

# *Table des matières*

---

Introduction générale	01
-----------------------	----

## **CHAPITRE I : Données bibliographiques sur les peuplements fongiques et présentation des hydrocarbures**

### **I. Données bibliographiques sur les peuplements fongiques**

1.	Caractères généraux des champignons	04
1.1.	Structure	04
1.2.	Reproduction	04
1.3.	Ecologie	05
1.4.	Relations biologiques	06
1.4.1.	Saprophytisme	06
1.4.2.	Parasitisme et pathogénie	07
1.4.3.	Symbiose	07
1.5.	Croissance	08
1.6.	Classification des champignons	08
1.6.1.	Chytridiomycotina	09
1.6.2.	Zygomycotina	10
1.6.3.	Ascomycotina	10
1.6.4.	Basidiomycotina	10
1.6.5.	Deuteromycotina	11
2.	Les champignons marins	11
2.1.	Profils écologiques	11
2.2.	Fonctions écologiques	12
2.3.	Les levures en milieu marin	14
2.4.	Les moisissures terrestres en milieu marin	15
2.5.	Facteurs influençant la biodiversité des champignons marins	16
2.5.1.	Habitats dans l'écosystème marin	17
2.5.2.	Disponibilité des substrats fongiques dans l'écosystème marin	18
2.5.3.	Concurrence d'inhibition	18
2.5.4.	Répartition géographique et température	19
2.5.5.	Effets de salinité	20
2.5.6.	Pression hydrostatique	21
2.6.	Applications biotechnologiques	22

## **II. Présentation des hydrocarbures**

1.	Généralités	25
1.1.	Structure des HAP	27
1.2.	Origines et sources des HAP	27
1.3.	Propriétés physico-chimiques	28
1.4.	Potentiel toxique	29
2.	Comportement des HAP dans le milieu marin	31
3.	Pénétration des hydrocarbures dans la chaîne alimentaire	33
4.	Microorganismes dégradant les hydrocarbures	33
4.1.	Bactéries	34
4.2.	Champignons	34
4.3.	Algues	35
5.	Voie de dégradation des HAP des champignons	35
6.	Facteurs physiques et chimiques affectant la biodégradation des hydrocarbures	35
6.1.	Composition chimique des hydrocarbures	36
6.2.	Etat physique et concentration des hydrocarbures ou du pétrole	39
6.3.	Influences de la température	40
6.4.	Influence de l'oxygène	40
6.5.	Influence des éléments nutritifs	42
6.6.	Effet de la salinité et du pH	42
6.7.	Effet de la pression	43
7.	Les sources des hydrocarbures en milieu marin	44
8.	Impacts des hydrocarbures en milieu marin	44

## **CHAPITRE II : Matériels et méthodes**

1.	Matériels et méthodes	46
1.1.	Les prélèvements	46
1.2.	Lieu de prélèvement	47
1.2.1.	Port d'Oran	47
1.3.	Milieu de culture utilisé	48
1.4.	Mise en culture pour l'isolement des souches fongiques	49
1.5.	Isolements et Purification des souches	49
1.6.	Identification	49
1.6.1.	Observations macroscopiques	50
1.6.2.	Observations microscopiques	50
1.7.	Conservation	51
1.7.1.	Conservation à 4°C	51
1.7.2.	Conservation de longue durée sous huile de paraffine	51
1.7.3.	Conservation dans l'eau distillée	52
1.7.4.	Conservation de très longue durée en cultures congelées	52
1.7.5.	Conservation de courte durée à température ambiante	52

1.8.	Détermination de l'index d'émulsion E <sub>24</sub>	52
1.9.	Test préliminaire de sélection des souches fongiques	53
1.10.	Biotest ou le test biologique	54
1.11.	Dégradation du pétrole brut en milieu liquide et production de biosurfactants	55

## **CHAPITRE III : Résultats et discussion**

<b>I. Résultats</b>		<b>56</b>
1.	Isolement et identification des souches	56
2.	Description et illustration des différents genres isolés	57
2.1.	Le genre <i>penicillium</i>	57
2.2.	Le genre <i>Aspergillus</i>	59
2.2.1.	<i>Aspergillus nidulans</i>	59
2.2.2.	<i>Aspergillus versicolor</i>	59
2.2.3.	<i>Aspergillus flavus</i>	62
2.2.4.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	62
2.2.5.	<i>Aspergillus niger</i>	65
2.3.	Le genre <i>Cladosporium</i>	67
2.4.	Le genre <i>Alternaria</i>	67
2.5.	Le genre <i>Acremonium</i>	67
3.	Détermination de l'index d'émulsion E <sub>24</sub>	71
4.	Test préliminaire de sélection des souches fongiques	72
5.	Biotest ou le test biologique	73
5.1.	Le volume	73
5.2.	Le temps	73
6.	Expérience de dégradation du pétrole brut en milieu liquide	79
<b>II. Discussion</b>		<b>80</b>
<b>Conclusion générale et perspectives</b>		<b>83</b>
<b>Références bibliographiques</b>		<b>85</b>
<b>Annexes</b>		

