carbone par les souches bactériennes, chaque souche a été inoculée dans des tubes stériles contenant du milieu liquide ONR7a additionné respectivement de 1% (v/v) de pétrole brut, n-hexadécane (C₁₆), n-Hexacosane (C₂₆), n-octacosane (C₂₈), benzène, toluène et xylène comme seule source de carbone et d'énergie. En tant que contrôle, un milieu sans hydrocarbures a été utilisé et un contrôle a été établi pour chaque essai. La croissance a été évaluée après une semaine d'incubation à 30 ± 1 ° C en mesurant la turbidité (DO à 600 nm) à l'aide d'un spectrophotomètre.

Parallèlement, des courbes de croissance ont été réalisées afin de suivre l'évolution des souches sélectionnées dans le milieu liquide additionné cette fois ci de pétrole brut comme unique source de carbone et d'énergie.

Dans des Erlen-Meyer stériles, contenant 90 ml d'ONR7a, on ensemence 1 ml de suspension bactérienne préparée à partir d'une culture pure de la bactérie sélectionnée puis on ajoute 1 ml d'hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie. Le tout est incubé à 30°C avec agitation. Des mesures quotidiennes de la densité optique (DO), ont été réalisées par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm.

IV.7 Caractérisations morphologiques des bactéries isolées.

Le caractère morphologique est un critère d'orientation très important de l'identification bactérienne (Marchal et al., 1988). Les observations suivantes ont été réalisées :

Aspect des colonies bactériennes isolées (Marchal et al., 1988):

- Taille : petites colonies lorsque le diamètre est égal ou inférieur à 1 mm, colonies moyennes lorsque le diamètre est compris entre 1,5 et 3 mm, grandes colonies lorsque le diamètre est supérieur à 3 mm.
- Allure des contours : bords lisses réguliers, irréguliers, déchiquetés pouvant même présenter parfois des prolongements, l'envahissement des milieux en vague.
- Forme du relief : colonies bombées, demi-bombées, plates, le centre surélevé ou ombiliqué.
- Transparence : colonies transparentes, translucides, lactescentes, opaques.
- Aspect de la surface : colonies lisses, rugueuses, muqueuses.
- Pigmentation : colonies rouges, orangées, jaunes, blanches, ocre.

IV.8 Caractérisations biochimiques des bactéries isolées.

IV.8.1 Coloration de Gram.

C'est un test qui permet la distinction entre deux groupes bactériens, les Gram + et les 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-ioduré 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).

IV.8.2 Test de la catalase.

IV.8.2.1 Principe.

La catalase est une enzyme contenant du fer, qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) 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](#)).

IV.8.2.2 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 avec une pipette Pasteur stérile une colonie bactérienne.
- On resuspend 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](#)).

IV.8.3 Test d'oxydase.

IV.8.3.1 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 diméthyl-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](#)).

IV.8.3.2 Technique.

- On dépose stérilement le disque d'oxydase au centre d'une lame propre.
- 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.

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

IV.9 Caractérisations moléculaires des bactéries isolées.

IV.9.1 Analyse taxonomique des gènes d'ARNr 16S et séquençage.

L'identification bactérienne se fait traditionnellement à partir des caractères phénotypiques de la bactérie: coloration (Gram), morphologie, aptitude à croître sur certains milieux de culture, caractères biochimiques détectés par diverses techniques commerciales (galeries API, ...). Toutefois certaines bactéries sont mal identifiées phénotypiquement car elles sont difficilement cultivables voir non cultivables du tout. En effet, certaines bactéries expriment peu de caractères phénotypiques. Pour d'autres espèces, une situation de stress peut altérer les caractères phénotypiques. Une identification basée exclusivement sur des caractères phénotypiques peut donc mener à un résultat erroné. Par ailleurs, les bactéries rares ne sont pas répertoriées dans les bases de données des systèmes commercialisés et en conséquence, les études basées sur les caractères phénotypiques ne permettront pas de les identifier. Enfin, pour certaines bactéries à croissance difficile les caractères phénotypiques sont difficiles à déceler ; la biologie moléculaire simplifie dans ce cas l'identification ([Petti et al., 2005](#) ; [Renvoisé, 2011](#)). Dans ces situations, l'amplification et le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S suivi de la comparaison de la séquence obtenue à des bases de données ont démontré leur efficacité pour l'identification bactérienne. Il s'agit d'une méthode universelle, précise et objective, dont la variabilité inter opérateur est limitée par rapport aux techniques conventionnelles. Pour différencier certains genres ou pour décrire une nouvelle espèce, l'amplification « 16S » reste nécessaire ([Clarridge, 2004](#)).

IV.9.2 Amplification des gènes d'ADNr 16 S par PCR.

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) consiste à multiplier la séquence du gène de l'ADNr 16S à l'aide d'amorces spécifiques encadrant la séquence de ce gène et générant un amplicon de 1500 bp ([Ennadir et al., 2014](#)).

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 en suivant la méthode de « Colonie PCR » ([China et al., 1996](#)). C'est une méthode basée sur le choc thermique, Des colonies isolées purifiées sont prélevées sous une hotte à flux laminaire vertical et 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 puis centrifugés pendant 5 minutes à 13 000 g. Au cours de ce processus, un culot contenant des protéines et des fragments de cellules est formé au fond du

tube, tandis que 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') (figure 38) (Lane, 1991 ; Frank et al., 2008).

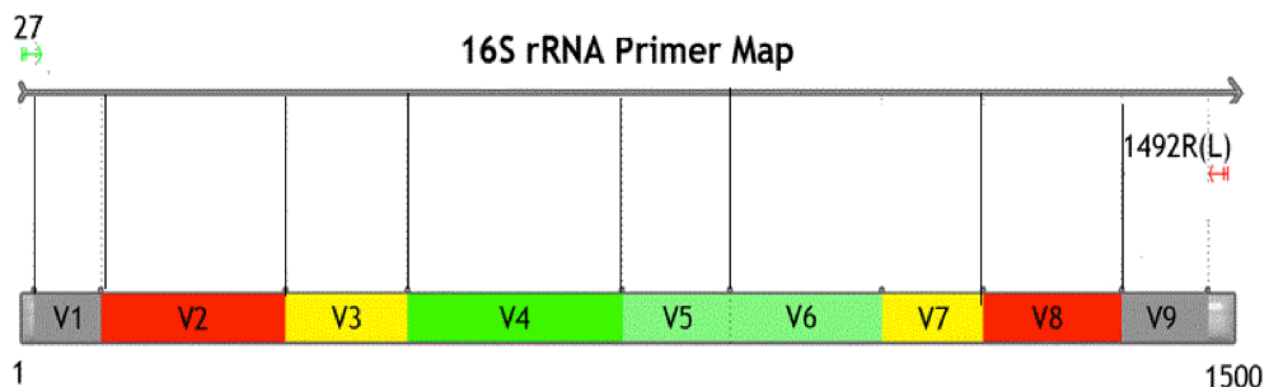


Figure 38. Représentation schématique du gène codant pour l'ARN 16S. La position des amorces est indiquée. V1 à V9= régions variables. 1 à 1500 : taille du gène en paires de bases (modifié de Yang et al., 2016)

La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel final de 30 μ l contenant 1 μ l d'ADN (entre 10 et 100 ng), 0,6 μ l de chaque amorce (0,2 μ M), 0,6 μ l 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 $\times$ final.

La PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Mastercycler Gradient, Eppendorf) en utilisant le programme de cycles suivant:

Tableau 14. Programme PCR pour l'amplification du gène ADNr 16 S

Etapes	Température	Durée	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	94°C	30 Sec	1 cycle
Dénaturation	94°C	30 Sec	30 cycles
Hybridation	50°C	1 min	
Elongation	68°C	1 min 30 sec	
Elongation finale	68°C	5 min	1 cycle
ADN	4°C	-	

IV.9.3 Electrophorèse sur gel d'agarose.

Cette technique est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Après la digestion, on fait migrer nos échantillons par électrophorèse dans un gel d'agarose (1%) afin de séparer la séquence d'intérêt du vecteur et aussi pour contrôler les poids moléculaires. Les plus petites molécules se déplacent plus vite et migreront donc plus loin. La migration peut être suivie grâce à du bleu de dépôt. On utilise des marqueurs de taille pour pouvoir déterminer la taille (en bp) des acides nucléiques. Les fragments d'ADN sont visibles sous UV grâce à la présence de bromure d'Ethidium dans le gel. La taille d'amplicon attendue est d'environ 1450 bp.

Pour préparer l'ADN à charger, on mélange de l'eau (4 µl), puis le tampon de charge (1 µl) et en dernier l'échantillon (1 µl). Les mélanges sont ensuite chargés dans les puits du gel. Le gel est placé dans un lit rempli de TAE (1x) et d'une intensité de courant de 100 V. Après migration, le gel est pris et est placé sur un trans illuminateur connecté avec un appareil photo et un ordinateur qui permet de capturer l'image.

IV.9.4 Purification des produits PCR.

Les produits PCR en solution ont été purifiés à l'aide du kit commercial NucleoSpin® Gel et PCR Clean-Up (Macherey-Nagel) (figure 38). Cette purification a pour but de séparer les fragments d'ADN amplifiés du milieu réactionnel de PCR (protéines, sels) ainsi que des autres acides nucléiques (Figure 39). La qualité et la taille des produits de PCR purifiés ont été vérifiées par électrophorèse.

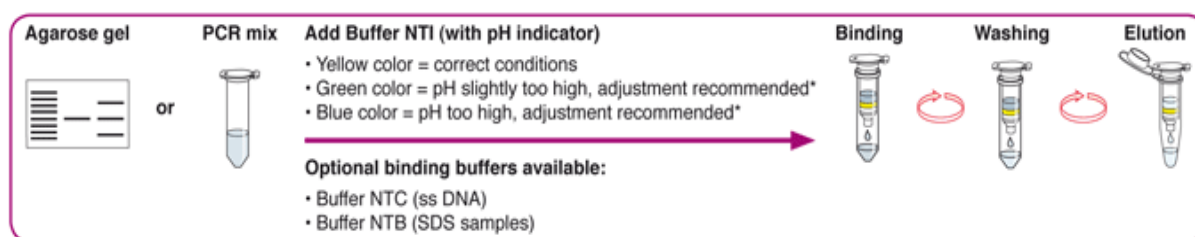


Figure 39. Schéma de la procédure de purification des produits PCR

IV.9.5 Séquençage.

Les fragments d'ADNr 16S amplifiés ont été séquencés par le biais de MacroGen Europe Service (Amsterdam, Pays-Bas). Les séquences ont été comparées avec celles présentes dans la banque de données GenBank database du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) grâce à l'outil d'alignement Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Cette étape permet l'identification de la séquence par homologie avec

des séquences connues (Altschul et al., 1990). Les séquences d'ARNr 16S issues de cette étude ont été déposées dans Genbank sous les numéros d'accès de [MH425630](#) à [MH425652](#).

IV.9.6 Analyse phylogénétique.

La PCR universelle ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S à l'aide d'amorces universelles, a d'abord été développée pour des études phylogénétiques. En effet ce gène est universellement retrouvé chez les bactéries et sa fonction est conservée. Ainsi, il peut servir d'« horloge moléculaire » pour mesurer les distances phylogénétiques entre les différentes espèces bactériennes (Renvoisé, 2011).

Les séquences 16S obtenues dans cette étude ont été utilisées pour rechercher les séquences les plus proches dans la banque de séquences genbank grâce au programme BLAST. Pour chaque séquence, la séquence la plus proche a été conservée et les séquences de ce travail et les séquences les plus proches de Genbank ont été utilisées pour réaliser un arbre phylogénétique à l'aide du programme Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) développé par l'EMBL (Sievers et al., 2011). Pour ce faire, toutes les séquences ont été alignées et seules les parties communes ont été gardées. Les séquences sont comparées deux à deux et la distance génétique est calculée.

Distance= 1-similarité

Similarité=% d'identité entre les séquences. Le logiciel tient aussi compte des insertions et des délétions éventuelles. La matrice de distance générée permet de créer un dendrogramme basé sur la méthode UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean).

IV.10 Détection et amplification des gènes de dégradation en utilisant des amorces spécifiques par PCR.

Dans une optique de bioremédiation, l'analyse fonctionnelle des microflore et donc des gènes intervenant dans les processus de dégradation, est un paramètre clé. L'étude des fonctions métaboliques chez les bactéries est souvent appréhendée par la recherche de gènes connus impliqués ou associés à des mécanismes de dégradation. Ces techniques de screening impliquent l'utilisation d'amorces pour l'utilisation en PCR ou de sondes pour les hybridations qui sont dessinées à partir d'éléments génétiques de souches isolées.

Ainsi, les amorces ou les sondes utilisées sont plus ou moins dégénérées de manière à cibler une diversité plus ou moins importante (M'rassi, 2014).

Dans cette étude, grâce à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), des gènes d'intérêts (également appelés biomarqueurs) ont été spécifiquement amplifiés à partir de l'ADN

génomique des souches bactérienne étudiées (Colonie PCR comme décrit précédemment). Afin de détecter les gènes cataboliques impliqués dans les voies de biodégradation des hydrocarbures, une amplification par PCR des fragments de gènes de monooxygénase a été réalisée.

IV.10.1 Gènes responsables de la dégradation des hydrocarbures aliphatiques.

IV.10.1.1 *alkB*

Les alcanes monooxygénases constituent un groupe d'enzymes qui catalysent la première étape de la dégradation aérobie des alcanes. La génétique de ces enzymes est bien caractérisée, en particulier chez *Pseudomonas* (Van Beilen. Et al., 2001; Hasanshahian et al., 2008) et *Rhodococcus* (Van Beilen et al., 2006). Habituellement, l'alcane monooxygénase initie la dégradation des n-alcanes par l'incorporation d'un atome d'oxygène au carbone terminal ou subterminal. Les intermédiaires sont ensuite transformés en leurs acides correspondants avant d'entrer dans la voie de la β -oxydation (Rojo 2009).

Un fragment du gène de l'alcane monooxygénase *alkB* a été amplifié par PCR. L'amplification a été réalisée en utilisant le couple d'amorces *alkB*-1f (5'-AAYACNGCNCAYGARCTNGGNCAAYAA- '3) et *alkB*-1r (5'-GCRTGRTGRTCNGARTGNCGYTG- '3) Avec C+T=Y (Kloos et al., 2006) dans un volume réactionnel final de 30 μ l contenant 2 μ l d'ADN, 1,5 μ l de chaque amorce (0,5 μ M), 0,6 μ l de desoxyribonucleoside triphosphate (dNTPs 0,2 mM) (Gibco, Invitrogen Co., Carlsbad, CA), 0,6 μ l de Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific) avec son tampon réactionnel 1X final. La taille d'amplicon attendue est d'environ 550 bp. Les amplicons obtenus ont été visualisés sur un gel d'agarose à 1%.

La PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Mastercycler Gradient, Eppendorf) en utilisant le programme de cycles suivant:

Tableau 15. Programme PCR pour l'amplification du gène *alkB*

	Température	temps	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	98°C	30 Sec	1 cycle
Dénaturation	98°C	15 Sec	35 cycles
Hybridation	55°C	15 Sec	
Elongation	72°C	10 sec	
Elongation finale	72°C	1 min	1 cycle

IV.10.2 Gènes responsables de la dégradation des hydrocarbures mono-aromatiques.

L'attaque oxydative initiale des BTEX convertissant le composé en une structure de catéchol et le clivage de la structure du catéchol sont des étapes clés dans la dégradation aérobie des BTEX. L'attaque oxydative initiale consiste en une oxydation directe du noyau aromatique via une mono-oxygénase (Kahng et al., 2001) ou un attaque via une dioxygénase (Zylstra et Gibson, 1989; Furukawa et al., 1993) ou l'oxydation de la chaîne latérale alkyle qui est catalysée par des mono-oxygénases (Burlage et al., 1989).

Une amplification par PCR des fragments de gènes de monooxygénase a été réalisée. Le fragment du composant hydroxylase terminal de la xylène monooxygénase codée par le gène *xy/M* et le composant de transfert d'électrons de la xylène monooxygénase codée par le gène *xy/A* ont été amplifiés en utilisant les couples d'amorces TOL-F / TOL-R (Baldwin et al., 2003) et XYLA-F / XYLA-R (Hendrickx et al. 2006) respectivement.

IV.10.2.1 *Xy/M*

L'amplification a été réalisée en utilisant le couple d'amorces TOL-F (5'-TGAGGCTGAACTTTACGTAGA- '3) et TOL-R (5'- CTCACCTGGAGTTGCGTAC- '3) (Kloos et al., 2006) dans un volume réactionnel final de 30 µl contenant 1 µl d'ADN, 6 µl de chaque amorce (10 µM), 0,6 µl de desoxyribonucleoside triphosphate (dNTPs 0,2 mM) (Gibco, Invitrogen Co., Carlsbad, CA), 0,5 U de Taq polymerase (Qiagen, Milano, Italie) avec son tampon réactionnel 1X final. La taille d'amplicon attendue est d'environ 475 bp. Les amplicons obtenus ont été visualisés sur un gel d'agarose à 1%.

La PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Mastercycler Gradient, Eppendorf) en utilisant le programme de cycles suivant:

Tableau 16. Programme PCR pour l'amplification du gène *xy/M*

	Température	temps	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	94°C	30 Sec	1 cycle
Dénaturation	94°C	30 Sec	35 cycles
Hybridation	55°C	1 min	
Elongation	68°C	2 min	
Elongation finale	68°C	5 min	1 cycle

IV.10.2.2 *xyIA*

L'amplification a été réalisée en utilisant le couple d'amorces *xyIA*-F (5'-CCAGGTGGAATTTTCAGTGGTTGG- '3) et *xyIA*-R (5'-AATTAAGTCGAAGCGCCACCCCA- '3) dans un volume réactionnel final de 30 µl contenant 1 µl d'ADN, 6 µl de chaque amorce (10 µM), 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 1X final. La taille d'amplicon attendue est d'environ 291 bp. Les amplicons obtenus ont été visualisés sur un gel d'agarose à 1%.

La PCR a été réalisée dans un thermocycleur (Mastercycler Gradient, Eppendorf) en utilisant le programme de cycles suivant:

Tableau 17. Programme PCR pour l'amplification du gène *xyIA*

	Température	temps	Nombre de cycle
Dénaturation initiale	94°C	30 Sec	1 cycle
Dénaturation	94°C	30 Sec	35 cycles
Hybridation	64°C	1 min	
Elongation	68°C	2 min	
Elongation finale	68°C	5 min	1 cycle
ADN	4°C	-	

IV.11 Test de biodégradation des souches sélectionnées.

La capacité de dégradation des souches sélectionnées a été évaluée dans le milieu de culture ONR7a additionné de pétrole brut. Les cultures de départ ont été préparées en inoculant une seule colonie dans du milieu ONR7a additionné d'hexadécane stérile à 1% (v/v) comme seule source de carbone. Après une semaine d'incubation à 30 ± 1 °C avec agitation, les cultures ont été centrifugées à 9 000 x g pendant 10 minutes. Le culot a ensuite été remis en suspension dans un milieu stérile (ONR7a) pour obtenir une densité optique (600 nm) de 0,1. La suspension obtenue est par la suite utilisée comme inoculum pour l'expérience de biodégradation.

En utilisant des flacons de 100 ml, on a inoculé 1 ml de chaque suspension dans 30 ml d'ONR7a supplémenté avec 30 µl de pétrole brut stérilisé par filtration. Un flacon sans aucun inoculum a été utilisé comme contrôle abiotique. Tous les flacons ont été incubés avec

agitation à 30 ° C pendant une semaine. Après incubation à 30°C pendant une semaine, les hydrocarbures résiduels ont été extraits à l'aide d'une technique d'extraction liquide-liquide en continu en utilisant 10% (V/V) de dichlorométhane (CH_2Cl_2 , Sigma-Aldrich, Milan, Italie) et la procédure a été répétée trois fois puis une séparation (phase organique, phase liquide) a été effectuée à l'aide d'une ampoule à décanter. Les phases organiques ont été combinées et déshydratées avec du Sulfate de Sodium anhydre (Na_2SO_4 , Sigma-Aldrich). Les extraits ont été concentrés par évaporation rotative (Rotavapor modèle R110; Büchi Labortechnik AG, Flawil, Suisse) à température ambiante. Toutes les mesures ont été effectuées utilisant un système de chromatographie en phase gazeuse rapide DANI Master GC (DANI Instruments S.p.A., Milan, Italie) équipé avec injecteur SSL split / splitless et détecteur FID selon la méthode 3510c de l'agence américaine de protection de l'environnement ([EPA 1996](#); [Gentile et al., 2016](#)). Le pourcentage de biodégradation des souches testées est calculé en incluant les valeurs résiduelles en GC-FID et le témoin abiotique. Cela correspond au rapport entre la quantité de substrat dosée par GC-FID 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

IV.12 Test de production de biosurfactants

Les bactéries ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures ont la propriété de l'émulsifier en solution en produisant 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](#)).

IV.12.1 Drop collapse test

Le drop collapse test ou test d'effondrement des gouttes a été réalisé en ajoutant 7 μl de pétrole brut dans chaque puits d'une plaque de microtitration à 96 puits. Le couvercle a été équilibré pendant 1 heure à température ambiante, puis 20 μl 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). Le dodécyl sulfate de sodium (SDS) et l'eau distillée stérile ont été utilisés comme contrôle positif et négatif, respectivement ([Bodour et Miller-Maier 1998](#); [Mahjoubi et al., 2013](#)).

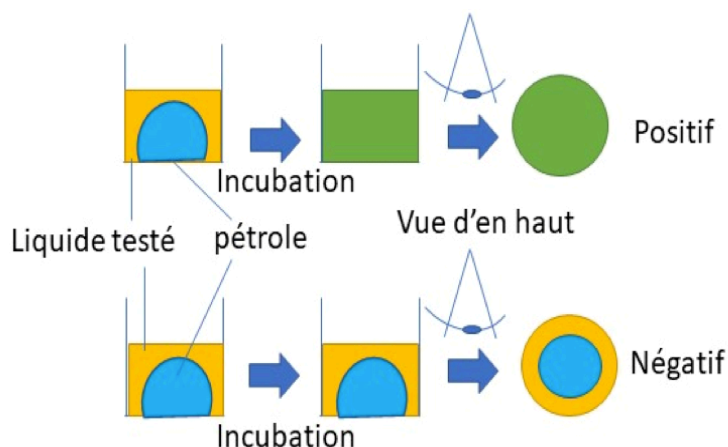


Figure 40. Schéma du test d'effondrement de la goutte. Le liquide testé (jaune) est mis en contact avec une goutte de pétrole (bleu). Soit les deux se mélangent (en haut) soit les deux restent distincts (bas).

IV.12.2 Test d'étalement du pétrole

Dans le procédé d'étalement de pétrole, 20 ml d'eau distillée ont été mis dans une boîte de Pétri vide (90 mm), 10 μ l 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 μ l 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 biosurfactant est importante

IV.12.3 Indice d'émulsification E24

L'indice d'émulsification (E24) de différentes cultures bactériennes a été déterminé en ajoutant 2 ml d'hexadécane à la même quantité 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 (Hassanshahian et al., 2012).

Chapitre V

Résultats et discussion

V Résultats et discussion.

V.1 Paramètres physico-chimiques des échantillons.

Dans le cadre de notre étude, Des échantillons d'eau de mer (5 échantillons) et de sédiment (5 échantillons) ont été prélevés du port de Sidi Fredj durant le mois de Mars 2016. Les échantillons ont fait l'objet d'analyses physico-chimiques et microbiologiques.

Les résultats des mesures des paramètres physico-chimiques : La température (T°), la salinité, le pH, la DCO (Demande Chimique en Oxygène) et les MES (Matières En Suspension) sont récapitulés dans le tableau 18.

Tableau 18. Principaux paramètres physico-chimiques des échantillons.

Station	T° ($\pm 0,1^{\circ}\text{C}$)	Salinité ($\pm$ 0,2 psu)	pH ($\pm 0,02$)	DCO ($\pm 0,5$ mg/l)		MES (mg/l)
				Sédiment	Eau de mer	
1	13,2	31,2	7,34	50,6	48,2	220
2	13,2	30,5	7,31	54,7	52,8	190
3	13,3	31,3	7,54	52,8	60,3	234
4	13,3	31,6	7,22	50,5	60,9	213
5	13,1	30,6	7,25	45,9	46,8	193
Moyenne	13,2	31,0	7,33	50,9	53,8	210
Ecart-type	0,1	0,5	0,1	3,3	6,6	18,5

Les résultats montrent que :

- Les valeurs de salinité obtenues sont assez homogènes dans les différentes stations et ont peu varié. Elles ont été comprises entre 30,5 et 31,6 psu. Ces valeurs sont assez faibles comparées aux salinités de l'eau de mer et à celles obtenues par [Bouaziz et Djerrai](#) en 2010 et [Aissat et Cheikh, 2013](#) qui ont obtenus une moyenne de 36,34 psu et 35,14 psu respectivement. Ceci peut être dû à une importante pollution, et aux rejets d'eaux usées qui se déversent directement dans le port.
- Pratiquement les mêmes valeurs de températures ont été enregistrées dans les différentes stations ($13,2^{\circ}\text{C}$) reflétant les conditions météorologiques des périodes saisonnières printanières.

- Le pH dans l'ensemble des stations a varié de 7,22 à 7,54. Ces valeurs sont très faibles par rapport à la valeur moyenne dans les eaux méditerranéennes qui est de 8,2 et par rapport aux valeurs de pH obtenues par [Bouaziz et Djerrai, 2010](#) et [Aissat et Cheikh, 2013](#) qui ont trouvé une moyenne du pH de 8,05 et 8,19 respectivement. Cela peut être justifié par les rejets anthropiques, du milieu confiné du port ainsi que l'acidification du milieu provoquée par le processus de dégradation de la matière organique. Cependant elles restent dans les limites fixées par la législation algérienne pour les eaux de mer (6 à 8) ([JORA, 2006](#)).
- Les teneurs moyennes en matière en suspension au niveau du port varient entre 190 et 234 mg/l. Ces valeurs se rapprochent de celles obtenues par [Bouaziz et Djerrai, 2010](#) qui ont trouvé une moyenne des matières en suspension de 232 mg/l au niveau du port de Sidi Fredj. Cependant les valeurs des MES obtenues sont supérieures à celles de [Aissat et Cheikh en 2013](#) qui ont obtenus une moyenne de 155,37 mg/l. Théoriquement, les ports étant le réceptacle de nombreux déchets générés par les activités humaines, les teneurs en matières organiques sont assez élevées par rapport à celles mesurées en milieu marin. Ceci peut aussi être dû à la faible profondeur des bassins, la nature du fond (sable fin), l'agitation causée par la circulation des bateaux qui favorisent la remise en suspension des sédiments superficiels.
- La demande chimique en oxygène (DCO), exprimée en mg d'O₂/l, correspond à la quantité d'oxygène nécessaire pour la dégradation par voie chimique et dans des conditions définies de la matière organique ou inorganique contenue dans l'eau ([Grosclaude, 1999](#)). Elle représente donc, la teneur totale de l'eau en matières oxydables. La DCO est un paramètre de qualité qui permet d'évaluer une charge polluante. Les moyennes de la DCO obtenues sont de 50,9 mg d'O₂/l pour les échantillons de sédiment et de 53,8 mg d'O₂/l pour les échantillons de sédiment. Ces valeurs sont inférieures à la norme de rejets industriels qui est de 120 mg/l (Journal officiel de la République Algérienne, 2006). On dispose de peu d'informations sur le taux de la DCO en milieu marin. Les plus nombreuses concernent le milieu conchylicole. Il semble qu'une eau de mer ayant une DCO supérieure à 25-30 mg/l soit peu propice à la conchyliculture ([Michel, 1972](#)).

V.2 Test de toxicité « Microtox ».

Le test Microtox est un test de toxicité aiguë à faible temps de contact. Il se base sur la modification de lumière d'une bactérie luminescente marine naturelle et non pathogène (*Aliivibrio fischeri* anciennement *Vibrio fischeri*) exposée à une substance toxique ou à un échantillon contenant des toxiques. Cette bactérie marine, émet naturellement des photons (= lumière). En présence de composés toxiques, son métabolisme (=ensemble des dépenses énergétiques) est affecté, ce qui se traduit par une chute de sa luminescence (émission lumineuse).

Le test avait pour but de mettre en évidence une toxicité non détectée par les analyses chimiques qui indiquent la présence de pas ou peu de polluants et ainsi donner une alerte quant à la toxicité des échantillons. L'effet inhibiteur est significatif s'il est supérieur à 20%.

Les valeurs obtenues par ce test, ont révélé que tous les échantillons inhibaient la bioluminescence de *V. fischeri* à plus de 20% et que leur toxicité était considérée comme aiguë. L'inhibition de la bioluminescence a varié entre 34,5% et 47,8%. Comme indiqué dans la figure 41, l'échantillon de la station 3 (S3) représentait le pourcentage le plus élevé d'inhibition de la bioluminescence et la toxicité la plus aiguë, tandis que l'échantillon de sédiment de la station 1 (S1) représentait le pourcentage le moins élevé mais qui reste néanmoins supérieur à 20%. [Schiewe et collaborateurs, \(1985\)](#) ont montré qu'il y a une importante association entre la toxicité aiguë et le degré de contamination par les hydrocarbures.

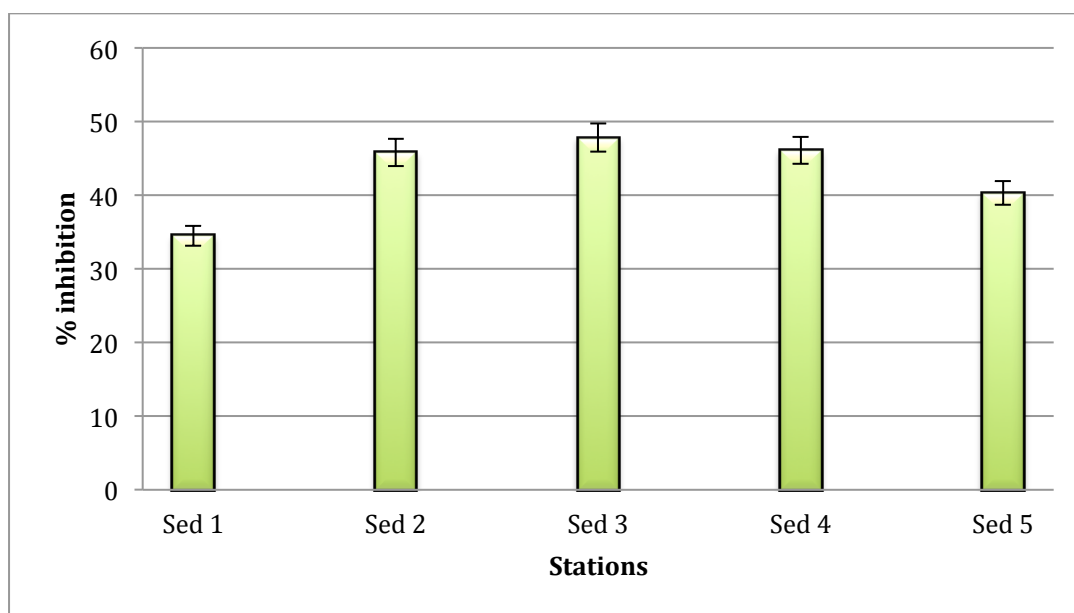


Figure 41. Taux d'inhibition de la luminescence de la bactérie *Vibrio fischeri* par les échantillons de sédiment du port de Sidi Fredj.

V.3 Mesure de l'abondance bactérienne.

L'abondance microbienne totale mesurée par comptage DAPI à partir des échantillons d'eau de mer du port de Sidi Fredj a montré que le nombre de cellules totales variait entre $4,62 \times 10^4$ et $4,14 \times 10^5$ cellules par ml. Les valeurs obtenues dans les stations 3, 4 et 5 sont semblables au nombre de cellule dans l'eau de mer de surface estimé à $>10^5$ cellules par ml (Porter et Feig, 1980; Hobbie et al., 1977 ; Kumar et al., 2019). Cependant le nombre de cellules obtenu dans les stations 1 et 2 est faible ($<10^5$) (figure 42).

Des valeurs comprises entre 10^5 et 10^7 cellules par ml ont été trouvées dans les échantillons d'eau prélevés de la baie de Priolo (Sicile) par Catania et collaborateurs (2015). Ces valeurs sont plus élevées que celles observées au niveau du port de Sidi Fredj.

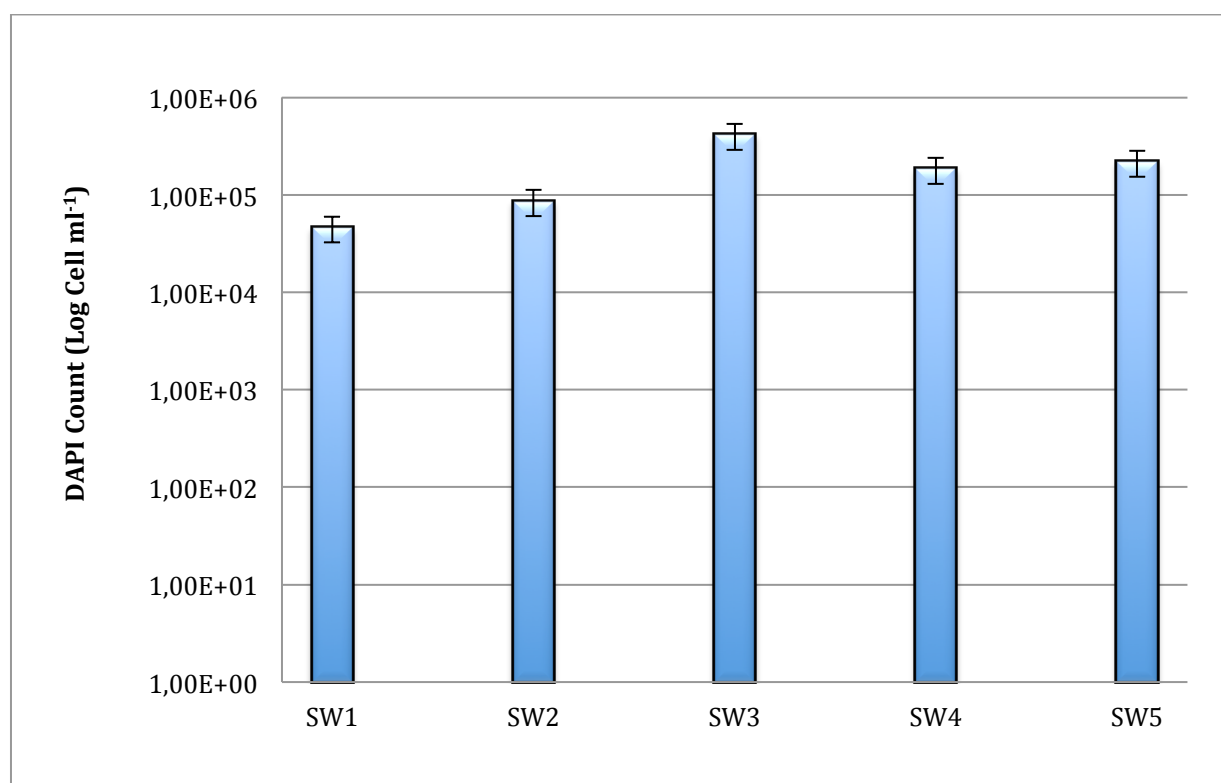


Figure 42. Abondance microbienne mesurée par DAPI count, dans les échantillons d'eau.

V.4 Les indices de diversité des échantillons d'eau et de sédiment par DGGE.

Afin de comparer la diversité bactérienne dans les échantillons d'eau de mer et de sédiments prélevés dans le port de Sidi Fredj, une technique indépendante à la culture « DGGE » a été réalisée. Les profils de diversité obtenus par cette méthode permettent d'estimer la diversité microbienne et de comparer des communautés bactériennes des différents échantillons. La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) est basée sur la séparation de produits

PCR de l'ADNr par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en fonction de leur composition en bases GC.

Dans un premier temps, la région variable V3 correspondant aux positions 341 à 534 de la séquence d'ARNr 16S d'*Escherichia coli* a été amplifiée par PCR à partir d'ADN génomique total en utilisant les amorces 341f-GC et 534r.

Les amplicons ont été ensuite visualisés sur gel d'agarose (1,5%) (figure 43).

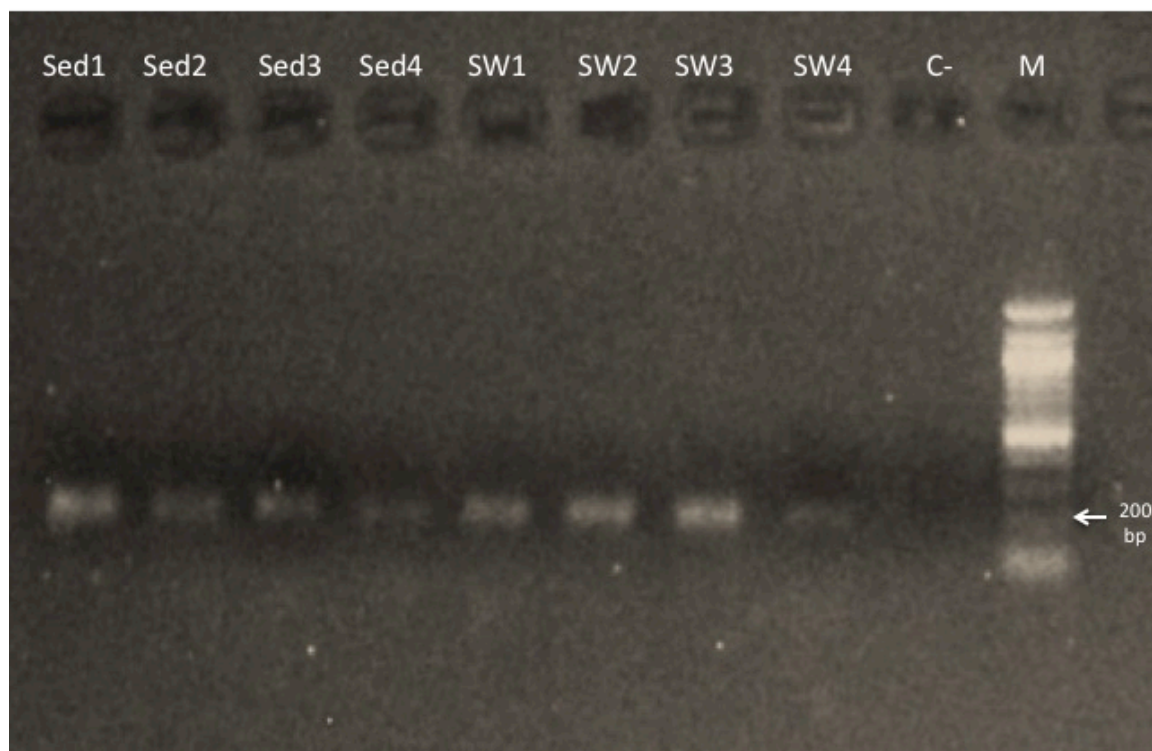


Figure 43. Gel d'électrophorèse des produits PCR de l'amplification de la région V3 à partir de l'ADN métagénomique des échantillons d'eau et de sédiment (Sed=sédiment, SW=seawater, C- : Contrôle négatif, M= marqueur de taille 100 bp)

Des amplicons de taille 190 bp ont été obtenus pour tous les échantillons d'eau et de sédiment des différentes stations. Les amplicons ont été par la suite séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Après 17h de migration, le gel a été colorié puis capturé avec un gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Les profils DGGE ont été analysés visuellement et à l'aide du logiciel Past 3. La présence ou l'absence de bandes à une distance de migration donnée, permet de générer une matrice à partir de laquelle le coefficient de similarité Jaccard est calculé (Sneath et Sokal, 1973). Des dendrogrammes selon la méthode *Neighbor-Joining* sont alors construits (figure 44, A).

Sept à trente et une bandes discernables ont été observées avec des intensités variables. Certaines bandes étaient spécifiques à un site donné, alors que d'autres étaient communes à plus d'un échantillon (figure 44, B). L'analyse visuelle des profils DGGE a révélé une similarité de la migration entre les différents échantillons.

Cependant l'analyse des profils DGGE par l'outil PAST a révélé que la composition de la communauté bactérienne de l'eau de mer et les sédiments étaient partiellement distincts, bien que quelques bandes identiques ont été identifiées dans tous les profils d'eau de mer et de sédiments. Les indices de diversité calculés pour chaque profil DGGE étaient en général plus élevés et plus variables dans les échantillons d'eau de mer que dans les échantillons de sédiment.

Tableau 19. Indices de diversité (PAST software) basés sur les profils DGGE des populations bactériennes présentes dans les échantillons d'eau et de sédiment du port de Sidi Fredj.