# ***INTRODUCTION GENERALE***

---

## Introduction générale

L'importance du trafic pétrolier maritime, le développement de l'exploitation offshore, l'implantation littorale d'unités de raffinage et du secteur industriel sont autant des causes chroniques ou accidentelles de rejets d'hydrocarbures dans les milieux aquatiques (Mesbaiah et Badis, 2013).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des contaminants retrouvés dans l'environnement, et ils sont libérés au cours des activités de l'industrie pétrolière, tels que le transport du pétrole. Ces composés peuvent être rejetés par la libération accidentelle des hydrocarbures dans le milieu marin, provoquant de graves dommages environnementaux, sociaux et économiques. Pour cette raison, les pays producteurs de pétrole devraient encourager le développement de technologies efficaces et à faible coût pour faire face à ces problèmes. Dans ce contexte, l'utilisation de micro-organismes peut être une alternative prometteuse pour le processus d'assainissement du polluant de l'environnement parce que certains micro-organismes sont capables de minéraliser des composés HAP à des produits solubles dans l'eau. Malgré l'identification du mécanisme de base impliqué dans la bioremédiation des HAP, le processus reste mal compris (Verdin et *al.*, 2006).

La biodégradation par les populations naturelles de micro-organismes est le mécanisme central et le plus fiable par lequel des milliers de polluants xénobiotiques, notamment le pétrole brut, sont éliminées de l'environnement (Emtiazi et *al.*, 2005; Ghanavati et *al.*, 2008). Une grande variété de levures, de bactéries et de champignons filamenteux sont capables d'utiliser des hydrocarbures (Manee et *al.*, 1998).

La présence de micro-organismes dégradant de pétrole tels que les bactéries et les champignons ne se limite pas à un écosystème particulier et a été trouvée dans l'Arctique, Antarctique et les régions tempérées (Prince, 1993; Elshafie, 2007).

Par voie de conséquence, les recherches actuelles s'orienteront vers l'élimination des HAP par les bioprocédés d'où l'intérêt de ces nouvelles techniques réside surtout dans son aspect non polluant, et l'absence de sous produits chimiques (Lan, 2009).

L'utilisation des champignons comme une méthode de bioremédiation fournit une option pour nettoyer les polluants environnementaux. La bioremédiation utilisant les champignons ont attiré peu d'attention dans les deux dernières décennies, puisque la plupart des études ont porté principalement sur l'utilisation de bactéries, tels que *Rhodococcus sp.* (Dean-Ross et al., 2001) et *Mycobacterium vanbaalenii* (Moody et al., 2005). Néanmoins, récemment, les champignons ont reçu une attention considérable pour leur potentiel de biodégradation qui est attribuée aux enzymes qu'ils produisent qui dégradent un large éventail de polluants récalcitrants tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les chlorophénols et les pesticides (Bumpus et al., 1985).

Beaucoup de travaux ont porté sur l'isolement et la caractérisation de ces champignons marins, l'évaluation de leurs capacités dans la dégradation des hydrocarbures et leur pouvoir d'émulsification, la production des biosurfactants et leurs différentes applications. Parmi ces nombreux travaux on peut citer ceux de (Zinjarde et Pant, 2002) au niveau du Port de Mumbai qui a révélé la présence de levures appartenant au genre *Candida* isolé à partir d'échantillons diverses et qui sont capables de dégrader le pétrole brut. Au niveau de la mer rouge (Egypte), une étude a été réalisée par El Sayed (2005) sur l'évaluation des microfunges dans la bioremédiation de l'huile diesel.

Dans une étude effectuée par Elshafie et al. (2007), Dix espèces fongiques isolées de boules de goudron recueillies à partir des plages d'Oman ont été testés pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures. Wu et al. (2010) ont également étudié la capacité de dégradation de deux souches de *Fusarium solani*, champignons isolés des sédiments de mangrove contaminés par des HAP.

Dans une autre étude réalisée par Passarini et al. (2011), huit champignons d'origine marine ont été isolés à partir de différents échantillons de cnidaires recueillis sur la côte nord de l'État de São Paulo en Brésil pour étudier leur potentiel de dégradation des composés de HAP. Au niveau du golf Persique une étude a également été menée par Hassanshahian et al. (2012) qui s'intéresse à l'évaluation de levures isolées à partir de l'eau de mer et des sédiments dans la biodégradation du pétrole brut.

Par conséquent, l'objectif principal de ce travail est d'identifier et de caractériser des souches fongiques isolées de l'eau de mer provenant du port d'Oran, afin d'évaluer leur potentiels de biodégradation du pétrole brut.