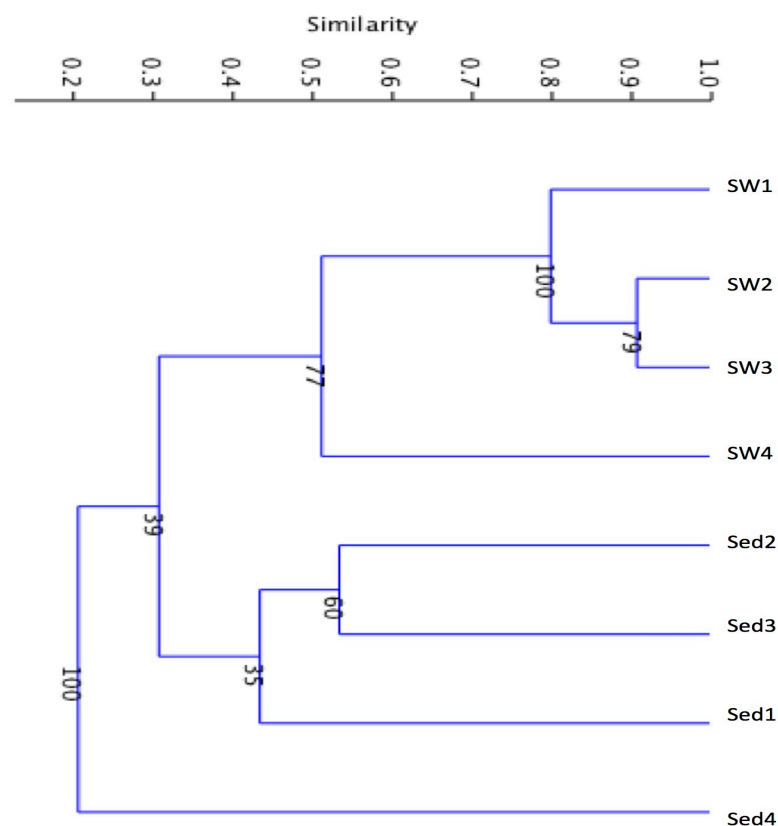
	Sédiment				Eau de mer			
	Sed1	Sed2	Sed3	Sed4	Sw1	Sw2	Sw3	Sw4
N	20	11	12	7	27	30	31	19
Bandes								
Shannon	3,00	2,40	2,48	1,95	3,30	3,40	3,43	2,94
Chao-1	210	66	78	28	378	465	496	190

Indice de Shannon $H = - \sum_i^s P_i \ln P_i$ avec P_i = proportion de la bande i soit $1/N$ avec N = nombre de bandes

Chao-1 = $N + \frac{N(N-1)}{2}$ avec N = nombre de bandes

Plus le nombre de bandes différentes sur l'électrophorétogramme est grand, plus la biodiversité est importante. L'échantillon d'eau de la station S3 présentait l'indice Chao de diversité le plus élevé (496), tandis que le sédiment provenant de la station S4, le plus bas (28) (tableau 19). L'indice moyen de Chao dans l'eau de mer était de 382.

(A)



(B)

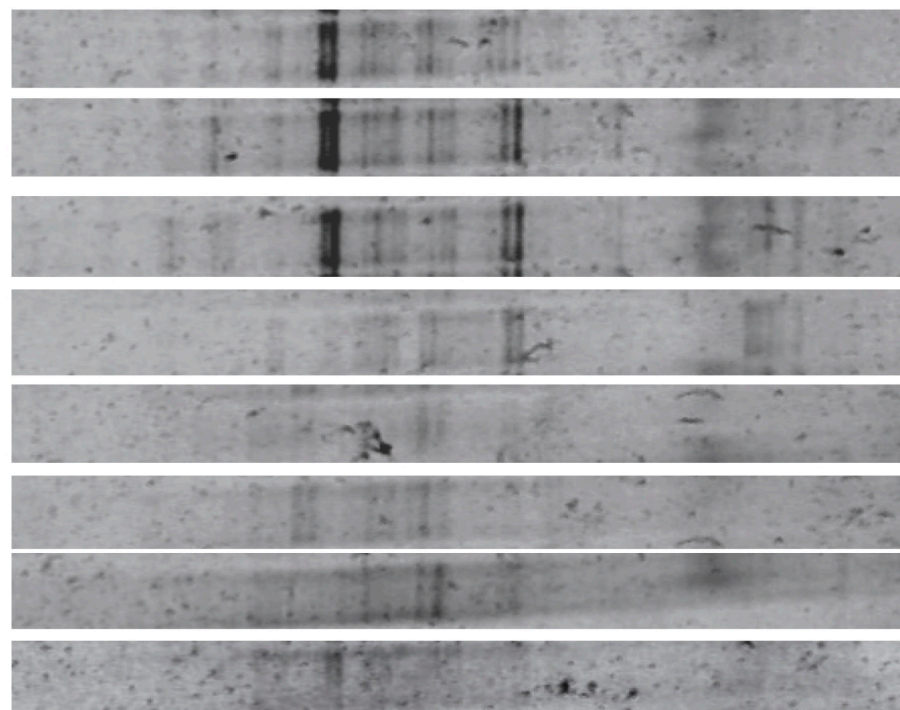


Figure 44: Diversité bactérienne de l'eau de mer et des sédiments du port de Sidi Fredj. (A) Dendrogramme d'analyse en grappes montrant la communauté bactérienne des échantillons d'eau de mer et de sédiment. Le coefficient de Jaccard et l'analyse par 100 bootstrap ont été utilisés pour mesurer la similarité entre les huit profils la DGGE. (B) Profils DGGE de la région V3 de l'ARNr 16S amplifiée par PCR à partir d'échantillons d'eau de mer et de sédiments de surface. Les échantillons Sw5 et sed5 sont manquants.

Le dendrogramme appliqué aux profils DGGE, a regroupé les profils des échantillons de sédiments et d'eau de mer sur deux branches différentes. Dans chacune de ces deux branches, les profils des stations S2 et S3 se sont regroupés. Les bandes de sédiments de la station S4 se trouvaient sur une branche différente, ce qui indique une communauté bactérienne totalement différente.

Catania et collaborateurs (2015) ont comparé la diversité bactérienne de l'eau de mer et du sédiment de surface de la baie de Priolo (Sicile) par DGGE et ont trouvé que les indices de diversité calculés pour chaque profil DGGE étaient en général plus élevés et plus variable dans les échantillons de sédiments que dans les échantillons d'eau. Contrairement aux résultats obtenus dans notre étude où les échantillons d'eau de mer étaient plus diversifiés que ceux du sédiment.

Des estimations récentes révèlent que les sédiments côtiers abritent les valeurs les plus élevées d'abondance microbienne (Mcgenity et al., 2014) et diversité biologique au sein du milieu marin (Zinger et al., 2011).

MacNaughton et collaborateurs (1999) estiment que la DGGE permet de détecter les espèces présentes à plus de 1 à 2% dans un échantillon environnemental. Pour leur parts, Muyzer et collaborateurs (1993) et Murray et collaborateurs (1996) considèrent que des populations présentes entre 0,1 et 1% au sein d'un échantillon peuvent être détectées par ces techniques d'électrophorèse et que ce sont les populations dominantes qui seront davantage analysées par cette technique.

V.5 Isolement et criblage des souches cultivables.

L'étude des micro-organismes en général repose sur leur culture dans des milieux ayant les caractéristiques nutritionnelles et physico-chimiques favorisant leur croissance, de manière à obtenir des colonies pures identifiables et caractérisées. Des cultures d'enrichissement des bactéries dégradant les hydrocarbures ont été préparés en utilisant un milieu minéral auquel des hydrocarbures sont ajoutés (pétrole brut, mélange d'alcane et un mélange d'hydrocarbures aromatiques) comme seule source de carbone et d'énergie.

L'approche dépendante à la culture basée sur l'isolement et l'identification des bactéries hydrocarbonoclastes nous a permis d'isoler une collection de 119 souches bactériennes provenant des échantillons contaminés d'eau de mer (74 souches) et de sédiments (45 souches) pendant une période d'incubation allant de 72h à une semaine à une température de 30°C sur du milieu ONR7 Agar (tableau 20).

Cinquante-quatre souches bactériennes ont été isolées à partir des cultures contenant le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie, 51 isolats ont manifesté une croissance en présence d'un mélange d'alcanes et 11 isolats en présence d'hydrocarbures aromatiques comme seule source de carbone et d'énergie.

Selon Tarayre (2012), le carbone des hydrocarbures joue le rôle de substrat pour la croissance des microorganismes. L'utilisation d'hydrocarbures par des micro-organismes a déjà été observée par ZoBell (1946), qui a reconnu qu'un grand nombre de micro-organismes sont capables d'utiliser des hydrocarbures comme unique source de carbone et d'énergie.

Tableau 20. Isolats bactériens totaux obtenus à partir des cultures d'enrichissement d'échantillons d'eau de mer et de sédiments sur différents substrats

Substrats	Sédiment	Eau de mer	Total
Pétrole brut ^a	25	29	54
<i>n</i> -alcanes ^b	14	37	51
Aromatiques ^c	6	8	14
Total	45	74	119

^a Pétrole brut léger Algérien

^b Mélange de *n*-alcanes (C₁₄, C₁₆, C₁₈)

^c mélange d'hydrocarbures aromatique (Benzène, Toluène, Xylène)

Les souches obtenues après enrichissement et purification ont été soumises à un criblage. Les souches présentant des taux de croissance les plus élevés avec pétrole brut comme unique source de carbone et d'énergie ont été sélectionnées.

Au total, 23 souches ont été sélectionnées (16 provenant des échantillons d'eau de mer et 7 des échantillons de sédiments).

V.6 Identification des souches sélectionnées.

Le développement des colonies a eu lieu après quelques jours (à partir du 3^{ème} jour d'incubation) sur milieu solide, Cependant la croissance est plus rapide en milieu liquide.

Les souches sélectionnées présentent des diversités morphologiques à caractères micro et macroscopiques. Les souches ont été répertoriés selon leur provenance (Sw : eau de mer et S: sédiment). Les caractères morphologiques des isolats sélectionnés sont résumés dans le tableau 21.

Tableau 21. Caractères morphologiques et biochimiques des souches sélectionnées

Substrats d'isolement	Station	Isolats	Couleur	Aspect	Forme	diamètre (mm)	Gram	Oxydase	Catalase
Pétrole brut	Sw1	PSF-30Sw	Crème	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1 mm	-	+	+
	Sw1	PSF-90Sw	Blanche	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1 mm	-	+	+
	Sw1	PSF-26Sw	beige	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1,5 mm	-	+	+
	Sed1	PSF-6S	Rouge orangé	Circulaire, plate, contour régulier, opaque	Bacille	2 mm	+	-	+
	Sw3	PSF-5Sw	Jaune	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1,5 mm	+	+	+
	Sw3	PSF-13Sw	Blanche	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1 mm	-	+	+
	Sed3	PSF-23S	Jaune	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque, lisse	Cocci	2 mm	+	-	+
	Sed3	PSF-31S	Beige rosé	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1,5 mm	-	+	+
	Sed4	PSF-18S	Transparente	Circulaire, convexe, contour irrégulier, translucide	Bacille	1 mm	-	+	-
	Sw3	PSF-16Sw	Blanc rosé	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque, lisse	Bacille	0,5 mm	-	+	+
n-alcanes	Sw3	PSF-12Sw	Blanche	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1 mm	-	+	-
	Sw3	PSF-34Sw	Crème	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1 mm	-	+	+
	Sw3	PSF-21Sw	Jaune crème	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1,5 mm	-	+	+
	Sed3	PSF-54S	Crème	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1 mm	-	+	+
	Sw2	PSF-15Sw	crème	Circulaire, convexe, contour irrégulier, translucide	Bacille	1 mm	-	+	-
	Sw2	PSF-14Sw	Jaune	Circulaire, convexe, contour irrégulier, translucide	Bacille	1,5 mm	-	+	-
	Sed3	PSF-84S	Blanche	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1 mm	-	+	-
	Sw4	PSF-88Sw	Blanche	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1 mm	-	+	-
	Sw5	PSF-3Sw	Blanche	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1 mm	-	+	-
	Sw5	PSF-8Sw	Jaune	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1 mm	-	-	+
Aromatiques	Sw1	PSF-35Sw	Jaune	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque, lisse	Bacille	2 mm	-	+	+
	Sed1	PSF-42S	Blanche	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1,5 mm	-	+	+
	Sw3	PSF-43Sw	Blanche	Circulaire, convexe, contour régulier, opaque	Bacille	1,5 mm	-	+	+

Selon les résultats obtenus, les souches sélectionnées sont circulaires, de tailles petites à moyennes (diamètre entre 0,5 et 2 mm), toutes les souches sont en forme de bâtonnets (à l'exception de la souche PSF-23S), à contour régulier, des colonies blanches, crèmes, jaunes, roses et rouge à croissance relativement lente.

Cette étude a montré la prédominance des bactéries Gram négatif ce qui est en accord avec les résultats décrits dans la littérature (Juhász et Naidu, 2000 ; Hagström et al., 2002; Roling et al., 2002 ; Chouari, 2003; Margesin et al., 2003; Gargouri et al., 2012; M'Rassi, 2014).

Selon Pelmont (1995) les bactéries aptes à biodégrader les hydrocarbures sont majoritairement des bacilles Gram négatif. Ces bactéries sont moins sensibles aux composés toxiques que les bactéries à Gram positif (Stancu et grifoll, 2011).

Selon Soltani (2004), des changements dans les paramètres de l'environnement (température, salinité, pH, source de carbone, ...) sont accompagnés par des modifications dans la composition membranaire, et en particulier les acides gras membranaires dans le but de protéger la bactérie. La complexité de la paroi cellulaire bactérienne à Gram négatif, pourrait entraver la pénétration de certaines substances et de leur entrée dans le cytoplasme.

Seulement trois bactéries à Gram positif ont été isolées. Même si le rôle des bactéries à Gram positif dans la biodégradation des hydrocarbures est moins connu, ces organismes se sont révélés des candidats potentiels pour des applications biotechnologiques (Das et Chandran, 2011). Les bactéries Gram+, et plus particulièrement celles appartenant au phylum des Actinobactéries, sont aussi impliquées dans la dégradation des hydrocarbures.

V.7 Caractérisation moléculaire des souches sélectionnées.

L'ADN a été directement extrait des souches puis l'ADN 16S a été amplifié par PCR grâce aux amorces universelles du domaine *Bacteria*. Des fragments d'environ 1500 pb ont été obtenus (figure 45).

Les produits PCR ont ensuite été purifiés et séquencés. Les séquences ont été comparées avec les séquences de la banque de données dans Genbank-BLASTn. Les résultats sont présentés dans le tableau 22. Les séquences déterminées dans cette étude, sont déposées à GenBank database du National Center for Biotechnology Information (NCBI) et désignées sous les numéros d'Accession de MH425630 à MH425652.

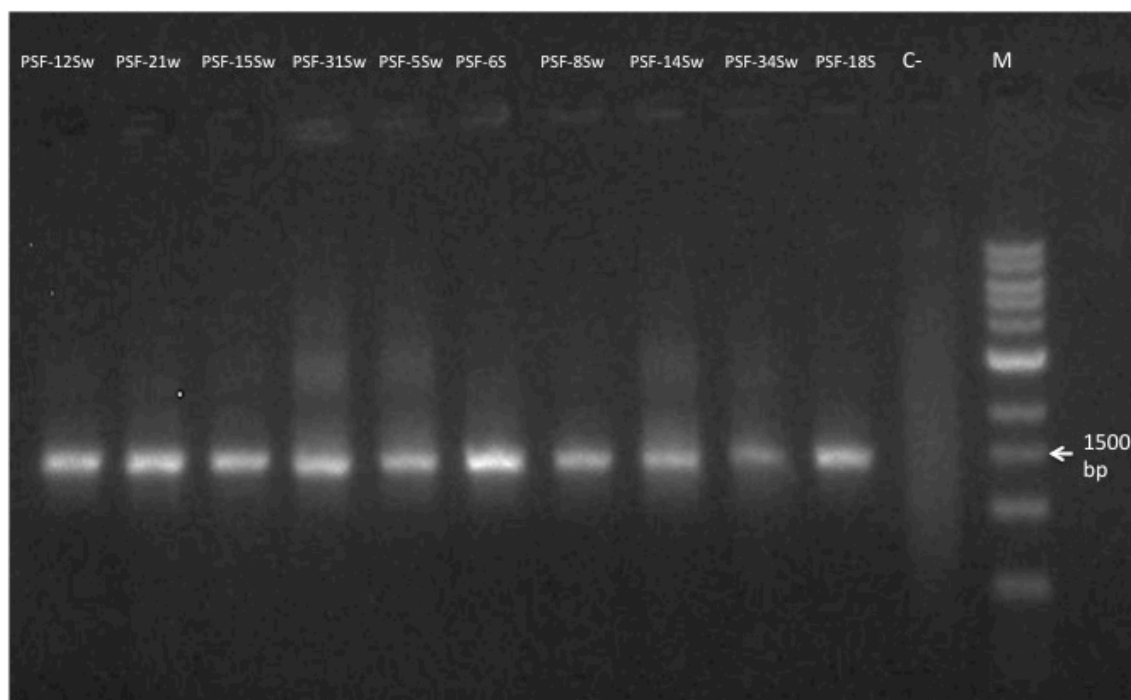


Figure 45. Gel d'électrophorèse des produits PCR d'ADNr16S des souches sélectionnées (C-=Contrôle négatif, M= marqueur de taille 1k bp)

Dans la présente étude, la recherche de micro-organismes susceptibles d'utiliser des hydrocarbures pétroliers reposait sur leur capacité à se développer dans un milieu minéral contenant des hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie. L'alignement des séquences dans les bases de données NCBI Genbank et RDP (Ribosomal Database Project) a montré une affiliation des souches sélectionnées à trois phyla bactériens: Proteobacteria (19 isolats), Actinobacteria (3 isolats) et Bacteroidetes (un isolat). Les protéobactéries représentaient près de 83% des souches isolées, suivies d'Actinobacteria (13%) et des Bacteroidetes (4%).

Les souches identifiées appartiennent à différents genres précédemment rapportés comme dégradant les hydrocarbures. Le groupe des protéobactéries se rencontre couramment dans les communautés microbiennes exposées à la pollution par les hydrocarbures ([McKew et al., 2007](#)).

Tableau 22. Identification des souches bactériennes isolées des échantillons de sédiments et d'eau de mer du port de Sidi Fredj (SW: Seawater, Sed: sédiment)

Isolats	Phylogénie			Blast 16S	Id. (%)	Accession number
	Phylum	Classe	Famille	Espèce		
PSF-5Sw	Actinobacteria	Actinobacteria	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium celere</i> strain KMM 3637	99%	NR_025727.1
PSF-6S			Gordoniaceae	<i>Gordonia hongkongensis</i> strain HKU50	99%	NR_152023.1
PSF-23S	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Micrococcaceae	<i>Micrococcus yunnanensis</i> strain YIM 65004	99%	NR_116578.1
PSF-8Sw			Flavobacteriaceae	<i>Xanthomarina gelatinilytica</i> strain AK20	100%	NR_145579.1
PSF-14Sw	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Erythrobacteraceae	<i>Erythrobacter citreus</i> strain RE35F/1	99%	NR_028741.1
PSF-16Sw			Rhodobacteraceae	<i>Labrenzia aggregata</i> strain NBRC 16684	99%	NR_113861.1
PSF-12Sw	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Alcanivoracaceae	<i>Alcanivorax borkumensis</i> strain SK2	99%	NR_074890.1
PSF-90Sw				<i>Alcanivorax borkumensis</i> strain SK2	99%	NR_074890.1
PSF-88Sw				<i>Alcanivorax borkumensis</i> strain SK2	99%	NR_074890.1
PSF-3Sw				<i>Alcanivorax borkumensis</i> strain SK2	100%	NR_074890.1
PSF-84S				<i>Alcanivorax borkumensis</i> strain SK2	99%	NR_074890.1
PSF-30Sw				<i>Alcanivorax xenomutans</i> strain JC109	99%	NR_133958.1
PSF-34Sw				<i>Alcanivorax xenomutans</i> strain JC109	99%	NR_133958.1
PSF-54S				<i>Alcanivorax xenomutans</i> strain JC109	100%	NR_133958.1
PSF-18S				<i>Alcanivorax dieselolei</i> strain B5	99%	NR_074734.1
PSF-13sw			Halomonadaceae	<i>Halomonas venusta</i> strain NBRC 102221	99%	NR_114048.1
PSF-31S			Alteromonadaceae	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> strain ATCC 49840	99%	NR_074619.1
PSF-26Sw				<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> strain ATCC 49840	99%	NR_074619.1
PSF-42S			Pseudomonadaceae	<i>Marinobacter nitratreducens</i> strain AK21	99%	NR_136469.1
PSF-43Sw				<i>Marinobacter nitratreducens</i> strain AK21	99%	NR_136469.1
PSF-15Sw				<i>Marinobacter zhanjiangensis</i> strain JSM 078120	99%	NR_116657.1
PSF-21sw				<i>Pseudomonas taiwanensis</i> strain BCRC 17751	99%	NR_152090.1
PSF-35sw				<i>Pseudomonas oceani</i> strain DSM 100277	99%	NR_116172.1

Les protéobactéries étaient composées de sous-divisions Alpha et Gammaproteobacteria. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment (Mahjoubi et al., 2013). Ces auteurs ont isolé des bactéries dégradant les hydrocarbures à partir d'un site contaminé en Tunisie et le groupe bactérien dominant était aussi les protéobactéries. Nos résultats sont aussi en accord avec ceux d'autres études (Juhász et Naidu, 2000 ; Vasconcellos et al., 2009; Ben Said et al., 2010) qui ont indiqué que ces bactéries sont indigènes des environnements marins pollués par les hydrocarbures et pourraient jouer un rôle écologique important dans la bioremédiation. D'autres études ont également montré que la plupart des isolats bactériens des environnements contaminés par les hydrocarbures sont à Gram négatif appartenant à la sous-classe gamma-protéobactéries (Batista et al., 2006). Leur dominance peut être expliquée par leur membrane lipopolysaccharide qui peut jouer le rôle de biosurfactant (Vasconcellos et al., 2009).

Du point de vue diversité taxonomique, la classe des Gammaproteobacteria est la plus représentée avec quatre genres et neuf espèces. Les souches appartenant à cette classe ont été détectées comme les principaux dégradeurs d'hydrocarbures pétroliers (Gao et al., 2015).

Des changements dans la composition de la communauté bactérienne sont généralement observés après un apport d'hydrocarbures, ce qui provoque une pression sélective qui entraîne une perte de diversité et un enrichissement de la communauté par des membres capables de tolérer et / ou de dégrader les hydrocarbures (Acosta-González et Marqués, 2016). Une tendance commune s'observe dans le déplacement des communautés microbiennes vers des sites hautement contaminés, ce qui entraîne généralement la prédominance des gammaprotéobactéries, considérées comme les espèces microbiennes "les mieux adaptées" dans les environnements pollués (Fuentes et al., 2014).

Dans nos conditions expérimentales et dans toutes les stations d'échantillonnage, *Alcanivorax* est le genre le plus prépondérant et le plus souvent isolé (9 isolats) et était représenté par trois espèces: *Alcanivorax borkumensis* (5 isolats), *Alcanivorax xenomutans* (3 isolats) et *Alcanivorax dieselolei* (1 isolat).

Les espèces d'*Alcanivorax* sont des bactéries à Gram négatif qui nécessitent généralement un hydrocarbure aliphatique comme seule source de carbone pour leur croissance. La possibilité d'utiliser le pétrole comme source d'énergie dans des environnements pollués rend les espèces d'*Alcanivorax* pertinentes sur le plan biotechnologique pour la bioremédiation.

L'espèce type du genre est *Alcanivorax borkumensis* qui a été isolée de l'île de Borkum, dans la mer du Nord, située près de la frontière germano-néerlandaise (Yakimov et al., 1998). C'est le premier et le plus étudié des membres de ce genre (Schneiker et al., 2006).

Alcanivorax borkumensis est une bactérie qui utilise les alcanes, principaux constituants du pétrole brut, comme principale source d'énergie pour la production de biosurfactants lipidiques de glucose (Kasai et al., 2002; Yakimov et al., 1998). On la trouve principalement dans l'eau de mer contenant du pétrole résultant d'un déversement d'hydrocarbures ou d'autres sources (Shao et Wang, 2013). Les caractéristiques distinctives d'*A. borkumensis* par rapport aux autres espèces pourraient être la flexibilité de son ADN et de son métabolisme, ce qui permet à la bactérie de supplanter d'autres espèces bactériennes, car elle consomme une plus grande variété d'alcanes (Hara et al., 2003). *Alcanivorax borkumensis* est l'espèce la plus étudiée parmi les bactéries hydrocarbonoclastes marines, n'a jusqu'à présent été cultivée qu'en présence de différents hydrocarbures et pyruvate en tant que sources uniques de carbone et d'énergie (Yakimov et al., 2007). En raison de sa capacité à utiliser une grande variété d'hydrocarbures aliphatiques, *A. borkumensis* se développe grandement lors de marées noires et peut représenter jusqu'à 80 à 90% de la communauté bactérienne associée (Hara et al., 2004; Yakimov et al., 2005).

Les propriétés communes des espèces identifiées d'*Alcanivorax* comprennent (i) la capacité à utiliser des hydrocarbures comme source unique de carbone; (ii) capacité à produire des lipides extracellulaires dans des conditions d'excès de carbone et de disponibilité limitée en azote, telles que les déversements d'hydrocarbures, et (iii) capacité à se développer dans les environnements salins (Yakimov et al., 1998 ; Liu et Shao, 2005 ; Rahul et al., 2014).

Le second genre le plus fréquemment isolé est *Marinobacter* (5 isolats), représenté par : *Marinobacter zhanjiangensis* (Id 99%), *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (Id 99%) et *Marinobacter nitratreducens* (Id 99%).

Les bactéries étroitement liées à *Marinobacter* sont considérées comme des acteurs majeurs de la bioremédiation des environnements marins contaminés par le pétrole (Kasai et al., 2002; Catania et al., 2015). Il est bien connu que ces bactéries marines utilisent les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. Ces bactéries ont été également utilisées pour la biorestauration des systèmes marins et côtiers pollués (Cappello et Yakimov, 2010).

La dominance de ces deux genres (*Alcanivorax* et *Marinobacter*) a également été observée dans les sédiments contaminés du port de Dalian Xingang (Chine), indiquant la réaction rapide d'*Alcanivorax* et de *Marinobacter* à la pollution par les hydrocarbures (Chen et al., 2017).

Alcanivorax peut utiliser les alcanes comme seule source de carbone (Harayama et al., 2004) et il existe des preuves démontrant que *Marinobacter* est responsable de la dégradation du benzène, du toluène, de l'éthylbenzène et du xylène (BTEX) (Vila et al., 2010).

Dans les milieux pollués, la diversité microbienne diminue et seule des souches capables d'utiliser les hydrocarbures survivent et prédominent (Huang et al., 2010). Ces données peuvent expliquer la prédominance des deux genres bactériens identifiés (*Alcanivorax* et *Marinobacter*) sur le reste des populations, mais sans pour autant négliger l'importance de chaque membre de la communauté microbienne qui fonctionne en consortium.

Les bactéries hydrocarbonoclastes telles qu'*Alcanivorax* et *Marinobacter* sont bien connues pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures seuls avec un taux élevé (Cappello et al., 2016), mais une seule espèce ne peut métaboliser qu'un nombre limité de substrats d'hydrocarbures car elle ne possède pas toute la machinerie enzymatique nécessaire pour dégrader un polluant jusqu'à sa minéralisation complète (Mahjoubi et al., 2013). Pour cette raison, un consortium de nombreuses espèces bactériennes différentes, ayant de larges capacités enzymatiques, est généralement impliqué dans la dégradation du pétrole (Röling et al., 2002; De Pasquale et al., 2012). La présence d'*Alcanivorax* et de *Marinobacter* dans des environnements naturels est généralement associée à la présence d'autres souches bactériennes (Santisi et al., 2015).

Dans cette étude, d'autres genres tels que *Pseudomonas*, *Erythrobacter*, *Gordonia*, *Halomonas*, *Labrenzia* ont été isolés. Ces souches ne peuvent pas être classées comme bactéries hydrocarbonoclastes mais sont des agents dégradants d'hydrocarbures généralistes.

Les genres *Halomonas* et *Pseudomonas* jouent un rôle important dans la dégradation des hydrocarbures halogénés et dans les mécanismes de «récupération assistée du pétrole par des microbes» (MEOR), dans les réservoirs de pétrole (Piubeli et al., 2014 ; Gao et al., 2015).

Pseudomonas est l'un des genres bactériens les plus ubiquistes dans le monde, et différentes espèces ont été isolées de niches écologiques diverses. Il est très souvent dominant dans les sites contaminés aux hydrocarbures (Evans et al., 2004). Il semble être impliqué dans les premières phases des procédés de bioremédiation lorsque les polluants sont disponibles (Kaplan et Kitt, 2004). *Erythrobacter* et *Labrenzia* ont été identifiés en tant que dégradeurs d'hydrocarbures aromatiques (Al-Awadhi et al. ; 2012; Gao et al., 2015), tandis que *Gordonia* aurait fréquemment été décrite comme pouvant utiliser des composés aliphatiques ou aromatiques comme substrat de croissance (Lo Piccolo et al., 2011).

D'autres bactéries à Gram positif appartenant aux groupes micrococcaceae et brevibacteriaceae, ont été isolées et ont souvent été décrites dans la littérature comme étant isolées d'environnements contaminés par des hydrocarbures (Chaillan et al., 2004).

Un isolat a été identifiés comme appartenant aux Bacteroidetes-Chlorobi (Flavobacteria et

Sphingobacteria). Ces bactéries ont été découvertes dans des environnements contaminés par du pétrole, suggérant leur rôle possible dans la biodégradation. (Brakstad et Lodeng 2005 ; catania, 2018). Cet isolat est *Xanthomarina gelatinilytica* (Flavobacteriaceae, 100% d'identité de séquence). Cette bactérie a été isolée pour la première fois dans de l'eau de mer provenant d'Inde (Vaidya et al., 2015), mais n'a jamais été isolée de la mer Méditerranée ni de milieux contaminés par des hydrocarbures.

Une étude menée au niveau des ports d'Annaba et d'El Kala, dont le but était d'isoler des bactéries marines autochtones dégradant les hydrocarbures a permis d'isoler quatre bactéries identifiées comme : *Halomonas venusta*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Vibrio alginolyticus* et *Dietzia sp.* (Feknous et al., 2017). *H.venusta* a également été isolé au niveau du port de Sidi Fredj

Nos résultats sont similaires à ceux obtenu par Tapilatu et collaborateurs (2010) qui ont isolé des bactéries dégradant les hydrocarbures à partir des sédiments marins de la Côte française (nord-ouest de la Méditerranée), et ont trouvé que la majorité des isolats appartenaient à *Alcanivorax*. Dans la même étude, les bactéries dégradant les alcanes appartenant aux les genres *Pseudomonas* et *Marinobacter* ont également été isolées. Catania et collaborateurs (2015) ont étudié la diversité des communautés bactériennes dégradant les hydrocarbures dans la baie de Priolo (Mer Ionienne, Méditerranée centrale) et ont constaté que les bactéries sont principalement affiliées à des genres de bactéries hydrocarbonoclastes spécialistes (*Alcanivorax*) et / ou au généraliste (*Thalassospira*, *Oleibacter*, *Vibrio*, *Marinobacter*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*) et que la plupart des échantillons de sédiments et d'eau étaient dominés par des bactéries apparentées aux genres *Alcanivorax* et *Marinobacter*. Nos résultats d'isolement et d'identification ont corroborés les données de la littérature sur la présence de ces bactéries aérobies dans les échantillons d'eau de mer et des sédiments contaminés par le pétrole ; ce qui soutient l'hypothèse que ces bactéries pourraient jouer un rôle dans les processus de biodégradation des hydrocarbures pétroliers *in situ*.

V.8 Analyses phylogénétiques.

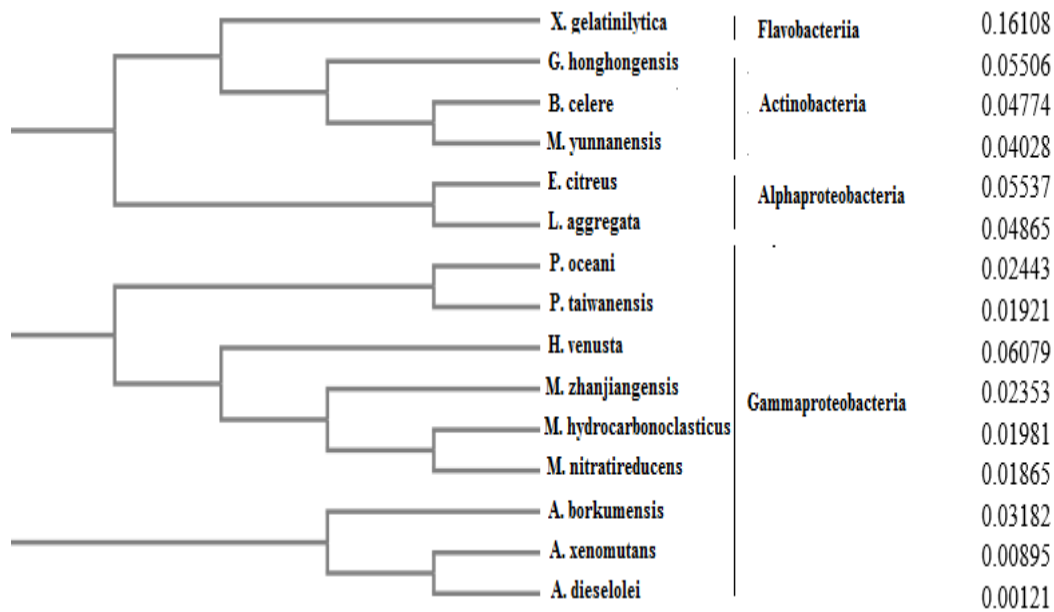


Figure 46. Cladogramme basé sur les alignements des séquences 16S des différentes bactéries. Les distances génétiques sont indiquées à droite.

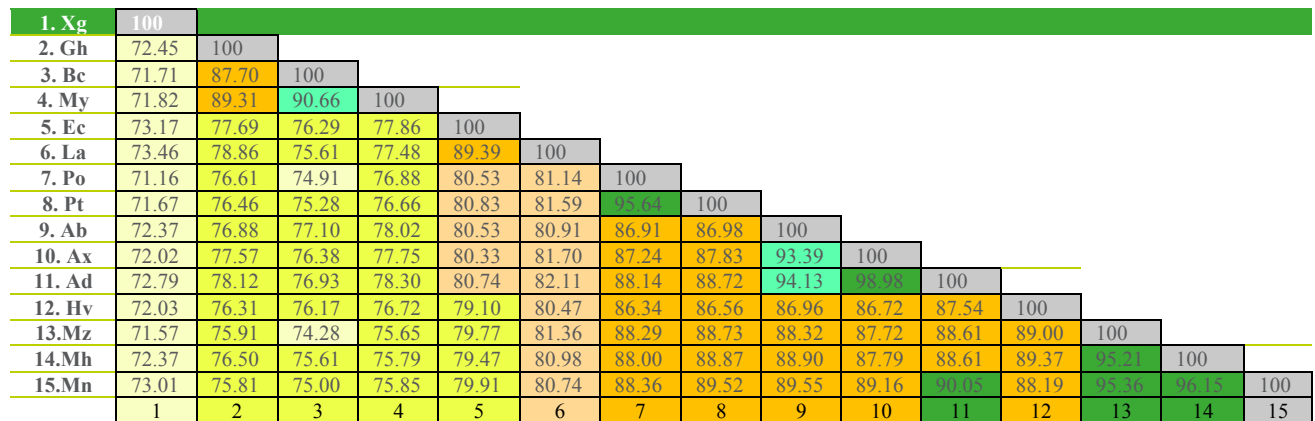
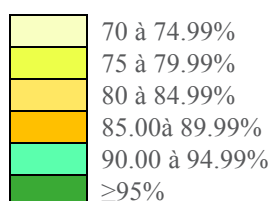


Figure 47. Matrice d'identité entre les séquences 16S des bactéries identifiées prises deux à deux. Xg: *Xanthomarina gelatinilytica*; Gh: *Gordonia Honghongsensis*; Bc: *Brevibacterium celere*; My: *Micrococcus yunnanensis*; Ec: *Erythrobacter citreus*; La: *Labrenzia aggregata*; Po: *Pseudomonas oceani*; Pt: *Pseudomonas taiwanensis*; Ab: *Alcanivorax burkomensis*; Ax: *Alcanivorax xenomutans*; Ad: *Alcanivorax dieselolei*; Hv: *Halomonas venusta*; Mz: *Marinobacter zhanjianfensis*; Mh: *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*; Mn: *Marinobacter nitratreducens*.



Sur le cladogramme (figure 46), on constate que les bactéries ségrégent selon leur classe. Les flavobactéries constituent un groupe taxonomiquement séparé. La distance génétique est la plus élevée (16%) par rapport aux autres bactéries. On constate aussi que le groupe des Gammaproteobactéries est homogène avec une distance génétique maximale de l'ordre de 5%. L'analyse de la matrice d'identité indique que *X. gelatinilytica* présente le moins d'homologie avec les autres bactéries alors que les bactéries du genre *Alcanivorax* sont les plus semblables.

V.9 Profils d'utilisation des hydrocarbures.

La capacité d'utiliser les hydrocarbures comme source principale de carbone et d'énergie est l'une des caractéristiques principales des bactéries hydrocarbonoclastes.

Afin de tester la capacité à utiliser diverses sources d'hydrocarbures comme source de carbone, les souches sélectionnées ont été cultivées dans le milieu minéral (ONR7a) additionné de 1% v / v de : pétrole brut, d'hydrocarbures à chaînes moyenne (n-hexadécane (C₁₆)), à chaînes longues (n-hexacosane (C₂₆), n-octacosane (C₂₈)), et des hydrocarbures aromatiques : benzène, toluène et xylène comme unique source de carbone et d'énergie. La croissance microbienne a été évaluée par spectrophotométrie. La densité optique (600 nm) a été mesurée après une semaine d'incubation à 30°C avec agitation.

Selon (Das et Chandran, 2011), dans la nature les hydrocarbures pétroliers sont dégradés par divers groupes de micro-organismes capables d'utiliser les hydrocarbures comme nutriments. La croissance des souches isolées sélectionnées en présence des différents hydrocarbures comme unique source de carbone a permis d'obtenir les résultats représentés dans le tableau 23.

Il a été noté que la plupart des souches testées étaient capables de métaboliser le pétrole brut et les hydrocarbures aliphatiques alors que la fraction aromatique était métabolisée par seulement 5 souches. Les hydrocarbures aromatiques sont plus résistants à la biodégradation que les composés aliphatiques; ils causent souvent de graves problèmes lors de la bioremédiation (Rajaei et al., 2011).

Tableau 23. Profils d'utilisation des hydrocarbures par les isolats sélectionnés (- : OD<0,1, (+) : 0,21<OD<0,4 croissance faible, (++) : 0,41<OD<0,6 croissance modérée, (+++) : 0,61<OD<0,80 croissance élevée, (++++) OD> 0,80 croissance excellente) Selon le classement de (Rahman et al., 2002)

Isolats		Hydrocarbures						
		Pétrole brut	C ₁₆	C ₂₆	C ₂₈	Benzène	Toluène	Xylène
PSF-30Sw	<i>Alcanivorax xenomutans</i>	++++	++	+	+	-	-	-
PSF-90Sw	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	+++	+++	-	+	-	-	-
PSF-26Sw	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	+++	+++	+	+	-	-	-
PSF-6S	<i>Gordonia hongkongensis</i>	++++	+++	+++	++	-	-	-
PSF-5Sw	<i>Brevibacterium celere</i>	++	+++	++	+	-	-	-
PSF-13Sw	<i>Halomonas venusta</i>	+	++	-	-	-	-	-
PSF-23S	<i>Micrococcus yunnanensis</i>	+	+	-	-	-	-	-
PSF-31S	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	++++	++++	++	++	-	+	-
PSF-18S	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	++	++	++	++	-	-	-
PSF-16Sw	<i>Labrenzia aggregata</i>	+	-	-	-	+	-	-
PSF-12Sw	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	+++	++++	+++	+	-	-	-
PSF-34Sw	<i>Alcanivorax xenomutans</i>	++++	+++	+	+	-	-	-
PSF-21Sw	<i>Pseudomonas taiwanensis</i>	+	++	-	-	-	-	-
PSF-54S	<i>Alcanivorax xenomutans</i>	++++	+	++	++	-	-	-
PSF-15Sw	<i>Marinobacter zhanjiangensis</i>	+++	++++	++	++	-	-	-
PSF-14Sw	<i>Erythrobacter citreus</i>	+	+	+	-	+	-	-
PSF-84S	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	+++	+++	++	+	-	-	-
PSF-88Sw	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	++	++++	+	-	-	-	-
PSF-3Sw	<i>Alcanivorax borkumensis</i>	++++	+++	+++	+	-	-	-
PSF-8Sw	<i>Xanthomarina gelatinilytica</i>	++	+++	-	-	-	-	-
PSF-35Sw	<i>Pseudomonas oceani</i>	+++	++	+++	+	-	-	+
PSF-42S	<i>Marinobacter nitratireducens</i>	+++	++	+++	++	-	-	+
PSF-43Sw	<i>Marinobacter nitratireducens</i>	++++	+	++	++	-	-	+

Selon Atlas, 1981 et Leathy et Colwell (1990), l'ordre décroissant de la biodégradabilité est comme suit : alcanes linéaires> alcanes ramifiés>composés aromatiques alkylés de faibles poids moléculaire>composés monoaromatiques> alcanes cycliques> polyaromatiques >> asphaltènes.

Les résultats montrent que toutes les souches ont manifesté une croissance en présence du pétrole brut en tant que source de carbone avec des rendements divers. Les souches PSF-34Sw et PSF-6S appartenant aux genres *Alcanivorax* et *Gordonia*, se sont révélées les plus efficaces avec des densités optiques de 1,32 et 0,98 respectivement. Ces résultats sont plus élevés que ceux obtenus par Hassanshahian et collaborateurs (2012) qui ont isolés des bactéries hydrocarbonoclastes du Golfe persique. Les densités optiques enregistrées pour *Alcanivorax* et *Gordonia* sont de 0,68 et 0,52 respectivement après une semaine d'incubation à 30°C.

Des résultats similaires aux notre, en ce qui concerne la croissance en présence de pétrole brut (DO à 600) ont été obtenus par [Mnif et collaborateurs \(2011\)](#), qui ont isolés des bactéries hydrocarbonoclastes à partir des eaux de production des champs pétrolifère offshore en Tunisie, et ont enregistré des densités optiques allant de 0,45 à 1,2.