Ce travail s'articule autour de trois chapitres :

- **Le premier chapitre :** aborde les connaissances sur le Règne des champignons et un rappel des principales données bibliographiques concernant l'origine des hydrocarbures dans l'environnement marin et leurs voies métaboliques chez les champignons.
- **Le deuxième chapitre :** Matériel et Méthodes, qui présente d'une part l'isolement et l'identification des souches fongiques, pour ensuite s'intéresser aux techniques ayant permis de déterminer leurs capacités dans la dégradation du pétrole brut.
- **Le troisième chapitre :** est dédié à une synthèse des principaux résultats obtenus, qui seront discutés, suivi par une conclusion générale et les perspectives de recherche de ce travail.

***CHAPITRE 1 :***

***DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR  
LES PEUPELEMENTS FONGIQUES***

---

# 1. Caractères généraux des champignons

Les champignons constituent une des lignées les plus diverses des Eukaryota (Blackwell, 2011) et sont perçus comme un des groupes les plus importants en raison de leurs fonctions vitales aux écosystèmes (Mueller et Schmit, 2007). De plus, ils ont un rôle économique important en tant que producteurs de biomolécules utilisées en pharmacologie et en recherche industrielle (Mueller et Schmit, 2007; Stajich *et al.*, 2009). Toutefois, leur étude a surtout été dirigée vers les écosystèmes continentaux (Richards *et al.*, 2012) et les groupes à intérêts économiques (Powell, 1993), laissant une partie de leur diversité encore insondée.

## 1.1. Structure

Une remarquable variété de morphologies et de cycles de vie est observée chez les champignons (Redecker, 2002). Ils présentent principalement deux types de structures : la forme levure unicellulaire et la forme mycélienne pluricellulaire constituée d'hyphes. Les champignons supérieurs Ascomycota et Basidiomycota ont des hyphes septés, c'est-à-dire qu'ils comportent des cloisons tandis que ceux de la plupart des autres champignons sont coenocytiques (sans septum) (Stajich *et al.*, 2009). Ces champignons supérieurs se distinguent également par la production de structures de fructification macroscopiques (Redecker, 2002).

## 1.2. Reproduction

Une caractéristique majeure des champignons est leur mode de reproduction; ils produisent un grand nombre de spores, ce qui leur assure un pouvoir de contamination considérable. Les spores sont issues de plusieurs modalités de reproduction sexuée ou asexuée qui représentent le principal critère de leur classification (Tabuc, 2007).

La forme sexuée est appelée téléomorphe et la forme asexuée est appelée anamorphe. D'un point de vue taxonomique, le *Code International de Nomenclature Botanique* (ICBN; McNeill *et al.*, 2006) accepte l'utilisation de noms différents pour chacune des deux phases, toutefois lorsque les deux phases sont connues, le nom du téléomorphe

est retenu. Les spores sexués ou asexués peuvent prendre des formes différentes, comme les zygospores et sporangiospores chez les Zygomycota (White *et al.*, 2006) et les zoospores chez les Chytridiomycota (Gleason et Lilje, 2009). Les différents groupes de champignons présentent de multiples mécanismes de dispersion de leurs spores résultant d'une adaptation à leur environnement (Lutzoni *et al.*, 2004).

### **1.3. Ecologie**

D'un point de vue écologique, les champignons sont ubiquistes, ils ont été observés dans de nombreuses régions du globe que ce soit en milieux continental ou océanique (Wardle et Van der Putten, 2002). Ce sont des organismes hétérotrophes, qui se nourrissent de composés organiques, et ils ont principalement été décrits comme étant saprophytes. Ils se nourrissent par osmotrophie (Richards *et al.*, 2012), par absorption, au travers de leur paroi riche en cellulose et en chitine. En effet, ils secrètent des enzymes pouvant cliver des polymères organiques complexes en des formes plus simples, qu'ils peuvent ensuite assimiler (Peay *et al.*, 2008; Richards *et al.*, 2012). De plus, leur fonction de décomposition de débris d'origine végétale (cellulose, lignine) ou d'origine animale (kératine, chitine) permet de relarguer dans l'écosystème des molécules utilisables par un plus grand nombre d'organismes (Hyde *et al.*, 2007). Ils jouent ainsi un rôle central dans le cycle du carbone et le recyclage des nutriments (Peay *et al.*, 2008) et se trouvent donc impliqués dans de nombreux réseaux trophiques (Wardle et Van der Putten, 2002). Une autre fonction incontournable des champignons est celle provenant de leur association avec les plantes. Par exemple, la plupart des plantes terrestres sont en relation mutualiste avec des Glomeromycota pour former les mycorhizes à arbuscules (Parniske, 2008). Le réseau d'hyphes des champignons qui prospecte le sol à partir des racines permet entre autre, la nutrition minérale et hydrique des plantes. En retour, les champignons reçoivent du carbone organique (Smith *et al.*, 2010). D'autres types de symbioses avec des organismes végétaux et animaux sont également observés. Par exemple, les champignons ont un rôle non négligeable en tant que parasites ou pathogènes. Ces fonctions sont les plus répandues et certaines autres, moins connues, ne sont pas pour autant moins importantes. Par exemple, celle du prédateur *Arthrobotrys*, un champignon nematophage qui pourrait

être utilisé comme agent de biocontrôle d'un nématode parasite de plantes (Kerry, 2000).

Les champignons montrent donc un large panel de fonctions écosystémiques, surtout étudiées dans les milieux continentaux (Mahé, 2012).

Au cours de leur évolution, ils ont colonisé de nombreux habitats, et ont subis plusieurs phases importantes de radiation (Mahé, 2012).

#### **1.4. Relations biologiques**

Les champignons marins (organismes hétérotrophes) vivent aux dépens de substrats organiques, dont ils tirent l'énergie grâce à un arsenal d'enzymes tout comme leurs homologues terrestres (Liberra et Lindequist, 1995). On leur connaît des interactions avec les algues marines, les plantes vasculaires, les invertébrés, les poissons et les Mammifères (Stanley, 1992). Les relations biologiques des champignons avec le monde vivant sont de plusieurs types :

##### **1.4.1. Saprophytisme**

Les champignons ont un rôle très important dans le recyclage de la matière organique sur Terre (Galagan et *al.*, 2003). Leur capacité d'exploration via l'extension des hyphes, couplée à la capacité de largage d'enzymes hydrolytiques, ont permis une colonisation d'une grande variété de substrats. Dans le sol, les champignons participent au cycle de l'azote par la dégradation de l'humus. Ils ont la capacité de consommer la cellulose ainsi que la lignine et sont considérés comme les principaux recycleurs de matière organique à partir de matériels végétaux (Lutzoni et *al.*, 2004). En milieu marin ils sont activement responsables de la dégradation des substrats ligneux marins riches en lignocelluloses (cellulose, hémicellulose et lignine) (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1995). Ils contribuent également à la dégradation des cadavres animaux marins (Sridhar et Prasannarai, 2001).

### 1.4.2. Parasitisme et pathogénie

Environ 20% des espèces de champignons connues sont capables de parasitisme. On trouvera des parasites obligatoires, facultatifs ou opportunistes (Lutzoni et *al.*, 2004). Les opportunistes sont des organismes saprophytes qui vont s'attaquer aux organismes dont les défenses sont affaiblies (Rinaldi, 1989). Les champignons peuvent attaquer tous les groupes du vivant, comme par exemple les plantes, les insectes, les animaux mais aussi les bactéries et les autres champignons (Lutzoni et *al.*, 2004).

Les mycoses ont un impact important dans l'environnement marin et agissent comme un facteur naturel limitant des plantes aquatiques, d'algues et d'animaux (intestins de poissons et crustacés). Ils provoquent de sérieuses infections chez les invertébrés marins, et affectent le développement des œufs et des larves de crustacés (Polglase et *al.*, 1986).

### 1.4.3. Symbiose

Les associations symbiotiques entre champignons et végétaux supérieurs (mycorhize) constituent la forme de symbiose la plus répandue à l'échelle planétaire (Jennings et Lysek, 1996). On estime que 90% des végétaux contractent spontanément cette association (Smith et Read, 1997).

Elles forment un lichen (ex. *Chadefaudia corallinarum* s'associe avec l'algue *Dermatoliton sp.*) ou une mycophycobiose (relation d'intérêt mutuel entre un champignon et une macroalgue) démontrée par la relation obligatoire et protectrice pour l'algue entre *Turgidosculum complicatum* et la macroalgue *Praseola borealis* (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979; Stanley, 1992; Hyde et *al.*, 1998).

Les champignons marins représentent un maillon important dans les chaînes alimentaires de l'écosystème marin et sont eux-mêmes une source de nourriture pour d'autres organismes marins. Ils colonisent et forment des structures communautaires sur les substrats vivants et morts, submergés dans la mer (Hughes, 1975; Cuomo et *al.*, 1995; Liberra et Lindequist, 1995).

Par ailleurs, la survie de ces micromycètes dans le monde marin, face à la rude compétition avec d'autres organismes, dépend entièrement de la production de métabolites secondaires. La dominance de certains genres sur certains substrats marins s'explique par leur production de molécules fortement bioactives, comme c'est le cas de *Corollospora maritima* et *Halocyphina villosa* (Cuomo et al., 1995; Liberra et Lindequist, 1995). 57 des espèces isolées de la mer du Japon se sont montrées bioactives (hémolytiques), notamment des souches de *Trichoderma sp.* et d'*Aspergillus sp.* (Khudyakova et al., 2000) se sont également montrés neurotoxiques vis-à-vis de larves de Diptères (Sallenave, 1999).