Les souches appartenant au genre *Marinobacter* et *Pseudomonas* ont également manifesté une très bonne croissance en présence de pétrole brut (OD>0,7). Les mêmes résultats ont été obtenus par [Zenati et collaborateurs \(2018\)](#) pour la souche *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (DO=0,79), isolée du port de Khemisti (Tipaza).

Toutes les souches ont pu croître en présence du n-hexadécane en tant que source de carbone à l'exception de la souche PSF-16Sw affiliée au genre *Labrenzia*.

Dix isolats ont pu se développer sur tous les hydrocarbures aliphatiques testés (n-hexadécane, n-hexacosane et n-octacosane); cependant, aucun d'entre eux ne s'est développé sur un milieu contenant des hydrocarbures aromatiques. Ces isolats sont affiliés à *Alcanivorax* (PSF-3Sw, PSF-12Sw, PSF-30Sw, PSF-18S, PSF-54S et PSF-84S), *Marinobacter* (PSF-15Sw, PSF-26Sw), *Gordonia* (PSF-6S) et *Brevibacterium* (PSF-5Sw). Ces souches sont bien connues en tant que bon dégradeurs d'alcanes. *Xanthomarina gelatinilytica* (PSF-8Sw) a montré une croissance significative en utilisant le n-hexadécane comme seule source de carbone et d'énergie.

Uniquement cinq isolats ont pu se développer sur les deux fractions aliphatiques et aromatiques, à savoir: *Erythrobacter citreus* (PSF-14Sw), *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (PSF-31S), *Pseudomonas oceani* (PSF-35Sw) et *Marinobacter nitratreducens* (PSF-43Sw, PSF-42S). Ces souches à l'exception d'*Erythrobacter* ont été les plus performantes et ont manifesté une croissance en présence des deux fractions d'hydrocarbures aliphatiques et aromatiques.

V.10 Cinétique de croissance des souches isolées.

Pour la cinétique de croissance, chaque genre est représenté par un isolat. Les mesures de la densité optique au cour du temps (13 jours) des souches testées en présence de pétrole brut comme unique source de carbone et d'énergie nous a permis de tracer les courbes représentées dans la figure 48.

Les mesures de densités optiques ont montré que les bactéries testées ont la capacité d'utiliser le pétrole brut comme substrat de croissance. Le degré de turbidité diffère d'une bactérie à une autre ce qui peut être du probablement à l'attaque initiale de la source de carbone qui diffère d'une souche à l'autre et les caractéristiques individuelles de la croissance.

Les souches affiliées aux genres *Alcanivorax*, *Marinobacter* et *Gordonia* sont les plus performantes et montrent un meilleur potentiel à dégrader le pétrole brut. [Zenati et collaborateurs \(2018\)](#) ont également noté que *Marinobacter* était la bactérie la plus performante parmi une collection de 15 souches isolées d'un échantillon de sédiment prélevé du port de Khemisti (Tipaza).

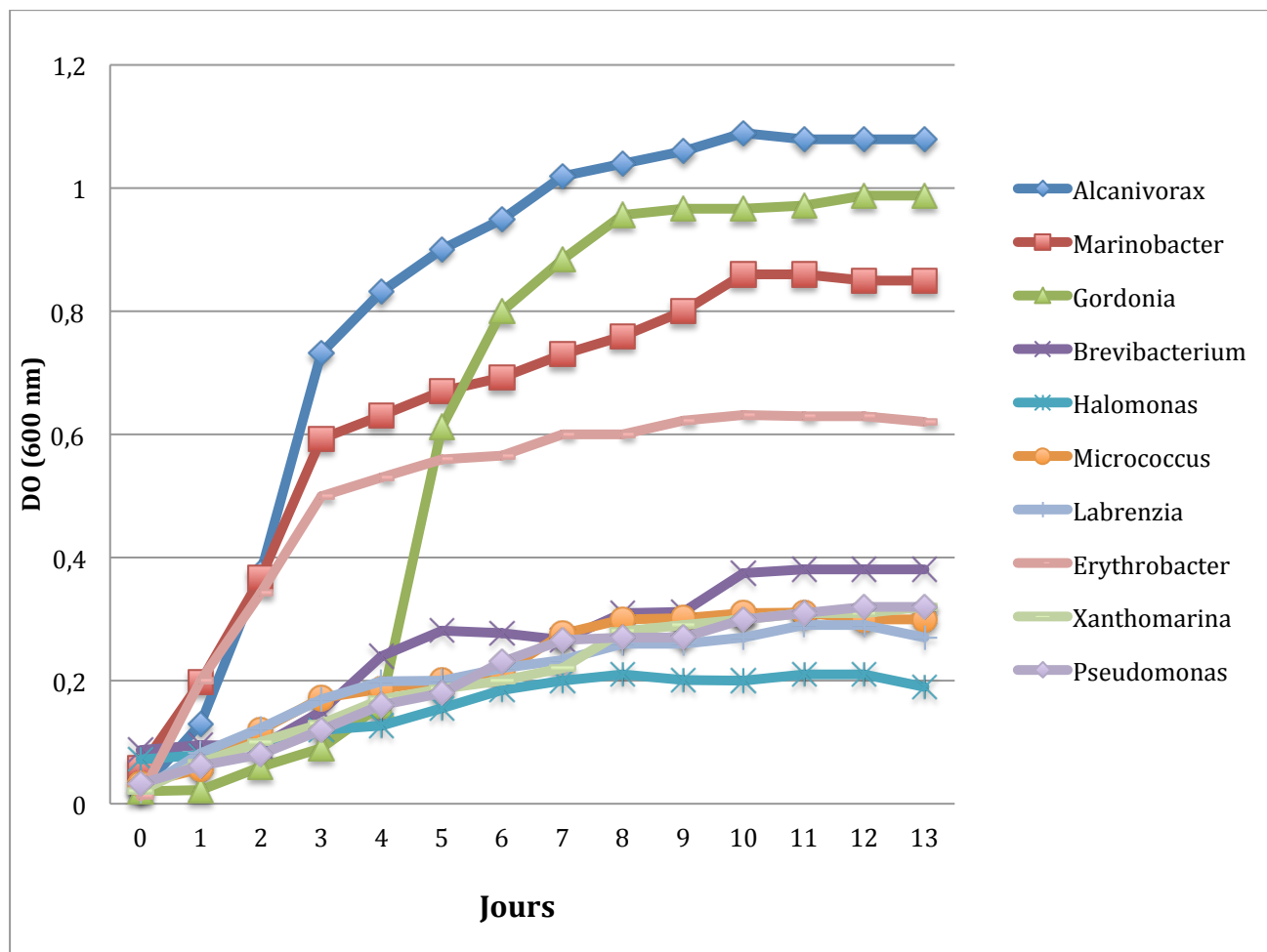


Figure 48. Courbes de croissance (DO) des bactéries en présence de pétrole brut pendant 13 jours d'incubation à 30°C

Alcanivorax, *Marinobacter* et *Erythrobacter* présentent une similarité de trajet de croissance, on remarque une absence de phase de latence et un passage direct à la phase exponentielle jusqu'au troisième jour d'incubation ce qui démontre une adaptation plus rapide de ces souches à la source de carbone utilisée. La croissance devient linéaire entre le 4^{ème} et 10^{ème} jours d'incubation où le pétrole brut est utilisé comme source d'énergie pour la croissance bactérienne. La croissance est limitée après le dixième jour d'incubation processus au cours duquel le pétrole n'est plus utilisé pour la croissance bactérienne mais est dégradé du fait de l'activité métabolique.

Contrairement aux souches précédentes, chez *Gordonia*, on a pu observer une phase de latence. La bactérie a pris du temps pour synthétiser les enzymes adaptées au substrat (pétrole brut). Le maximum de croissance est atteint au bout du 8^{ème} jour d'incubation.

La croissance bactérienne pour les souches affiliées à *Labrenzia*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Micrococcus* et *Xanthomarina* a été linéaire du premier au huitième jour d'incubation puis une phase stationnaire a été observée jusqu'au dernier jour d'incubation. Cependant les densités optiques mesurées ont été inférieures à celle observées pour les souches précédentes.

V.11 Détection des gènes de dégradation.

V.11.1 Le gène *alkB*.

La capacité catabolique des bactéries à utiliser les hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie, dépend de la présence dans leur génome de gènes codants pour les enzymes qui interviennent dans la voie de dégradation des polluants. L'une des enzymes clés intervenant dans la première étape de la dégradation des alcanes est la monooxygénase *alkB*. Cette enzyme, qui introduit des atomes d'oxygène dérivés de l'oxygène moléculaire dans le substrat d'alcane, joue un rôle important dans la biodégradation du pétrole brut. À ce jour, des *alkB* ont été trouvés dans divers environnements, tels que les sédiments d'Alaska, sol contaminé, écosystèmes froids, site contaminé, un sol en vrac, sol arctique et antarctique et eau de la mer des Sargasses (Van Beilen et al., 2003). Le gène *alkB* pourrait être utilisé comme marqueur pour prédire le potentiel de dégradation du pétrole des différents environnements (Van Beilen et al., 2003).

Afin vérifier la présence du gène *alkB* dans les isolats sélectionnés. Un fragment de 550 pb a été amplifié à l'aide d'une paire d'amorces dégénérées (Kloos et al., 2006). La figure 49 présente les résultats d'amplification obtenus pour les bactéries sélectionnées.

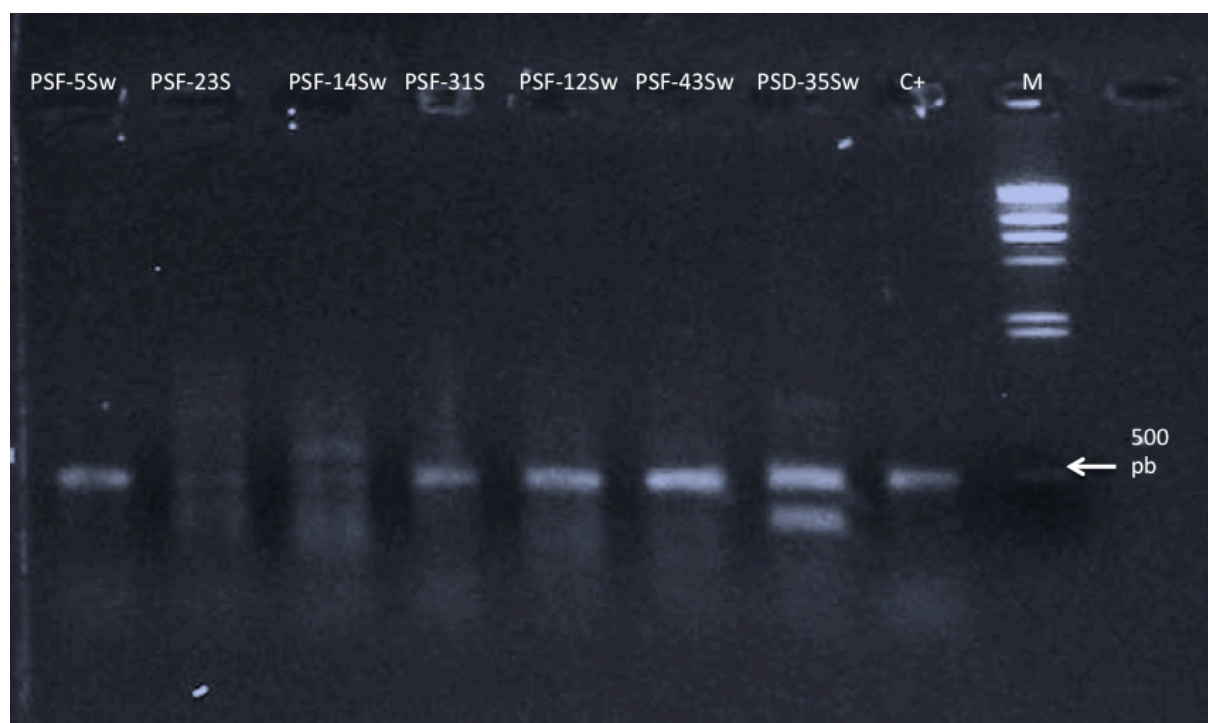


Figure 49. Gel d'électrophorèse (1%) des produits PCR de l'*alkB* des souches sélectionnées (C+=Contrôle positif, M= marqueur de taille 1k bp)

Les souches contenant le gène *alkB* comprenaient celles affiliées à *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Gordonia*, *Pseudomonas* et *Brevibacterium*. Au moins un isolat de chaque genre a été sélectionné pour le séquençage. Les séquences obtenues, de longueurs variables, ont été comparées aux séquences de la base de données du "Centre national d'information sur la biotechnologie (NCBI)" par le biais du programme nucléotide BLAST (blastn). Les résultats sont rapportés dans le tableau 24.

L'analyse nucléotidique des séquences du gène *alkB* a révélé que l'identité des fragments amplifiés était cohérente avec l'identification basée sur le 16S pour *Alcanivorax*, *Marinobacter* et *Gordonia* au niveau du genre (99% Id). Ces bactéries sont connues dans la littérature pour leurs capacités cataboliques vis-à-vis des hydrocarbures pétroliers. *A. borkumensis* possède deux systèmes *alkB* alkane hydroxylase et trois gènes codant pour les cytochromes P450 impliqués dans l'oxydation d'alcanes ramifiés (Scheinker et al., 2006).

En revanche, le gène *alkB* appartenant à *Brevibacterium* présentait une identité de séquence nucléotique identique à 99% avec *Dietzia sp* et celui de *Pseudomonas taiwanensis* à *Marinobacter salarius* (99%)

Tableau 24. Analyses nucléotidique (BLASTn) comparatives des séquences des gènes 16S et *alkB* des bactéries isolées du port de Sidi Fredj

16S			<i>alkB</i>			
Isolats	Description	Similarité	Description	Taille bp	Similarité	Accession number
PSF-12Sw	<i>Alcanivorax borkumensis</i> strain SK2	99%	<i>Alcanivorax</i> sp. PA2 alkane hydroxylase (<i>alkB</i>) gene	475	99%	FJ173005.1
PSF-21Sw	<i>Pseudomonas taiwanensis</i> strain BCRC 17751	99%	<i>Marinobacter salarius</i> strain R9SW1	498	99%	CP007152.1
PSF-31S	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> strain ATCC 49840	99%	<i>Marinobacter</i> sp. P1-14D alkane hydroxylase (<i>alkB2</i>) gene	448	99%	GQ184211.1
PSF-5Sw	<i>Brevibacterium celere</i> strain KMM 3637	99%	<i>Dietzia</i> sp. IMV 195 FLAG-tagged alkane hydroxylase-rubredoxin (<i>alkB</i>) and TetR family transcriptional regulator (<i>tetR</i>) genes	397	99%	KM019157.1
PSF-6S	<i>Gordonia hongkongensis</i> strain HKU50	99%	<i>Gordonia</i> sp. S14-10 putative alkane monooxygenase (<i>alkB</i>) gene	460	99%	GQ145212.1
PSF-26Sw	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> strain ATCC 49840	99%	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> strain S17-4 alkane hydroxylase (<i>alkB</i>) gene	420	99%	EU853368.1
PSF-43Sw	<i>Marinobacter nitratireducens</i> strain AK21	99%	Alkane monooxygenase <i>AlkB</i> [<i>Marinobacter</i> sp. SL004A-39A]	317	99%	JN986868.1

Le fait que l'identité maximale pour ces séquences ait été trouvée avec une souche taxonomiquement éloignée suggère un mécanisme possible de "transfert de gène horizontal", à savoir l'acquisition de ce gène non pas à partir de cellules ascendantes, mais à partir de bactéries phylogénétiquement éloignées. Comme on le sait déjà pour d'autres micro-organismes dégradants d'alcanes, le groupe entier alkSB1GHJ est une région d'origine étrangère; caractérisée par une teneur significativement faible en G + C et par la présence de transposases hypothétiques aux extrémités, qui permettent le transfert aléatoire entre bactéries à travers des éléments génétiques mobiles (Yakimov et al., 2007 ; Catania, 2018).

En revanche, *alkB* n'a pas pu être détecté dans les isolats liés à *Halomonas*, *Xanthomarina*, *Erythrobacter* et *Micrococcus* bien qu'ils aient pu se développer en présence d'alcanes. D'après Kloos et collaborateurs (2006), des régions conservées ont été choisies pour la conception de ces amorces. Les fragments amplifiés ne représentent pas la totalité des gènes considérés. Pour tous les cas où aucune amplification n'est observée, et au vu des performances de dégradation obtenues vis-à-vis des hydrocarbures brut dans notre travail, il est probable qu'un gène codant l'alcane hydroxylase *alkB* soit présent. Cependant, sa séquence divergerait suffisamment pour ne pas permettre l'hybridation avec le couple d'amorces utilisées au cours de l'amplification (Paisse et al., 2011).

Beaucoup de voies métaboliques de dégradation empruntées sont en effet encore inconnues. Ce ne sont par ailleurs pas forcément les microorganismes les plus représentés dans les banques des souches bactériennes identifiées par l'ADNr 16S qui sont les plus actifs au sein d'un écosystème. Les capacités de dégradation sont probablement dispersées au sein de ces microflore. Beaucoup de gènes identifiés jusqu'à maintenant semblent par ailleurs situés sur des plasmides. Il existe probablement de nombreux cas de transferts horizontaux entre microorganismes qui favorisent le transfert des capacités de dégradation au sein d'une microflore (M'rassi et al., 2015).

L'étude du gène *alkB* a permis de mettre en évidence la présence de ce gène chez les bactéries isolée des échantillons de sédiment et d'eau de mer contaminés par les hydrocarbures du port de Sidi Fredj. Ainsi malgré l'optimisation des outils utilisés pour la détection de ce gène chez les bactéries, le gène *alkB* ne permet pas de rendre compte de la réponse à une contamination pétrolière dans l'environnement étudié. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces observations. Tout d'abord, la dégradation des alcanes au sein de communautés impliquerait plusieurs familles d'enzymes, dont les cytochromes P450, aux spécificités de substrats différentes. Il serait donc intéressant de suivre également la détection des gènes codant pour

les cytochromes P450, susceptible d'intervenir dans la dégradation des iso-alcanes afin de mieux caractériser la microflore bactérienne, et sa capacité de dégradation vis à vis d'une contamination par les alcanes.

V.11.1.1 Analyses phylogénétiques.

1.PSF-21Sw	100						
2.PSF-5S	50.38	100					
3.PSF-12Sw	46.93	53.63	100				
4.PSF-43Sw	46.67	48.04	56.41	100			
5.PSF 6S	55.94	62.63	59.65	54.52	100		
6.PSF-26Sw	52.09	50.88	59.46	71.54	63.12	100	
7. PSF-31S	48.89	48.12	55.53	66.15	57.99	89.43	100
	1	2	3	4	5	6	7

Figure 50. Matrice d'identité (%) des gènes *alkB* pour les différents isolats ayant produit des amplicons *alkB*.

L'homologie la plus importante est trouvée entre les séquences des amplicons des isolats PSF-31S et PSF-26Sw qui ont tous les deux été identifiés comme *M. hydrocarbonoclasticus*. La séquence de l'amplicon *alkB* de la souche PSF-43Sw (*M. nitratreducens*) est également proche de celles des deux précédentes. Alors que la séquence *alkB* de l'amplicon de PSF-21Sw est la plus différentes des autres séquences.

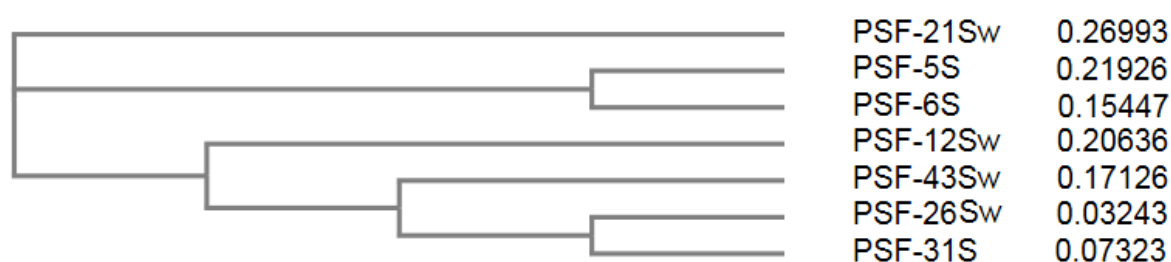


Figure 51. Cladogramme de l'alignement des séquences *alkB*. La distance génétique est indiquée à droite.

On constate que les bactéries du genre *Marinobacter* forment un groupe distinct alors que la souche PSF-21Sw est la plus éloignée génétiquement des autres.

V.11.2 Le gène *xylM* et *xylA*

Les souches ayant montré un bon potentiel à se développer sur des hydrocarbures aromatiques (PSF-14Sw, PSF-16Sw, PSF-31S, PSF-35Sw et PSF-43Sw) ont été examinées pour la présence du gène de la xylène monooxygénase par PCR.

Aucun produit de PCR n'a été obtenu avec les amorces TOL-F/TOL-R. Tandis qu'un seul produit de PCR de la *xylA* a été obtenu pour la souche PSF-43Sw avec les amorces XYLA-F / XYLA-R.

La séquence nucléotidique du *xylA* de la souche PSF-43Sw est identique à celle de *Marinobacter* Sp qui confirment les résultats obtenus par séquençage 16S et *alkB* pour cet isolat (tableau 25).

Il est rare de trouver des micro-organismes ayant la capacité à dégrader à la fois des composés aliphatiques et aromatiques. La dégradation des deux types d'hydrocarbures nécessite différentes voies métaboliques (M'rassi et al., 2015). Cette souche PSF-43Sw liée à *M. nitratireducens* possède à la fois les voies cataboliques de dégradation des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques ce qui confirme sa capacité à métaboliser à la fois les alcanes et les hydrocarbures aromatiques. Résultat révélé également par l'analyse du profil d'utilisation des hydrocarbures.

Tableau 25. Analyses nucléotidique (BLASTn) comparatives des séquences des gènes 16S, *alkB* et *xylA* de la souche PSF-43Sw

Gènes	Description	Similarité	Accession number
16	<i>Marinobacter nitratireducens</i> strain AK21	99%	NR_136469.1
<i>alkB</i>	Alkane monooxygenase AlkB [<i>Marinobacter</i> sp. SL004A-39A]	88%	ALP44217.1
<i>xylA</i>	<i>Marinobacter similis</i> strain A3d10 (<i>xylA</i> gene)	99%	CP007151.1

Selon des études similaires, il est possible que les deux voies de dégradation coexistent (Zhang et al., 2011).

Sotsky et collaborateurs (1994) ont isolés des bactéries des sédiments affectés par la marée noire Exxon Valdez et ont étudié leur capacité à métaboliser les hydrocarbures aliphatiques et aromatiques en examinant la présence des gènes *alkB* et *xylE*. Ces auteurs ont trouvé qu'une proportion significative (32%) des populations dégradant les hydrocarbures dans les

sédiments de l'Alaska affectés par le déversement d'hydrocarbures possédait à la fois les gènes *xyIE* et *alkB*.

Whyte et collaborateurs (1997) ont isolé et caractérisé des bactéries dégradant les hydrocarbures des régions arctiques contaminées par du pétrole. Des souches identifiées comme étant *Pseudomonas sp.* ont dégradé les n-alcanes, toluène et naphthalène à 5 et 25 ° C et possédait à la fois la voie catabolique *alkB* pour la biodégradation des alcanes et la voie catabolique de *nah* pour la biodégradation des hydrocarbures aromatiques polynucléaires.

Arvanitis et collaborateurs (2008) ont isolé des bactéries d'une raffinerie et ont étudié la présence des gènes *nahH* et *alkJ*, enzymes clés dans la dégradation des hydrocarbures aromatiques et aliphatiques. Ces auteurs ont trouvé que des souches des genres *Pseudomonas* et *Bacillus* possédaient les deux gènes. Ces résultats indiquent que les gènes des voies de dégradation des hydrocarbures aromatiques et aliphatiques ne sont pas incompatibles et peuvent coexister dans le même organisme.

Certaines des souches isolées du port de Sidi Fredj, se développant en présence de pétrole brut ne donnaient aucun produit d'amplification, ce qui implique l'existence d'autres voies de biodégradation ou de séquences de gènes très divergentes, ce qui suggère qu'elles hébergent probablement d'autres gènes de dégradation des hydrocarbures (comme AlmA, P450...) (M'rassi et al., 2015).

V.12 Evaluation des taux de biodégradation des hydrocarbures.

D'après les données obtenues à partir des profils d'utilisation des différents hydrocarbures, les courbes de croissance ainsi que l'identification moléculaire, 15 isolats ont été sélectionnés afin d'évaluer leur capacité à dégrader le pétrole brut.

Les taux de biodégradation du pétrole brut par les souches sélectionnées, ont été déterminés à partir des cultures in vitro sur une période d'une semaine d'incubation. La quantité du substrat biodégradé a été mesurée en utilisant l'analyse de chromatographie en phase gazeuse couplée à une détection par ionisation de flamme (GC-FID). Au niveau du test lui-même, il convenait de ne pas négliger la mise en œuvre de fioles dites « abiotiques » afin de quantifier les pertes liées notamment aux fuites de substrats. Les concentrations calculées ont été converties en pourcentage de biodégradation. Le pourcentage de dégradation des hydrocarbures totaux ainsi que les deux fractions du pétrole brut (aliphatiques et aromatiques) par les isolats a été calculé à partir de la différence entre la perte totale d'hydrocarbures dans le milieu inoculé et la perte abiotique dans le milieu stérile.

V.12.1 Biodégradation des hydrocarbures totaux.

Les pourcentages de dégradation du pétrole brut par les isolats sélectionnés sont représentés à la figure 52.

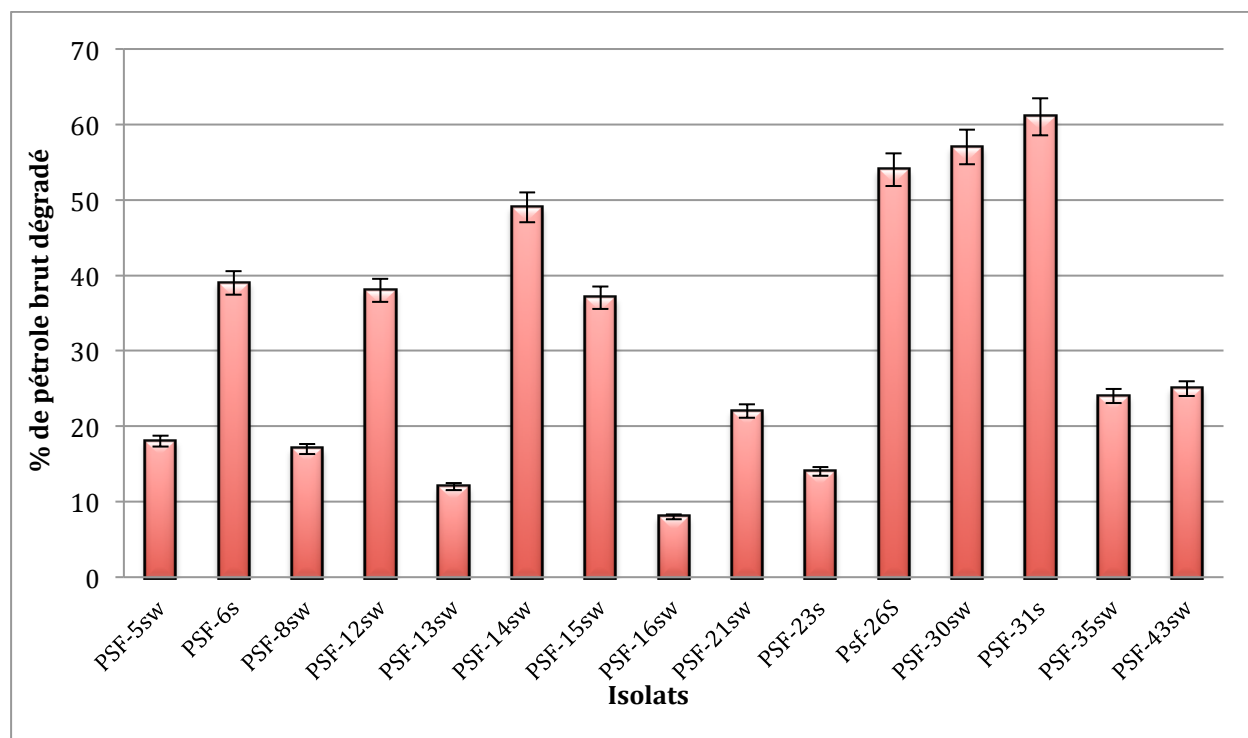


Figure 52. Histogramme montrant le taux de biodégradation (%) des hydrocarbures totaux par les souches sélectionnées.

Parmi les 15 souches testées, *M.hydrocarbonoclasticus* (PSF-31S) a présenté le taux de biodégradation le plus élevé avec 61% de pétrole brut éliminé après une semaine d'incubation, suivis de *A.xenomutans* (PSF-30Sw) avec 57%. Ces souches étaient les plus performantes parmi les Gammaprotéobactéries. Ces souches ont également montré les potentiels les plus élevés de dégradation lors de l'étude de la cinétique de croissance.

Les mêmes résultats ont été obtenus par [Hassanshahian et collaborateurs \(2012\)](#) qui ont trouvé que ces souches étaient les plus performantes parmi une collection de 11 isolats avec des taux de dégradation du pétrole brut de 71% pour *Alcanivorax* et 52% pour *Marinobacter* après une semaine d'incubation à 30°C.

Parmi Les Alphaproteobactéries, *E. citreus* (PSF-14Sw) a été la plus performante en ayant dégradé 49% de pétrole brut.

Avec seulement 8 et 12% de pétrole brut dégradé, les souches PSF-13Sw (*Halomonas venusta*) et PSF-16Sw (*Labrenzia aggregata*) étaient les moins performantes parmi les

Protéobactéries. Ces souches ont également montré les potentiels les moins élevés de dégradation lors de l'étude de la cinétique de croissance.

Gordonia hongkongensis (PSF-6S) avec 39% du pétrole brut dégradé, était la souche la plus performante parmi le groupe des Actinobactéries. *Xanthomarina gelatinilytica*, le seul isolat appartenant aux Bacteroidetes, a pu dégrader 17% de pétrole brut.

V.12.2 Biodégradation des hydrocarbures aliphatiques.

La biodégradation de la fraction aliphatique est très intéressante du fait qu'elle constitue la fraction majoritaire du pétrole brut. Les résultats du test de biodégradation des n-alcanes par les souches sélectionnées sont représentés dans la figure 53.

A la fin de la période d'incubation d'une semaine, les n-alcanes diminuent mais restent toujours présents à la fin du test de dégradation.

Les données obtenues montrent que les souches PSF-31S, PSF-14Sw et PSF-30Sw affiliées à *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, *Erythrobacter citreus* et *Alcanivorax xenomutans* ont dégradé 65%, 54% et 51% des n-alcanes (C10-C39) présents dans le pétrole brut respectivement. Ces souches étaient les plus performantes. Par contraste, les souches PSF-8Sw (*X. gelatinilytica*), PSF-16Sw (*L. aggregata*) et PSF-23S (*M. yunnanensis*) ont les plus faibles capacités de dégradation des n-alcanes avec 16, 13 et 12% d'n-alcanes dégradés.

M. hydrocarbonoclasticus est bien connue pour son pouvoir de dégradation. Les résultats obtenus par [Zenati et collaborateurs \(2018\)](#) ont montré que *M. hydrocarbonoclasticus* a éliminé 48,29% des n-alcanes après 3 jours d'incubation. À la fin de l'expérience (21 jours), le taux de biodégradation de la fraction aliphatique a atteint 83,68%. Les souches bactériennes marines liées à *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* sont bien connues par leur capacité métabolique à croître et à minéraliser les hydrocarbures aliphatiques ([Kim et al., 2014](#)). [Huu et collaborateurs \(1999\)](#) ont abouti à une minéralisation de 41% de la fraction saturée du pétrole (5%, v/v) par l'utilisation de la souche *Marinobacter aquaeolei* VT8 τ ([Zenati, 2018](#)).

Il a été clairement établi que le genre *Alcanivorax* est prépondérant dans la dégradation des alcanes ([Yakimov et al., 1998](#)). Les résultats obtenus confirment le rôle fondamental des bactéries appartenant au genre *Alcanivorax* dans la dégradation des hydrocarbures linéaires dans des environnements pollués par les hydrocarbures.

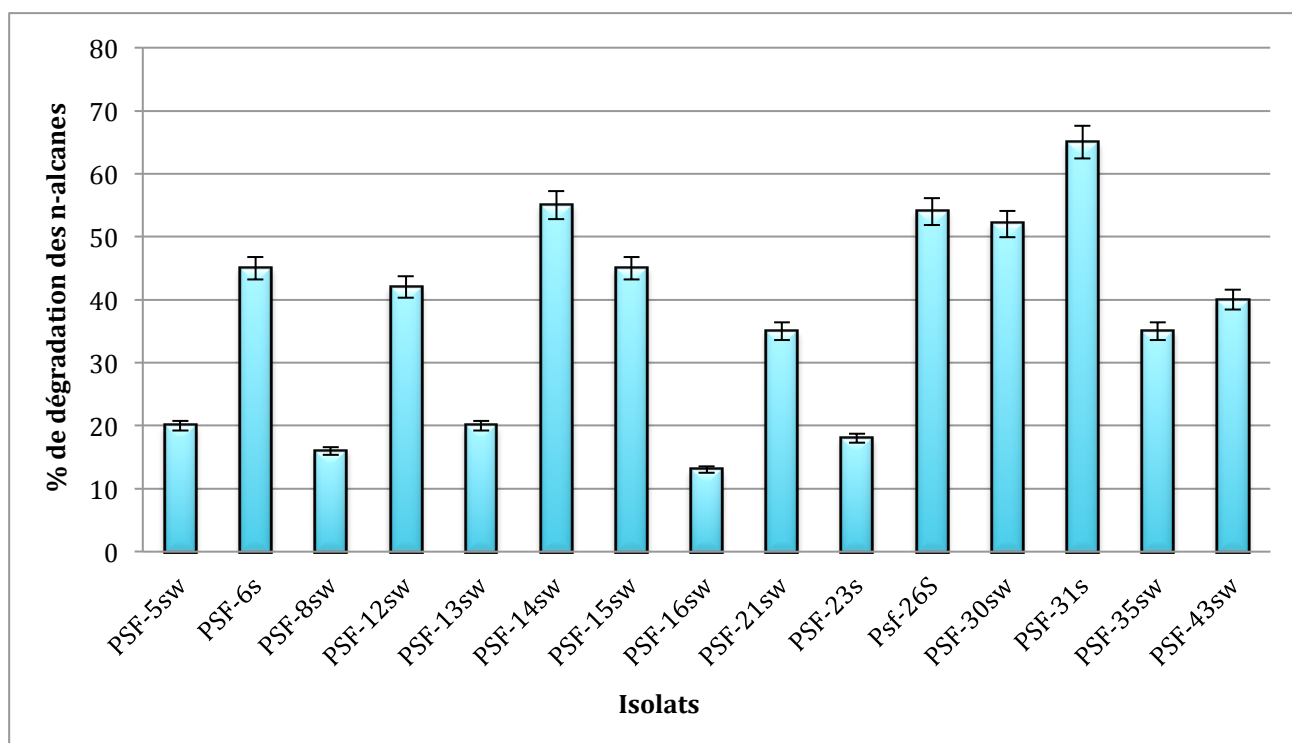


Figure 53. Histogramme montrant le taux de biodégradation (%) des n-alcanes (C_{10} - C_{39}) par les souches sélectionnées.

Les souches PSF-21Sw et PSF-35Sw liées à *Pseudomonas* et PSF-43Sw à *Marinobacter nitratireducens* présentaient des taux significatifs de dégradation des alcanes avec un pourcentage d'élimination de 35% et 40% respectivement. Le genre *Pseudomonas* est un groupe de bactérie qui présente une gamme variée d'activités métaboliques, y compris la dégradation des divers hydrocarbures aliphatiques (Binazadeh et al., 2009) et ramifiés comme source de carbone et d'énergie (Vomberg et Klinner, 2000 ; Xie et al., 2011).

L'Actinobactérie, *Gordonia hongkongensis* (PSF-6S) a pu dégrader quant à elle, 45% des n-alcanes après une semaine d'incubation. Les souches appartenant au genre *Gordonia* sont connues pour leur capacité à dégrader une large gamme d'alcanes (Quatrini et al., 2008).

Pour la plupart des souches, les n-alcanes à courtes chaînes (C_{10} – C_{17}) ont été dégradés dans une plus grande mesure que les chaînes longues (C_{18} – C_{30}) et les aliphatiques lourds (C_{31} – C_{39}) (figure 54).

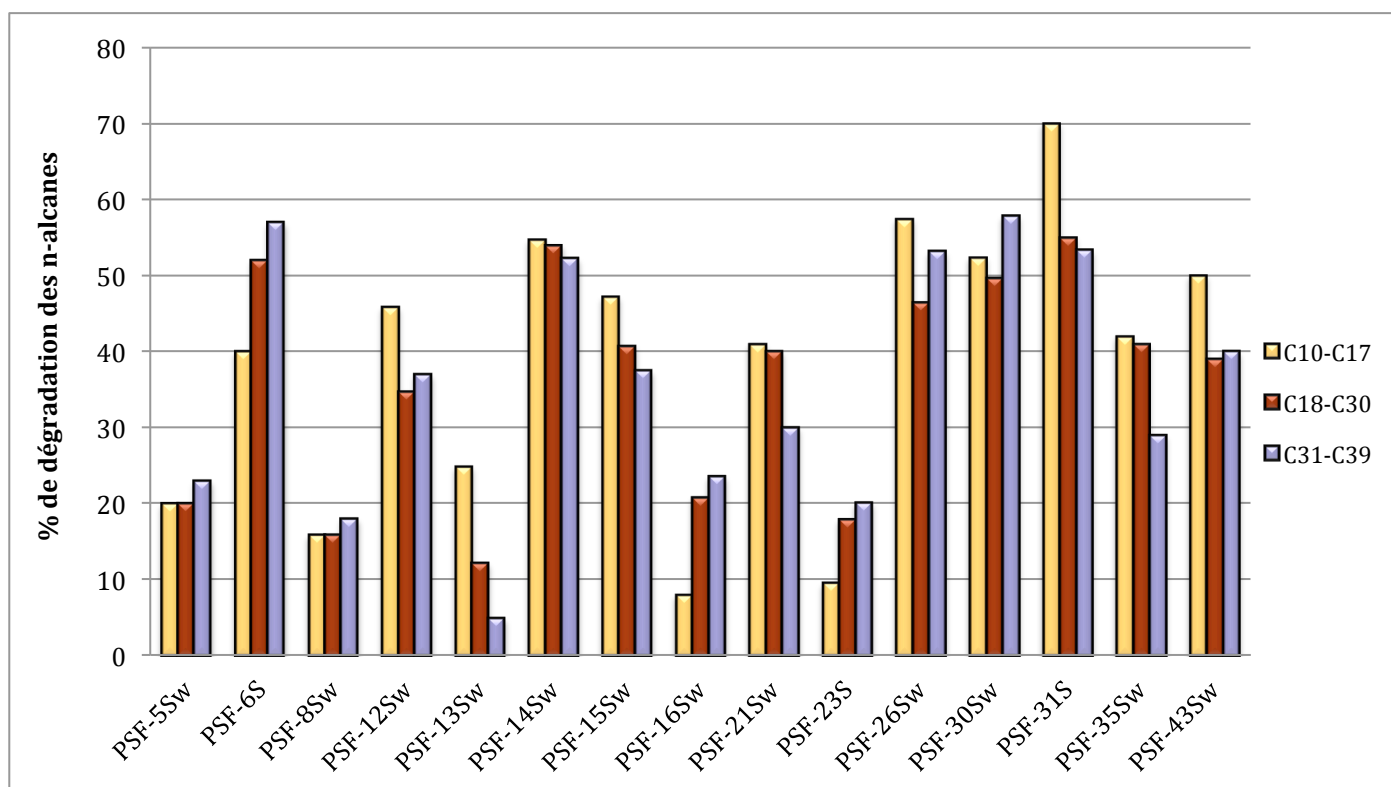


Figure 54. Histogramme montrant le taux de biodégradation (%) des n-alcanes par les souches sélectionnées.

Hassanshahian et collaborateurs (2012) ont examiné la biodégradation du pétrole brut par onze souches isolées du golfe Persique en utilisant la CG-SM. Ils ont trouvé que les n-alcanes de la chaîne moyenne sont fortement dégradés par rapport à la chaîne aliphatique longue (C₁₉-C₂₅). Après une semaine d'incubation à 30°C, la souche *Acinetobacter calcoaceticus* a conduit à une élimination de 73,7% de la fraction aliphatique C₉-C₂₅ du pétrole brut.

De même, Li et collaborateurs (2013) ont révélé que les n alcanes à chaîne courte (C₁₀-C₁₇) du pétrole brut sont fortement dégradés (90,68%) par rapport aux alcanes à chaînes longues (C₁₈-C₃₀) (77,38%) et aux aliphatiques lourds (41,4% pour C₃₁-C₃₈) en présence de la souche *Rhodococcus* sp.

V.12.3 Biodégradation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.

Les HAP sont beaucoup plus résistants à la biodégradation. La dégradation des HAP à trois, quatre et cinq noyaux aromatiques ont été testés par les bactéries sélectionnées dans cette étude pendant une semaine d'incubation à 30°C dans milieu ONR7a contenant 1% (v/v) de pétrole brut. Les résultats de biodégradation des principaux HAP sont présentés dans la figure 55.

La souche PSF-31Sw appartenant au genre *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* a la capacité de dégrader 76% de l'ensemble des HAP étudiés et représente le taux de dégradation le plus élevée, suivie par la souche PSF-30Sw affiliée à *Alcanivorax* qui était capable de dégrader 67% des HAP. Les espèces appartenant aux genres *Marinobacter* et *Alcanivorax* appartiennent au groupe des bactéries marines hydrocarbonoclastes spécialisées et il est avéré que le rôle de ces genres bactériens, demeure central pour la dépollution des milieux marins contaminés par les hydrocarbures pétroliers (Yakimov et al., 2007).