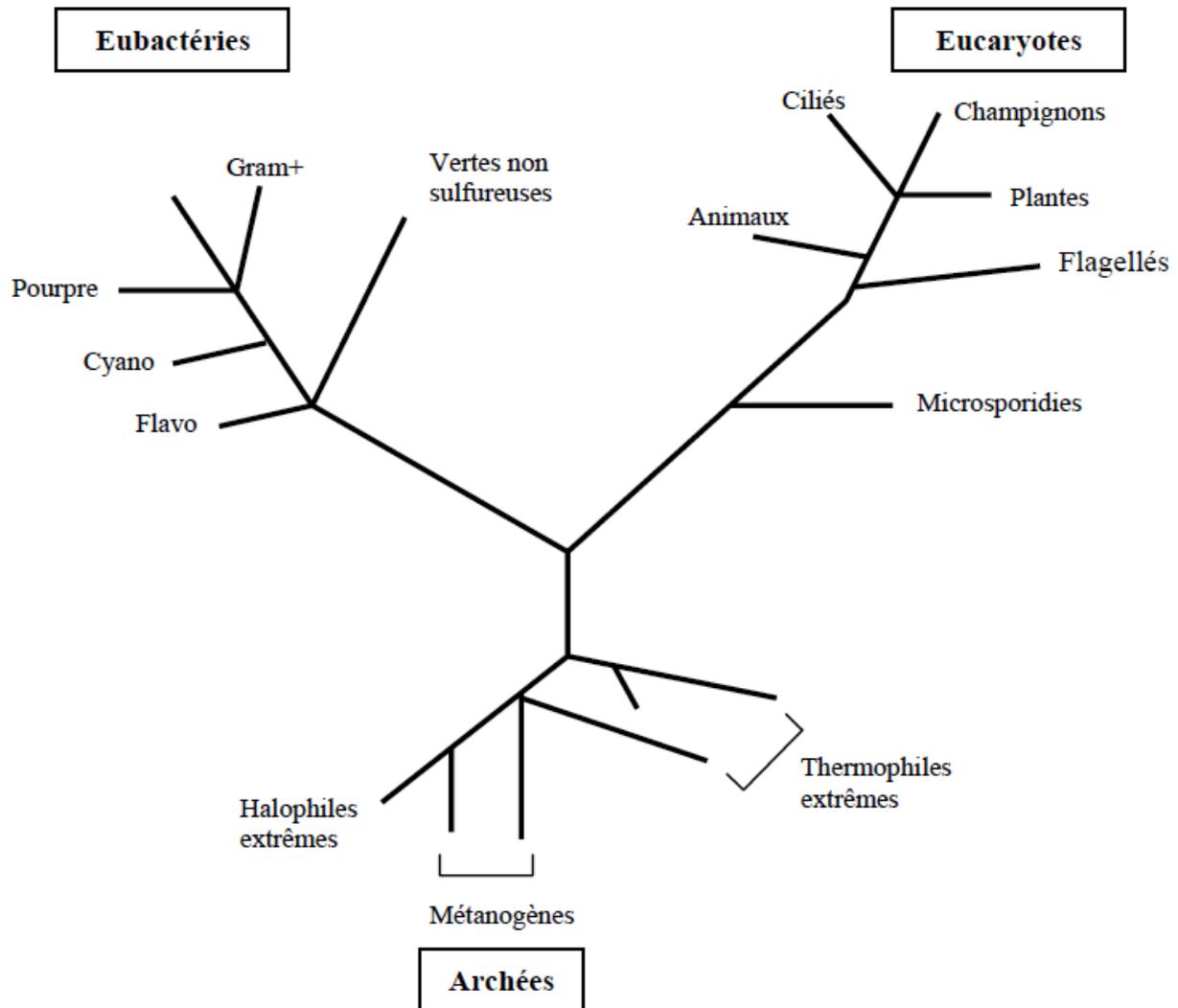
### **1.5. Croissance**

La croissance des champignons mycéliens est assurée par des hyphes qui sont constitués de cellules hétérocaryotiques (Ascomycota et Basidiomycota) ou coenocytiques (Zygomycota et Glomeromycota). Leur extension est restreinte à l'apex. Après division, l'article apical nouvellement formé peut se séparer du reste du mycélium par une cloison (mycélium septé) ou non (mycélium siphonné) (Jennings et Lysek, 1996). Les hyphes vont se brancher en réseau, déterminant en partie la morphologie macroscopique du thalle (Carlile et Watkinson, 1994). La croissance et la nutrition vont se faire de façon concomitante; la croissance sera réalisée par une extension de la paroi à l'apex, par un apport continu de chitine. Dans le même temps, au niveau de l'apex également, des enzymes hydrolytiques seront déversées dans le milieu extérieur (Carlile et Watkinson, 1994).