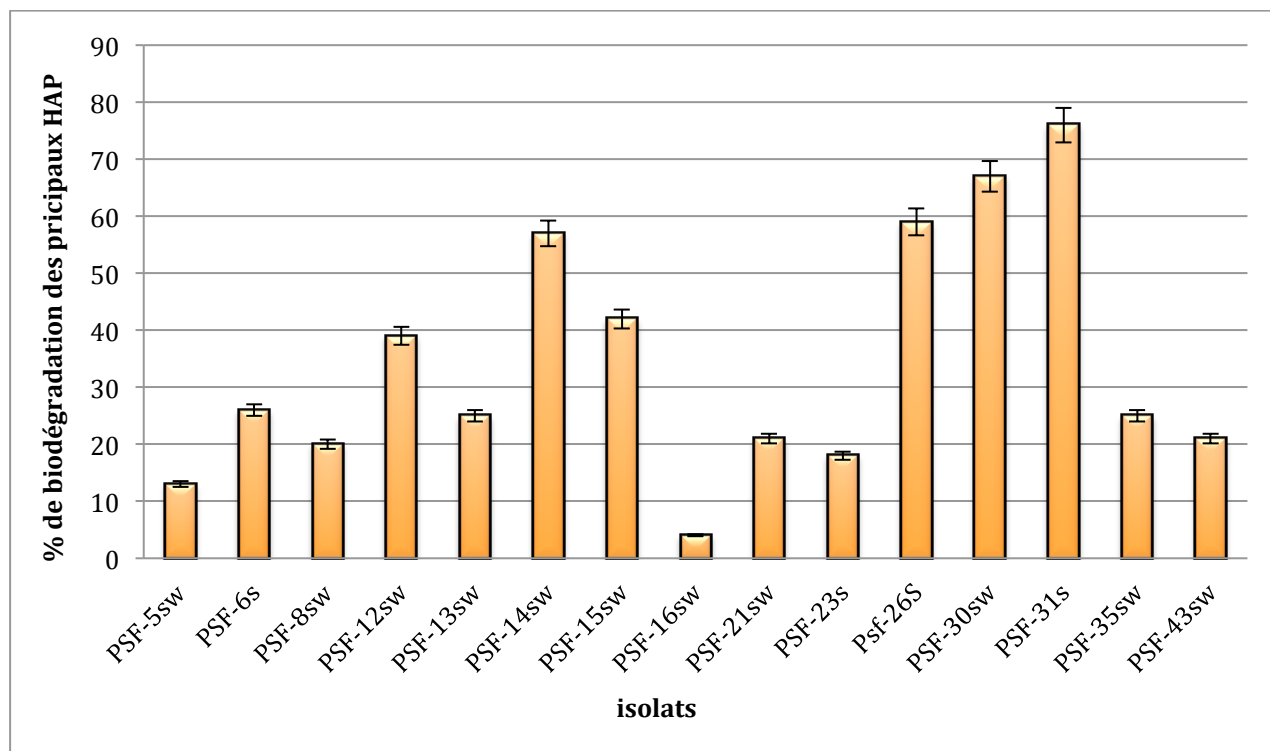


Figure 55. Histogramme montrant le taux biodégradation (%) des principaux hydrocarbures aromatiques polycycliques par les souches sélectionnées.

Outre ces deux genres, la souche (PSF-14Sw) apparentée à *Erythrobacter* a dégradé environ 57% de l'ensemble des HAP tandis que les *Pseudomonas* (PSF-35Sw, PSF-21S) ont minéralisé environs 30% des HAP.

Les résultats de cette étude montrent que deux souches à Gram-positif appartenant aux genres *Gordonia* et *Micrococcus* ont la capacité de dégrader les HAP à 20%.

La plupart de ces isolats hormis *Erythrobacter* possédaient le gène *alkB* et ont la capacité de dégrader à la fois les HAP et les n-alcanes. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* a la capacité de minéraliser 64% des n-alcanes et 76% des HAP après une semaine d'incubation de même pour la souche PSF-43 affiliés à *marinobacter nitrareduces* qui pouvait dégrader les deux fractions. Cette souche de *Marinobacter* possède à la fois les voies cataboliques responsables

de la dégradation des hydrocarbures aromatiques et aliphatiques comme l'ont montré les résultats obtenus par PCR. Il a été rapporté que les deux composés HAP et alcanes peuvent être dégradés par une seule espèce bactérienne (Sotsky et al., 1994 ; Whyte et al., 1997).

Les souches appartenant au genre *Pseudomonas* ont également pu minéraliser les deux fractions. Ce genre d'espèce présente un grand intérêt dans la bioremédiation, non seulement pour la dégradation des hydrocarbures pétroliers mais aussi une gamme variée de composés xénobiotiques (Parales et al., 2002).

Des études montrent que plusieurs espèces de bactéries capables de dégrader les HAP à haut poids moléculaire ont été isolées (Rentz et al., 2008 ; Juhasz et Naidu, 2000), de ces microorganismes peu ont été capables d'utiliser des HAP à quatre ou cinq noyaux aromatiques pour la croissance en l'absence de co-facteurs ou des agents tensio-actifs, leur métabolisme a lieu généralement sous des conditions de co-métabolisme avec d'autres HAP ou autres hydrocarbures (Boonchan et al., 2000).

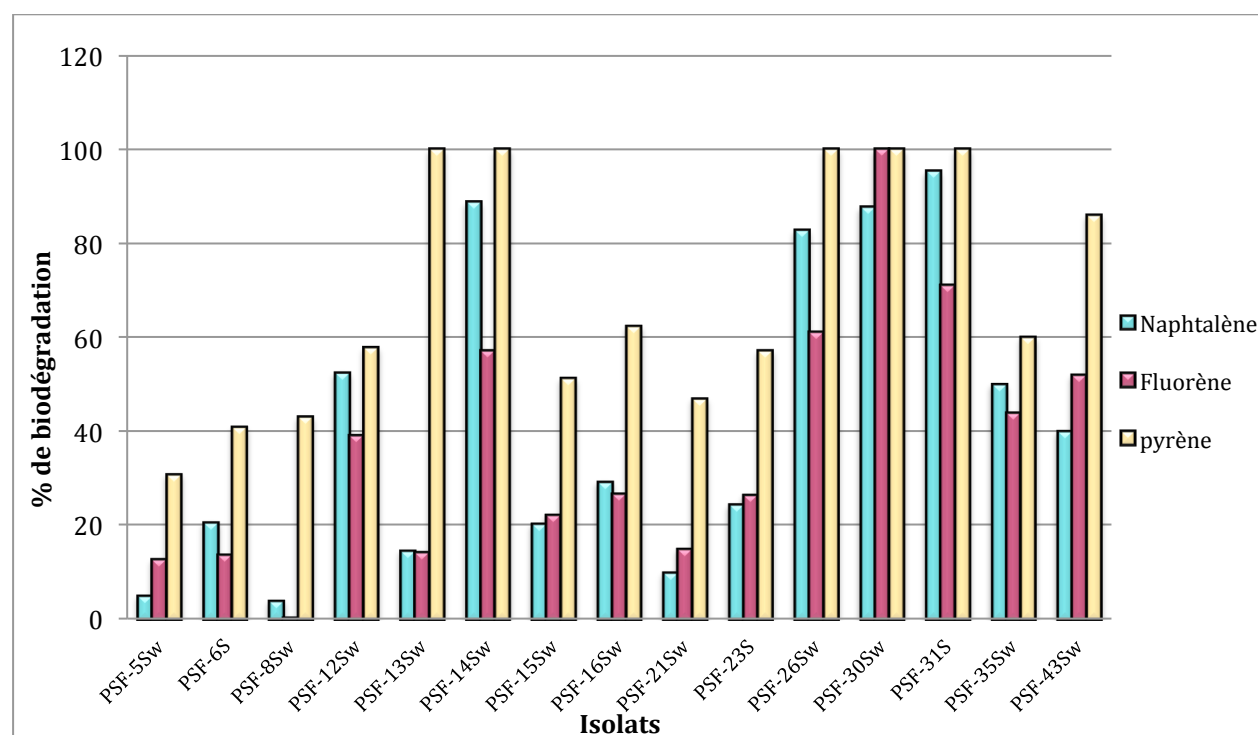


Figure 56. Histogramme montrant le taux biodégradation (%) du naphtalène, fluorène et pyrène par les souches sélectionnées.

Dans la figure 56, sont représentés les taux de biodégradation du naphtalène (2 noyaux), fluorène (3 noyaux) et pyrène (4 noyaux) par les souches sélectionnées après une semaine

d'incubation à 30°C. Toutes les souches ont présentés des taux élevés de dégradation du pyrène comparé aux deux autres HAP.

Le pyrène a complètement été dégradé par les souches *H.venusta* (PSF-13Sw), *E.citreus* (PSF-14Sw), *A.xenomutans* (PSF-30S) et *M.hydrocarbonoclasticus* (PSF-31Sw). Cependant, les bactéries attaquent normalement d'abord les composés à faible poids moléculaire (Mrozik et al., 2003). Les bactéries capables de dégrader le pyrène jouent un rôle essentiel dans la biodégradation des molécules de haut poids moléculaires (Zeng et al., 2019).

Nous suggérons que ces isolats possèdent un système enzymatique spécifique pour dégrader les hydrocarbures aromatiques lourds. Certaines bactéries ont la capacité de produire des agents tensioactifs comme *Pseudomonas*, *Erythrobacter* (Rocha et al., 2011 ; Thangaraj et al., 2008 ; Das et Mukhrjee, 2007 ; Salgado-Brito et al., 2007). L'effet de l'agent tensio-actif produit par les microorganismes dans le milieu de culture en présence des hydrocarbures aromatiques, solubilise les HAP et conduit à une augmentation de sa concentration dans le milieu, ce qui le rend plus accessibles aux microorganismes.

Zenati et collaborateurs (2018) ont effectué le dosage du pyrène et de l'anthracène par CG-SM dans des expériences séparées de biodégradation, maintenues pendant 20 jours d'incubation, et ont obtenus des taux d'élimination respectivement de 38 et 31% par la souche *M.hydrocarbonoclasticus*. Ghosh et collaborateurs (2014) ont obtenus un taux de dégradation élevé du pyrène qui a atteint $92,2 \pm 5,6\%$ avec une souche de *Pseudomonas aeruginosa* après une semaine d'incubation à 30°C.

Deux souches (*Pseudomonas taiwanensis* PYR1 et *Acinetobacter baumannii* INP1) ont été isolées de zones humides estuariennes contaminées par les HAP et ont pu dégrader après 70 jours, respectivement 70,7% et 80,9% de pyrène et d'indéno (1,2,3-cd) pyrène (Huang., 2016).

Dans notre étude, la minéralisation des hydrocarbures aliphatiques est plus élevée que celle des aromatiques. Les mêmes résultats ont été observés dans plusieurs études (Vinas et al., 2002 ; Hasanshahian et Giti, 2008).

L'accessibilité difficile des substrats complexes pour les microorganismes apparaît comme un facteur limitant important à prendre en compte pour expliquer ce phénomène. En effet ce sont les hydrocarbures les plus lourds et complexes qui résistent le plus à la biodégradation.

Ce travail a montré que les différentes souches sélectionnées ont le potentiel d'utiliser efficacement les fractions des n-alcanes et des aromatiques comme source de carbone et d'énergie et ont été capable de les minéraliser avec des taux différents.

Par conséquent, nous suggérons que ces microorganismes peuvent être intéressants pour des applications dans les techniques de bioremédiation.

Ainsi, ces souches peuvent être utilisées pour concevoir des cultures mixtes avec des capacités de biodégradation spécifiques pour des fractions pétrolières déterminées. Néanmoins des études devraient être menées pour évaluer les interactions microbiennes au cours de la biodégradation des hydrocarbures au fil du temps (M'rassi, 2015).

V.13 Production de biosurfactants.

De nombreuses bactéries sont capables de produire un type d'agents actifs, connus sous le nom de bio-surfactants, qui augmentent l'adhérence des cellules au substrat (Banat, 1995). Le mécanisme d'action des biosurfactants réside dans leur accumulation à l'interface de composés non miscibles, réduisant la tension superficielle et en augmentant leur surface; cela conduit à une biodisponibilité plus élevée qui facilite la dégradation des polluants (Batista et al., 2006). Les bioémulsifiants appartiennent à différentes classes, notamment les glycolipides, lipopeptides, acides gras, phospholipides, lipides neutres et lipopolysaccharides (Thavasi et al., 2011). Les différentes applications de ces agents tensioactifs ont conduit au développement de méthodes fiables et rapides de dépistage des bactéries productrices de biosurfactants. Dans cette étude, la capacité à produire des biosurfactants a été vérifié avec différentes méthodes: le test d'effondrement des gouttes « drop collapse test », le test de dispersion du pétrole et l'activité d'émulsification (E24).

Les résultats obtenus sont représentés dans le tableau 26. Les figures 57 et 58 représentent l'aspect des résultats positifs et négatifs pour le drop collapse test et l'indice d'émulsification.

Parmi les 23 souches examinées, 16 (69,6%) étaient positives pour le « Drop collapse test » (gammaprotéobactéries (81%), alpha-protéobactéries (6,25%), actinobactéries (12,5%)). 14 de ces souches sont liées aux genres *Alcanivorax* et *Marinobacter*; une souche est liée à *Erythrobacter* et une souche à *Brevibacterium*. Les mêmes résultats ont été obtenus par Cappello et collaborateurs (2012) qui ont trouvé que les souches *A. dieselolei* et *E. citreus* montraient des résultats positifs au « drop collapse test ».

Tableau 26. Mesures de la production de biosurfactant (+ : positif, - : négatif), Activité d'émulsification E24 (%)

substrat	isolats	Production de biosurfactants		Activité d'émulsification E24 (%)
		Oil spreading (mm)	Drop collapse	
Pétrole brut	PSF-30Sw	6	+	52
	PSF-90Sw	4	+	41,5
	PSF-26Sw	5	+	30
	PSF-6S	2	-	22,2
	PSF-5Sw	4	+	40
	PSF-13Sw	2	-	8
	PSF-23S	2	+	20
	PSF-31S	6	+	36,3
	PSF-18S	4	+	32
	PSF-16Sw	2	-	10,8
	PSF-12Sw	5	+	42
n-alcanes	PSF-34Sw	5	+	43,2
	PSF-21Sw	4	-	20
	PSF-54S	4	-	34,2
	PSF-15Sw	4	+	23,6
	PSF-14Sw	5	+	49
	PSF-84S	4	+	46
	PSF-88Sw	4	+	48
	PSF-3Sw	4	+	41
	PSF-8Sw	2	-	0
Aromatiques	PSF-35Sw	2	-	22
	PSF-42S	4	+	29,4
	PSF-43Sw	4	+	32,3

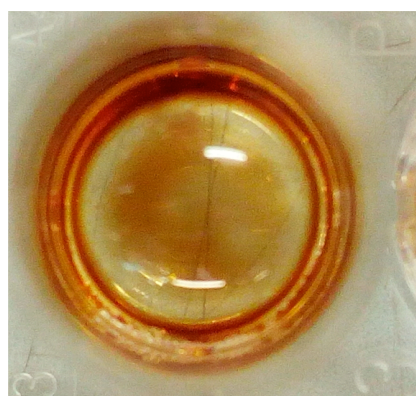
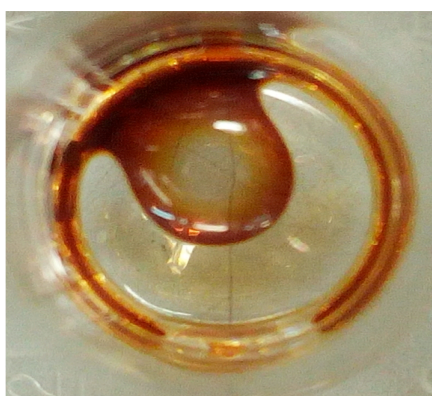


Figure 57. Photos représentant les résultats du drop collapse test (photo à gauche : résultat négatif et la photo à droite représente un résultat positif)

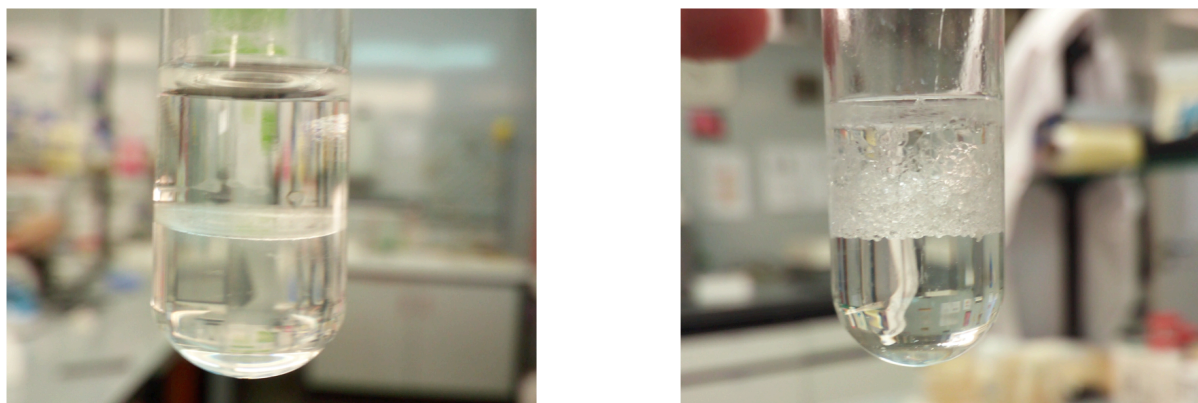


Figure 58. Photos représentant les résultats du test d'indice d'émulsification E24 (photo à gauche : résultat négatif et la photo à droite représente un résultat positif)

La méthode de « déplacement de pétrole » a été utilisée pour détecter la faible production de biosurfactants. Ce test consiste à détecter le diamètre de la zone claire qui est proportionnelle à la concentration en biosurfactant (Youssef et al., 2004).

Les espèces hautement productrices ayant montré un diamètre de 5 mm ou plus lors du test de déplacement d'huile étaient *M. hydrocarbonoclasticus* (PSF-31S), *A. xenomutans* (PSF-30Sw), *A. borkumensis* (PSF-12Sw) et *E. citreus* (PSF-14S). Nos résultats indiquent également que les souches de la même espèce, telles que *Marinobacter*, ne produisent pas la même quantité de biosurfactant. En fait, plusieurs isolats négatifs au drop collapse test, ont été révélés positifs par la méthode de déplacement de pétrole telles que *Pseudomonas* (PSF-21Sw).

L'indice d'émulsification (E24), qui détermine la productivité du bioémulsifiant, est exprimé en pourcentage de la hauteur de la couche émulsionnée divisée par la hauteur totale de la colonne du liquide. La plupart des souches se sont avérées capable de produire les biosurfactant en raison de leur capacité à émulsionner l'hexadécane.

Dans la sous-classe des Alphaproteobacteria, *E. Citreus* (SF-14Sw) présentait l'indice d'émulsification le plus élevé avec 49% d'activité, tandis qu'*A. Borkumensis* (PSF-12Sw) était la souche la plus active de la fraction GammaProteobacteria avec 52% d'émulsification. Aucune activité d'émulsification n'a été observée pour *Xanthomarina gelatinilytica* (PSF-8Sw). L'activité d'émulsification s'est également révélée être importante (40%) pour la bactérie Gram-positive *Brevibacterium celere* (PSF-5Sw). Une corrélation relative entre la production de biosurfactant et l'activité d'émulsification a été observée. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus précédemment (Cappello et al., 2012 ; Mahjoubi et al., 2013).

Les souches liées à *A. borkumensis* (PSF-12Sw), *M. hydrocarbonoclasticus* et *E. citreus* ont

démontré une production élevée de biosurfactants par les trois méthodes utilisées. La conjugaison des deux activités (émulsification et productions de biosurfactants) confère à ces souches une bonne condition préalable à la dégradation des hydrocarbures ([Hassanshahian et al., 2012](#)) ce qui en fait des candidats potentiels, en tant que cultures pures ou en consortium, pour des expériences de biormédiation. Ces résultats sont en accord avec les rapports antérieurs qui démontraient la production d'un biosurfactant polysaccharidique par *Marinobacter* avec un indice d'émulsification de 46% ([Zhao et al., 2011](#)) ainsi que la production de biosurfactant et la présence de gènes de dégradation des hydrocarbures chez *A. borkumensis* ([Wojcieszynska et al., 2011](#)).

La capacité du genre *Alcanivorax* à utiliser les hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie a été largement décrite ([Yakimov et al., 1998](#); [Schneiker et al., 2006](#)) et semble être attribuée à la capacité de cette souche à produire un bio-surfactant lipide qui augmente la biodisponibilité des contaminants et leur capacité à les utiliser ([Yakimov et al., 1998](#); [Schneiker et al., 2006](#), [Kasai 2002](#); [Cappello et al. 2012](#)). Le surfactant de la souche d'*Alcanivorax borkumensis* SK2 est considéré comme l'un des surfactants bactériens les plus efficaces.

Nos résultats ont montré que les isolats les plus efficaces ont présentés les taux de dégradation du pétrole brut les plus élevés. Une relation entre les niveaux de production de biosurfactant et de biodégradation du pétrole brut a été observée ([Hassanshahian et al., 2012](#)). Les souches produisant des taux élevés de biosurfactants peuvent mieux dégrader le pétrole brut, ce qui indique que la production de biosurfactants extracellulaires pourrait être l'un des mécanismes sous-jacents mis en œuvre par les bactéries pour la métabolisation du pétrole brut ([Banat et al., 2010](#)). Mais cette suggestion ne s'appliquait pas à toutes les souches étudiées. En effet, *Gordonia* était capable de dégrader 40% du pétrole brut après une semaine d'incubation mais n'était pas efficace dans la production de biosurfactant. Un mécanisme différent de contact direct avec les n-alcanes par adhérence cellulaire a été décrit pour le complexe *Corynebacterium* / *Mycobacterium* / *Nocardia* (CMN) auquel appartient *Gordonia* ([Lo Piccolo et al., 2011](#)).

Conclusions et perspectives

Conclusions et perspectives

La contamination des écosystèmes par le pétrole brut est un problème environnemental mondial auquel sont confrontés les pays producteurs de pétrole en raison de sa forte exploitation, son raffinage, son transport, son stockage ainsi que les accidents. De nombreux efforts ont été déployés pour isoler les bactéries indigènes dégradant les hydrocarbures dans les sédiments et l'eau de mer contaminés en mer Méditerranée, en particulier au nord. Ces études ont confirmé la présence de communautés microbiennes dégradant les hydrocarbures et présentant un fort potentiel de bioremédiation. Ces sites représentent des sources inestimables et inexplorées de micro-organismes présentant un potentiel élevé pour l'étude des processus de bioremédiation et pour le développement de nouveaux produits dans ce domaine.

La caractérisation des consortiums microbiens de dégradation des hydrocarbures présents dans les zones polluées, est l'un des outils de base à la fois pour améliorer les connaissances sur les capacités de biodégradation dans des environnements contaminés de manière chronique et pour la conception de nouvelles approches de bioremédiation.

L'atténuation naturelle d'une pollution, désigne l'ensemble des processus qui concourent à la réduction de la pollution sur le site considéré. Il s'agit essentiellement de la migration des pollutions sous toutes leurs formes, mais aussi de la biodégradation. L'évaluation de l'atténuation naturelle dans un site pollué défini est un objectif essentiel. En effet, elle vise à prévoir le devenir de cette pollution pour en tirer les conclusions relatives aux actions à entreprendre. D'autre part, si une action de réhabilitation doit voir le jour, elle permet de proposer un type de traitement et ses modalités principales.

L'Algérie est l'un des trois principaux producteurs de pétrole en Afrique et ses côtes ont été fortement contaminées au cours des dernières années, menaçant les écosystèmes locaux et la santé humaine. L'objectif de notre travail visait à identifier des bactéries isolées, à partir d'une zone contaminée par les hydrocarbures du littoral Algérois, ayant un pouvoir auto épurateur vis à vis des différentes fractions du pétrole. Et ceci en établissant des relations entre la composition des bactéries sélectionnées, leurs bagages génétiques permettant l'oxydation initiale des principaux types d'hydrocarbures et les capacités de dégradation des hydrocarbures par ces bactéries isolées. Le principal but était d'explorer la capacité des bactéries isolées d'une zone contaminée, à dégrader les hydrocarbures pétroliers

Dans cette perspective, nous avons abordé différents axes de recherche :

- L'élaboration d'une collection de souches aptes à se développer en présence d'hydrocarbures.
- Calculer les indices de diversités des échantillons d'eau et de sédiments on utilisant une méthode indépendante à la culture.
- La caractérisation moléculaire des bactéries isolées afin d'avoir des connaissances sur les communautés microbiennes associées aux hydrocarbures pétroliers.
- Le suivi de la biodégradation par chromatographie (GC-FID) afin de mesurer la capacité de dégradation des bactéries sélectionnées en réponse à l'effet polluant ou stimulant de l'hydrocarbure.
- L'étude et détection de gènes fonctionnels chez les bactéries sélectionnées afin de mettre en évidence des mécanismes adaptatifs mis en place par certaines bactéries en réponse à la contamination.
- L'étude du pouvoir de productions de biosurfactants par les souches isolées.

Cette étude a été menée sur les communautés bactériennes présentes dans l'eau de mer et sédiment du port de Sidi Fredj (Alger). Ce port est soumis à une pollution chronique par les hydrocarbures et constitue donc un milieu propice à la croissance des bactéries hydrocarbonoclastes. En effet, ces populations bactériennes sont supposées posséder les systèmes enzymatiques permettant de répondre à la contamination.

Dans cette étude, nous avons fait appel à l'utilisation de techniques de biologie moléculaire afin d'accéder à l'identification précise des microorganismes (extraction d'ADN, PCR, séquençage, analyse par bioinformatique et dépôt de séquences dans la banque de données universelle « GenBank ») couplées à des méthodes analytiques chimiques (GC-FID) permettant le dosage résiduel des hydrocarbures.

Plusieurs points de conclusion peuvent être tirés de ce travail :

- **Etude de la diversité microbienne:**

L'étude de la diversité bactérienne a été réalisée par deux méthodes : La DGGE qui est une méthode indépendante à la culture a révélé une diversité plus importante dans les échantillons d'eau par rapport à ceux du sédiment. Le calcul des indices de biodiversité a révélé une bonne diversité entre les différentes stations, et ce malgré l'étroitesse entre les différents points de prélèvements.

La seconde méthode était basée sur le séquençage des gènes codant l'ARNr 16S pour étudier la diversité taxonomique de la microflore obtenue à partir d'enrichissements des échantillons d'eau et de sédiment contaminés en utilisant un milieu minéral additionné d'hydrocarbures comme unique source de carbone et d'énergie. L'identification des bactéries sélectionnées, nous a permis d'obtenir une flore bactérienne variée. Le groupe prédominant parmi les isolats est celui des *Protéobactéries*, constituant 82% des séquences obtenues. La classe des *Gamma-Protéobactéries* est la plus abondante, ce groupe phylogénétique est reconnu comme un élément très important des écosystèmes contaminés par les hydrocarbures et jouent un rôle clé dans leur dégradation. De ce groupe, le genre *Alcanivorax* était le plus prépondérant et le plus fréquemment isolé. Les bactéries liées à ce genre sont considérées comme des bactéries hydrocarbonoclastes, hautement spécialisées dans la dégradation des alcanes, et qui prédominent en présence de pétrole brut, et en particulier de n-alcanes. Les bactéries appartenant au genre *Alcanivorax* sont des bactéries cosmopolites que l'on trouve à de faibles concentrations dans des environnements marins préservés, mais qui deviennent rapidement prédominants dans des sites contaminés par des hydrocarbures (Hara et al., 2003, Yakimov et al., 2005).

- **Capacités de biodégradation du pétrole et ses dérivés**

La capacité de biodégradation du pétrole par les différentes souches sélectionnées a été mesurée par Chromatographie en phase gazeuse (GC-FID). Nos résultats indiquent que le groupe *Gamma-Protéobactéries* était le principal acteur de cette dégradation, les souches appartenant aux genres *Marinobacter* et *Alcanivorax* étaient les plus performantes avec 61% et 57% de pétrole brut dégradé respectivement. Ces bactéries sont considérées comme des acteurs majeurs de la bioremédiation des environnements marins contaminés par le pétrole (Kasai et al., 2002; Catania et al., 2015). Il est bien connu que ces bactéries marines utilisent les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. Elles ont été également utilisées pour la biorestauration des systèmes marins et côtiers pollués (Cappello et Yakimov, 2010). Les souches liées à *Labrenzia* et *Halomonas* étaient les moins performantes avec seulement 8% et 12% de pétrole brut dégradé. La minéralisation des hydrocarbures aliphatiques par les bactéries était plus importante que celle des hydrocarbures aromatiques bien que plusieurs souches aient pu dégrader la totalité du pyrène, hydrocarbures aromatique polycycliques à haut poids moléculaire.

Il a été également constaté que les souches produisant des taux élevés de biosurfactants dégradent mieux le pétrole brut, ce qui indique que la production de biosurfactants extracellulaires pourrait être l'un des mécanismes sous-jacents mis en œuvre par les bactéries pour la métabolisation du pétrole brut (Banat et al., 2010).

- **Détection des gènes de dégradation :**

Dans une optique de bioremédiation, l'analyse des gènes intervenant dans les processus de dégradation est un paramètre clé. Lors de cette étude, différents gènes intervenant dans l'attaque initiale des hydrocarbures aromatiques et aliphatiques ont été choisis. Il s'agit des gènes codant pour les monooxygénase (*alkB* et *xylA*) qui sont considérés comme des marqueurs moléculaires de la biodégradation des hydrocarbures (Fuentes al., 2014).

Le gène *alkB* a été détecté dans plusieurs souches tandis que le gène *xylA* n'a été détecté que dans une seule souche. Cette dernière (PSF-43Sw) apparentée à *Marinobacter* a donné des résultats positifs avec les deux gènes. Ceci dit, pour quelques souches aucun des gènes étudiés n'a été détecté. La grande diversité de ces gènes rend difficile leur détection au sein des souches isolées (Paisse et al., 2011). Ceci peut être dû aussi au manque de sensibilité de la méthode ainsi qu'à une divergence avec les amorces utilisées mais aussi du fait que tous les gènes impliqués n'ont pas été recherchés.

Les résultats obtenus dans ce travail démontrent la diversité des bactéries dégradant les hydrocarbures provenant d'une zone contaminée, et leurs capacités variables de biodégradation. La connaissance du potentiel de biodégradation et l'étude des communautés microbiennes biodégradatrices associées à l'eau de mer et aux sédiments contaminés est une condition importante pour les futures applications de bioremédiation. La collection des bactéries obtenue dans cette étude pourrait être exploitée pour des applications biotechnologiques.

Au regard de l'ensemble des résultats obtenus, les principales perspectives de recherche qui pourraient être mises en œuvre à ce stade, seraient de plusieurs types :

- L'étude de la diversité par la méthode DGGE nous a permis de comparer la diversité bactérienne entre les échantillons d'eau et de sédiment. Cependant il conviendrait de séquencer les différentes bandes des différents profils DGGE afin d'identifier les genres bactériens présents et dominants dans les différents échantillons et de pouvoir

les comparer avec les résultats obtenus par la méthode d'enrichissement. Les techniques de métagénomique avec utilisation du séquençage à haut débit devraient permettre d'avoir une meilleure idée de la composition de la flore bactérienne du site d'étude.

- Afin de donner une bonne image de la diversité microbienne, il conviendrait d'effectuer des prélèvements sur des zones plus importantes et porter un intérêt particulier à l'échantillonnage et s'intéresser également aux sédiments profonds.
- Dans ce travail nous avons étudié la capacité des bactéries isolées à dégrader le pétrole brut individuellement. Il est généralement admis qu'un seul microorganisme n'est pas capable de dégrader tous les composés de ce mélange complexe (pétrole brut) et les cultures mixtes ont non seulement un large choix de substrat mais aussi la dégradation peut se réaliser dans un système de cooxydation et commensalisme ([chikere et al., 2012](#)). De nombreux scientifiques ont reporté que les populations mixtes avec leurs vastes capacités enzymatiques sont nécessaires pour dégrader les mélanges complexes d'hydrocarbures tels que le pétrole dans les milieux marins. Il serait donc intéressant de faire des combinaisons des différentes souches isolées et former des consortiums pour atteindre une dégradation extensive.
- La recherche d'autres gènes de dégradation (AlmA, P450. . .) susceptible d'intervenir dans la dégradation des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques sont nécessaires afin de mieux caractériser la microflore bactérienne, et sa capacité de dégradation vis à vis d'une contamination par les hydrocarbures.
- La microflore autochtone des milieux contaminés par les hydrocarbures, constitue l'acteur principal du processus d'atténuation naturelle. C'est pour cela qu'il est important d'avoir une bonne vision des relations existant entre la composition des communautés bactériennes et leurs aptitudes à dégrader le polluant. Ceci permettrait de mieux comprendre le système de traitement des milieux contaminés par les hydrocarbures pétroliers et d'améliorer l'efficacité du traitement par bioremédiation.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abbasian, F., Lockington, R., Mallavarapu, M. and Naidu, R., 2015. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176(3), pp.670-699.
- Abdel-Shafy, H.I. and Mansour, M.S., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), pp.107-123.
- Acosta-González, A. and Marqués, S., 2016. Bacterial diversity in oil-polluted marine coastal sediments. *Current opinion in biotechnology*, 38, pp.24-32
- Adams, G.O., Fufeyin, P.T., Okoro, S.E. and Ehinomen, I., 2015. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: a review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1), pp.28-39.
- Aissat, N., Cheikh.O., 2013. Evaluation 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
- Albakjaji, M., 2011. La pollution de la mer méditerranée par les hydrocarbures liée au trafic maritime. Thèse de doctorat Paris est, 299p
- Alonso-Alvarez, C., Munilla, I., López-Alonso, M. and Velando, A., 2007. Sublethal toxicity of the Prestige oil spill on yellow-legged gulls. *Environment International*, 33(6), pp.773-781.
- Al-Awadhi, H., Dashti, N., Kansour, M., Sorkhoh, N. and Radwan, S., 2012. Hydrocarbon-utilizing bacteria associated with biofouling materials from offshore waters of the Arabian Gulf. *International biodeterioration & biodegradation*, 69, pp.10-16.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), pp.403-410.
- Amann, R.I., Ludwig, W. and Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, 59(1), pp.143-169.
- Amer, R.A., Mapelli, F., El Gendi, H.M., Barbato, M., Goda, D.A., Corsini, A., Cavalca, L., Fusi, M., Borin, S., Daffonchio, D. and Abdel-Fattah, Y.R., 2015. Bacterial diversity and bioremediation potential of the highly contaminated marine sediments at El-Max district (Egypt, Mediterranean Sea). *BioMed research international*, 2015.
- Aminaut, A., et Chaussepied, M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. Centre National pour l'Exploitation des Océans. 395p.

- Andreoni, V. and Gianfreda, L., 2007. Bioremediation and monitoring of aromatic-polluted habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(2), pp.287-308.
- Arvanitis, N., Katsifas, E.A., Chalkou, K.I., Meintanis, C. and Karagouni, A.D., 2008. A refinery sludge deposition site: presence of nahH and alkJ genes and crude oil biodegradation ability of bacterial isolates. *Biotechnology letters*, 30(12), pp.2105-2110.
- 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 en Sciences de l'Université d'Aix-Marseille en Chimie Analytique. 175 p.
- Atlas, R.M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews*, 45(1), p.180.
- Atlas, R.M., 1998. *Microbial Ecology: Fundamentals And Applications*, 4/E. Pearson Education India.
- Attar, M. and Hammat, M., 2009. Le Potentiel en Hydrocarbures de L'Algérie. *Rapport*.
- Balba, M.T., Al-Awadhi, N. and Al-Daher, R., 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of microbiological methods*, 32(2), pp.155-164.
- Ball, H.A., Johnson, H.A., Reinhard, M. and Spormann, A.M., 1996. Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *Journal of bacteriology*, 178(19), pp.5755-5761.
- Ballerini, D., Gatellier, C. and Vogel, T., 1998. Techniques de traitement par voie biologique de sols pollués. *Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie. Angers, Francia*, pp.18-157.
- Bamforth, S.M. and Singleton, I., 2005. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80(7), pp.723-736.
- Banat, I.M., 1995. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource technology*, 51(1), pp.1-12.
- Banat, I.M., Makkar, R.S. and Cameotra, S.S., 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 53(5), pp.495-508.
- Bargiela, R., Mapelli, F., Rojo, D., Chouaia, B., Tornés, J., Borin, S., Richter, M., Del Pozo, M.V., Cappello, S., Gertler, C. and Genovese, M., 2015. Bacterial population

and biodegradation potential in chronically crude oil-contaminated marine sediments are strongly linked to temperature. *Scientific reports*, 5, p.11651.

- Batista, S.B., Mounteer, A.H., Amorim, F.R. and Totola, M.R. 2006. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresource technology*, 97(6), pp.868-875.
- Baudouin, C., Charveron, M., Tarroux, R. and Gall, Y., 2002. Environmental pollutants and skin cancer. *Cell biology and toxicology*, 18(5), pp.341-348.
- Bélanger, D., 2009. *Utilisation de la faune macrobenthique comme bioindicateur de la qualité de l'environnement marin côtier* (Doctoral dissertation, Université de Sherbrooke.).
- Benmecheta, A., Belkhir, L. 2016. Oil pollution in the waters of Algeria. The Handbook of Environmental Chemistry ed. Barcelo, D. and Kostianoy, A.G. pp. 1–16. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Bento, F.M., de Oliveira Camargo, F.A., Okeke, B.C. and Frankenberger Jr, W.T., 2005. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiological research*, 160(3), pp.249-255.
- Ben Said, O., Goñi Urriza, M., El Bour, M., Duran, R. and Aissa, P., 2010. Diversité des bactéries capables de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques et résistantes aux métaux et aux antibiotiques isolés à partir des sédiments de la lagune de Bizerte, Tunisie. *Revue de Microbiologie, Industrie, Santé et Environnement*, 1, pp.32-48.
- Benzina-Tihar, F., Chaouche, T., Khoja, M. and Oulebsir, H.M.K., 2017, November. Characterization of Bacteria Isolated from Hydrocarbon Contaminated Soils and Producers of Biosurfactants. In *Euro-Mediterranean Conference for Environmental Integration* (pp. 281-282). Springer, Cham.
- Bertrand, J.C., Esteves, J.L., Mulyono, M. and Mille, G., 1986. Use of continuous flow through systems to determine petroleum hydrocarbon evolution in superficial marine sediments. *Chemosphere*, 15(2), pp.205-210.
- Bertrand, J.C. and Mille, G., 1989. Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures. *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques. Masson (Paris), Chapitre, 13*, pp.343-385.
- Bertrand, J.C., Bianchi, M., Al Mallah, M., Acquaviva, M. and 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), pp.125-138.
- Binazadeh, M., Karimi, I.A. and Li, Z., 2009. Fast biodegradation of long chain n-alkanes and crude oil at high concentrations with *Rhodococcus* sp. Moj-3449. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(3), pp.195-202.

- Binet, P., Portal, J.M. and Leyval, C., 2000. Dissipation of 3–6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(14), pp.2011-2017.
- 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), pp.273-280.
- Boopathy, R., 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource technology*, 74(1), pp.63-67.
- Boonchan, S., Britz, M.L. and Stanley, G.A., 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and environmental microbiology*, 66(3), pp.1007-1019
- Bordoloi, N.K. and Konwar, B.K., 2009. Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, 170(1), pp.495-505.
- Bossard, I. And Bartha, R., 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan, New York, pp. 440-445.
- Bouaziz. T., Djerrai.N., 2010. Etude des caractéristiques physicochimiques et Bactériologiques des eaux de mer et des sédiments dans le port de plaisance de Sidi Fredj. Mémoire d'ingénieur. Environnement marin. Alger : ENSSMAL. p.p. 35-39.
- Bouchez, M., Blanchet, D. and Vandecasteele, J.P., 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(1), pp.156-164.
- Bouchez Naïtali, M., Rakatozafy, H., Marchal, R., Leveau, J.Y. and Vandecasteele, J.P., 1999. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *Journal of Applied Microbiology*, 86(3), pp.421-428.
- Boukir, A., Aries, E., Guiliano, M., Asia, L., Doumenq, P. and Mille, G., 2001. Subfractionation, characterization and photooxidation of crude oil resins. *Chemosphere*, 43(3), pp.279-286.
- Brakstad, O.G. and Lødeng, A.G.G., 2005. Microbial diversity during biodegradation of crude oil in seawater from the North Sea. *Microbial Ecology*, 49(1), pp.94-103.
- Britton, L.N., 1984. Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. *Microbial degradation of organic compounds.*, pp.89-129.
- Brooijmans, R.J., Pastink, M.I. and Siezen, R.J., 2009. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. *Microbial biotechnology*, 2(6), pp.587-594.

- Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Pierard, C. and Garrigues, P.H., 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine chemistry*, 58(1-2), pp.85-97.
- Burlage, R.S., Hooper, S.W. and Sayler, G.S., 1989. The TOL (pWW0) catabolic plasmid. *Applied and environmental microbiology*, 55(6), p.1323.
- Cantwell, S.G., Lau, E.P., Watt, D.S. and Fall, R.R., 1978. Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *Journal of bacteriology*, 135(2), pp.324-333.
- Cappello, S., Caruso, G., Zampino, D., Monticelli, L.S., Maimone, G., Denaro, R., Tripodo, B., Troussellier, M., Yakimov, M. and Giuliano, L., 2007. Microbial community dynamics during assays of harbour oil spill bioremediation: a microscale simulation study. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), pp.184-194.
- Cappello, S. and Yakimov, M.M., 2010. *Alcanivorax*. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1737-1748). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Cappello, S., Calogero, R., Santisi, S., Genovese, M., Denaro, R., Genovese, L., Giuliano, L., Mancini, G. and Yakimov, M.M., 2015. Bioremediation of oil polluted marine sediments: A bio-engineering treatment. *International Microbiology*, 18(2), pp.127-134.
- 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, pp.235-244.
- Casamayor, E.O., Schäfer, H., Bañeras, L., Pedrós-Alió, C. and Muyzer, G., 2000. Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, 66(2), pp.499-508.
- Catania, V., Santisi, S., Signa, G., Vizzini, S., Mazzola, A., Cappello, S., Yakimov, M.M. and Quatrini, P., 2015. Intrinsic bioremediation potential of a chronically polluted marine coastal area. *Marine pollution bulletin*, 99(1-2), pp.138-149.
- Catania, V., Sara, G., Settanni, L. and Quatrini, P., 2016. Bacterial communities in sediment of a Mediterranean marine protected area. *Canadian journal of microbiology*, 63(4), pp.303-311.
- Catania, V., Cappello, S., Di Giorgi, V., Santisi, S., Di Maria, R., Mazzola, A., Vizzini, S. and Quatrini, P., 2018. Microbial communities of polluted sub-surface marine sediments. *Marine pollution bulletin*, 131, pp.396-406.
- Catania, V., 2018. Biodegradazione degli idrocarburi: dalle comunità microbiche marine ai sistemi ready to use per il biorisanamento. Doctorat en sciences moléculaire et biomoléculaire de l'université de Palermo, 124 p.

- Cerniglia, C.E., 1984. Microbial transformation of aromatic hydrocarbons.
- Cerniglia, C.E., 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*, 4(3), pp.331-338.
- Chaillan, F., Le Flèche, A., Bury, E., Phantavong, Y.H., Grimont, P., Saliot, A. and Oudot, J., 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in microbiology*, 155(7), pp.587-595.
- Chandra, S., Sharma, R., Singh, K. and Sharma, A., 2013. Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Annals of microbiology*, 63(2), pp.417-431.
- Caulet J., 1972. Les sédiments organogènes du précontinent algérien. Mémoire du muséum national d'histoires naturelles, nouvelle série, 289p.
- Chen, C., Liu, Q., Liu, C. and Yu, J., 2017. Effect of different enrichment strategies on microbial community structure in petroleum-contaminated marine sediment in Dalian, China. *Marine pollution bulletin*, 117(1-2), pp.274-282.
- Chikere, C.B., Chikere, B.O. and Okpokwasili, G.C., 2012. Bioreactor-based bioremediation of hydrocarbon-polluted Niger Delta marine sediment, Nigeria. 3 *Biotech*, 2(1), pp.53-66.
- Chikhi, S., Ferradji, F.Z., Badis, A. and Bouzid, B., 2016. Microbial removal of xylene using free and immobilized *Streptomyces* sp. AB1: bioreactors application. *Desalination and Water Treatment*, 57(13), pp.6148-6156.
- China, B., Pirson, V. and 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), pp.3462-3465.
- Chouari, R., Le Paslier, D., Daegelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J. and Sghir, A., 2003. Molecular evidence for novel planctomycete diversity in a municipal wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(12), pp.7354-7363.
- Chroma, L., Mackova, M., Kucerova, P., In Der Wiesche, C., Burkhard, J. and Macek, T., 2002. Enzymes in plant metabolism of PCBs and PAHs. *Acta biotechnologica*, 22(1-2), pp.35-41.
- Churchill, P.F., Dudley, R.J. and Churchill, S.A., 1995. Surfactant-enhanced bioremediation. *Waste management*, 15(5-6), pp.371-377.
- Clarridge, J.E., 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 17(4), pp.840-862.

- Cohen, A., Nugegoda, D. and Gagnon, M.M., 2001. Metabolic responses of fish following exposure to two different oil spill remediation techniques. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 48(3), pp.306-310.
- Cojan I., Renard M., 1997. Sédimentologie. Dunod, Paris, 2ème édition, collection Sciences Sup., p. 481.
- Coll, M., Piroddi, C., Steenbeek, J., Kaschner, K., Lasram, F.B.R., Aguzzi, J., Ballesteros, E., Bianchi, C.N., Corbera, J., Dailianis, T. and Danovaro, R., 2010. The biodiversity of the Mediterranean Sea: estimates, patterns, and threats. *PloS one*, 5(8), p.e11842.
- Costa, A.S., Romão, L.P.C., Araújo, B.R., Lucas, S.C.O., Maciel, S.T.A., Wisniewski Jr, A. and Alexandre, M.D.R., 2012. Environmental strategies to remove volatile aromatic fractions (BTEX) from petroleum industry wastewater using biomass. *Bioresource Technology*, 105, pp.31-39.
- Coulon, F., McKew, B.A., Osborn, A.M., McGenity, T.J. and Timmis, K.N., 2007. Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environmental Microbiology*, 9(1), pp.177-186.
- Crisafi, F., Genovese, M., Smedile, F., Russo, D., Catalfamo, M., Yakimov, M., Giuliano, L. and Denaro, R., 2016. Bioremediation technologies for polluted seawater sampled after an oil-spill in Taranto Gulf (Italy): A comparison of biostimulation, bioaugmentation and use of a washing agent in microcosm studies. *Marine pollution bulletin*, 106(1-2), pp.119-126.
- Dachs, J., Lohmann, R., Ockenden, W.A., Méjanelle, L., Eisenreich, S.J. and Jones, K.C., 2002. Oceanic biogeochemical controls on global dynamics of persistent organic pollutants. *Environmental science & technology*, 36(20), pp.4229-4237
- Daffonchio, D., Ferrer, M., Mapelli, F., Cherif, A., Lafraya, A., Malkawi, H.I., Yakimov, M.M., Abdel-Fattah, Y.R., Blaghen, M., Golyshin, P.N. and Kalogerakis, N., 2013. Bioremediation of Southern Mediterranean oil polluted sites comes of age. *New biotechnology*, 30(6), pp.743-748.
- Dalemont, E., 1998. Le pétrole. Presses Universitaires de France, 135 p.
- Das, N. and Chandran, P., 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011.
- Das, K. and Mukherjee, A.K., 2007a. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource technology*, 98(7), pp.1339-1345.
- Das, K. and Mukherjee, A.K., 2007b. Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains: role of

- biosurfactants in enhancing bioavailability. *Journal of applied microbiology*, 102(1), pp.195-203.
- De Pasquale, C., Palazzolo, E., Piccolo, L.L. and Quatrini, P., 2012. Degradation of long-chain n-alkanes in soil microcosms by two actinobacteria. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47(3), pp.374-381.
 - Del Gratta, F., Durif, M., Fagault, Y. and Zdanevitch, I., 2004. Exposition by inhalation to the benzene, toluene, ethyl-benzene and xylenes (BTEX) in the air. Sources, measures and concentrations.
 - Deppe, U., Richnow, H.H., Michaelis, W. and Antranikian, G., 2005. Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. *Extremophiles*, 9(6), pp.461-470.
 - Desforges, J.P.W., Sonne, C., Levin, M., Siebert, U., De Guise, S. and Dietz, R., 2016. Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals. *Environment International*, 86, pp.126-139.
 - Desai, J.D. and Banat, I.M., 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular biology reviews*, 61(1), pp.47-64.
 - Deyme, R., 2011. Transport vertical des particules dans l'océan, étude des contaminants organiques et des biomarqueurs du phytoplancton en mer Ligure (NW Méditerranée). *Thèse de Doctorat*. Université Pierre et Marie Curie.
 - Deziel, E., Paquette, G., Villemur, R., Lepine, F. and Bisaillon, J., 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and environmental microbiology*, 62(6), pp.1908-1912.
 - Díaz, E., Jiménez, J.I. and Nogales, J., 2013. Aerobic degradation of aromatic compounds. *Current opinion in biotechnology*, 24(3), pp.431-442.
 - Dubinsky, E.A., Conrad, M.E., Chakraborty, R., Bill, M., Borglin, S.E., Hollibaugh, J.T., Mason, O.U., M. Piceno, Y., Reid, F.C., Stringfellow, W.T. and Tom, L.M., 2013. Succession of hydrocarbon-degrading bacteria in the aftermath of the Deepwater Horizon oil spill in the Gulf of Mexico. *Environmental science & technology*, 47(19), pp.10860-10867
 - Dutta, T.K. and Harayama, S., 2001. Biodegradation of n-alkylcycloalkanes and n-alkylbenzenes via new pathways in *Alcanivorax* sp. strain MBIC 4326. *Applied and environmental microbiology*, 67(4), pp.1970-1974.
 - Dyksterhouse, 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), pp.116-123.
 - D.T.P., 2009. Etude de désensablement du port de plaisance de Sidi Fredj : collecte et analyse des données de base, annexe 1, Tome 1.

- Eddouaouda, K., Mnif, S., Badis, A., Younes, S.B., Cherif, S., Ferhat, S., Mhiri, N., Chamkha, M. and Sayadi, S., 2012. Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. *Journal of basic microbiology*, 52(4), pp.408-418.
- El Fantroussi, S. and Agathos, S.N., 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. *Current opinion in microbiology*, 8(3), pp.268-275.
- Engelhardt, M.A., Daly, K., Swannell, R.P.J. and Head, I.M., 2001. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, Gram-positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. nov. *Journal of Applied Microbiology*, 90(2), pp.237-247.
- Ennadir, J., Hassikou, R., Al Askari, G., Arahou, M. and Bouazza, F., Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées des farines de blé d'origine marocaine (Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat flour from Morocco).
- EPA., 1996. Method 3510c: Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction Part of Test Methods for Evaluation Solid Waste, Physical/Chemical Methods. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency.
- Evans, P.J., Mang, D.T., Kim, K.S. and Young, L.Y., 1991. Anaerobic degradation of toluene by a denitrifying bacterium. *Applied and environmental microbiology*, 57(4), pp.1139-1145.
- Evans, F.F., Rosado, A.S., Sebastián, G.V., Casella, R., Machado, P.L., Holmström, C., Kjelleberg, S., van Elsas, J.D. and Seldin, L., 2004. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 49(2), pp.295-305.
- Faiferlick, D., 1997. Open-water response strategies: in-situ burning. Oil Spill : Behaviour, Response and Planning. Proceedings of the 1997 International Oil Spill Conference. Washington, USA.
- Fall, R.R., Brown, J.L. and Schaeffer, T.L., 1979. Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Applied and environmental microbiology*, 38(4), pp.715-722.
- Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D. and Larroche, C., 2008. In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: a review. *Bioresource technology*, 99(13), pp.5296-5308.
- Fathepure, B.Z., 2014. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Frontiers in microbiology*, 5, p.173.

- Feknous, N., Branes, Z., Rouabhia, K., Batisson, I. and Amblard, C., 2017. Isolation characterization and growth of locally isolated hydrocarbonoclastic marine bacteria (eastern Algerian coast). *Environmental monitoring and assessment*, 189(2), p.49.
- Feknous, N., 2017. Essais d'isolement et d'identification des souches bactériennes à pouvoir auto-épurateur vis-à-vis des hydrocarbures. Doctorat en Microbiologie de l'université Badji Mokhtar, Annaba. 159 p.
- Fellenberg, G., 1980. Introdução aos Problemas da Poluição Ambiental-EPU. *São Paulo*.
- Fent, K., 2004. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, 205(3), pp.223-240.
- Ferek, R.J., Allen, A.A. and Kucklick, J.H., 1997. *Air quality considerations involving in-situ burning*. Marine Preservation Association.
- Fernandez-Linares, L., Acquaviva, M., Bertrand, J.C. and Gauthier, M., 1996. Effect of sodium chloride concentration on growth and degradation of eicosane by the marine halotolerant bacterium *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 19(1), pp.113-121.
- Ferradji, F.Z., Mnif, S., Badis, A., Rebbani, S., Fodil, D., Eddouaouda, K. and Sayadi, S., 2014. Naphthalene and crude oil degradation by biosurfactant producing *Streptomyces* spp. isolated from Mitidja plain soil (North of Algeria). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86, pp.300-308.
- Finnerty, W.R., 1990. Assay methods for long-chain alkane oxidation in *Acinetobacter*. *Methods in Enzymology*; (USA), 188.
- Fodelianakis, S., Antoniou, E., Mapelli, F., Magagnini, M., Nikolopoulou, M., Marasco, R., Barbato, M., Tsiola, A., Tsikopoulou, I., Giaccaglia, L. and Mahjoubi, M., 2015. Allochthonous bioaugmentation in ex situ treatment of crude oil-polluted sediments in the presence of an effective degrading indigenous microbiome. *Journal of hazardous materials*, 287, pp.78-86.
- Foght, J., 2008. Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: pathways and prospects. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 15(2-3), pp.93-120.
- Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A. and Olsen, G.J., 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(8), pp.2461-2470.
- Fries, M.R., Zhou, J., Chee-Sanford, J. and Tiedje, J.M., 1994. Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8), pp.2802-2810.

- Fuentes, S., Méndez, V., Aguila, P. and Seeger, M., 2014. Bioremediation of petroleum hydrocarbons: catabolic genes, microbial communities, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(11), pp.4781-4794.
- Furukawa, K., Hirose, J., Suyama, A.K.I.K.O., Zaiki, T.O.M.O.K.O. and Hayashida, S., 1993. Gene components responsible for discrete substrate specificity in the metabolism of biphenyl (bph operon) and toluene (tod operon). *Journal of bacteriology*, 175(16), pp.5224-5232.
- Gao, X., Gao, W., Cui, Z., Han, B., Yang, P., Sun, C. and 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), pp.373-380.
- Gargouri, B., Aloui, F. and Sayadi, S., 2012. Reduction of petroleum hydrocarbons content from an engine oil refinery wastewater using a continuous stirred tank reactor monitored by spectrometry tools. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 87(2), pp.238-243.
- Gasperi, J., 2006. Introduction et transfert des hydrocarbures à différentes échelles spatiales dans le réseau d'assainissement parisien (Doctoral dissertation, Marne-la-vallée, ENPC)
- Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P. and Bertrand, J.C., 1992. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 42(4), pp.568-576.
- Genovese, M., Crisafi, F., Denaro, R., Cappello, S., Russo, D., Calogero, R., Santisi, S., Catalfamo, M., Modica, A., Smedile, F. and Genovese, L., 2014. Effective bioremediation strategy for rapid in situ cleanup of anoxic marine sediments in mesocosm oil spill simulation. *Frontiers in microbiology*, 5, p.162.
- Gentile, G., Bonsignore, M., Santisi, S., Catalfamo, M., Giuliano, L., Genovese, L., Yakimov, M.M., Denaro, R., Genovese, M. and Cappello, S., 2016. Biodegradation potentiality of psychrophilic bacterial strain *Oleispira antarctica* RB-8T. *Marine pollution bulletin*, 105(1), pp.125-130.
- Gesteira, J.G. and Dauvin, J.C., 2000. Amphipods are good bioindicators of the impact of oil spills on soft-bottom macrobenthic communities. *Marine Pollution Bulletin*, 40(11), pp.1017-1027.
- Ghazali, F.M., Rahman, R.N.Z.A., Salleh, A.B. and Basri, M., 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(1), pp.61-67.
- Ghoreishi, G., Alemzadeh, A., Mojarrad, M. and Djavaheiri, M., 2017. Bioremediation capability and characterization of bacteria isolated from petroleum contaminated soils in Iran. *Sustainable Environment Research*, 27(4), pp.195-202.

- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T.K. and Ahn, Y., 2016. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Frontiers in microbiology*, 7, p.1369.
- Ghosh, I., Jasmine, J. and Mukherji, S., 2014. Biodegradation of pyrene by a *Pseudomonas aeruginosa* strain RS1 isolated from refinery sludge. *Bioresource technology*, 166, pp.548-558.
- Gibson, T.D. and Subramanian, V., 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In: Gibson, T.D. (Ed.), *Microbial degradation of organic compounds*, pp. 181-252. Marcel Dekker, New York, Basel.
- Gieg, L.M., Fowler, S.J. and Berdugo-Clavijo, C., 2014. Syntrophic biodegradation of hydrocarbon contaminants. *Current Opinion in Biotechnology*, 27, pp.21-29.
- Golyshin, P.N., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Lünsdorf, H., Timmis, K.N. and Yakimov, M.M., 2002. Oleiphilaceae fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(3), pp.901-911.
- Goswami, P. and Singh, H.D., 1991. Different modes of hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnology and Bioengineering*, 37(1), pp.1-11.
- Gottschalk, G. and Knackmuss, H.J., 1993. Bacteria and the biodegradation of chemicals achieved naturally, by combination, or by construction. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 32(10), pp.1398-1408.
- Grosclaude, G., 1999. L'eau : usage et polluants. Edition INRA, 210p.
- Grova, N., Feidt, C., Crépineau, C., Laurent, C., Lafargue, P.E., Hachimi, A. and Rychen, G., 2002. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in milk collected near potential contamination sources. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 50(16), pp.4640-4642.
- Guiraud, J.P., 1998. Microbiologie Alimentaire. Dunod. Paris. France.
- Gundersen, D.T., Kristanto, S.W., Curtis, L.R., Al-Yakoob, S.N., Metwally, M.M. and Al-Ajmi, D., 1996. Subacute toxicity of the water-soluble fractions of Kuwait crude oil and partially combusted crude oil on *Menidia beryllina* and *Palaemonetes pugio*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 31(1), pp.1-8.
- Hagström, Å., Pommier, T., Rohwer, F., Simu, K., Svensson, D. and Zweifel, U., 2002. Bio-informatics reveal surprisingly low species richness in marine bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol*, 67, pp.3628-33.

- Hara, A., Syutsubo, K. and Harayama, S., 2003. Alcanivorax which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation. *Environmental Microbiology*, 5(9), pp.746-753.
- Hara, A., Baik, S.H., Syutsubo, K., Misawa, N., Smits, T.H., Van Beilen, J.B. and Harayama, S., 2004. Cloning and functional analysis of alkB genes in Alcanivorax borkumensis SK2. *Environmental Microbiology*, 6(3), pp.191-197.
- Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y. and Shutsubo, K., 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1(1), pp.63-70.
- Harayama, S., Kasai, Y. and Hara, A., 2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current opinion in biotechnology*, 15(3), pp.205-214.
- Harms, G., Rabus, R. and Widdel, F., 1999. Anaerobic oxidation of the aromatic plant hydrocarbon p-cymene by newly isolated denitrifying bacteria. *Archives of microbiology*, 172(5), pp.303-312.
- 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.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G. and Cappello, S., 2012. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine pollution bulletin*, 64(1), pp.7-12
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Caruso, G. and Cappello, S., 2014. Bioremediation (bioaugmentation/biostimulation) trials of oil polluted seawater: a mesocosm simulation study. *Marine environmental research*, 95, pp.28-38.
- Head, I.M., Jones, D.M. and Röling, W.F., 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), p.173
- Hedlund, B.P., Geiselbrecht, A.D., Bair, T.J. and Staley, J.T., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, Neptunomonas naphthovorans gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), pp.251-259.
- Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R. and Widdel, F., 1998. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(5), pp.459-473.
- Hendrickx, B., Junca, H., Vosahlova, J., Lindner, A., Rüegg, I., Bucheli-Witschel, M., Faber, F., Egli, T., Mau, M., Schlömann, M. and Brennerova, M., 2006. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *Journal of Microbiological Methods*, 64(2), pp.250-265.

- Hobbie, J.E., Daley, R.J. and Jasper, S., 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33(5), pp.1225-1228.
- Hommel, R.K., Stegner, S., Kleber, H.P. and Weber, L., 1994. Effect of ammonium ions on glycolipid production by *Candida (Torulopsis) apicola*. *Applied microbiology and biotechnology*, 42(2-3), pp.192-197.
- Hosokawa, R., Nagai, M., Morikawa, M. and Okuyama, H., 2009. Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(9), pp.1519-1528.
- Huang, X.F., Guan, W., Liu, J., Lu, L.J., Xu, J.C. and Zhou, Q., 2010. Characterization and phylogenetic analysis of biodemulsifier-producing bacteria. *Bioresource technology*, 101(1), pp.317-323.
- Huang, R.Y., Tian, W.J., Liu, Q., Yu, H.B., Jin, X., Zhao, Y.G., Zhou, Y.H. and Feng, G., 2016. Enhanced biodegradation of pyrene and indeno (1, 2, 3-cd) pyrene using bacteria immobilized in cinder beads in estuarine wetlands. *Marine pollution bulletin*, 102(1), pp.128-133.
- Huu, N.B., Denner, E.B., Ha, D.T., Wanner, G. and Stan-Lotter, H., 1999. *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49(2), pp.367-375.
- IMO/UNEP., 1995. Guidelines on Oil Spill Dispersant Application including Environmental Considerations, International maritime organization.
- IPCS, O., 1998. Environmental Health Criteria 202: Selected Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons World Health Organisation, International Programme on Chemical Safety.
- Jada, A. and Salou, M., 2002. Effects of the asphaltene and resin contents of the bitumens on the water-bitumen interface properties. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 33(1-3), pp.185-193.
- Jaekel, U., Musat, N., Adam, B., Kuypers, M., Grundmann, O. and Musat, F., 2013. Anaerobic degradation of propane and butane by sulfate-reducing bacteria enriched from marine hydrocarbon cold seeps. *The ISME journal*, 7(5), p.885.
- Janbandhu, A. and Fulekar, M.H., 2011. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of Hazardous Materials*, 187(1-3), pp.333-340.
- Jeon, C.O., Park, W., Padmanabhan, P., DeRito, C., Snape, J.R. and Madsen, E.L., 2003. Discovery of a bacterium, with distinctive dioxygenase, that is responsible for in situ biodegradation in contaminated sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), pp.13591-13596.

- Ji, Y., Mao, G., Wang, Y. and Bartlam, M., 2013. Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. *Frontiers in microbiology*, 4, p.58.
- Journal officiel de la république algérienne., 2006. Valeurs limites des paramètres de rejets d'effluents liquides industriels N°26 : 24Rabie Elaouel 427 23avril 2006
- Jouanneau, Y., Martin, F., Krivobok, S. and Willison, J.C., 2011. Ringhydroxylating dioxygenases involved in PAH biodegradation: structure, function and biodiversity. *Microbial bioremediation of non metals: current research*. Caister Academic Press, Norflok, UK, pp.149-175.
- Juhasz, A.L. and Naidu, R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [a] pyrene. *International biodeterioration & biodegradation*, 45(1-2), pp.57-88.
- Kada. M., 2012. Détection de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans l'environnement marin, influence des apports anthropiques. Mémoire de magister. Alger : ENSSMAL, p 77.
- Kahng, H.Y., Malinverni, J.C., Majko, M.M. and Kukor, J.J., 2001. Genetic and Functional Analysis of the tbc Operons for Catabolism of Alkyl-and Chloroaromatic Compounds in Burkholderia sp. Strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(10), pp.4805-4816.
- Kaiser, J., 2001. *Bioindicators and biomarkers of environmental pollution and risk assessment*. Science Publishers, Inc.
- Kanaly, R.A. and Harayama, S., 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of bacteriology*, 182(8), pp.2059-2067.
- Kaplan, C.W. and Kitts, C.L., 2004. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(3), pp.1777-1786.
- Kasai, Y., Kishira, H., Sasaki, T., Syutsubo, K., Watanabe, K. and Harayama, S., 2002. Predominant growth of Alcanivorax strains in oil-contaminated and nutrient-supplemented sea water. *Environmental Microbiology*, 4(3), pp.141-147.
- Kim, I.S., Park, J.S. and Kim, K.W., 2001. Enhanced biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using nonionic surfactants in soil slurry. *Applied Geochemistry*, 16(11-12), pp.1419-1428.
- Kim, E.J., Oh, J.E. and Chang, Y.S., 2003. Effects of forest fire on the level and distribution of PCDD/Fs and PAHs in soil. *Science of the Total Environment*, 311(1-3), pp.177-189.

- Kim, M., Oh, H.S., Park, S.C. and Chun, J., 2014. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(2), pp.346-351.
- Kleinstuber, S., Schleinitz, K.M. and Vogt, C., 2012. Key players and team play: anaerobic microbial communities in hydrocarbon-contaminated aquifers. *Applied microbiology and biotechnology*, 94(4), pp.851-873.
- Kloos, K., Munch, J.C. and Schlöter, M., 2006. A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (alkB) in soils based on PCR-hybridization. *Journal of Microbiological Methods*, 66(3), pp.486-496.
- Kluser, S., Richard, J.P., Giuliani, G., De Bono, A. and Peduzzi, P., 2006. Illegal oil discharge in European Seas.
- Kouzayha, M., 2011. Développement des méthodes analytique pour la détection et la quantification de traces des HAP et de pesticides dans l'eau. Application à l'évaluation de la qualité des eaux libanaises. Thèse de Doctorat en chimie analytique et l'environnement, université de bordeaux, 231 p.
- Kuhn, E., Bellicanta, G.S. and Pellizari, V.H., 2009. New alk genes detected in Antarctic marine sediments. *Environmental microbiology*, 11(3), pp.669-673.
- Kumar, R., Mishra, A. and Jha, B., 2019. Bacterial community structure and functional diversity in subsurface seawater from the western coastal ecosystem of the Arabian Sea, India. *Gene*.
- Lafortune, I., 2007. *Étude de la diversité d'un consortium bactérien capable de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans un système biphasique* (Doctoral dissertation, Université du Québec, Institut National de la Recherche Scientifique).
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, pp.115-175
- Larid M., 1992. Cours d'aménagement du littoral. Alger. I.S.M.A.L, 159p.
- Laurent, E.N. and Castellanet, F., 2003. Rapport sur la pollution marine par hydrocarbures et les dégazages sauvages en Méditerranée.
- Leclaire, L., 1972. La sédimentation holocène sur le versant méridional Algéro-Baléares (Précontinent algérien). *Mém Mus Natl Hist Paris*, 124, pp.1-392.
- Leahy, J.G. and Colwell, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological reviews*, 54(3), pp.305-315.
- Lei, A.P., Hu, Z.L., Wong, Y.S. and Tam, N.F.Y., 2007. Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource technology*, 98(2), pp.273-280.

- Leys, N.M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Wattiau, P., Top, E.M., Verstraete, W. and Springael, D., 2005. Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology*, 51(3), pp.375-388.
- Li, H., Wang, X.L., Mu, B.Z., Gu, J.D., Liu, Y.D., Lin, K.F., Lu, S.G., Lu, Q., Li, B.Z., Li, Y.Y. and Du, X.M., 2013. Molecular detection, quantification and distribution of alkane-degrading bacteria in production water from low temperature oilfields. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 76, pp.49-57.
- Lipiatou, E. and Saliot, A., 1991. Fluxes and transport of anthropogenic and natural polycyclic aromatic hydrocarbons in the western Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*, 32(1), pp.51-71.
- Liste, H.H. and Alexander, M., 2000. Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere*, 40(1), pp.7-10.
- Liu, C. and Shao, Z., 2005. *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(3), pp.1181-1186.
- Loughheed, L.W., Edgar, G.J. and Snell, H.L., 2002. *Biological impacts of the Jessica Oil Spill on the Galápagos environment*. Charles Darwin Foundation for the Galapagos Islands. 127p
- Lovley, D.R. and Lonergan, D.J., 1990. Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS-15. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), pp.1858-1864.
- Lo Piccolo, L., De Pasquale, C., Fodale, R., Puglia, A.M. and Quatrini, P., 2011. Involvement of an alkane hydroxylase system of *Gordonia* sp. strain SoCg in degradation of solid n-alkanes. *Applied and environmental microbiology*, 77(4), pp.1204-1213.
- Lundstedt S., 2003. Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes. *PhD Thesis, Umea University, Sweden* , 56 p.
- L.E.M., 1998. Etude de délimitation d'une zone d'extraction de sable en baie d'Alger, 22p.
- MacNaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y.J. and White, D.C., 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(8), pp.3566-3574.
- Maeng, J.H., Sakai, Y., Tani, Y. and Kato, N., 1996. Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *Journal of bacteriology*, 178(13), pp.3695-3700.

- 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), pp.723-733.
- Mahjoubi, M., Cappello, S., Souissi, Y., Jaouani, A. and Cherif, A., 2018. Microbial Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon–Contaminated Marine Environments. In *Recent Insights in Petroleum Science and Engineering*. InTech.
- Maki, H., Sasaki, T. and Harayama, S., 2001. Photo-oxidation of biodegraded crude oil and toxicity of the photo-oxidized products. *Chemosphere*, 44(5), pp.1145-1151.
- Marchal, N., Bourdon, J.I. and Bimet, P., 1988. *Le laboratoire de bacteriologie medicale*. Paris: Doin.
- Margesin, R. and Schinner, F., 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied microbiology and biotechnology*, 56(5-6), pp.650-663.
- Margesin, R., Spröer, C., Schumann, P. and Schinner, F., 2003. *Pedobacter cryoconitis* sp. nov., a facultative psychrophile from alpine glacier cryoconite. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(5), pp.1291-1296.
- Marín, M., Pedregosa, A., Ríos, S. and Laborda, F., 1996. Study of factors influencing the degradation of heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. *International biodeterioration & biodegradation*, 38(2), pp.69-75.
- Mascarelli, A., 2010. Deepwater Horizon: after the oil. *Nature News*, 467(7311), pp.22-24.
- Mau, S., Valentine, D.L., Clark, J.F., Reed, J., Camilli, R. and Washburn, L., 2007. Dissolved methane distributions and air-sea flux in the plume of a massive seep field, Coal Oil Point, California. *Geophysical Research Letters*, 34(22).
- McGenity, T.J., Folwell, B.D., McKew, B.A. and Sanni, G.O., 2012. Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquatic Biosystems*, 8(1), p.10.
- Meckenstock, R.U., Boll, M., Mouttaki, H., Koelschbach, J.S., Tarouco, P.C., Weyrauch, P., Dong, X. and Himmelberg, A.M., 2016. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 26(1-3), pp.92-118.
- McKew, B.A., Coulon, F., Yakimov, M.M., Denaro, R., Genovese, M., Smith, C.J., Osborn, A.M., Timmis, K.N. and McGenity, T.J., 2007. Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environmental Microbiology*, 9(6), pp.1562-1571.

- Merlin, F.X., 2005. *Traitement aux dispersants des nappes de pétrole en mer traitement par voie aérienne et par bateau guide opérationnel*. Technical report, CEDRE.
- Michel, P., 1972. Mesure de la demande chimique en oxygène dans l'eau de mer. *Rev. des Trav. l'Institut des Pêches Marit*, 36(3), pp.361-365.
- Milinkovitch, T., 2011. Stratégie de lutte contre les catastrophes pétrolières et risque environnemental associé : évaluation de la toxicité d'un dispersant en milieu côtier chez *Liza* sp. Life Sciences. Université de La Rochelle, 217p.
- Militon, C., 2012 Caractérisation des communautés procaryotiques impliquées dans la bioremédiation d'un sol pollué par des hydrocarbures et développement d'outils d'analyse à haut débit. Thèse de doctorat, P. 441..
- Millot, C., 1989, September. La circulation générale en Méditerranée occidentale: Aperçu de nos connaissances et projets d'études. In *Annales de géographie* (pp. 497-515). Armand Colin.
- Mittal, A. and Singh, P., 2009. Isolation of hydrocarbon degrading bacteria from soils contaminated with crude oil spills.
- Miyasaka, T., Asami, H. and Watanabe, K., 2006. Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene-contaminated marine sediments. *Biodegradation*, 17(3), pp.227-235.
- Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M. and Sayadi, S., 2011. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. *Journal of applied microbiology*, 111(3), pp.525-536.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z. and Labuzek, S., 2003. Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12(1).
- Murray, A.E., Hollibaugh, J.T. and Orrego, C., 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(7), pp.2676-2680.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), pp.695-700.
- M'rassi, A.G., Bensalah, F., Gury, J. and Duran, R., 2015. Isolation and characterization of different bacterial strains for bioremediation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(20), pp.15332-15346.

- National Research Council (U.S.), 2002. Oil in the sea: inputs, fates and effects. National Academy of Science, Washington DC.
- Nikolopoulou, M. and Kalogerakis, N., 2009. Biostimulation strategies for fresh and chronically polluted marine environments with petroleum hydrocarbons. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 84(6), pp.802-807.
- Nikolopoulou, M., Pasadakis, N. and Kalogerakis, N., 2013a. Evaluation of autochthonous bioaugmentation and biostimulation during microcosm-simulated oil spills. *Marine pollution bulletin*, 72(1), pp.165-173.
- Nikolopoulou, M., Eickenbusch, P., Pasadakis, N., Venieri, D. and Kalogerakis, N., 2013b. Microcosm evaluation of autochthonous bioaugmentation to combat marine oil spills. *New biotechnology*, 30(6), pp.734-742.
- NOAA., 2010. Characteristics of Response Strategies: A Guide for Spill Response Planning in Marine Environments. U.S. Dept. of Commerce. Seattle, WA: Emergency Response Division, Office of Response and Restoration National Oceanic and Atmospheric Administration. 76 pp.
- Notar, M., Leskovšek, H. and Faganeli, J., 2001. Composition, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 42(1), pp.36-44.
- Ouverney, C.C. and Fuhrman, J.A. (1999) Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types in situ, *Applied and environmental microbiology*, 65, 1746-1752.
- Owsianiak, M., Chrzanowski, Ł., Szulc, A., Staniewski, J., Olszanowski, A., Olejnik-Schmidt, A.K. and Heipieper, H.J., 2009. Biodegradation of diesel/biodiesel blends by a consortium of hydrocarbon degraders: effect of the type of blend and the addition of biosurfactants. *Bioresource Technology*, 100(3), pp.1497-1500.
- O.N.M., 2003. Office National de la Météorologie. Relevé météorologique 1993-2004.
- Paisse, S., Duran, R., Coulon, F. and Goñi-Urriza, M., 2011. Are alkane hydroxylase genes (alkB) relevant to assess petroleum bioremediation processes in chronically polluted coastal sediments?. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(4), pp.835-844.
- Pamp, S.J. and Tolker-Nielsen, T., 2007. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 189(6), pp.2531-2539.
- Parales, R.E., Bruce, N.C., Schmid, A. and Wackett, L.P., 2002. Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis (B3). *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(10), pp.4699-4709.

- Parra-Barraza, H., Hernández-Montiel, D., Lizardi, J., Hernández, J., Urbina, R.H. and Valdez, M.A., 2003. The zeta potential and surface properties of asphaltenes obtained with different crude oil/n-heptane proportions*. *Fuel*, 82(8), pp.869-874.
- Payne, J.R. and Phillips, C.R., 1985. Photochemistry of petroleum in water. *Environmental science & technology*, 19(7), pp.569-579.
- Pelmont, J., 1995. Bactéries et environnement-adaptation biologique. OPU. P 875.
- Pérez-Cadahía, B., Lafuente, A., Cabaleiro, T., Pásaro, E., Méndez, J. and Laffon, B., 2007. Initial study on the effects of Prestige oil on human health. *Environment international*, 33(2), pp.176-185.
- Peressutti, S.R., Alvarez, H.M. and Pucci, O.H., 2003. Dynamics of hydrocarbon-degrading bacteriocenosis of an experimental oil pollution in Patagonian soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52(1), pp.21-30.
- Peterson, C.H., Rice, S.D., Short, J.W., Esler, D., Bodkin, J.L., Ballachey, B.E. and Irons, D.B., 2003. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science*, 302(5653), pp.2082-2086.
- Petti, C.A., Polage, C.R. and Schreckenberger, P., 2005. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *Journal of clinical microbiology*, 43(12), pp.6123-6125.
- Pettigrove, V. and Hoffmann, A., 2005. Effects of long-chain hydrocarbon-polluted sediment on freshwater macroinvertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(10), pp.2500-2508.
- Phale, P.S., Basu, A., Majhi, P.D., Deveryshetty, J., Vamsee-Krishna, C. and Shrivastava, R., 2007. Metabolic diversity in bacterial degradation of aromatic compounds. *Omics: a journal of integrative biology*, 11(3), pp.252-279.
- Pilon-Smits, E., 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, pp.15-39.
- Piubeli, F., Grossman, M.J., Fantinatti-Garboggini, F. and Durrant, L.R., 2014. Phylogenetic analysis of the microbial community in hypersaline petroleum produced water from the Campos Basin. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(20), pp.12006-12016.
- Pornsunthorntawe, O., Wongpanit, P., Chavadej, S., Abe, M. and Rujiravanit, R., 2008. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. *Bioresource Technology*, 99(6), pp.1589-1595.
- Porter, K.G. and Feig, Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora 1. *Limnology and oceanography*, 25(5), pp.943-948.

- Prince, R.C., 2005. The microbiology of marine oil spill bioremediation. In *Petroleum microbiology* (pp. 317-335). American Society of Microbiology.
- Quatrini, P., Scaglione, G., De Pasquale, C., Riela, S. and Puglia, A.M., 2008. Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. *Journal of applied microbiology*, 104(1), pp.251-259.
- Rabus, R., Nordhaus, R., Ludwig, W. and Widdel, F., 1993. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(5), pp.1444-1451.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N.R. and Murrell, J.C., 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature*, 403(6770), p.646.
- Rahul, K., Sasikala, C., Tushar, L., Debadrita, R. and Ramana, C.V., 2014. *Alcanivorax xenomutans* sp. nov., a hydrocarbonoclastic bacterium isolated from a shrimp cultivation pond. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(10), pp.3553-3558.
- Rajaei, S., Seyedi, S.M., Raiesi, F., Shiran, B. and 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), pp.32-40.
- Ratledge, C., 1978. Degradation of aliphatic hydrocarbons. *Developments in biodegradation of hydrocarbons*, 1, pp.1-46.
- Reddy, M.S., Naresh, B., Leela, T., Prashanthi, M., Madhusudhan, N.C., Dhanasri, G. and Devi, P., 2010. Biodegradation of phenanthrene with biosurfactant production by a new strain of *Brevibacillus* sp. *Bioresource technology*, 101(20), pp.7980-7983.
- Reid, B.J., Jones, K.C. and Semple, K.T., 2000. Bioavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments—a perspective on mechanisms, consequences and assessment. *Environmental Pollution*, 108(1), pp.103-112.
- Rehm, H.J. and Reiff, I., 1981. Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. In *Reactors and Reactions* (pp. 175-215). Springer, Berlin, Heidelberg.
- REMPEC: Regional Marine Pollution Emergency Response Centre for the Mediterranean Sea. <http://www.rempec.org>.
- Rentz, J.A., Alvarez, P.J. and Schnoor, J.L., 2008. Benzo [a] pyrene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* JAR02. *Environmental pollution*, 151(3), pp.669-677.
- Renvoisé, A., 2012. Applicabilité de la PCR " universelle " 16S comme outil d'identification et de détection bactérienne en laboratoire hospitalier de bactériologie (Doctoral dissertation, Aix-Marseille).

- Rocha, C.A., Pedregosa, A.M. and Laborda, F., 2011. Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 55925. *AMB express*, 1(1), p.9.
- Rodier, J., Legube, B., Merlet, N. and Brunet, R., 2009. L'analyse de l'eau-9ème édition, -Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer: Analyse de l'eau.
- Rojo, F., 2009. Degradation of alkanes by bacteria. *Environmental microbiology*, 11(10), pp.2477-2490.
- Röling, W.F., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J. and Head, I.M., 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), pp.5537-5548.
- Röling, W.F., Head, I.M. and Larter, S.R., 2003. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Research in Microbiology*, 154(5), pp.321-328.
- Ron, E.Z. and Rosenberg, E., 2014. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Current Opinion in biotechnology*, 27, pp.191-194.
- Rontani, J.F. and Giusti, G., 1987. Photosensitized oxidation of pristane in sea water: effect of photochemical reactions on tertiary carbons. *Journal of Photochemistry*, 40(1), pp.107-120.
- Rosenberg E., 1986. Microbial biosurfactants. *Critical Reviews in Biotechnology*. 3:109-132.
- Rouidi, S., 2002. Cartographie de la pollution par les hydrocarbures totaux au niveau de la plate forme pétrochimique de Skikda. Mémoire de Magistère, Université Mentouri, Constantine, 112 p.
- Rowe, A.A., Totten, L.A., Xie, M., Fikslin, T.J. and Eisenreich, S.J., 2007. Air– water exchange of polychlorinated biphenyls in the Delaware River. *Environmental science & technology*, 41(4), pp.1152-1158.
- Roy, P.K., Singh, H.D. and Baruah, J.N., 1978. Metabolism of n-alkane in *Endomycopsis lipolytica* (Saccharomycopsis lipolytica). IV. Characteristics of lipid formation from n-alkanes by non-proliferating cells. *Indian journal of biochemistry and biophysics*.
- Roy, S., Hens, D., Biswas, D., Biswas, D. and Kumar, R., 2002. Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(6), pp.575-581.
- Ruder, A.M., 2006. Potential health effects of occupational chlorinated solvent exposure. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1076(1), pp.207-227.