### **1.6. Classification des champignons**

La classification des champignons est en constante évolution. Pendant longtemps, elle s'est appuyée sur celle de Hawksworth, Sutton et Ainsworth (Hawksworth et al., 1995). Fondée sur des caractères morphologiques simples, elle a longtemps fait référence, mais l'étude ultrastructurale, biochimique et génétique a révélé d'importantes différences, nécessitant une réorganisation de la taxinomie (Figure 1). La classification, proposée par Kwon-Chung et al. (1992), actualisée par Sutton et al. (1998) et de Hoog et al. (2000) fait référence aujourd'hui.

On différencie quatre divisions selon les modalités de la reproduction sexuée : les Chytridiomycotina, les Zygomycotina, les Ascomycotina et les Basidiomycotina. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la division est appelée Deuteromycotina ou champignons imparfaits (Blackwell et *al.*, 1998).



**Figure 1** : Les trois règnes du vivant Woese (1977).

### 1.6.1. Chytridiomycotina

Ce sont les seuls champignons à posséder, des spores uniflagellées (zoospores) (Jennings et Lysek, 1996). Ce sont les champignons les plus anciens (James et *al.*, 2000; James et *al.*, 2006). La présence de spores flagellées semble restreindre ces organismes aux milieux aquatiques et dans les sols humides (James et *al.*, 2000).

Environ 1000 espèces ont été décrites au sein de ce phylum, ce qui correspond à environ 1% des espèces décrites de champignons (Taylor et *al.*, 2004).

### **1.6.2. Zygomycotina**

Les Zygomycotina constituent un groupe ancien des champignons ayant divergé après les Chytridiomycota (James et *al.*, 2006; Bar-Hen et *al.*, 2008). Plus de 600 espèces ont été décrites à ce jour, ce qui représente moins de 1% des champignons décrits (Hawksworth, 1991; Hawksworth et Rossman, 1997; Hawksworth, 2001). Ils sont caractérisés par un mycélium siphonné et une reproduction asexuée le plus souvent par sporocystospore et une reproduction sexuée par fusion de gamétocyste (Barnett et Barry, 1972; Botton et *al.*, 1990; Bouchet et *al.*, 1999).

### **1.6.3. Ascomycotina**

Les Ascomycotina comptent 45000 espèces décrites à ce jour (Hawksworth, 1991 et 2001; Taylor et *al.*, 2004). On retrouve également chez ces organismes les champignons utilisés en agroalimentaire (*Saccharomyces cerevisiae*) ou en pharmacologie (*Penicillium chrysogenum*).

Ils présentent une structure caractéristique appelée asque, formée au cours de la reproduction sexuée, qui renferme un nombre défini d'ascospores. Ce sporocyste, globuleux, cylindrique ou plus ou moins claviforme, avec une paroi simple ou double représente un important critère d'identification. Ils sont caractérisés par : Un mycélium cloisonné ou unicellulaire (levure); Reproduction asexuée par des conidies; Reproduction sexuée par formation de spore méiotique (ascospores) dans des asques (Botton et *al.*, 1990).

### **1.6.4. Basidiomycotina**

Les Basidiomycota regroupent 22000 espèces décrites (Taylor et *al.*, 2004). Ils sont caractérisés par un mycélium cloisonné ou unicellulaire (levure), une reproduction asexuée par des conidies et sexuée par formation de méiospore (basidiospore) dans des basides (Botton et *al.*, 1990).

### **1.6.5. Deuteromycotina**

Ce groupe comprend tous les champignons qui ne produisent ni ascospores, ni basidiospores et qui se multiplient au moyen de conidies (Botton et *al.*, 1990). Les Deutéromycotina ne constituent pas un groupe naturel, mais d'un ensemble artificiel regroupant environ 15.000 espèces (plus du quart des champignons actuellement connus). Ils sont caractérisés par un thalle en général cloisonné ou unicellulaire. Ne présentant jamais, ou très exceptionnellement, de forme de reproduction sexuée. La plupart présentent, néanmoins, des affinités d'Ascomycètes. Ils se reproduisent uniquement par voie végétative au moyen de spores asexuées (conidie) ou par simple fragmentation du mycélium (arthroconidie) (Bouchet et *al.*, 1999).

## **2. Les champignons marins**

### **2.1. Profil écologique**

Le milieu marin est un écosystème très peu étudié par les mycologues comparativement au milieu continental. Les premières observations, réalisées au XIX siècle, rendaient compte de champignons associés à des algues dérivant avec le courant ou en voie de décomposition (Jones, 2011). L'étude de Barghoorn et Linder (1944) est probablement celle qui a créé un nouvel intérêt pour la mycologie marine (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979; Jones, 2011). En examinant des échantillons de bois immergé continuellement dans l'eau de mer ou exposé aux marées dans des mangroves, ils ont observé des champignons analogues aux formes terrestres mais qui présentaient des adaptations aux conditions marines (Barghoorn et Linder, 1944). Suite à ces travaux, le nombre de champignons marins décrits par année a augmenté (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979).

Dans l'objectif d'étudier le rôle et l'impact des champignons en milieu marin, Kohlmeyer et Kohlmeyer (1979) ont proposé une définition écologique de ces formes fongiques observées en milieu marin, qui est de nos jours communément admise : "*Les champignons marins obligatoires se développent et se reproduisent exclusivement en milieu marin ou estuarien; les champignons marins facultatifs sont observés en milieu*

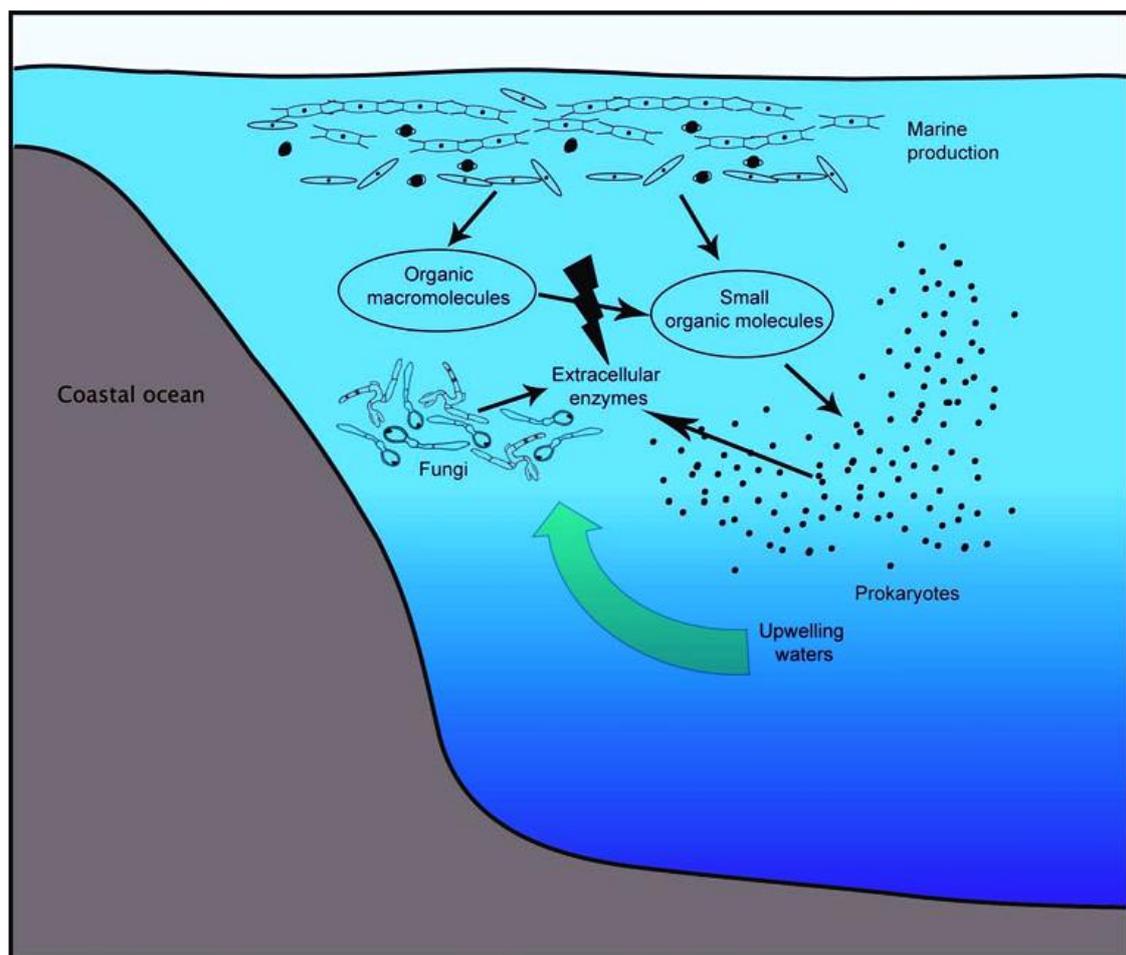
*continental (i.e. milieu terrestre et eau douce) et sont également capables de se développer (et probablement de se reproduire) en milieu marin."*