- Sabine, C.L., Feely, R.A., Gruber, N., Key, R.M., Lee, K., Bullister, J.L., Wanninkhof, R., Wong, C.S.L., Wallace, D.W., Tilbrook, B. and Millero, F.J., 2004. The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *science*, 305(5682), pp.367-371.
- Saeki, H., Sasaki, M., Komatsu, K., Miura, A. and Matsuda, H., 2009. Oil spill remediation by using the remediation agent JE1058BS that contains a biosurfactant produced by *Gordonia* sp. strain JE-1058. *Bioresource Technology*, 100(2), pp.572-577.
- Sajna, K.V., Sukumaran, R.K., Gottumukkala, L.D. and Pandey, A., 2015. Crude oil biodegradation aided by biosurfactants from *Pseudozyma* sp. NII 08165 or its culture broth. *Bioresource technology*, 191, pp.133-139.
- Sakari, M., Zakaria, M.P., Junos, M.B.M., Annuar, N.A., Yun, H.Y., Heng, Y.S., Zainuddin, S.M.H.S. and Chai, K.L., 2008. Spatial distribution of petroleum hydrocarbon in sediments of major rivers from east coast of peninsular Malaysia. *Coastal Marine Science*, 32(1), pp.9-18.
- Salgado-Brito, R., Neria, M.I., Mesta-Howard, A.M., Cedillo, F.D. and Wang, E.T., 2007. Oxidation of solid paraffin (C 11– 40) by *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1. *Annals of microbiology*, 57(3), pp.321-328.
- Saliot, A., 1981. Natural Hydrocarbons in Sea Water Alain Saliot. In *Elsevier Oceanography Series* (Vol. 31, pp. 327-374). Elsevier.
- Salleh, A.B., Ghazali, F.M., Rahman, R.N.Z.A. and Basri, M., 2003. Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution.
- Salt, D.E., Smith, R.D. and Raskin, I., 1998. Phytoremediation. *Annual review of plant biology*, 49(1), pp.643-668.
- Santisi, S., Cappello, S., Catalfamo, M., Mancini, G., Hassanshahian, M., Genovese, L., Giuliano, L. and Yakimov, M.M., 2015. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), pp.377-387.
- Sauret, C., 2011. Ecologie des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière. Influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie Paris. 287 p.
- Schneiker, S., dos Santos, V.A.M., Bartels, D., Bekel, T., Brecht, M., Buhrmester, J., Chernikova, T.N., Denaro, R., Ferrer, M., Gertler, C. and Goesmann, A., 2006. Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nature biotechnology*, 24(8), p.997.

- Schwarz, J.R., Walker, J.D. and Colwell, R.R., 1975. Deep-sea bacteria: growth and utilization of n-hexadecane at in situ temperature and pressure. *Canadian journal of microbiology*, 21(5), pp.682-687.
- Sei, K., Sugimoto, Y., Mori, K., Maki, H. and Kohno, T., 2003. Monitoring of alkane-degrading bacteria in a sea-water microcosm during crude oil degradation by polymerase chain reaction based on alkane-catabolic genes. *Environmental Microbiology*, 5(6), pp.517-522.
- Shao, Z. and Wang, W., 2013. Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation. *Frontiers in microbiology*, 4, p.116.
- Sieber, J.R., McInerney, M.J. and Gunsalus, R.P., 2012. Genomic insights into syntrophy: the paradigm for anaerobic metabolic cooperation. *Annual review of microbiology*, 66, pp.429-452.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J. and Thompson, J.D., 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7(1), p.539.
- Sihag, S., Pathak, H. and Jaroli, D.P., 2014. Factors affecting the rate of biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 2, pp.185-202.
- Sikkema, J., de Bont, J.A. and Poolman, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*, 59(2), pp.201-222.
- Singer, M.E., 1984. Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. *Petroleum microbiology*, pp.1-59.
- Singleton P. et Sainsbury D., 1984. Bactériologies. Ed. MASSON, 158 p.
- Singleton, P. 1999. Bactériologie. Dunod, Paris.p.356.
- Sneath, P.H. and Sokal, R.R., 1973. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*.
- So, C.M. and Young, L.Y., 1999. Initial reactions in anaerobic alkane degradation by a sulfate reducer, strain AK-01. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12), pp.5532-5540.
- Soclo, H.H., Garrigues, P.H. and Ewald, M., 2000. Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Marine pollution bulletin*, 40(5), pp.387-396
- Soltani, M., 2004. Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Doctorat en Chimie Analytique de l'université Paris 6, 284 p.

- Song, H.G., Wang, X. and Bartha, R., 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(3), pp.652-656.
- Sotsky, J.B., Greer, C.W. and Atlas, R.M., 1994. Frequency of genes in aromatic and aliphatic hydrocarbon biodegradation pathways within bacterial populations from Alaskan sediments. *Canadian journal of microbiology*, 40(11), pp.981-985.
- Souza, E.C., Vessoni-Penna, T.C. and de Souza Oliveira, R.P., 2014. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: an overview. *International biodeterioration & biodegradation*, 89, pp.88-94.
- Speight, J.G., 2014. *The chemistry and technology of petroleum*. CRC press.
- Spencer, P.S., Kim, M.S. and Sabri, M.I., 2002. Aromatic as well as aliphatic hydrocarbon solvent axonopathy. *International journal of hygiene and environmental health*, 205(1-2), pp.131-136.
- Spormann, A.M. and Widdel, F., 2000. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*, 11(2-3), pp.85-105.
- Stancu, M.M. and Grifoll, M., 2011. Multidrug resistance in hydrocarbon-tolerant Gram-positive and Gram-negative bacteria. *The Journal of general and applied microbiology*, 57(1), pp.1-18.
- Stroud, J.L., Paton, G.I. and Semple, K.T., 2007. Microbe-aliphatic hydrocarbon interactions in soil: implications for biodegradation and bioremediation. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), pp.1239-1253.
- Suess, M.J., 1976. The environmental load and cycle of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Science of the Total Environment*, 6(3), pp.239-250.
- Sugiura, K., Ishihara, M., Shimauchi, T. and Harayama, S., 1996. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environmental Science & Technology*, 31(1), pp.45-51.
- Swannell, R.P. and Daniel, F., 1999, March. Effect of dispersants on oil biodegradation under simulated marine conditions. In *International Oil Spill Conference* (Vol. 1999, No. 1, pp. 169-176). American Petroleum Institute.
- Tapilatu, Y., Acquaviva, M., Guigue, C., Miralles, G., Bertrand, J.C. and Cuny, P., 2010. Isolation of alkane-degrading bacteria from deep-sea Mediterranean sediments. *Letters in applied microbiology*, 50(2), pp.234-236.
- Tarayre, C., 2012. Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures. *Ed. Univ. Eur.*, p.116.

- Thamer, M., Al-Kubaisi, A.R., Zahraw, Z., Abdullah, H.A., Hindy, I. and Khadium, A.A., 2013. Biodegradation of Kirkuk light crude oil by *Bacillus thuringiensis*, Northern of Iraq. *Natural Science*, 5(07), p.865.
- Thangaraj, K., Kapley, A. and Purohit, H.J., 2008. Characterization of diverse *Acinetobacter* isolates for utilization of multiple aromatic compounds. *Bioresource technology*, 99(7), pp.2488-2494.
- Thavasi, R., Sharma, S. and Jayalakshmi, S., 2011. Evaluation of screening methods for the isolation of biosurfactant producing marine bacteria. *J. Pet. Environ. Biotechnol. S, I*, pp.1-6.
- Tiehm, A., 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(1), pp.258-263.
- Trudgill, P.W., 1984. Microbial degradation of the alicyclic ring. *Microbial degradation of organic compounds*.
- Vaidya, B., Kumar, R., Sharma, G., Srinivas, T.N.R. and Kumar, P.A., 2015. *Xanthomarina gelatinilytica* gen. nov., sp. nov., isolated from seawater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(11), pp.3926-3932.
- Van Beilen, J.B., Penninga, D. and Witholt, B., 1992. Topology of the membrane-bound alkane hydroxylase of *Pseudomonas oleovorans*. *Journal of Biological Chemistry*, 267(13), pp.9194-9201.
- Van Beilen, J.B., Panke, S., Lucchini, S., Franchini, A.G., Röthlisberger, M. and Witholt, B., 2001. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the alk genes. *Microbiology*, 147(6), pp.1621-1630.
- Van Beilen, J.B., Li, Z., Duetz, W.A., Smits, T.H.M. and Witholt, B., 2003. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & gas science and technology*, 58(4), pp.427-440.
- van Beilen, J.B. and Funhoff, E.G., 2005. Expanding the alkane oxygenase toolbox: new enzymes and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(3), pp.308-314.
- Van Der Meer, J.R., De Vos, W.M., Harayama, S. and Zehnder, A.J., 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 56(4), pp.677-694.
- Van Meter, R.J., Spotila, J.R. and Avery, H.W., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons affect survival and development of common snapping turtle (*Chelydra serpentina*) embryos and hatchlings. *Environmental Pollution*, 142(3), pp.466-475.
- Vandecasteele, J.P. and Ourisson, G., 2005. Microbiologie pétrolière (concepts, implications environnementales, applications industrielles). *Publications de l'institut français du pétrole*.

- Varjani, S.J. and Upasani, V.N., 2012. Characterization of hydrocarbon utilizing *Pseudomonas* strains from crude oil contaminated samples. *Int J Sci Computing*, 6, pp.120-127.
- Varjani, S.J. and Upasani, V.N., 2013. Comparative studies on bacterial consortia for hydrocarbon degradation. *Int. J. Innov. Res. Sci. Eng. Technol*, 2(10).
- Varjani, S.J., Thaker, M.B. and Upasani, V.N., 2014. Optimization of growth conditions of native hydrocarbon utilizing bacterial consortium "HUBC" obtained from petroleum pollutant contaminated sites. *Indian J Appl Res*, 4, pp.474-476.
- Varjani, S.J., Srivastava, V.K., 2015. Green technology and sustainable development of environment. *Renewable Res. J.* 3 (1), 244–249.
- Varjani, S.J., Rana, D.P., Jain, A.K., Bateja, S. and Upasani, V.N., 2015. Synergistic ex-situ biodegradation of crude oil by halotolerant bacterial consortium of indigenous strains isolated from on shore sites of Gujarat, India. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, pp.116-124.
- Varjani, S.J. and Upasani, V.N., 2016. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. *Bioresource technology*, 222, pp.195-201.
- Varjani, S.J., 2017. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, 223, pp.277-286.
- Vasconcellos, S.P., Crespim, E., da Cruz, G.F., Senatore, D.B., Simioni, K.C.M., dos Santos Neto, E.V., Marsaioli, A.J. and 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), pp.574-588.
- Vila, J., Nieto, J.M., Mertens, J., Springael, D. and Grifoll, M., 2010. Microbial community structure of a heavy fuel oil-degrading marine consortium: linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization. *FEMS microbiology ecology*, 73(2), pp.349-362.
- Vinas, M., Grifoll, M., Sabate, J. and Solanas, A.M., 2002. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(5), pp.252-260.
- Vogel, T. and Ballerini, D., 2001. Biorestauration des sols et des aquifères contaminés par des hydrocarbures et des composés halogénés. *Bull. Soc. Fr. Microbiol*, 16(3), pp.204-209.
- Vomberg, A. and Klinner, U., 2000. Distribution of *alkB* genes within n-alkane degrading bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 89(2), pp.339-348.

- Wakeham, S.G., Schaffner, C. and Giger, W., 1980. Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediments—I. Compounds having anthropogenic origins. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 44(3), pp.403-413.
- Walker, J.D., Colwell, R.R., Vaituzis, Z. and Meyer, S.A., 1975. Petroleum-degrading achlorophyllous alga *Prototheca zopfii*. *Nature*, 254(5499), p.423.
- Walker, C.H., Sibly, R.M., Hopkin, S.P. and Peakall, D.B., 2005. *Principles of ecotoxicology*. CRC press.
- Walworth, J., Braddock, J. and Woolard, C., 2001. Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soils. *Cold Regions Science and Technology*, 32(2-3), pp.85-91.
- Wang, Z., Fingas, M., Lambert, P., Zeng, G., Yang, C. and Hollebone, B., 2004. Characterization and identification of the Detroit River mystery oil spill (2002). *Journal of Chromatography A*, 1038(1-2), pp.201-214.
- Watkinson, R.J. and Morgan, P., 1991. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. In *Physiology of Biodegradative Microorganisms* (pp. 79-92). Springer, Dordrecht.
- Whang, L.M., Liu, P.W.G., Ma, C.C. and Cheng, S.S., 2009. Application of rhamnolipid and surfactin for enhanced diesel biodegradation—effects of pH and ammonium addition. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2-3), pp.1045-1050.
- Whyte, L.G., Bourbonniere, L. and Greer, C.W., 1997. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(9), pp.3719-3723.
- Widdel, F. and Rabus, R., 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*, 12(3), pp.259-276.
- Wilcke, W., 2007. Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. *Geoderma*, 141(3-4), pp.157-166.
- Wilkes, H., Kühner, S., Bolm, C., Fischer, T., Classen, A., Widdel, F. and Rabus, R., 2003. Formation of n-alkane-and cycloalkane-derived organic acids during anaerobic growth of a denitrifying bacterium with crude oil. *Organic Geochemistry*, 34(9), pp.1313-1323.
- Wilkes, H., Buckel, W., Golding, B.T. and Rabus, R., 2016. Metabolism of hydrocarbons in n-alkane-utilizing anaerobic bacteria. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 26(1-3), pp.138-151.
- Woese, C.R., Gutell, R., Gupta, R.A.M.E.S.H. and Noller, H.F., 1983. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiological reviews*, 47(4), p.621.

- Wojcieszńska, D., Hupert-Kocurek, K., Greń, I. and Guzik, U., 2011. High activity catechol 2, 3-dioxygenase from the cresols-Degrading *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2. *International biodeterioration & biodegradation*, 65(6), pp.853-858.
- Wu, M., Dick, W.A., Li, W., Wang, X., Yang, Q., Wang, T., Xu, L., Zhang, M. and Chen, L., 2016. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 107, pp.158-164 ;
- Xie, M., Alonso, H. and Roujeinikova, A., 2011. An improved procedure for the purification of catalytically active alkane hydroxylase from *Pseudomonas putida* GPo1. *Applied biochemistry and biotechnology*, 165(3-4), pp.823-831.
- Xue, J., Yu, Y., Bai, Y., Wang, L. and Wu, Y., 2015. Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review. *Current microbiology*, 71(2), pp.220-228.
- Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R., Abraham, W.R., Lünsdorf, H. and Timmis, K.N., 1998. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(2), pp.339-348.
- Yakimov, M.M., Giuliano, L., Gentile, G., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Lünsdorf, H., Timmis, K.N. and Golyshin, P.N., 2003. *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(3), pp.779-785.
- Yakimov, M.M., Giuliano, L., Denaro, R., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Luensdorf, H., Timmis, K.N. and Golyshin, P.N., 2004. *Thalassolituus oleivorans* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(1), pp.141-148.
- Yakimov, M.M., Denaro, R., Genovese, M., Cappello, S., D'Auria, G., Chernikova, T.N., Timmis, K.N., Golyshin, P.N. and Giluliano, L., 2005. Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environmental microbiology*, 7(9), pp.1426-1441.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N. and Golyshin, P.N., 2007. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current opinion in biotechnology*, 18(3), pp.257-266.
- Yamada-Onodera, K., Mukumoto, H., Katsuyama, Y. and Tani, Y., 2002. Degradation of long-chain alkanes by a polyethylene-degrading fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(6), pp.828-831.

- Yang, B., Wang, Y. and Qian, P.Y., 2016. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC bioinformatics*, 17(1), p.135.
- Youssef, N., Simpson, D.R., Duncan, K.E., McInerney, M.J., Folmsbee, M., Fincher, T. and Knapp, R.M., 2007. In situ biosurfactant production by *Bacillus* strains injected into a limestone petroleum reservoir. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), pp.1239-1247.
- Zanaroli, G., Di Toro, S., Todaro, D., Varese, G.C., Bertolotto, A. and Fava, F., 2010. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. *Microbial cell factories*, 9(1), p.10.
- Zenati, B., Chebbi, A., Badis, A., Eddouaouda, K., Boutoumi, H., El Hattab, M., Hentati, D., Chelbi, M., Sayadi, S., Chamkha, M. and Franzetti, A., 2018. A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement. *Ecotoxicology and environmental safety*, 154, pp.100-107.
- Zenati, B., 2018. Etude de la biodégradation des hydrocarbures pétroliers par des bactéries marines : application en traitement des eaux de mer contaminées par le pétrole. Doctorat en Chimie industrielle de l'université Saad Dahleb, Blida, 187 p.
- Zeng, J., Zhu, Q., Li, Y., Dai, Y., Wu, Y., Sun, Y., Miu, L., Chen, H. and Lin, X., 2019. Isolation of diverse pyrene-degrading bacteria via introducing readily utilized phenanthrene. *Chemosphere*, 222, pp.534-540.
- Zengler, K., Richnow, H.H., Rosselló-Mora, R., Michaelis, W. and Widdel, F., 1999. Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature*, 401(6750), p.266.
- Zhang, C. and Bennett, G.N., 2005. Biodegradation of xenobiotics by anaerobic bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), pp.600-618.
- Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F. and Xu, P., 2011. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology*, 102(5), pp.4111-4116.
- Zhao, Z., Selvam, A. and Wong, J.W.C., 2011. Synergistic effect of thermophilic temperature and biosurfactant produced by *Acinetobacter calcoaceticus* BU03 on the biodegradation of phenanthrene in bioslurry system. *Journal of hazardous materials*, 190(1-3), pp.345-350.
- Zhou, Y., Liu, R. and Tang, H., 2004. Sorption interaction of phenanthrene with soil and sediment of different particle sizes and in various CaCl₂ solutions. *Journal of colloid and interface science*, 270(1), pp.37-46.
- Zinger, L., Amaral-Zettler, L.A., Fuhrman, J.A., Horner-Devine, M.C., Huse, S.M., Welch, D.B.M., Martiny, J.B., Sogin, M., Boetius, A. and Ramette, A., 2011. Global

patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PloS one*,6(9), p.e24570.

- ZoBell, C.E., 1946. Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev*, 10: 1-49.
- Zrafi, I., Hizem, L., Chalhmi, H., Ghrabi, A., Rouabhia, M. and Saidane-Moshabi, D., 2013. Aliphatic and aromatic biomarkers for petroleum hydrocarbon investigation in marine sediment. *Journal of Petroleum Science Research (JPSR)*,2(4).
- Zwank, L., Schmidt, T.C., Haderlein, S.B. and Berg, M., 2002. Simultaneous determination of fuel oxygenates and BTEX using direct aqueous injection gas chromatography mass spectrometry (DAI-GC/MS). *Environmental science & technology*, 36(9), pp.2054-2059.
- Zylstra, G.J. and Gibson, D.T., 1989. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. Nucleotide sequence of the *todC1C2BADE* genes and their expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 264(25), pp.14940-14946.

Annexes

Annexe

Annexe 1:

Extraction d'ADN des échantillons de sédiment :

L'ADN total des échantillons de sédiments marins a été extrait à l'aide du kit pour sol FastDNA™ SPIN (MP Biomedicals, Santa Ana, Californie), selon les spécifications du fournisseur

Procédure :

- Ajouter 500 mg d'échantillon de sédiment dans un tube à matrice de lyse (fourni dans le kit) et ajouter 978 µl de tampon phosphate de sodium et 122 µl de MT Buffer. Les protéines membranaires commencent à se solubiliser avec des détergents ainsi que des protéines extracellulaires ;
- Homogénéiser dans le FastPrep instrument pendant 40 secondes à une vitesse 6.0 ;
- Centrifuger à 14 000 x g pendant 5 à 10 minutes. Ceci va causer une perturbation mécanique des parois cellulaires des microorganismes du sédiment et libération d'acides nucléiques dans le tampon protecteur ;
- Transférer le surnageant dans des tubes de 2 ml, ajouter 250 µl de PPS (Protein Precipitation Solution) et mixer en inversant les tubes 10 fois afin séparer les acides nucléiques solubilisés des débris cellulaires et de la matrice de lyse ;
- Centrifuger à 14 000 x g pendant 5 minutes et transférer le surnageant dans des tubes propres de 15 ml ; un tube de 2 ml aurait suffi, mais un tube plus large est plus pratique pour un meilleur mélange ;
- Remettre en suspension la matrice et ajouter 1 ml de surnageant dans le tube de 15 ml ;
- Placer sur le rotateur ou inverser à la main pendant 2 minutes pour permettre la liaison de l'ADN ;
- Placer le tube dans un portoir pendant 3 minutes pour permettre la sédimentation de la matrice de silice (les acides nucléiques se lient à la matrice de silice en présence de sels chaotropes) ;
- Retirer et jeter 500 µl de surnageant en prenant soin d'éviter la matrice de liaison décollée ;
- Remettre doucement en suspension la matrice de liaison dans la quantité restante de surnageant. transférer environ 600 µl du mélange sur un filtre Spin et centrifuger à 14 000 x g pendant 1 minute. vider le tube collecteur et ajouter le mélange restant dans le filtre Spin et centrifuger comme avant. vider le tube de capture à nouveau ;

Annexe

- Ajouter 500 µl de SEWS-M préparé et remettre doucement le culot en suspension en utilisant la force du liquide provenant de la pointe de la pipette ;
- Centrifuger à 14 000 x g pendant 1 minute. vider le tube de capture et le remplacer ;
- Sans aucun ajout de liquide, centrifuger une seconde fois à 14 000 x g pendant 2 minutes pour sécher la matrice de solution de lavage résiduelle. jeter le tube de capture et le remplacer par un nouveau tube de capture propre ;
- Sécher à l'air le filtre d'essorage pendant 5 minutes à température ambiante ;
- Resuspendre doucement la matrice de liaison dans 50-100 µl de acqua gibco ; centrifuger à 14 000 pendant 1 minute pour amener l'ADN élué dans le tube de capture propre. jeter le filtre d'essorage.

Extraction d'ADN des échantillons d'eau de mer :

- Filtrer 100 ml d'eau de mer recueillie des différentes stations sur un filtre de 0,2 µm de porosité (Millipore, Milan, Italie) ;
- Dans une boîte de pétri, Ajouter 300 µl de solution de lyse (Tissue and cell lysis solution, fournie avec le kit) plus 1 µl de Protéinase K au filtre. Laisser imbiber le filtre puis bien le gratter ;
- Transférer le filtre ainsi que le liquide dans un tube eppendorf ;
- Incuber à 65°C pendant 15 minutes, puis centrifuger pour séparer le filtre du liquide ;
- Mettre les tubes dans de la glace pendant 3 à 5 minutes ;
- Ajouter 150 µl de MPC protein precipitation reagent (fourni dans le kit), et vortexer vigoureusement pendant 10 secondes ;
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes à 10 000 x g, et transférer le surnageant dans un nouveau tube eppendorf ;
- Ajouter 500 µl d'isopropanol et mixer les tubes par retournement (30 à 40 fois)
- Conserver à -80°C pour favoriser la précipitation de l'ADN ;
- Centrifuger à 4°C pendant 10 minutes (14 000 x g) puis éliminer l'isopropanol en faisant attention au précipité ;
- Ajouter 250 µl d'éthanol à 70%, centrifuger rapidement, éliminer le surnageant et répéter l'opération une seconde fois, puis faire évaporer pendant 15 minutes ;
- Les acides nucléiques totaux ont été mis en suspension dans 50 µl de tampon TE préchauffé à 45 ° C.

Annexe

Annexe 2 :

Préparation du milieu ONR7a :

Solution 1 :

NaCl	22,8 gr
Na ₂ SO ₄	3,98 gr
KCl	0,72 gr
NH ₂ Cl	0,27 gr
TAPSO	1,3 gr
NaBr (0,83 gr dans 10 ml)	1 ml
NaHCO ₃ (1,55 gr dans 50 ml)	1 ml
H ₃ BO ₃ (1,35 gr dans 50 ml)	1 ml
NaF (0,13 gr dans 50 ml)	1 ml
Na ₂ HPO ₄ (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 une agitateur magnétique jusqu'à solubilisation complète.
- Ajouter tous les éléments traces sous hotte à flux laminaire.
- Ajuster le pH à 7,6 avec quelques gouttes de NaOH.
- Porter au volume final (600 ml).
- Autoclaver.

Pour le milieu solide: ajouter 15 gr de bacto agar directement dans la solution 1

Solution 2 :

MgCl ₂ , 6H ₂ O	11,18 gr
CaCl ₂ , 2 H ₂ O	1,46 gr
SrCl ₂ , 6H ₂ 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 une agitateur magnétique jusqu'à

Annexe

solubilisation complète.

- Ajouter tous les éléments traces sous hotte à flux laminaire.
- Porter au volume final (300 ml).
- Autoclaver.

Solution 3 :

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

- Déplacer sous hotte à flux laminaire la quantité désirée de solution de FeCl₂ dans un Falcon 50 ml. Ajouter de l'eau distillée.
- Stériliser la solution par filtration à travers le filtre de 0,22 um directement dans la solution 2
- Verser le tout dans la solution 1.

Solutions tampon :

TAE 50x :

Tris base 242 gr

Acide acétique glacial 57 ml

EDTA 0,5 M (pH 8.0) 100 ml

Compléter jusqu'à un litre avec de l'eau distillée.

TAE 1x :

Pour obtenir une solution diluée (TAE 1X) ; prélever 20 ml de la solution 50X et porter le volume à 1000 ml avec de l'eau distillée.

TE buffer :

Tris 50 mM

EDTA 20 mM

PH final 7,0

Préparation du gel d'agarose :

Pour obtenir un gel à 1,5%, dissoudre 2,25 gr d'agarose dans 150 ml de TAE 1X.

Annexe

Annexe 3 : Forme Fasta des séquences des souches isolées identifiées (16S)

>PSF-11Sw

```
CCGAAGGTTAGACTAACCACTTCTGGAGCAATCCACTCCCATGGTGTGAC
GGACGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTG
ACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATC
CGGACTACGACGCGTTTTTGTGAGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTTGCAGC
CCTCTGTGCGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCA
TGA
```

>PSF-31Sw

```
GCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG
TATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACG
GAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGAAGTACGACGCGTTTTAAGGGATTG
GCTCACTCTCGCGAGTTGGCAGCCCTCTGTACGCGCCATTGTAGCACGTG
TGTAAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACCTGACGTCATCCCCACCTTC
CTCCGGTTTTGTACCGGCGAGTCTCCCTGGAGTTCTCAGCATTACCTGCTA
GCAACCAGGGATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTC
ACGACACGAGCTGACGACGGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAA
GGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGGCCAGGTAAGG
TTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC
CCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGG
TCAACTTAGTGCGTTAGCTGCGCCACTAAGACTTCAAGAGTCCCAACGGC
TAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTG
CTCCCCACGCTTTTCGCACCTCAGTGTGAGTGTGGTCCAGGTAGCCGCCT
TCGCCACTGGTGTTCCTTCCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGA
AATTCACCTACCTCTACCACTCTAGTCTGACAGTTTCGAAATGCCGTT
CCCAGGTTAAGGCCCGGGGCTTTACATCTCGCTTACCAAACCACTACGC
GCGCTTTACGCCCAGTAATTCGGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACC
GCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTAGGTAACGTCAA
GCCTCATGGGTATTAACCATAAGGTTTTCTCCCTACTGAAAGTGCTTTA
CAACCCGAAAGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGGTTGCC
CCCATTG
```

>PSF-3Sw

```
GTTAGACTATCCACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGG
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGCGATT
ACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACT
ACGAACAGTTTTTAAGGGATTTGCTTGGCCTCGCGACTTTGCTGCCCTCTG
TACTGCCCATTTGTAGCACGTGTGTAGCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGA
CTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTTGTCACCGGCAGTCTCCCTAG
AGTTCCCACCATTAAGTGTGGCAACTAGGGACAAGGGTTGCGCTCGTTA
CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC
```

Annexe

ACCTGTCACTTGGCTCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTAGAAAGTTCCAA
GGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACA
TGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTT
GCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAACTTCGTCACCAA
GAATACTAAGATTCCCAACGACTAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGAATA
CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCA
ATGTCAGTCCAGGAGGCCGCTTTCGCCACTGGTGTTCCTTCGGATCTCTA
CGCATTTACCGCTACACCGGAAATTCCACCTCCCTCTACTGCATTCTAG
CCTGCCAGTTTCAAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATC
TGACTTAGCAAACCGCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAA
CGCTCGCACCTTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAATTAGCCGGTG
CTTCTTCTGTAGGTAACGTCAAGTACTCATCCGTATTAAGGATAAGCCTT
CCTCCCTACTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCA

>PSF-6S

TGGCAATACAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATC
TCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTACACCAACCACAA
GGGAACGACTATCTCTAGCCGCGTCTGGTGTATGTCAAACCCAGGTAAGG
TTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGC
CCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGG
GG

>PSF-14Sw

GGGTGAATCCAACCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACTAGGCCTGGG
AACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGCCTT
CATGCTCTCGAGTTGCAGAGAACAAATCCGAACCTGAGACATCTTTTGGAGA
TTAGCTAACCTCGCGGGATCGCTGCTCACTGTAGATGCCATTGTAGCAC
GTGTGTAGCCCAGCCTGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCCCCACC
TTCCTCCGGCTTATCACCGGCAGTTTCCTTAAAGTGCCCAACTAAATGAT
GGCAACTAAGGACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCT
CACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCACTAGGTCCCCGA
AGGGAAGGAATCTGTCTCCAGAAACCGTCCTAGGATGTCAAAGGCTGGTA
AGGTTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCA
GGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGG
CGGATAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCCAAGCTCCATGAGCCCGGAC
AGCTAGTTATCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAACCTGT
TTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAATAACTGTCCAGTGAGTCG
CCTTCGCCACTGGTGTTCCTCC

>PSF-15Sw

ACTAAGGGCGAGGaTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACG
ACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCCTGGCGTCCCCGAAGGG

Annexe

AACCTTCCATCTCTGGAAGTAGCACCAAATGTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGGGACCGTACTCCCCAGGCGGGAA GCTTAATGCGTTAGCTGCGCCACCAAATAGCATGCTACCTGACGGCTAGC TTCCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCC CCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTACCGAGCCAGTGAGCCGCCTTCGC CACTGGTGTTCTTCCGAATATCTACGAATTTACCTCTAC

>PSF-18S

GTTAGACTAACTACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGG TGTGTACAAGGCCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGCGATT ACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACT ACGATTGGCTTTGAGAGATTAGCTCCGCCTCGCGACTTCGCAACCCTCTG TACCAACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGA CTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCAATTTGTCACCGGCAGTCTCCCTAG AGTTCCCACCCGAAGTGCTGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTAC GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA CCTGTCACTGCGCTCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTAGAAAGTTCGCAG GATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACAT GCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTG CGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACCAAA GTCACTAAGGACCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTAC CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAG TGTCAGTCCAGGAGGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCGATCTCTAC GCATTTACCGCTACACCGGAAATTCACCTCCCTCTACTGCACTCTAGC GTGCCAGTATCGGATGCAATTCCAAGGTTGAGCCCTGGGCTTTCACATCC GACTTAACACACCGCCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAAAC GCTCGCACCTTTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAATTAGCCGGTGC TTCTTCTGTAGGTAACGTCAAGTACTCCAGGGTATTAGCCCAAAGCCTTC CTCCCTACTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCA

>PSF-23S

ATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCC AATCCGAACCTGAGACCGGCTTTTTTGGGATTAGCTCCACCTCACAGTATCG CAACCCATTGTACCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAAGG GGCATGATGATTTGACGTCGTCCTACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCA GTCTCCCATGAGTCCCCACCATACGTGCTGGCAACATGGAACGAGGGTT GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACA ACCATGCACCACCTGTGAACCCGCCCCAAAGGCGAAACCGTATCTCTACG GCGATCGAGAACATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAA TTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAG TTTTAGCCTTGCGGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCT

Annexe

GCGGCGCGAAAACCGTGGAATGGTCCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTAC
GGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCATGCTTTCGCT
CCTCAGCGTCAGTTACAGCCCAGAGACCTGCCTTCGCCATCGGTGTTCTT
CCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTCCCCTA
CTGCACTCTAGTCTGCCCCGTACCCACCGCAGATCCGGGGTTAAGCCCCGG
ACTTTCACGACAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAATA
ATTCCGGATAACGCTCGCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTA

>PSF-34Sw

GTTAGACTAACTACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGGCGG
TGTGTACAAGGCCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGCGATT
ACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACT
ACGATTGGCTTTGAGAGATTAGCTCCGCCTCGCGACTTCGCAACCCTCTG
TACCAACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGA
CTTGACGTCGTCCCCAGCTTCCTCCAATTTGTCACCGGCAGTCTCCCTAG
AGTTCCCACCCGAAGTGCTGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTAC
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCA
CCTGTCACTGCGCTCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTAGAAAGTTCGCAG
GATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACAT
GCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTG
CGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACCAAA
GTCACTAAGGACCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTAC
CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAG
TGTCAGTCCAGGAGGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCCGATCTCTAC
GCATTTACCGCTACACCGGAAATTCACCTCCCTCTACTGCACTCTAGC
GTGCCAGTATCGGATGCAATTCCAAGGTTGAGCCCTGGGCTTTCACATCC
GACTTAACACACCGCCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAAAC
GCTCGCACCTTTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAATTAGCCGGTGC
TTCTTCTGTAGGTAACGTCAAGTACTCCAGGGTATTAGCCCAAAGCCTTC
CTCCCTACTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCAC

>PSF-35Sw

GTTAGACTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGGGG
TGTGTACAAGGCCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATT
ACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACT
ACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTG
TACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGA
CTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAG
AGTGCCCACCATAACGTGCTGGTAACCTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTA
CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC
ACCTGTGTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCT
GCATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACA

Annexe

TGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAATCTT
GCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAGTGCGTTAGCTGCGCCACTAA
AATCTCAAGGATTCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTAC
CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAG
TATCAGTCCAGGTGGTCGCCTTCGCCACTGG

>PSF-42S

CTAACCACCTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTA
CAAGGCCCCGGAACGTATTCACCGCAACATTCTGATTTGCGATTACTAGC
GATTCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATA
CGTTTTATGAGATTAGCTCCCCCTCGCGGGTTTGCAGCCCTCTGTACGCA
CCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACCTGAC
GTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCCTAGAGTTCT
CA

>PSF-43Sw

GCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCCGGAACG
TATTCACCGCAACATTCTGATTTGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACG
CAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATACGTTTTATGAGATTA
GCTCCCCCTCGCGGGTTTGCAGCCCTCTGTACGTACCATTGTAGCACGTG
TGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACCTGACGTCATCCCCACCTTC
CTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCCTAGAGTTCTCAGCCGAAGTCTAG
CAACTAGGGATAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCA
CGACACGAGCTGACGACGGCCATGCAGCACCTGTCACTGCGTTCCCGAAG
GCACCAATCTATCTCTAGAAAGTTCGCAGGATGTCAAGGCCAGGTAAGGT
TCTTCGCGTTGCGTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCC
CCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGT
CTACTTAGTGCGTTAGCTGCGCCACTAAGACTTCAAGAGTCCCAACGGCT
AGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGC
TCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTGTGGTCCAGGTAGCCGCCTT
CGCCACTGGTGTTTCCTTCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAA
ATTCCACTACCCTCTACCACACTCTAGCCTGCCAGTTCGAAATGCCGTTTC
CCAGGTTAAGCCCCGGGGCTTTCACATCTCGCTTAACAAACCACCTACGCG
CGCTTTACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCG
CGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTAAGTAACGTCAAG
CCTTAAGGGTATTAACCTTAAGGTTTTCCTCCTTACTGAAAGTGCTTTAC
AACCCGAAAGCCTTCTTCAC

>PSF-54S

TTGTCACCGGCAGTCTCCCTAGAGTTCCCACCCGAAGTGCTGGCAACTAA
GGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACG
AGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCACTGCGCTCCCGAAGGCACCA

Annexe

TCTATCTCTAGAAAGTTCGCAGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGC
GTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCA
ATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTA
TCGCGTTAGCTGCGCCACCAAAGTCACTAAGGACCCCAACGGCTAGTAGA
CATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCA
CGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTGTCAGTCCAGGAGGCCGCCTTCGCCAC
TGGTGTTCCTTCCGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCGGAAATTCCA
CCTCCCTCTACTGCACTCTAGCGTGCCAGTATCGGATGCAATTCCAAGGT
TGAGCCCTGGGCTTTCACATCCGACTTAACACACCGCCTACGCGCGCTTT
ACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCTTTCGTATTACCGCGGCTG
CTGGCACGAAATTAGCCGGTGCTTCTTCTGTAGGTAACGTCAAGTACTCC
AGGGTATTAGCCCAAAGCCTTCCTCCCTACTGAAAGTGCTTTACAACCCG

>PSF-84S

GCTGCCCTCTGTACTGCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTAGCCGTAAG
GGCCATGATGACTTGACGTGTCCTCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGC
AGTCTCCCTAGAGTTCCAGCATTACGTGCTGGCAACTAGGGACAAGGGT
TGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC
AGCCATGCAGCACCTGT

>PSF-88Sw

TGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGCGATTAC
TAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTAC
GAACAGTTTTTAAGGGATTTGCTTGGCCTCGCGACTTTGCTGCCCTCTGTA
CTGCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGCCTATGATGACT
TGACGTGTCCTCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCCTAGAG
TTCCCACCATTTATGTGCTGGCAACTAGGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACG
GGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCAC
CTGTCACTTGGCTCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTAGAAAGTTCCAAGG
ATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATG
CTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGC
GGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAACTTCGTACCAAGA
ATACTAAGATCCCCAACGACTAGTAGACATCGTTTACGGCGTGCACTACC
AGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCA

PSF-90Sw

GTTAGACTATCCACTTCTGGTGCAATCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGG
TGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATTCTGATCCGCGATT
ACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACT
ACGAACAGTTTTTAAGGGATTTGCTTGGCCTCGCGACTTTGCTGCCCTCTG
TACTGCCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGA

Annexe

CTTGACGTCGTCCCCGCCTTCCTCAAGTTTGTACCGGCAGTCTCCCTAG
AGTTCCCACCATTATGTGCTGGCAACTAGGGACAAGGGTTGCGCTCGTTA
CGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGC
ACCTGTCACTTGGCTCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTAGAAAGTTCCAA
GGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACA
TGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTT
GCGGGCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAACTTCGTCACCAA
GAATACTAAGATTCCCAACGACTAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTA
CCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCA
ATGTCAGTCCAGGAGGCCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCGGATCTCTA
CGCATTTACCGCTACACCGGAAATTCCACCTCCCTCTACTGCATTCTAG
CCTGCCAGTTTCAAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATC
TGACTTAGCAAACCGCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAA
CGCTCGCACCTTTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAATTAGCCGGTG
CTTCTTCTGTAGGTAACGTCAAGTACTCATCCGTATTAAGGATAAGCCTT
CCTCCCTACTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCA

>PSF-26S

TGGTATCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAACTACTTCTGGTGCAATCCACT
CCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGC
GACATTCTGATTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGGAGTCGAGTT
GCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCGTTTTAAGGGATTGGCTCACTCTC
GCGAGTTGGCAGCCCTCTGTACGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTG
GCCGTAAGGGCCATGATGACCTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTG
TCACCGGCAGTCTCCCTGGAGTTCTCAGCATTACCTGCTAGCAACCAGGG
ATAGGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAG
CTGACGACGGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGCACCAATC
CATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGT
TGCGTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAT
TCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCAGGCGGTCAACTTAGT
GCGTTAGCTGCGCCACTAAGACTTCAAGAGTCCCAACGGCTAGTTGACAT
CGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGC
TTTCGCACCTCAGTGTCAGTGTTGGTCCAGGTAGCCGCTTCGCCACTGG
TGTTCCCTTCCTATATCTACGCATTTACCGCTACACAGGAAATTCCACTA
CCCTCTACCACACTCTAGTCTGACAGTTCGAAATGCCGTTCCCAGGTTAA
GCCCCGGGGCTTTCACATCTCGCTTACCAAACCACCTACGCGCGCTTTACG
CCCAGTAATTCGATTAAACGCTTGCACCTCCGTATTACCGCGGCTGCTG
GCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGTAGGTAACGTCAAGCCTCATGGG
TATTAGCCATAAGGTTTTCTCCCTACTG

>PSF-5Sw

TAGTCGAATTGCAGACTACGATCCGAACTGAGACTGGCTTTAAGGGATTC

Annexe

GCTGACCCTCACGGGTTCGCTTCTCTTTGTACCAGCCATTGTAGCATGCG
TGAAGCCCAAGACATAAAGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTC
CTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTATGAGTTCCCACCATCACGTGCTG
GCAACATAGAACGAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTC
ACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTACACCAACCCCAAAG
GGGAAGACCTGTTTCCAGGCCGGTCTGGTGTATGTCAAGCCTTGGTAAGG
TTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGC
CCCCGTCAATTCTTTGAGTTTTAGCCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGG
GGCACTTAATGCGTTAGCTACGGCGCGGAGAACGTGGAATGTCCCCACA
CCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
CGCTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGTGTACGTTACAGCCCAGAGTCCCGC
CTTCGCCACCGGTGTTCTCCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCA
GGAATTCCAGACTCCCCTACTGCACTCTAGTCAGCCCGTACCCACTGCAC
GCGCAACGTTAAGCGTTGCGTTTCCACAGCAGACGTGACCAACCACCTAC
GAGCTCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTCGTACCCTACGTATTA
CCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTACTTCTTCTGCAGGTACCGTC
ACTTTCGCTTCTTCCCTGCTGAAAGCGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCAT
CCCGCA

>PSF-12Sw

ACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCAC
CGCGGCATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGA
GTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGAACAGTTTTTAAGGGATTTGCTTGGC
CTCGCGACCTCGCTGCCCTCTGTACTGCCCATTTGTAGCACGTGTGTAGCC
CAGGCCGTAAAGGGCCATGATGACTTGACGTGTCCTCCACCTTCTCCGGT
TTGTACACCGGCAGTCTCCCTAGAGTTCCCACCATTATGTGCTGGCAACTA
GGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACAC
GAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCACCTGGCTCCCGAAGGCACCA
ATCTATCTCTAGAAAGTTCCAAGGATGTCAAGGCCTGGTAAGGTTCTTCG
CGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTC
AATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTT
ATCGCGTTAACTTCGTACCAAGAATACTAAGATTCCCAACGACTAGTAG
ACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCC
ACGCTTTTCGCACCTCAGCGTCAATGTCAGTCCAGGAGGCCGCCTTCGCCA
CTGGTGTTCTTCCGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCGGAAATTCC
ACCTCCCTCTACTGCATTCTAGCCTGCCAGTTTCAAATGCAGTTCCCAGG
TTGAGCCCGGGGCTTTCACATCTGACTTAGCAAACCGCCTACGCGCGCTT
TACGCCCAGTAATTCCGATTAACGCTCGCACCTTTCGTATTACCGCGGCT
GCTGGCACGAAATTAGCCGGTGCTTCTTCTGTAGGTAACGTCAAGTACTC
ATCCGTATTAAGGATAAGCCTTCCTCCCTACTGAAAGTGCTTTACAACCC
GAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATGGCT

Annexe

>PSF-8Sw

TTCCATGGCTTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
CATCATGGCTGATATGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGGAGTCGAG
TTGCAGACTCCGATCCGAAGTGTGATAGGGTTTATAGATTCGCTCCTGGT
CGCCCAGTGGCTGCTCTCTGTCCCTACCATTTGTAGCACGTGTGTAGCCCA
GGACGTAAGGGCCGTGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCACGGTT
TGCACCGGCAGTCTTGTTAGAGTTCCCGACTTGAATCGCTGGCAACTAAC
AACAGGGGTTGCGCTCGTTATAGGACTTAACCTGACACCTCACGGCACGA
GCTGACGACAACCATGCAGCACCTTGTGGATTGTCCGAAGAAAAGTCTAT
TTCTAAACCTGTCAATCCACATTTAAGCCCTGGTAAGGTTCCCTCGCGTAT
CATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC
CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAACGTACTCCCCAGGTGGGATACTTATCAC
TTTCGCTTAGCCACTCAGATAAATCCGAACAGCTAGTATCCATCGTTTAC
GGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGTC
CATCAGTGTCAATGTATTGTTAGTAATCTGCCTTCGCAATCGGTATTCTA
TGTGATATCTATGCATTTACACCGCTACACCACATATTCTAACTACTTCAC
AATAATTCAAGACAACCAGTATCAAAGGCAATTCTACAGTTGAGCTGCAG
GATTTACCTCTGACTTAATCATCCACCTACGGACCCTTTAAACCCAATG
ATTCGGGATAACGCTTGGATCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGA
GTTAGCCGATCCTTATTCTTACAGTACCGTCAAGCTCCCTCACGA

>PSF-21Sw

CGGGAACGTATTCACCGCGACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCG
ACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTG
TGAGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTCTGTACCGACCATTGT
AGCACGTGTGTAGCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCC
CCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTA
ACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCC
AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCAGAG
TTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCC
TGGAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTT
GTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTA CTCC
CCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAAATCTCAAGGATT
CCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT
CCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTATCAGTCCAGGT
GGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTTCCTATATCTACGCATTTACCGCT
ACACAGGAAATTCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTTGCCAGTTTTGG
ATGCAGTTCCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTTAACAAACC
ACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCT
GTATTACCGCGGCTGCTGGCACAGAGTTAGCCGGTGCTTATTCTGTGCGT
AACGTCAAAACAGCAAGGTATTAACCTTACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAA
GTGCTTTACAATCCGAAGACCTTCTTCA

Annexe

>PSF-25Sw

```
GCAGTCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG
TATTCACCGTGACATTCTGATTCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACG
GAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGAAGTACGACCGGCTTTTCGGGATTA
GCTGACTCTCGCGAGCTCGCAACCCTTTGTACCGGCCATTGTAGCACGTG
TGTAAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTC
CTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCCCGCCATTACGCGCTG
GCAAATAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATTTTC
ACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCTGCGTTCCCGAA
GGCACCAAGTGATCTCTCACAAGTTCGCAGGATGTCAAGAGTAGGTAAGG
TTCTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC
CCCCGTCAATTCAATTTGAGTTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGG
TCGACTTATCGCGTTAACTTCGCCACAAAGTGCAGTGGCAGCCCAACGGC
TGGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTG
CTACCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTGTGAGTCCAGAAAGCCGCT
TCGCCACTGGTATTCCTCCCGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCGGG
AATTCTACCTTCCTCTCCTGCACTCTAGCTTGACAGTTCCGGATGCCGTT
CCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTTACAACCGGCTTATCAAGACACCTACGC
GCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACC
GCGGCTGCTGGCACGGA
```

>PSF-30Sw

```
GACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCCTA
GAGTTCCACCCGAAGTGCTGGCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTAC
GGGACTTAACCCAACATCTCAGGACAGAGCTGACGACAGCCATGCAGCAC
CTGTCACTGCGTTCCCGAAGGCACCAATCTATCTCTAGAAAGTTCGCAGGA
TGTCAGGACTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAAT
```

Annexe 4: Forme Fasta des séquences alkB

>PSF-12Sw

```
AGGTGACATTGGCGCCGGTGGCCTACGGGCATTTTTTTGTGGAGCACAAC
AAAGGGCACCACAAAAACGTGGCCACCCCCGAGGACCCGGCCAGCTCACG
GATGGGCGAATCCTTCTGGGCGTTTTTACCGCGTACCATGATCGGCAGCG
TGCGATCCGCCTGGCAGATTGAGGCGCAACGCCTGCAACGCTGTGACCAG
CCGCGCTGGTCCCTGCACAATGAAAACCTGCAGGGCTGGTTGATGACTGT
GGTGCTATTGCGCCTGCTGACGTTGTGGCTAGGCTGGATCGTTTTGCCCT
TTCTGCTGTTGCAGGCTTTTTATGGTGCTTCCCTGCTGGAAGTCATCAAC
TACATGGAACATTACGGCCTGCGACGCCAGAAAAAAGCCGACGGGCGTTA
CGAACGTTGCGAGCCCCGGCATTCTGGAACAGCAATCATATCGTCACCA
ACCTTTTTCTGTATCAGCTGCAGCG
```

Annexe

>PSF-21Sw

CTGGGCCGGCGGCTTCCTGCTGTCAGTGGTCAGCTACGCCGGCTTCAAAG
TCGAACACCTGCGCGGCCACCACGTGCAGTCTCCACCCCGGAAGACGCC
TCGTCCTCGCGCTACAACCAGTCCCTCTACAACCTTCCTGCCCCAGGCCTA
TGCCCGCAACTTCATCAACGCCTGGAAGCTGGAAGCCAAACGCCTCGAGA
AAAAAGGCCATAACGCCCTCAGCTGGCGCAACGAACCTCATCTGGTGGTAC
AGCATCACCGCGCTGGCCTTCACGGCCTTCACCGTCGCCTTTGGCTGGCT
CGGCGCCGTGTTCTTCCTCGGCCAGAGCTTCATCGCCCTCAACCTGCTGG
AGATCGTCAACTACCTCGAACACTACGGCCTCCACCGTCGCAAGCTCAAA
AACGGCCGCTACGAACGCACCGGCCCGGAACACAGCAGGAACCTCAACTA
CTTCCTCACCAACGTCTTCCTGTTCCACCTCCAACGCCACAGCGACCA

>PSF-31Sw

AATTTTGGTCATCACAAGCGGGTAGCCACACCGGAGGACCCCGCCAGCAG
CCGAATGGGCGAGAGTTCCTGGTAATGTTTCCTGCCCCGAACCGTGTTCGG
CGGCATCAAGTCGTCGATCAAGATCGAAAAGGCACGCCTGGAACGCAAGG
GTAAGAGCTTCTGGAGTCTTGATAACGAAGTGTACAGGGTTGGGCCATG
ACGGCCGGGTTCCTTGGCGCCACGACGCTGGTCTGCGGCCCGAGGGCGGT
GCCGTTTCCTGGCGGCACAGGCGGTTTATGGCGCCAGTCTGTTGGAGAGTG
TGAATTACATCGAGCACTATGGTCTGTTGCGGCAGAAGGACAAGAATGGC
AAGTATGAGCGCACGAAGCCGGAACACAGCTGGAACAGTAATCACATTGT
GACCAACCTGTTCTGTATCAGTTGCAACGGCATTCTGACCACCACGC

>PSF-5Sw

TACGGACACTTCTTCATCGAGCACAACCGCGGACACCACGCGCGTGTCGC
CACTCCGGAGGATCCGGCCAGCTCGCGCTTCGGTGAGTCGTTCTGGGCCT
TCCTCCCGCGCAGCGTGTTGGGTCGCTGACGTGCGCCTGGCACCTGGAG
TCCGAGCGGCTCCGGCGGCTGGGCAAGAGCCCGTGGACCCTGCGCAACGA
CAACCTCAACGCCTGGCTCATGACGGTCGTGCTTTCGGCGGACTCATCG
CCGTGTTGACTGGGAGATCGCGCCGTGGCTCATCGTGACAGGCCGTCTTC
GGCTTCTCGCTGCTGGAGGTCGTCAACTACCTCGAGCACTACGGCCTGCT
CCGCCAGAAGACCTCCGCCGGCCGCTATCAGCGCTGCCGCCCGGAGC

>PSF-6S

AGACGTTTTACGGTCACTTCTACATCGAGCACAACCGTGGGCACCACGTG
CGGGTCGCGACGCCCGAAGATCCGGCCAGCTCCCGTTTCGGAGAGTCGTT
CTGGCGCTTCCTCCCCCGTAGCGTCTGGGGAAGCCTCACGTCCTCCGTGCG
AACTCGAGCGCAAACGCCTCGAGCGGGCGGGCAAGCCCTTCTGGCATCCG
AGCAACGACGTCCTCAACGCATGGGCGATGTCGATCGTGCTGTGGGGGGC
GCTCACCGCGATCTTCGGCTGGGAGATCCTCCCTTCCTCGTGATCCAGG
CCGTCTACGGTTTCTCACTGCTGGAGACCGTGAACCTACCTCGAGCACTAC

Annexe

GGTCTACTCCGCCAGAAGACGCGGACCGGCCGCTACGAGCGGTGCACGCC
CGAGCACAGCTGGAACCTCCGACCACATCTGCACCAACATCTTCCTGTACC
ACCTCCAGCG

>PSF-26S

GGAACATAATTTTGGTCATCACAAGCGGGTAGCCACACCGGAGCACCCCG
CCAGCAGCCGAATGAGCGAGAGTTTCTGGAAGTTCCTGCCCCGAACCGTG
TTCGGCGGCATCAAGTCGTGCATCAAGATCGAAAAGGCACGCCTGGAACG
CAAGGGTAAGAGCTTCTGGAGTCTTGATAACGAACTGCTACAGGGTTGGG
CCATGACGGCCGGGTTCTTTGGCGCCACGACGCTGGTCTGCGGCCCGAGG
CCGGTGCCGTTCTGCGGCACAGGCGGTTTATGGCGCCAGTCTGTTGGA
GAGTGTGAATTACATCGAGCACTATGGTCTGTTGCGGCAGAAGGACAAGA
ATGGCAAGTATGAGCGCACGAAGCCGGAACACAGCTGGAACAGTAATCAC
ATTGTGACCAACCTGTTCT

>PSF-43Sw

AGCAGCCGCATGGGTGAGAGCTTCTGGAAGTTCCTGCCCCGGACGGTGGT
TGGCGGGATCAAGTCATCCATCAAGATTGAGAAGGCGAGGCTTGCCCGCA
AGGGTAAAAGCATTCTGGAGTCTCGACAATGAGTTGCTGCAGGGCTGGGC
CATGAGCGCTGGCTTCTTCGGCGCAACCACTCTGGTGTGCGGCCCGGGG
CTGTGCCGTTCTAGCCGCGCAAGCGGTCTATGGCGCAAGTTTGCTGGAA
AGCGTGAATACATCGAGCATTACGGATTGCTTCGCCAGAAAGACAAGAA
CGGCAAGTACGAGCGCA

Annexe 5: Forme Fasta des séquences XYLA

PSF-43sw

```
CCCGGGCTTTGGTCGTCTGGGATGATGGAACCGCTAAGGGTTGCGTATGA  
AGTGCGTTTATTACGGGCTGCAGGGAGTGTCTGCGGAGACAGAGGATGAA  
GACCTGGTTGAGGTGCTCGAGCAAGCGATTGAAAGCAAGCGGGAGTCGCT  
GCCCATTTGCCGTCTGGAATGCTACCTGGGGTGGGCGCTTCGAGTTAATTA  
GATCAATGCAGGCATTTCCCCCGCTAATGACGAACGCACTCTTAGACCTA  
GAAAAATCCATTGCTTTTATACGGATCTGTTTTGTGTTTTCTTGGGTTTC  
ATGGAAGGATTTGATATTCATTTGTTGGGACCGGTATGGTCTCTACACAT  
TATGATGATTTCCCTGATTGTGGTCTATACCCACACCCCCCCCCCTGGTG  
GACCCACCATTGTCCTACCTGGAATGTTGGCACCTCTCACCGTCGGCTCA
```

Annexe

AGATCTCCGATGTTGTATAGATCTGAAATTTTGAAATTCCTTCTGCTCCC
GAAAGACCTACTCATAGGGAATTGCCTCCCCCTGGCAGCCTTGGCCGGAG
CCGAGGGAACGCCAAACGAAAGAAAAGAAGAATGGAGTCAATGGATAGGA
ACTAATACCTGTTTCATTACGCCACCTGATCTGCGACTCATCGAATCTAC
TTTCAGCACCTGGTCCCGACTCTTGTACCTACCACTGAGTGTGGTAACCG
CGCGCTGGCCTTTTTCCCTGGAGTGGTTGACAACGGTATATTCTGGCGCA
ACCAATCTAATGCATGGGGCGTAACAACAGGCCAGCGAGACTCAAGCACA
TGGGAGCCTCAGTCTTCATGCCTAAGGTCTATGAAACAATTGTACCAATC
TCTATGACATTGCACTCAAAAATCAGGCTATAATGTATATAGAGGTAAGT
GTGTATCTGCCGAATCTATGCGGCTCAACTGTCAAAAAGGCTACTTGGCG
ATCAGTCCAACCCGTCTTCTCGAAACCGAACGGCTGTCTGGATCCAAACT
TT

ORIGINAL ARTICLE

Isolation, characterization and determination of biotechnological potential of oil-degrading bacteria from Algerian centre coast

N. Djahnit¹ , S. Chernai¹, V. Catania², B. Hamdi¹, B. China³, S. Cappello⁴  and P. Quatrini²

¹ Laboratoire de Conservation et de Valorisation des Ressources Marines, Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et l'Aménagement du Littoral, ENSSMAL, Alger, Algérie

² Department of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences and Technologies (STEBICEF), University of Palermo, Palermo, Italy

³ Sciensano, J. Wytsmanstreet, Brussels, Belgium

⁴ Istituto per l'Ambiente Marino Costiero (IAMC) – C.N.R. U.O.S. di Messina Sp., Messina, Italy

Keywords

Algeria, *alkB*, bioremediation, hydrocarbon, oil-degrading bacteria.

Correspondence

Nora Djahnit, Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et l'Aménagement du Littoral, Laboratoire de Conservation et Valorisation des Ressources Marines. ENSSMAL, B.P.19 Bois des Cars, Dély brahim, 16320 Alger, Algérie.

E-mail: djahnit.nora@gmail.com

2018/1464: received 27 July 2018, revised 31 October 2018 and accepted 20 December 2018

doi:10.1111/jam.14185

Abstract

Aims: The Algerian coastline is exposed to several types of pollution, including hydrocarbons. The aim of this work was to isolate oil-degrading bacteria and to explore the intrinsic bioremediation potential of part of its contaminated harbour.

Methods and results: A collection of 119 strains, capable to grow on mineral medium supplemented with hydrocarbons, were obtained from polluted sediment and seawater collected from Sidi Fredj harbour (Algiers). Twenty-three strains were selected for further studies. Sequencing of the 16S rRNA gene showed that most isolates belong to genera of hydrocarbonoclastic bacteria (*Alcanivorax*), generalist hydrocarbons degraders (*Marinobacter*, *Pseudomonas*, *Gordonia*, *Halomonas*, *Erythrobacter* and *Brevibacterium*) and other bacteria not known as hydrocarbon degraders (*Xanthomarina*) but were able to degrade hydrocarbons. Strains related to *Marinobacter* and *Alcanivorax* were frequently isolated from our samples and resulted the most effective in degrading crude oil. Screening of catabolic genes *alkB* and *xylA* revealed the presence of *alkB* gene in several bacterial strains; one isolate harboured both catabolic genes while other isolates carried none of the studied genes. However, they grew in the presence of crude oil implying the existence of other biodegradation pathways.

Conclusions: The samples of seawater and sediment from the Algerian coast contain high level of hydrocarbon-degrading bacteria that could be interesting and useful for future bioremediation purposes.

Significance and Impact of the Study: This investigation demonstrates the diversity of hydrocarbon-degrading bacteria from a marine-contaminated area in Algeria, and their variable biodegradation abilities

Introduction

Oceans and seas cover almost three-quarters of our planet and are home to a wide variety of marine animals, plants and micro-organisms. Over the last few decades, with the increase of human population and human activities, the coastal zones and marine ecosystems are under great

stress and have become highly vulnerable to pollution. The attention has been focused on the marine environment since it is considered as the final and largest receptor of human pollution particularly petroleum hydrocarbons considered as a vital energy resource used by industries and in our daily life, at the same time petroleum is the most widespread contaminant in the

marine environment (Hara *et al.* 2004). About 2.37 million tons of oil are introduced into the seas every year (GESAMP 1993). Petroleum hydrocarbons come to the environment from a variety of sources, both natural and anthropogenic: terrestrial and freshwater run-off, crude oil spills, refuse from coastal oil refineries, offshore oil production, shipping activities, and accidental spillage of fuels and other petroleum products all contribute to marine pollution (Yakimov *et al.* 1998). Crude oil can be classified into four main operationally defined groups of chemicals: the saturated hydrocarbons and the aromatic hydrocarbons, and the more polar, non-hydrocarbon components the resins and the asphaltenes. Many of these constituents are difficult to degrade and highly toxic due to presence of hemotoxic, carcinogenic and teratogenic components and cause severe environmental damages that may directly or indirectly affect human health and ecological systems (Chandra *et al.* 2013). Several approaches including physical, chemical and biological strategies have been developed and used to remove hydrocarbons from polluted sites. Mechanical and chemical methods have been shown to be expensive and alter the natural ecosystem by generating more toxic products and an incomplete removal of these pollutants. For this reason, an increasing attention has been directed towards the research of new strategies and environmental-friendly technologies to be applied for the remediation of contaminated sites by hydrocarbons. Bioremediation technology uses micro-organisms to degrade toxic pollutants to harmless products such as CO₂ and H₂O, and other inorganic compounds and these processes are environmentally safe and cost-efficient (Fathepure 2014). In general, bioremediation is based on in situ stimulation of the microbial communities (biostimulation) or amending the microbial community with an inoculum of hydrocarbon-degrading bacteria (bioaugmentation) (Catania *et al.* 2015).

Biodegradation by natural populations of micro-organisms is the most reliable mechanism by which thousands of xenobiotic pollutants, including crude oil, are eliminated from the environment (Cappello *et al.* 2007). Diverse petroleum-degrading bacteria such as *Alcanivorax* (Yakimov *et al.* 1998), *Cycloclasticus* (Dyksterhouse *et al.* 1995), *Marinobacter* (Gauthier *et al.* 1992), *Neptunomonas* (Hedlund *et al.* 1999), *Oleiphilus* (Golyshin *et al.* 2002) and *Oleispira* (Yakimov *et al.* 2003) have been isolated from marine environments and have been shown to play a key role in the removal of hydrocarbons from polluted environments (Yakimov *et al.* 2007). Pollution by petroleum hydrocarbons stimulates the growth of such organisms and causes changes in the structure of microbial communities in the contaminated area (Harayama *et al.* 2004). The proportions of hydrocarbon-degrading

bacterial populations in hydrocarbon-contaminated marine environments often exceed 10% of the total bacterial population (Atlas 1981). These bacteria have the property of emulsifying hydrocarbons in solution by producing surface-active agents such as biosurfactants that increase the adhesion of cells to the substrate and reduce interfacial tension between the aqueous and the organic phases which leads to increased bioavailability and subsequent biodegradation of the hydrocarbons (Batista *et al.* 2006). Microbial degradation of crude oil often occurs first by the attack of alkanes, which are major components of crude oil. Alkane hydroxylase is a key enzyme involved in alkane degradation in Gram-negative and Gram-positive bacteria (Quatrini *et al.* 2008). This enzyme introduces an oxygen atom derived from molecular oxygen into the alkane substrate and plays an important role in crude oil bioremediation (Van Beilen *et al.* 2003).

There have been many studies about the microbial communities participating in the degradation of pollutants in the Mediterranean Sea especially in the northern side of the basin. The southern side remains poorly studied, despite many of the southern countries being major oil producers and exporters (Daffonchio *et al.* 2013). As one of the top three oil producers in Africa and with a coastline of 1622 km along the Mediterranean south shore, Algeria is a major stakeholder in the oil pollution in the Western Basin of the Mediterranean Sea. In 2015, the country produced about 1.7 million barrels per day of total petroleum products. More than 75% of this production was exported by sea. In terms of gross input of organic matter, hydrocarbons pollution has been mentioned as one of the primary environmental problems along the Algerian coast (Benmecheta and Belkhir 2016).

The present work aims to provide knowledge about indigenous bacterial strains involved in the bioremediation of hydrocarbons. It is indeed the native microflora that determines the self-purification capacities of the site in the absence of any physico-chemical limitation. The aim was to isolate and characterize hydrocarbon-degrading bacteria from an oil-polluted harbour in the central part of Algeria (Sidi Fredj). The main characteristics investigated were: (i) the ability to grow in the presence of different hydrocarbons, (ii) the biosurfactants production, (iii) the oil fractions degradation and (iv) the presence of catabolic genes involved in aliphatic and aromatic hydrocarbons degradation

Materials and methods

Study area and samples collection

Sidi Fredj is a marina built in 1970 located along the west coast of Algiers (Centre Algeria, south Mediterranean sea,

36°45'51"N, 2°50'38"E) in the western part of Djamilia Bay. This port is characterized by the presence of small fishing boats throughout the year, which use hydrocarbons as fuel and cause pollution from careening operations (painting, gasoline, detergent). Sediment and seawater samples were collected aseptically in March 2016 from Sidi Fredj harbour. About 1 liter of seawater was collected from five different stations (Fig. 1), in sterile containers from ~30 cm below the top layer of the surface; sediment samples were also collected from the same stations using a Van Veen grab sampler (Duncan and Associates Kahl Scientific Instrument Corporation, KC Denmark). After collection, samples were immediately transported to the laboratory in a cool box (4–8°C). Once in the laboratory, samples were either used as inoculum for enrichment culture in mineral medium supplemented with hydrocarbons or were stored at –20°C for further analysis.

Physico-chemical parameters

Measurement of temperature, salinity and pH was performed *in situ* using a multiparameter probe (Multiline

F/SET W.T.W Wissenschaftlich, Technishe, Werstätten). Chemical Oxygen Demand (COD) was measured using LCK test kits (LCK 1014, HACH Lange SRL, Lennate, Italy) following the manufacturer's instructions and the analysis was done spectrophotometrically using a HACH LANGE DR 3900 spectrophotometer (HACH Lange SRL Lennate, Italy).

Toxicity assay Microtox

Toxicity analysis of sediment samples was carried out using the Microtox bioluminescence assay based on the activity of the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. Sediment samples were suspended in sterile artificial seawater (1 : 4; w/v). After sonication (30 min) and vigorous agitation (200 g for 24 h), the aqueous phase was separated from the sediment by successive filtrations and was used as a matrix for the toxicity tests. Samples were maintained at $4 \pm 1^\circ\text{C}$ until used in assay. The tests were conducted according to the standard procedures; the toxicity (bioluminescence inhibition) was expressed as a percentage of calculate bioluminescence inhibition following the procedures outlined in the Microtox System Operating Manual (Genovese *et al.* 2014).

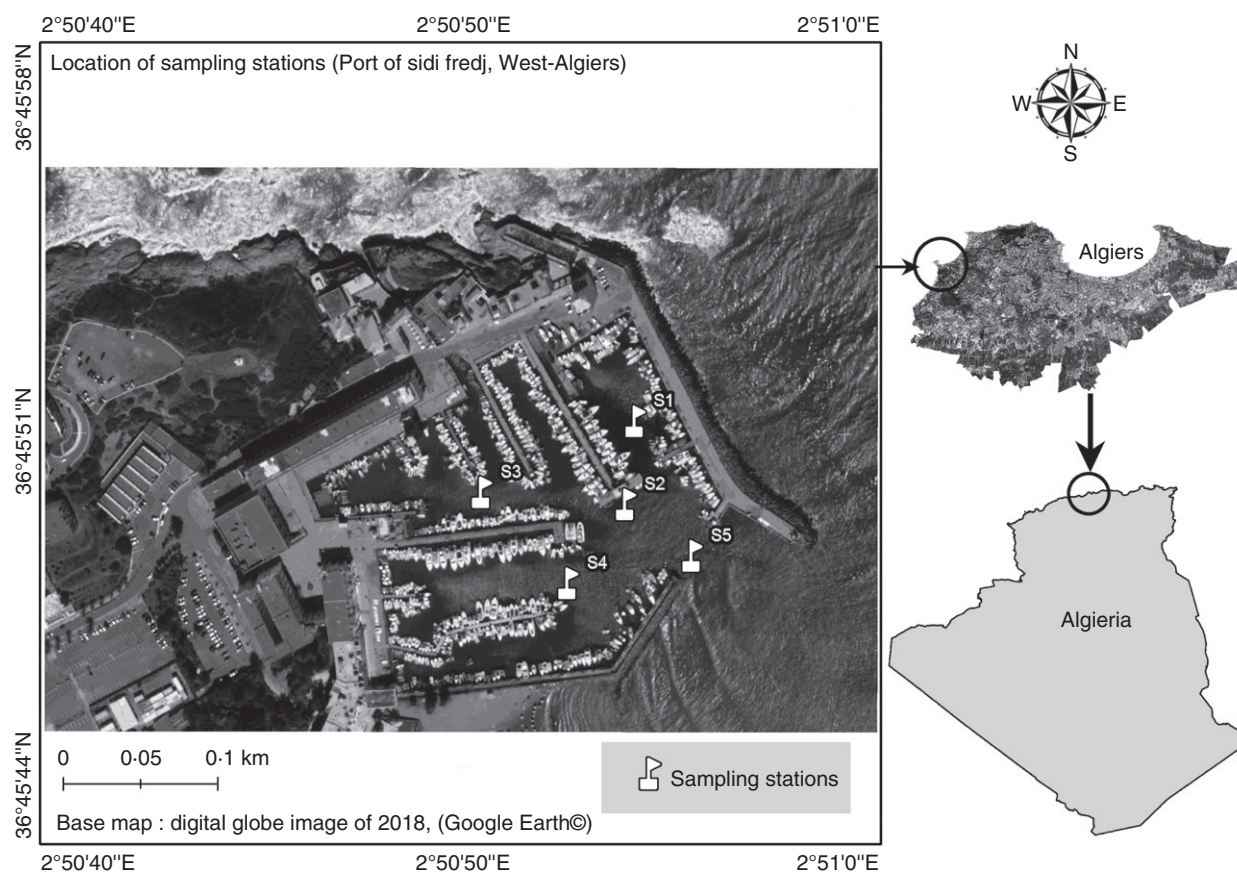


Figure 1 Map showing the location of sampling station in port of Sidi Fredj (Algiers, Algeria).

Bacterial abundance

The bacterial abundance was measured only for seawater samples by direct counting under epifluorescence as previously reported (Porter and Feig 1980; Catania *et al.* 2015). Volumes of seawater samples were fixed with formaldehyde (2% v/v) then filtered on polycarbonate black filters (0.2 µm). The filters were stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma Aldrich S.R.L., Milan, Italy). Slides were examined under a Zeiss Axio-plan 2 Imaging epifluorescence microscope (Zeiss; Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY). Results were expressed as number of cells per millilitre of seawater (Cappello *et al.* 2007).

DNA extraction

A volume of 100 ml of collected seawater from different sampling stations was filtered on 0.2 µm filter (Millipore, Milan, Italy). Then filters were used for extraction of total DNA using the MasterPure™ complete DNA and RNA purification kit (Epicentre, Madison, WI). Total DNA was extracted from marine sediment samples using the FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Santa Ana, CA), according to the supplier's specifications as described previously (Catania *et al.* 2015). The concentration and purity of total DNA extracted from samples were determined using NanoDROP ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). DNAs were stored at −20°C until further analysis.

Denaturing gradient gel electrophoresis analysis

The variable region V3 corresponding to positions 341–534 in the *Escherichia coli* 16S rRNA sequence was amplified by PCR from total genomic DNA using primers 341f-GC and 534r (Muyzer *et al.* 1993) as described in Catania *et al.* (2016). DGGE profiles were visually analysed and the relative position of each band was recorded in a resulting 0–1 matrix that was put into the PAST software package and analysed using multivariate cluster analysis based on Jaccard dissimilarity. Some dominant DGGE bands were excised with a sterile pipette tip and resuspended overnight in 20 µl DNA/RNA free water (GIBCO, Milano, Italy) at 4°C and then frozen at −20°C. Sediment and seawater samples from station 5 are missed due to technical problems.

Enrichment and isolation of aerobic hydrocarbon-degrading bacteria

To isolate autochthonous hydrocarbon-degrading bacteria and to investigate their degradation potential, enrichment

cultures were set up. Aliquots of sediment and seawater were transferred to sterile flasks containing 100 ml of ONR7a supplemented respectively with 0.1% (v/v) crude oil, *n*-alkane mixture (C₁₄+C₁₆+C₁₈, 1 : 1 : 1) or a mixture of benzene/toluene/xylene (1 : 1 : 1). Cultures were incubated at 25°C with shaking for 10 days. Then aliquots were removed and placed in fresh medium ONR7a containing the same concentration of hydrocarbons and incubated under the same conditions. Subcultures were spread onto plates containing solid ONR7a medium with same hydrocarbons supplied on sterile filter paper on the lid of the Petri dish with the same concentrations as mentioned previously. Plates were incubated at 25°C. Phenotypically different colonies obtained from plates were purified and transferred to fresh liquid medium. Only isolates exhibiting pronounced growth on crude oil and/or other hydrocarbons were stored in 20% glycerol solution at −20°C for further characterization (Hassan-shahian *et al.* 2012; Catania *et al.* 2016).

Taxonomical analysis of 16S rRNA genes and sequencing

Molecular characterization of isolates was based on 16S ribosomal RNA (rRNA) gene sequence analysis. The bacterial DNA was extracted using colony PCR method (China *et al.* 1996). PCR amplification of the 16S rRNA gene was performed using the domain-specific forward primer Bac27_F (AGAGTTTGATCCTGGCTAG) and the universal reverse primer Uni_1492R (TACGYTACCTTGTTAC GACTT) (Lane 1991). The amplification reaction was carried out in a total volume of 30 µl consisting of 1 µl DNA (between 10 and 100 ng), 0.2 µmol l^{−1} of each forward and reverse primer, 0.2 mmol l^{−1} dNTPs, 1× reaction buffer and 0.5 U of Taq DNA polymerase (Qiagen, Milano, Italy). PCR was carried out in a Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) using the following cycles programme: one cycle at 94°C for 30 s; 30 cycles of (94°C for 30 s, 50°C for 60 s and 68°C for 30 s) and a final extension cycle at 68°C for 5 min. PCR amplicons were analysed in 1% agarose gel electrophoresis. The expected amplicon size was around 1450 bp. The amplified 16S rDNA fragments were sequenced using Macrogen Europe Service (Amsterdam, The Netherlands). The sequences were analysed using the BLAST tool of the National Centre for Biotechnology Information website (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) (Altschul *et al.* 1990). 16S rRNA sequences were deposited in Genbank under accession number from MH425630 to MH425652.

Hydrocarbon utilization profile and degradation abilities

To determine the use of different hydrocarbons as carbon source by the bacterial strains, each strain was inoculated

in sterile tubes containing ONR7a liquid medium supplemented respectively with 1% (v/v) of crude oil, *n*-hexadecane (C_{16}), *n*-hexacosane (C_{26}), *n*-octacosane (C_{28}), benzene, toluene and xylene as sole carbon and energy source. As a control hydrocarbon-free medium was used and a control was set up for each trial. Growth was evaluated after 1 week of incubation at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ by measuring the turbidity (OD at 600 nm) using a spectrophotometer. The degradation ability of selected strains was evaluated in culture medium ONR7a supplemented with crude oil. Starter cultures were prepared by inoculating a single colony into ONR7a medium supplemented with 1% (v/v) sterile hexadecane as the sole carbon source. After 1 week of incubation at $30 \pm 1^\circ\text{C}$ in a rotary shaker, cells were centrifuged at 9000 g for 10 min. The pellet was then resuspended in sterile medium to an OD (600 nm) of 0.1 and used as inoculum for the biodegradation experiment. Using 100 ml flasks, 1 ml of the suspension was inoculated into 30 ml of ONR7a supplemented with 30 μl filter-sterilized crude oil. A flask without any inoculum was used as an abiotic control. All flasks were incubated in a rotary shaker at 30°C for 1 week. Residual hydrocarbons were extracted using a continuous liquid–liquid extraction technique, and analysed by high-resolution GC–FID following the 3510 EPA (Environmental Protection Agency). After acidification of the samples, dichloromethane (CH_2Cl_2 , Sigma-Aldrich, Milan, Italy; 10% v/v) was added to the culture flask and homogenized on a shaking table at room temperature. The procedure was repeated three times, and the solvent phase was combined and dehydrated with anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4 , Sigma-Aldrich). The extracts were concentrated by rotary evaporation (Rotavapor model R110; Büchi Labortechnik AG, Flawil, Switzerland) at room temperature. All measurements were performed using a DANI Master GC Fast Gas Chromatograph System (DANI Instruments S.p.A., Milan, Italy) equipped with a split/splitless SSL injector and FID detector (EPA 1996; Gentile *et al.* 2016).

Detection of catabolic genes in selected bacteria

In order to detect the catabolic genes involved in biodegradation pathways of hydrocarbons, PCR amplification of monooxygenase genes fragments was performed. The fragment of the terminal hydroxylase component of xylene monooxygenase encoded by the *xyIM* gene, and the electron transfer component of the xylene monooxygenase encoded by the *xyIA* gene was amplified using primer sets TOL-F/TOL-R and XYLA-F/XYLA-R respectively as described by (Hendrickx *et al.* 2006). A fragment of the alkane monooxygenase gene *alkB* was amplified by PCR. The amplification was carried out by using the

primers set *alkB*-1f and *alkB*-1r (Kloos *et al.* 2006) in a total volume of 30 μl containing: 1 μl DNA, 0.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ of each forward and reverse primer, 0.2 mmol l^{-1} dNTPs, 1 $\times$ phire reaction buffer and 0.6 μl of Phire Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Scientific). The PCR conditions used were as follows: an initial denaturation at 98°C for 30 s, followed by 35 cycles of (98°C for 15 s, 55°C for 15 s, 72°C for 10 s) and a final extension at 72°C for 1 min. All amplicons were visualized on 1% agarose gel.

Biosurfactant production and emulsification test

Two distinct methods were used for the screening of the biosurfactant production by isolates: (i) the drop collapse test and (ii) the oil spreading method. The drop collapse test was performed by adding 7 μl of crude oil into each well of a 96-well microtitre plate lid. The lid was equilibrated for 1 h at room temperature, and then 20 μl of the culture was added to the surface of oil. After 1 min of incubation, the shape of the drop on the surface of the oil was observed. If the drop collapses, it indicates the presence of surfactant (positive result), if it remains beaded, it indicates the absence of surfactant (negative response). Sodium dodecyl sulphate with the sterile distilled water was used as positive and negative control respectively (Bodour and Miller-Maier 1998; Mahjoubi *et al.* 2013). In the oil spreading method, 20 ml of distilled water was added to an empty Petri dish (90 mm), and 10 μl of crude oil was added to the surface of water to form a thin layer of hydrocarbons on the surface. The following step was to apply 10 μl of bacterial culture on the oil surface. The diameter of clear zone around the bacterial suspension was measured as the activity of surfactants (Cappello *et al.* 2016). The emulsification index (E24) of different bacterial culture was determined by adding 2 ml of hexadecane to the same amount of bacterial culture. The mixture was vigorously mixed (vortex) for 2 min. The mixture could stand for 24 h prior to measurement. The emulsification activity was calculated as a percentage of the height of the emulsified layer divided by the total height of the liquid column (Hassan-shahian *et al.* 2012).

Results

Toxicity assay

The bioluminescence inhibition assay (Microtox) based on the Gram-negative bacterium *V. fischeri* was used to establish the toxicity level of the polluted marine sediment. The data revealed that all samples inhibited the bioluminescence of *V. fischeri* more than 20% and their

toxicity is considered as acute. The bioluminescence inhibition varied between 34.5 and 47.8%. As reported in Table 1, sample from station 3 (S3) represented the highest percentage of bioluminescence inhibition and the most acute toxicity.

Bacterial community abundance

Measures of microbial abundance (DAPI count) from seawater samples showed that total cells varied between 4.62×10^4 and 4.14×10^5 cells ml⁻¹ detected in station 1 (S1) and in station 3 (S3) respectively (Fig. 2).

Bacterial diversity of sediment and water samples

In order to characterize the bacterial diversity in seawater and sediment samples collected from Sidi Fredj Port, DGGE culture-independent technique was performed. About 7–31 discernible bands were observed for each sample with variable intensities. Some bands were specific to a given site, whereas other bands were shown to be common to more than one sample (Fig. 3).

Diversity indices calculated for each DGGE profile were in general higher and more variable in water than in sediment samples. Water from station S3 showed the highest Chao's diversity index (496) as calculated by the PAST software, while sediment from station S4 showed the lowest one (28) (Table 2). The average Chao's index in seawater was 382. The dendrogram applied to the DGGE profiles, clustered sediment and seawater on two different branches. Inside each of the two branches, profiles from station S2 and S3 clustered together. The banding pattern of sediment from station S4 was on a different branch, indicating a totally different bacterial community.

Isolation and identification of bacterial strains

A total of 119 bacterial strains were isolated from seawater and sediment samples by enrichment cultures on mineral medium (ONR7a) supplemented with crude oil (54

isolates), *n*-alkanes mixture (51 isolates) and aromatic hydrocarbons (11 isolates) as sole carbon and energy source. Based on colony morphology and growth rate on crude oil, 23 isolates were selected, 16 from seawater samples and 7 from sediment samples for further identification and characterization. The molecular identification was performed by 16S-rDNA analysis and the results are shown in Table 3. Sequence similarity search in NCBI Genbank and RDP database showed affiliation of the selected strains to three bacterial phyla: Proteobacteria (19 isolates), Actinobacteria (three isolates) and Bacteroidetes (one isolate). Proteobacteria was composed of Alpha and Gamma subdivisions; Strains belonging to this phylum were detected as the key degraders of petroleum hydrocarbons (Gao *et al.* 2015). Gammaproteobacteria with its four genera *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Pseudomonas* and *Halomonas* represented nearly 74% of the total isolated strains. In our experimental conditions, and from all sampling station, *Alcanivorax* was the most frequently isolated (nine isolates) and was represented by three species: *Alcanivorax borkumensis*, *Alcanivorax xenomutans* and *Alcanivorax dieselolei*, followed by *Marinobacter* (five isolates) which was represented by three genera *Marinobacter zhanjiangensis* (99% sequence id), *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* (99% sequence id) and *Marinobacter nitratreducens* (99% sequence id). In this study, Alphaproteobacteria is represented by two isolates identified as *Erythrobacter* and *Labrenzia*. Lastly, the Bacteroidetes group was represented by only one isolate belonging to *Xanthomarina gelatinilytica* (Flavobacteriaceae, 100% of sequence identity).

Hydrocarbon utilization profiles

The ability of isolates to use diverse hydrocarbons as substrate was tested by adding 1% v/v of different hydrocarbon sources (Crude oil, *n*-hexadecane, *n*-hexacosane, *n*-octacosane, benzene, toluene and xylene) to mineral medium (ONR7a), to which isolates have been inoculated. The results (Table 4) showed that all strains grew

Table 1 Principle physico-chemical characteristics (pH, Temperature, Salinity, COD) and estimation of potential toxicity (bioluminescence inhibition; Microtox, *Vibrio fischeri*) of samples (sediment and seawater) in study

Station	T° (±1°C)	Salinity (±0.2)	pH (±0.1)		COD (±0.5 mg l ⁻¹)		Bioluminescence inhibition	
			Sediment	Seawater	Sediment	Seawater	±0.5%	Toxicity ^a
1	13.2	31.24	7.22	7.34	50.6	48.2	34.5	Acute
2	13.2	30.54	7.29	7.31	54.7	52.8	45.8	Acute
3	13.3	31.39	7.13	7.54	52.8	60.3	47.8	Acute
4	13.3	31.62	7.1	7.22	50.5	60.9	46.1	Acute
5	13.1	30.66	7.19	7.25	45.9	46.8	40.3	Acute

^aToxicity considered as acute when I (%) >20%.

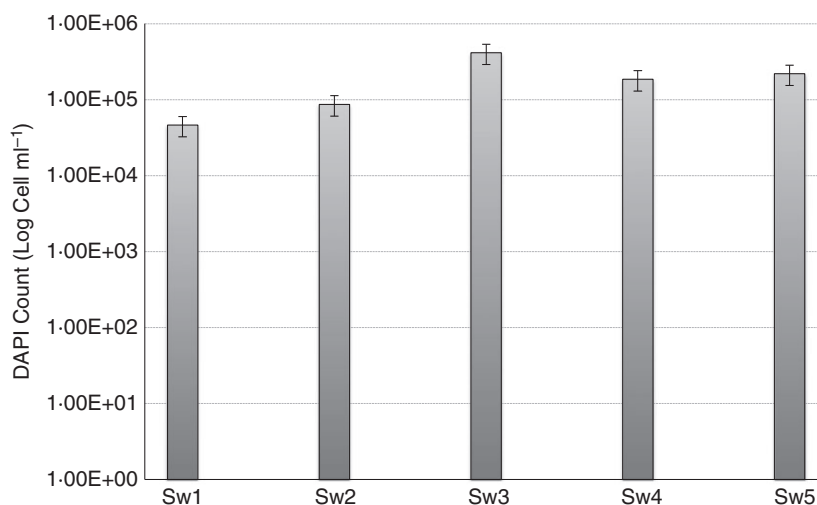


Figure 2 Microbial abundance measured as DAPI total counts (cell ml⁻¹) verified in seawater samples of Sidi Fredj port.

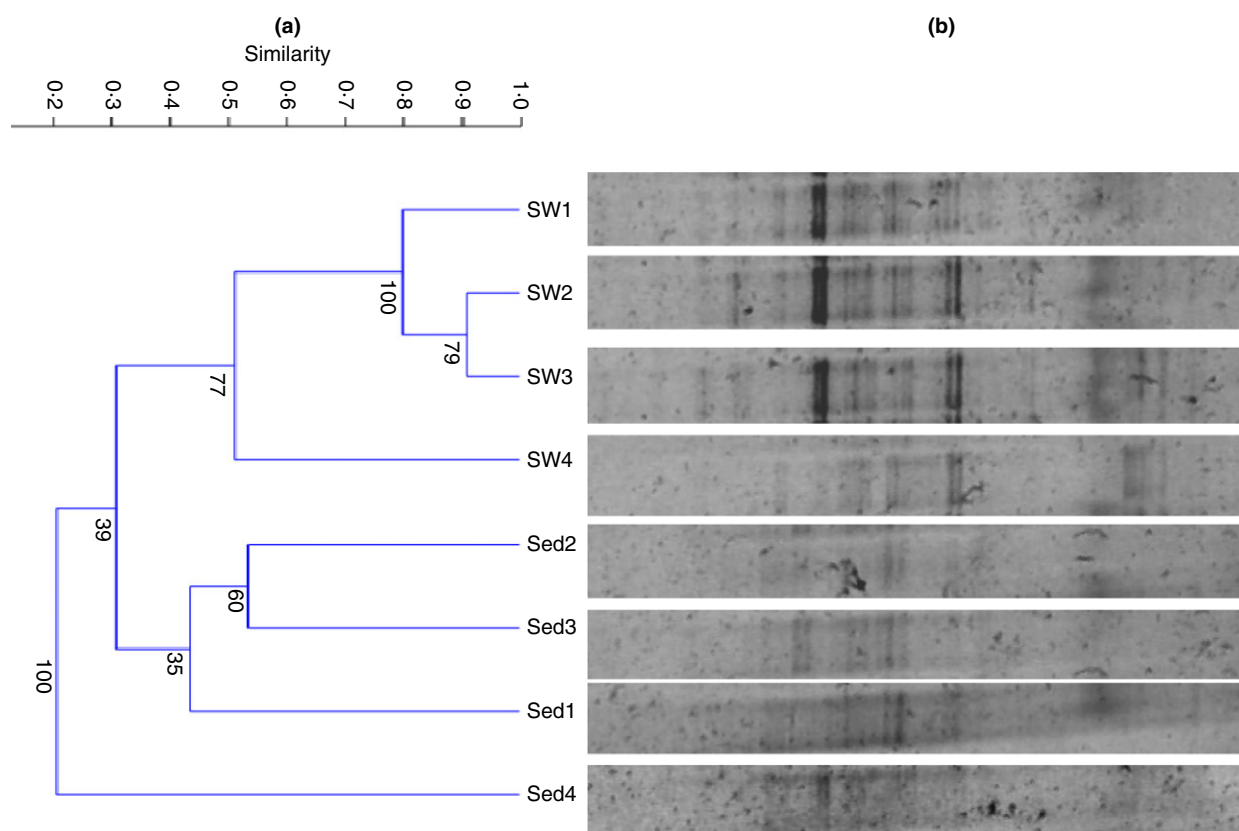


Figure 3 Bacterial diversity of seawater and sediment of Sidi Fredj Port. (a) Cluster analysis dendrogram displaying the bacterial community of seawater and sediment samples. Jaccard's coefficient and 100 bootstrap analysis were used to measure similarity among the eight DGGE banding patterns. (b) DGGE profiles of PCR amplified 16S rRNA V3 region from seawater and surface sediment samples. Sw5 and sed5 samples are missing. [Colour figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

on crude oil and *n*-hexadecane as carbon source with diverse yields, except to strain PSF-16Sw that was able to grow only on crude oil and benzene. Ten isolates were able to grow on all aliphatic hydrocarbons tested (*n*-

hexadecane, *n*-hexacosane and *n*-octacosane); however, none of them grew on medium amended with aromatic hydrocarbons. These isolates are affiliated to *Alcanivorax* (PSF-3Sw, PSF-12Sw, PSF-30Sw, PSF-18S, PSF-54S, and

Table 2 Diversity indices (PAST software) based on DGGE profile of bacterial population present in sediment and water samples in Sidi Fredj Port

	Sediment				Seawater			
	Sed1	Sed2	Sed3	Sed4	Sw1	Sw2	Sw3	Sw4
Taxa_S	20	11	12	7	27	30	31	19
Shannon	2.996	2.398	2.485	1.946	3.296	3.401	3.434	2.944
Chao-1	210	66	78	28	378	465	496	190

Table 3 Identification of bacterial strains isolated from Sidi Fredj Port sediment and seawater samples (Sw: Seawater samples, Sed: sediment samples)

		Phylogeny			Blast 16S		
Isolate code	Station	Phylum	Class	Family	Closest relative	Id. (%)	Accession number
PSF-5Sw	Sw3	Actinobacteria	Actinobacteria	Brevibacteriaceae	<i>Brevibacterium celere</i> strain KMM 3637	99	NR_025727.1
PSF-6S	Sed1			Gordoniaceae	<i>Gordonia hongkongensis</i> strain HKU50	99	NR_152023.1
PSF-23S	Sed3			Micrococcaceae	<i>Micrococcus yunnanensis</i> strain YIM 65004	99	NR_116578.1
PSF-8Sw	Sw5	Bacteroidetes	Flavobacteriia	Flavobacteriaceae	<i>Xanthomarina gelatinilytica</i> strain AK20	100	NR_145579.1
PSF-14Sw	Sw2			Erythrobacteraceae	<i>Erythrobacter citreus</i> strain RE35F/1	99	NR_028741.1
PSF-16Sw	Sw5	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodobacteraceae	<i>Labrenzia aggregata</i> strain NBRC 16684	99	NR_113861.1
PSF-12Sw	Sw3			Alcanivoracaceae	<i>Alcanivorax borkumensis</i> strain SK2	99	NR_074890.1
PSF-90Sw	Sw1				<i>Alcanivorax borkumensis</i> strain SK2	99	NR_074890.1
PSF-88Sw	Sw4				<i>Alcanivorax borkumensis</i> strain SK2	99	NR_074890.1
PSF-3Sw	Sw5				<i>Alcanivorax borkumensis</i> strain SK2	100	NR_074890.1
PSF-84S	Sed2				<i>Alcanivorax borkumensis</i> strain SK2	99	NR_074890.1
PSF-30Sw	Sw1				<i>Alcanivorax xenomutans</i> strain JC109	99	NR_133958.1
PSF-34Sw	Sw3				<i>Alcanivorax xenomutans</i> strain JC109	99	NR_133958.1
PSF-54S	Sed3				<i>Alcanivorax xenomutans</i> strain JC109	100	NR_133958.1
PSF-18S	Sed4			Halomonadaceae	<i>Alcanivorax dieselolei</i> strain B5	99	NR_074734.1
PSF-13Sw	Sw3				<i>Halomonas venusta</i> strain NBRC 102221	99	NR_114048.1
PSF-31S	Sed3	Pseudomonadaceae		Alteromonadaceae	<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> strain ATCC 49840	99	NR_074619.1
PSF-26Sw	Sw1				<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> strain ATCC 49840	99	NR_074619.1
PSF-42S	Sed1				<i>Marinobacter nitratireducens</i> strain AK21	99	NR_136469.1
PSF-43Sw	Sw3				<i>Marinobacter nitratireducens</i> strain AK21	99	NR_136469.1
PSF-15Sw	Sw2				<i>Marinobacter zhanjiangensis</i> strain JSM 078120	99	NR_116657.1
PSF-21Sw	Sw3				<i>Pseudomonas oceani</i> strain DSM 100277	99	NR_152090.1
PSF-35Sw	Sw1				<i>Pseudomonas taiwanensis</i> strain BCRC 17751	99	NR_116172.1

Table 4 Hydrocarbon utilization fingerprint of isolated strain (—: OD<0.1/+; 0.1<OD<0.5, ++: 0.5<OD<1, +++: OD>1), measurement of biosurfactant production (+: positive, —: negative), emulsification activity (%) and investigation of catabolic genes (+ presence, — absence, n.t.: not tested)

Isolation substrate	Isolates code	Hydrocarbon utilization fingerprint							Biosurfactant production		Emulsification activity E24 (%)	Catabolic genes	
		Crude oil	C ₁₆	C ₂₆	C ₂₈	Benzene	Toluene	Xylene	Oil spreading (mm)	Drop collapse		alkB	xylA
Crude oil	PSF-30Sw	++	++	+	+	—	—	—	6	+	52	+	n.t.
	PSF-90Sw	++	++	—	+	—	—	—	4	+	41.5	n.t.	n.t.
	PSF-26Sw	++	++	+	+	—	—	—	5	+	30	+	n.t.
	PSF-6S	++	++	++	+	—	—	—	2	—	22.2	+	n.t.
	PSF-5Sw	+	++	++	+	—	—	—	4	+	40	+	n.t.
	PSF-13Sw	+	+	—	—	—	—	—	2	—	8	+	n.t.
	PSF-23S	+	+	—	—	—	—	—	2	+	20	—	n.t.
	PSF-31S	++	++	+	+	—	+	—	6	+	36.3	+	n.t.
	PSF-18S	+	+	+	++	—	—	—	4	+	32	n.t.	n.t.
	PSF-16Sw	+	—	—	—	+	—	—	2	—	10.8	—	—
n-alkanes	PSF-12Sw	++	++	++	+	—	—	—	5	+	42	+	n.t.
	PSF-34Sw	+++	++	+	—	—	—	—	5	+	43.2	n.t.	n.t.
	PSF-21Sw	+	+	—	—	—	—	—	4	—	20	+	n.t.
	PSF-54S	++	+	+	+	—	—	—	4	—	34.2	n.t.	n.t.
	PSF-15Sw	++	++	++	+	—	—	—	4	+	23.6	+	n.t.
	PSF-14Sw	+	+	+	—	+	—	—	5	+	49	—	—
	PSF-84S	++	++	+	+	—	—	—	4	+	46	n.t.	n.t.
	PSF-88Sw	++	+++	—	—	—	—	—	4	+	48	n.t.	n.t.
	PSF-3Sw	++	++	++	+	—	—	—	4	+	41	n.t.	n.t.
	PSF-8Sw	+	++	—	—	—	—	—	2	—	0	—	n.t.
Aromatics	PSF-35Sw	++	++	++	—	—	—	+	2	—	22	+	—
	PSF-42S	++	—	++	++	—	—	+	4	+	29.4	+	—
	PSF-43Sw	++	+	+	+	—	—	+	4	+	32.3	+	+

PSF-84S), *Marinobacter* (PSF-15Sw, PSF-26Sw), *Gordonia* (PSF-6S) and *Brevibacterium* (PSF-5Sw). These strains are well known as alkanes degraders. *Xanthomarina gelatinilytica* (PSF-8Sw) showed rich growth using *n*-hexadecane as sole carbon and energy source. Only five isolates were able to grow on both aliphatic and aromatic hydrocarbons namely: *Erythrobacter citreus* (PSF-14Sw), *M. hydrocarbonoclasticus* (PSF-31S), *Pseudomonas oceani* (PSF-35Sw) and *M. nitratreducens* (PSF-43Sw, PSF-42S).

Crude oil removal by the Algerian isolates

According to data obtained from hydrocarbon utilization profiles and molecular identification, 14 isolates were selected and screened for their ability to degrade crude oil. The oil-degrading capacity of selected strains was evaluated by incubation experiments using 1% of crude oil as carbon source in mineral medium (ONR7a). After 1 week of incubation, the residual crude oil was extracted and analysed by GC-FID as previously described. The percentage of degradation by isolates was calculated from the difference between total hydrocarbon loss in inoculated medium and abiotic loss in sterile medium (Fig. 4). Among the 14 strains tested, *M. hydrocarbonoclasticus*

(PSF-31S) exhibited the highest biodegradation rate with 61% of crude oil removed after 1 week of incubation, followed by *A. xenomutans* (PSF-30Sw) with 57%, while the Alphaproteobacterium *E. citreus* (PSF-14Sw) degraded 49% of crude oil. These strains showed the highest rate of degradation of both aliphatic and aromatic fractions compared to other strains tested. Strains PSF-21Sw and PSF-35Sw both related to *Pseudomonas* and PSF-43Sw related to *M. nitratreducens* showed an obvious rate of degradation of alkanes with 40% degraded (data not showed). With only 8 and 12% of crude oil degraded, strains PSF-13Sw (*Halomonas venusta*) and PSF-16Sw (*Labrenzia aggregata*) were the least degraders among the Proteobacteria. *Gordonia hongkongensis* (PSF-14Sw) with 39% of crude oil degraded was the most performing among the group of Actinobacteria. *Xanthomarina gelatinilytica*, the only isolate belonging to Bacteroidetes, degrades 17% of crude oil after 1 week of incubation.

Identification of catabolic genes

Strains able to grow on *n*-alkanes were subsequently inspected for the presence of the catabolic genes *alkB* by PCR (Table 4) and sequencing (Table 5). Strains

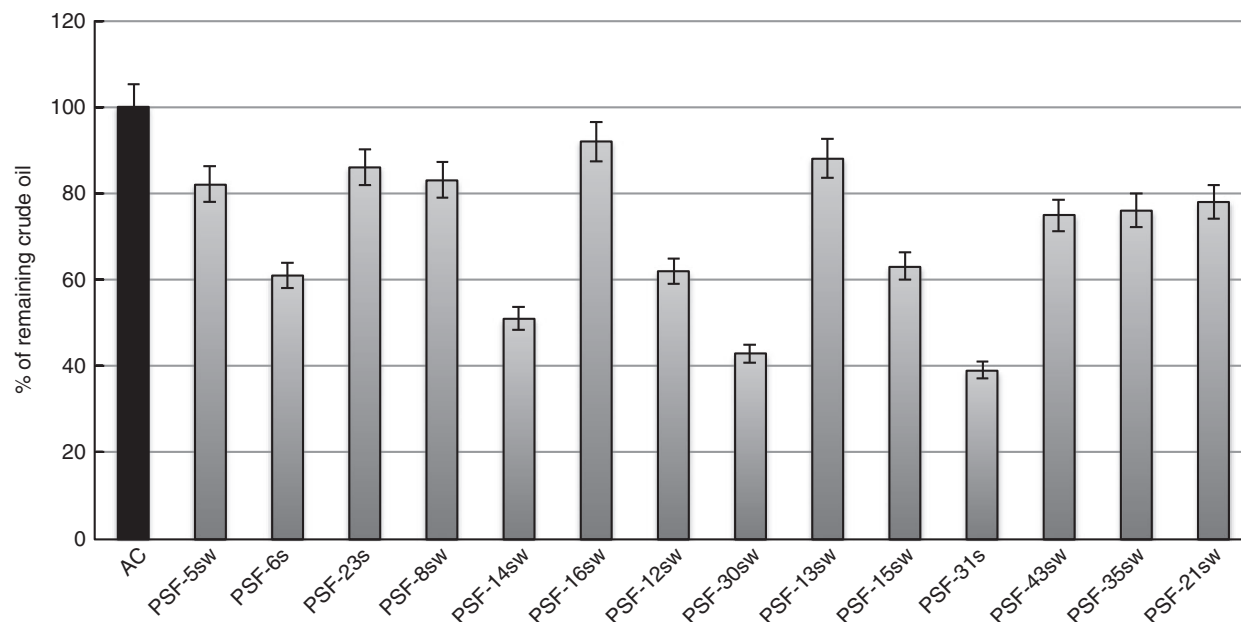


Figure 4 Degradation capability of the bacteria expressed as percentage of oil remaining after cultivation in ONR7a with 0.1% of crude oil ($30 \pm 1^\circ\text{C}$ for 1 week on rotator shaker, 180 g). AC: abiotic control. The names of the isolates are reported in Table 4.

containing *alkB* included those affiliated to *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Gordonia*, *Pseudomonas* and *Brevibacterium*. At least one isolate from each genus was selected for sequencing (Table 5). Nucleotide sequence of *alkB* revealed that identity of the amplified fragments was coherent with the 16S-based identification for *Alcanivorax*, *Marinobacter* and *Gordonia* at genus level, while the *alkB* gene belonging to *Brevibacterium* showed 99% nucleotide sequence identity with *Dietzia* sp. *alkB* gene. In contrast, *alkB* could not be detected in isolates related to *Halomonas*, *Xanthomarina*, *Erythrobacter* and *Micrococcus* although they were able to grow on *n*-alkanes. Strains that were able to grow on aromatic hydrocarbons (PSF-14Sw, PSF-16Sw, PSF-31S, PSF-35Sw and PSF-43Sw) were examined for the presence of xylene monooxygenase gene by PCR. A PCR product was obtained only for strain PSF-43Sw with primers XYLA-F/XYLA-R. The PSF-43Sw *xylA* nucleotide sequence is identical to that of *Marinobacter* sp. which confirms the results obtained by 16S and *alkB* sequencing for this isolate.

Biosurfactant production and emulsification activity

In this study, we tested the production of biosurfactant by different methods: the drop collapse test, the oil spreading test and the emulsification index E24 were performed for each strain. The results are shown in Table 4. Among the 23 strains screened, 16 (69.6%) strains were positive for drop collapse activity. All these

strains are related to genus *Alcanivorax* and *Marinobacter*; one strain is related to *Erythrobacter* and one strain to *Brevibacterium*. Diameter of clearing on the oil surface varied between 2 and 6 mm. The highly producer species that showed 6 mm in the oil spreading test are PSF-31S and PSF-12Sw related to *M. hydrocarbonoclasticus* and *A. borkumensis* respectively. Oil spreading assay results were in corroboration with those obtained by drop collapse assay. Strains found with positive drop collapse results represented the highest diameter of clearing zone. Except for strain PSF-23S related to *Micrococcus yunnanensis* that was positive for drop collapse activity but showed the lowest size of clearing zone (2 mm). Emulsification index (E24) determines the productivity of bioemulsifier and is given as a percentage of the height of the emulsified layer divided by the total height of the liquid column. The major parts of organisms screened were found to produce biosurfactant by their ability to emulsify hexadecane. In the subclass of Alphaproteobacteria, *E. citreus* (strain SF-14Sw) exhibited the highest emulsification index with 49% of activity, while *A. borkumensis* (Strain PSF-12Sw) proved to be the most active strain among the fraction Gammaproteobacteria with 52% of the emulsification. No emulsification activity was observed for *X. gelatinolytica* (PSF-8Sw). Emulsification activity was also shown to be important (40%) for the Gram-positive bacteria *Brevibacterium celere* (PSF-5Sw), which demonstrated also a positive result for the drop collapse test. The

Table 5 Analysis of the nucleotide (BLASTn) and amino acid (tblastx) sequence of the *alkB* and *xylA* genes amplified from the Algerian bacterial isolates

Catabolic gene	Isolates code	Size bp	BLASTn		BLASTx			
			Description	Similarity (%)	Accession number	Description	Similarity (%)	Accession number
alkB	PSF-12Sw	475	Alcanivorax sp. PA2 alkane hydroxylase (alkB) gene	99	FJ173005.1	Alkane hydroxylase (Alcanivorax sp. PA2)	100	AC115226.1
	PSF-21Sw	498	Marinobacter salarius strain R9SW1	99	CP007152.1	Alkane 1-monoxygenase (Marinobacter salarius)	99	WP_085679373.1
	PSF-31S	448	Marinobacter sp. P1-14D alkane hydroxylase (alkB2) gene	99	GQ184211.1	Alkane hydroxylase (Marinobacter hydrocarbonoclasticus)	100	ACJ22716.1
	PSF-55w	397	Dietzia sp. IMV 195 FLAG-tagged alkane hydroxylase-rubredoxin (alkB) and TetR family transcriptional regulator (tetR) genes	99	KM019157.1	Alkane-1 monoxygenase (Dietzia sp. H0)	99	ACR56751.1
	PSF-6S	460	Gordonia sp. S14-10 putative alkane monoxygenase (alkB) gene	99	GQ145212.1	Putative alkane monoxygenase (Gordonia sp. S14-10)	99	ACT31522.1
	PSF-26Sw	420	Marinobacter hydrocarbonoclasticus strain S17-4 alkane hydroxylase (alkB) gene	99	EU853368.1	Alkane hydroxylase (Marinobacter hydrocarbonoclasticus)	98	ACJ22716.1
xylA	PSF-43Sw	317	Uncultured bacterium clone KL2c09 alkane hydroxylase (alkB) gene	99	JN986868.1	Alkane monoxygenase AlkB (Marinobacter sp. SL004A-39A)	88	ALP44217.1
	PSF-43Sw	145	Marinobacter similis strain A3d10 (xylA) gene	99	CP007151.1	DUF3080 domain-containing protein (Marinobacter similis)	100	WP_041342712.1

results obtained by the three methods reveal a correlation between biosurfactant production and emulsifying activity.

Discussion

Crude oil contamination of ecosystems is a global environmental problem which oil-producing countries face due to crude oil exploitation, refining, transportation, storage as well as accidents. Numerous efforts have been made to isolate indigenous oil-degrading bacteria in contaminated sediment and seawater in the Mediterranean Sea especially in the northern side, while the southern side remains poorly studied. Algeria is one of the top three oil producers in Africa and its coasts have been heavily contaminated over the past years, threatening local ecosystems and human health. This study aims to discern for the first time the intrinsic bioremediation potential of a contaminated area (Sidi Fredj port) located along the centre coast of Algeria (South Mediterranean Sea)

Analysis of sediment samples from Sidi Fredj Port, by the bioluminescence inhibition assay revealed that all sediment samples represented an acute toxicity. Sediment from Station 3 was the most toxic. This may be due to the presence of a fuel pump near station 3. There is a significant association between acute toxicity and the degree of contamination with hydrocarbons (Schiewe *et al.* 1985). The bacterial diversity in seawater and sediment samples collected from Sidi Fredj Port was performed by the culture-independent technique DGGE. Results showed that there is a higher diversity and variability in seawater samples than in sediment samples (Catania *et al.* 2015). At the same time, seawater samples revealed higher diversity of culturable hydrocarbon-degrading bacteria. The most diverse seawater sample hosted higher total bacterial diversity, higher abundance of bacteria and the highest degree of bioluminescence inhibition from sediment samples of the same station.

The intrinsic biodegradability of the hydrocarbons and the distribution in the environment of competent degrading micro-organisms are crucial information for the implementation of bioremediation processes. In the present study, the search for micro-organisms with the potential to use petroleum hydrocarbons was based on their ability to grow in mineral medium containing hydrocarbons as the only source of carbon and energy. The hydrocarbon-degrading strains belonged to different genera previously reported as oil-degrading species. Proteobacteria group represented nearly 83% of isolated strains followed by Actinobacteria (13%) and Bacteroidetes (4%). Proteobacteria group is commonly found in microbial communities exposed to hydrocarbon pollution

(McKew *et al.* 2007). Among the 23 strains selected, *Alcanivorax* and *Marinobacter* were the most frequently isolated. Bacteria closely related to *Alcanivorax* became dominant in petroleum-contaminated seawater and are considered as major actors in the bioremediation of oil-contaminated marine environments (Kasai *et al.* 2002; Catania *et al.* 2015). These marine bacteria are well known to use petroleum hydrocarbons as carbon and energy source, and have been employed for bioremediation in polluted marine and coastal systems (Cappello and Yakimov 2010). The dominance of these two genera was also observed in the contaminated sediment of Dalian Xingang Port (China) indicating the quick response of *Alcanivorax* and *Marinobacter* to the hydrocarbons (Chen *et al.* 2017). *Alcanivorax* can use alkanes as a sole carbon source (Harayama *et al.* 2004), and there is evidence demonstrating that *Marinobacter* is responsible for the degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, xylene (BTEX) (Vila *et al.* 2010). Alkanes are the major constituents of crude oil and the excellent ability of *Alcanivorax* to degrade branched alkanes is one of the factors that allow this strain to predominate in oil-contaminated seawater (Hara *et al.* 2003). Hydrocarbonoclastic bacteria such as *Alcanivorax* and *Marinobacter* are well known for their ability to degrade hydrocarbons alone with a high rate (Cappello *et al.* 2016) but a single species can metabolize only a limited range of hydrocarbon substrates because it does not have all the enzymatic machinery to degrade a pollutant until its complete mineralization (Mahjoubi *et al.* 2013). For this reason, a consortium of many different bacterial species, with broad enzymatic capacities, is usually involved in oil degradation (Röling *et al.* 2002; De Pasquale *et al.* 2012). The presence of *Alcanivorax* and *Marinobacter* in natural environments or enrichment by laboratory is generally combined with the presence of other bacterial strains (Santisi *et al.* 2015). In this survey, other genera such as *Pseudomonas*, *Erythrobacter*, *Gordonia*, *Halomonas* and *Labrenzia* were isolated. These strains cannot be classified as hydrocarbonoclastic bacteria but are generalist hydrocarbon degraders. *Erythrobacter* and *Labrenzia* were determined as degraders of aromatic hydrocarbons (Al-Awadhi *et al.* 2012; Gao *et al.* 2015), while *Gordonia* is frequently reported to utilize aliphatic or aromatic compounds as growth substrate (Goodfellow and Maldonado 2006; Lo Piccolo *et al.* 2011).

Other Gram-positive strains belonging to micrococcaceae and brevibacteriaceae were isolated and are often described in the literature as being isolated from hydrocarbon-contaminated environments (Chaillan *et al.* 2004; Malik and Ahmed 2012). Even if the role of Gram-positive bacteria in hydrocarbon biodegradation is less known, these organisms proved to be potential candidates

for biotechnological applications (Das and Chandran 2011). Interestingly, one isolate was reported for the first time from oil-contaminated areas; this strain is related to *X. gelatinilytica*. This Bacteroidetes was first time isolated from seawater collected from India (Vaidya *et al.* 2015) but has never been isolated from the Mediterranean Sea nor hydrocarbon-contaminated environments. This strain is closely related to the genus *Bizionia* that was found co-existing with *Alcanivorax* and *Marinobacter* isolated from contaminated sediment samples (Chen *et al.* 2017).

Hydrocarbon-degrading bacteria were isolated from a contaminated site in Tunisia and the dominant bacterial group was also Proteobacteria but belonging to different genera such as *Acinetobacter* and *Stenotrophomonas* (Mahjoubi *et al.* 2013). Our results were similar to those obtained by Tapilatu *et al.* (2010) who isolated hydrocarbon-degrading bacteria from marine sediment from the French coast (North western Mediterranean), and found that the majority of isolates belonged to *Alcanivorax*. In the same study, alkane-degrading bacteria belonging to the genera *Pseudomonas* and *Marinobacter* were also isolated. Catania *et al.* (2015) studied the diversity of culturable hydrocarbon-degrading bacteria in Priolo bay (Ionian Sea, Central Mediterranean) and found that they were affiliated mainly to genera of obligate hydrocarbon-oclastic bacteria (*Alcanivorax*) and/or to generalist hydrocarbon degraders (*Thalassospira*, *Oleibacter*, *Vibrio*, *Marinobacter*, *Rhodococcus*, *Pseudomonas*) and that most sediment and water samples were dominated by bacteria related to *Alcanivorax* and *Marinobacter* genera. Our results of microbial isolation and identification corroborated literature data about the presence of aerobic bacteria in petroleum-contaminated seawater and sediment samples support the hypothesis that these bacteria might play a role in oil biodegradation processes *in situ*.

Biosurfactants are a heterogeneous group of surface-active compounds produced by a wide variety of micro-organisms. Surfactants enhance solubilization and removal of contaminants (Batista *et al.* 2006). The action mechanism of biosurfactants lies in their accumulation at the interface of immiscible compound, reducing the surface tension and thereby increasing their surface area; this leads to a higher bioavailability that eases the degradation of pollutants. Our results showed that there is a positive correlation between biosurfactant production and emulsification activity. Isolates affiliated to *Alcanivorax*, *Marinobacter* and *Erythrobacter* were the most efficient; at the same time they represented the highest rates of crude oil degradation (more than 50% of crude oil degraded). A relationship between the levels of biosurfactant production and crude oil biodegradation was observed (Hassanshahian *et al.* 2012). Strains producing high levels of biosurfactant can better degrade crude oil, indicating that the production of

extracellular biosurfactants may be one of the underlying mechanisms implemented by the isolates for crude oil metabolism (Banat *et al.* 2010). But this suggestion was not applicable for all studied strains. Indeed, *Gordonia* was able to degrade 40% of crude oil after 1 week of incubation but was not efficient in biosurfactant production. A different mechanism of direct contact to the n-alkanes by cell adherence has been described for the *Corynebacterium*/*Mycobacterium*/*Nocardia* complex to which *Gordonia* belongs (Lo Piccolo *et al.* 2011).

In this investigation, we also studied the capacity of selected strains to grow in the presence of various aliphatic and aromatic hydrocarbons as the sole carbon and energy source. It was noted that most of strains tested were able to metabolize aliphatic hydrocarbons, while the aromatic fraction was metabolized by only five strains. Aromatic hydrocarbons are more resistant against biodegradation than aliphatic compounds; they often cause serious problems during bioremediation (Rajaei *et al.* 2013). Some strains were able to grow on both fractions.

It is uncommon to find micro-organisms having the capacity to degrade both aliphatic and aromatic compounds. The degradation of the two types of hydrocarbons requires different metabolic pathways (M'rassi *et al.* 2015). Monooxygenase genes have been used as functional biomarkers for the characterization of aerobic degrading bacterial populations in environmental samples and in bioremediation experiments (Van Beilen *et al.* 2003). The specific primers of *alkB*, *tol*, *xylA* genes and catabolic genes involved in hydrocarbon degradation were used to detect the catabolic pathways of bacterial isolates. The PCR amplification trials revealed the presence of *alkB* gene in several bacterial strains. The *xylA* gene involved in the aromatic hydrocarbon degradation pathway (BTEX degradation) was found in only one bacterial isolate (PSF-43Sw). Strain PSF-43Sw related to *M. nitratireducens* possesses both aliphatic and aromatic catabolic pathways, which confirms the ability of this strain to metabolize both alkanes and aromatic hydrocarbons as revealed also by the hydrocarbon utilization profile analysis. Some isolates growing in the presence of crude oil gave no amplification product implying the existence of other biodegradation pathways or highly divergent gene sequences that suggest they probably harbour other hydrocarbon-degrading genes (as *AlmA*, *P450*...) (M'rassi *et al.* 2015).

The results obtained in this work demonstrate the diversity of hydrocarbon-degrading bacteria from marine-contaminated area in Algeria, and their variable biodegradation abilities.

Knowledge of biodegradation potential and studies of the biodegrading microbial communities associated with

contaminated seawater and sediment is the prerequisite for future bioremediation applications to the Algerian coasts. The collection of Algerian hydrocarbon biodegraders obtained in this study could be exploited for biotechnological applications also integrated into newly designed, ready to use, biodegradable scaffold-bacteria systems (Scaffaro *et al.* 2017).

Conflict of Interest

No conflict of interest declared.

References

- Al-Awadhi, H., Dashti, N., Kansour, M., Sorkhoh, N. and Radwan, S. (2012) Hydrocarbon-utilizing bacteria associated with biofouling materials from offshore waters of the Arabian Gulf. *Int Biodeterior Biodegradation* **69**, 10–16.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410.
- Atlas, R.M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev* **45**, 180.
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J. and Marchant, R. (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbial Biotechnol* **87**, 427–444.
- Batista, S.B., Mounteer, A.H., Amorim, F.R. and Totola, M.R. (2006) Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresour Technol* **97**, 868–875.
- Benmecheta, A. and Belkhir, L. (2016) Oil pollution in the waters of Algeria. *The Handbook of Environmental Chemistry* ed. Barcelo, D. and Kostianoy, A.G. pp. 1–16. Berlin, Heidelberg: Springer.
- 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. *J Microbiol Methods* **32**, 273–280.
- Cappello, S. and Yakimov, M.M. (2010) Alcanivorax. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* ed. Timmis, K.T. pp. 1737–1748. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Cappello, S., Caruso, G., Zampino, D., Monticelli, L.S., Maimone, G., Denaro, R., Tripodo, B., Troussellier, M. *et al.* (2007) Microbial community dynamics during assays of harbour oil spill bioremediation: a microscale simulation study. *J Appl Microbiol* **102**, 184–194.
- Cappello, S., Volta, A., Santisi, S., Morici, C., Mancini, G., Quatrini, P., Genovese, M., Yakimov, M.M. *et al.* (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. *Int Biodeterior Biodegradation* **110**, 235–244.
- Catania, V., Santisi, S., Signa, G., Vizzini, S., Mazzola, A., Cappello, S., Yakimov, M.M. and Quatrini, P. (2015) Intrinsic bioremediation potential of a chronically polluted marine coastal area. *Marine Poll Bull* **99**, 138–149.
- Catania, V., Sara, G., Settanni, L. and Quatrini, P. (2016) Bacterial communities in sediment of a Mediterranean marine protected area. *Can J Microbiol* **63**, 303–311.
- Chaillan, F., Le Flèche, A., Bury, E., Phantavong, Y.H., Grimont, P., Saliot, A. and Oudot, J. (2004) Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Res Microbiol* **155**, 587–595.
- Chandra, S., Sharma, R., Singh, K. and Sharma, A. (2013) Application of bioremediation technology in the environment contaminated with petroleum hydrocarbon. *Ann Microbiol* **63**, 417–431.
- Chen, C., Liu, Q., Liu, C. and Yu, J. (2017) Effect of different enrichment strategies on microbial community structure in petroleum-contaminated marine sediment in Dalian, China. *Marine Poll Bull* **117**, 274–282.
- China, B., Pirson, V. and Mainil, J. (1996) Typing of bovine attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex in vitro amplification of virulence-associated genes. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3462–3465.
- Daffonchio, D., Ferrer, M., Mapelli, F., Cherif, A., Lafraya, A., Malkawi, H.I., Yakimov, M.M., Abdel-Fattah, Y.R. *et al.* (2013) Bioremediation of Southern Mediterranean oil polluted sites comes of age. *N Biotechnol* **30**, 743–748.
- Das, N. and Chandran, P. (2011) Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnol Res Int* **2011**, 941810.
- De Pasquale, C., Palazzolo, E., Piccolo, L.L. and Quatrini, P. (2012) Degradation of long-chain n-alkanes in soil microcosms by two actinobacteria. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* **47**, 374–381.
- Dyksterhouse, 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. *Int J Syst Evol Microbiol* **45**, 116–123.
- EPA (1996) *Method 3510c: Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction Part of Test Methods for Evaluation Solid Waste, Physical/Chemical Methods*. Washington, DC: United States Environmental Protection Agency.
- Fathepure, B.Z. (2014) Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Front Microbiol* **5**, 173.
- Gao, X., Gao, W., Cui, Z., Han, B., Yang, P., Sun, C. and Zheng, L. (2015) Biodiversity and degradation potential of oil-degrading bacteria isolated from deep-sea sediments of South Mid-Atlantic Ridge. *Marine Poll Bull* **97**, 373–380.
- Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P. and Bertrand, J.C. (1992) *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a

- new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **42**, 568–576.
- Genovese, M., Crisafi, F., Denaro, R., Cappello, S., Russo, D., Calogero, R., Santisi, S., Catalfamo, M. et al. (2014) Effective bioremediation strategy for rapid in situ cleanup of anoxic marine sediments in mesocosm oil spill simulation. *Front Microbiol* **5**, 162.
- Gentile, G., Bonsignore, M., Santisi, S., Catalfamo, M., Giuliano, L., Genovese, L., Yakimov, M.M., Denaro, R. et al. (2016) Biodegradation potentiality of psychrophilic bacterial strain *Oleispira antarctica* RB-8T. *Marine Poll Bull* **105**, 125–130.
- GESAMP. (1993) Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. Rep Stud GESAMP.
- Golyshin, P.N., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Lünsdorf, H., Timmis, K.N. and Yakimov, M.M. (2002) *Oleiphilaceae* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 901–911.
- Goodfellow, M. and Maldonado, L.A. (2006) The families dietziaceae, gordoniaceae, nocardiaceae and tsukamurellaceae. In *The prokaryotes* ed. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. and Stackebrandt, E. pp. 843–888. New York, NY: Springer.
- Hara, A., Syutsubo, K. and Harayama, S. (2003) *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation. *Environ Microbiol* **5**, 746–753.
- Hara, A., Baik, S.H., Syutsubo, K., Misawa, N., Smits, T.H., van Beilen, J.B. and Harayama, S. (2004) Cloning and functional analysis of *alkB* genes in *Alcanivorax borkumensis* SK2. *Environ Microbiol* **6**, 191–197.
- Harayama, S., Kasai, Y. and Hara, A. (2004) Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr Opin Biotechnol* **15**, 205–214.
- Hassanshahian, M., Emtiazi, G. and Cappello, S. (2012) Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Poll Bull* **64**, 7–12.
- Hedlund, B.P., Geiselbrecht, A.D., Bair, T.J. and Staley, J.T. (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a new marine bacterium, *Neptunomonas naphthovorans* gen. nov., sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **65**, 251–259.
- Hendrickx, B., Junca, H., Vosahlova, J., Lindner, A., Rüegg, I., Bucheli-Witschel, M., Faber, F., Egli, T. et al. (2006) Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *J Microbiol Methods* **64**, 250–265.
- Kasai, Y., Kishira, H., Sasaki, T., Syutsubo, K., Watanabe, K. and Harayama, S. (2002) Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrient-supplemented sea water. *Environ Microbiol* **4**, 141–147.
- Kloos, K., Munch, J.C. and Schloter, M. (2006) A new method for the detection of alkane-monooxygenase homologous genes (*alkB*) in soils based on PCR-hybridization. *J Microbiol Methods* **66**, 486–496.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* ed. Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. pp. 115–175. New York: Wiley.
- Lo Piccolo, L., De Pasquale, C., Fodale, R., Puglia, A.M. and Quatrini, P. (2011) Involvement of an alkane hydroxylase system of *Gordonia* sp. strain SoCg in degradation of solid n-alkanes. *Appl Environ Microbiol* **77**, 1204–1213.
- Mahjoubi, M., Jaouani, A., Guesmi, A., Amor, S.B., Jouini, A., Cherif, H., Najjari, A., Boudabous, A. et al. (2013) Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *N Biotechnol* **30**, 723–733.
- Malik, Z. and Ahmed, S. (2012) Degradation of petroleum hydrocarbons by oil field isolated bacterial consortium. *Afr J Biotechnol* **11**, 650–658.
- McKew, B.A., Coulon, F., Yakimov, M.M., Denaro, R., Genovese, M., Smith, C.J., Osborn, A.M., Timmis, K.N. et al. (2007) Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environ Microbiol* **9**, 1562–1571.
- M'rassi, A.G., Bensalah, F., Gury, J. and Duran, R. (2015) Isolation and characterization of different bacterial strains for bioremediation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Sci Poll Res* **22**, 15332–15346.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**, 695–700.
- Porter, K.G. and Feig, Y.S. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora 1. *Limnol Oceanogr* **25**, 943–948.
- Quatrini, P., Scaglione, G., De Pasquale, C., RIELA, S. and Puglia, A.M. (2008) Isolation of Gram-positive n-alkane degraders from a hydrocarbon-contaminated Mediterranean shoreline. *J Appl Microbiol* **104**, 251–259.
- Rajaei, S., Seyedi, S.M., Raiesi, F., Shiran, B. and 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. *Iran J Biotechnol* **11**, 32–40.
- Röling, W.F., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J. and Head, I.M. (2002) Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5537–5548.
- Santisi, S., Cappello, S., Catalfamo, M., Mancini, G., Hassanshahian, M., Genovese, L., Giuliano, L. and

- Yakimov, M.M. (2015) Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium. *Braz J Microbiol* **46**, 377–387.
- Scaffaro, R., Lopresti, F., Catania, V., Santisi, S., Cappello, S., Botta, L. and Quatrini, P. (2017) Polycaprolactone-based scaffold for oil-selective sorption and improvement of bacteria activity for bioremediation of polluted water: porous PCL system obtained by leaching melt mixed PCL/PEG/NaCl composites: oil uptake performance and bioremediation efficiency. *Eur Polym J* **91**, 260–273.
- Schiewe, M.H., Hawk, E.G., Actor, D.I. and Krahn, M.M. (1985) Use of a bacterial bioluminescence assay to assess toxicity of contaminated marine sediments. *Can J Fish Aquat Sci* **42**, 1244–1248.
- Tapilatu, Y., Acquaviva, M., Guigue, C., Miralles, G., Bertrand, J.C. and Cuny, P. (2010) Isolation of alkane-degrading bacteria from deep-sea Mediterranean sediments. *Lett Appl Microbiol* **50**, 234–236.
- Vaidya, B., Kumar, R., Sharma, G., Srinivas, T.N.R. and Kumar, P.A. (2015) *Xanthomarina gelatinilytica* gen. nov., sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**, 3926–3932.
- Van Beilen, J.B., Li, Z., Duetz, W.A., Smits, T.H.M. and Witholt, B. (2003) Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas Sci Technol* **58**, 427–440.
- Vila, J., Nieto, J.M., Mertens, J., Springael, D. and Grifoll, M. (2010) Microbial community structure of a heavy fuel oil-degrading marine consortium: linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization. *FEMS Microbiol Ecol* **73**, 349–362.
- Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R., Abraham, W.R., Lünsdorf, H. and Timmis, K.N. (1998) *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **48**, 339–348.
- Yakimov, M.M., Giuliano, L., Gentile, G., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Lünsdorf, H., Timmis, K.N. *et al.* (2003) *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 779–785.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N. and Golyshin, P.N. (2007) Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **18**, 257–266.