Le nombre actuel d'espèces marines obligatoires de champignons supérieurs est de 549 dont 54 seulement décrites après l'an 2000 (Jones, 2011). Près de 450 d'entre elles sont des Ascomycota, les autres étant des anamorphes ou des Basidiomycota. La plus grande partie de ces espèces sont lignicoles (associées à un substrat en bois) dans les zones tempérées et dans les mangroves tropicales (Jones, 2011). Les algues représentent le second réservoir d'espèces de champignons marins (Bugni et Ireland, 2004). On trouve également des espèces fongiques saprophytes ou endophytes, sur des plantes marines (*Spartina*, *Posidonia*) en milieux tropical ou tempéré. D'autres sont isolées à partir de sable, de coraux, d'algues calcaires, de coquilles de mollusques, d'exosquelettes d'hydrozoaires ou de tubes d'annélides. Enfin, des animaux marins comme les éponges forment également des associations avec les champignons (Gao et al., 2008). La plupart de ces espèces font partie de la diversité étudiée en zone littorale et sublittorale, en examinant au microscope les structures de fructification sur des substrats marins ou en les isolant sur des milieux de culture. Les méthodes moléculaires, de plus en plus utilisées pour l'identification, ont quant à elles permis de mettre en évidence des souches endophytes (Jones, 2011).

## **2.2. Fonctions écologiques**

Les champignons jouent un rôle important de décomposeur de substrats ligneux (bois) flottant dans les écosystèmes marins comme les mangroves ou d'autres zones côtières, relatif à leur fonction lignocellulolytique (Hyde et al., 1998). Ainsi, ils ont un rôle clé puisqu'ils fractionnent un polymère complexe en matière organique particulière qui devient utilisable pour d'autres organismes du réseau trophique. On l'observe également dans des systèmes riches en carbone organique dissous produit par des organismes autotrophes (phytoplancton). Dans les eaux côtières d'Hawaï, denses en producteurs primaires, Gao et al. (2010) ont décrit une grande diversité d'Ascomycota et de Basidiomycota jusqu'à 100 m de profondeur. Un phénomène similaire a été observé au niveau des écosystèmes d'upwelling ou des eaux profondes et froides remontant à la surface chargées en éléments minéraux induisant une augmentation de

la biomasse autotrophe (Gutierrez et *al.*, 2011). Au niveau du courant de Humboldt (Chili), Gutierrez et *al.* (2011) ont mis en évidence une biomasse fongique importante sous forme d'hyphes et de spores, associée à la présence d'enzymes extracellulaires hydrolytiques. Ils ont observé que les champignons réalisaient jusqu'à 90% de l'hydrolyse extracellulaire du carbone photosynthétique pendant la saison haute de production. Des champignons dans ce type de système océanique auraient donc une forte implication dans le cycle du carbone comme c'est le cas en milieu continental (Figure 2).



**Figure 2 :** Model conceptuel de la dégradation de la matière organique, y compris la dégradation des polymères organiques par les champignons dans l'écosystème d'upwelling au sud centre de chili (Gutiérrez et *al.*, 2011).

Les champignons agissent sur un autre cycle biogéochimique, celui de l'azote. Il a été montré que les champignons utilisent du nitrate pour leur respiration dans des sédiments suboxiques, participant ainsi à la dénitrification anaérobie de l'environnement marin (Jebaraj et Raghukumar, 2009). On retrouve également des champignons en symbiose avec des algues microscopiques ou des cyanobactéries sous forme de lichens, avec des algues macroscopiques formant ainsi de mycophycobioses, mais ces symbioses sont très peu documentées (Hyde et *al.*, 1998). Des communautés fongiques sont associées avec des éponges (Gao et *al.*, 2008) mais il n'a pas encore été déterminé de quel type d'interaction biologique il s'agit. Enfin, certains champignons marins sont des pathogènes d'animaux ou d'algues pouvant causer des infections sévères (Hyde et *al.*, 1998). Van Dover et *al.* (2007) ont identifié une levure pathogène comme étant l'agent responsable de la détérioration des tissus de modioles, pouvant entraîner la décimation de la population dans le bassin des Fidji. De même, les champignons endolithiques sont considérés comme des parasites nuisibles aux récifs de corail ou aux gorgones puisqu'ils peuvent provoquer des épizooties pouvant mener à la mort de la colonie si celle-ci est en plus exposée à un stress environnemental (Alker et *al.*, 2001). Ce sont des champignons qui creusent des substrats carbonates (squelettes de coraux, gorgones mais aussi formations calcaires, coquilles de mollusques), pour se nourrir de matière organique minéralisée (Golubic et *al.*, 2005).

### **2.3. Les levures en milieu marin**

Les levures sont omniprésentes dans l'environnement marin. Elles sont fréquemment trouvées dans le tube digestif des organismes marins, dans l'eau de mer et dans le sable de plage (Van Uden et Branco, 1963; Taysi et Van Uden, 1964; Kawakita et Van Uden, 1965; Fell, 1967; Vogel et *al.*, 2007; Kutty et Philip, 2008). On considère donc que les facteurs affectant la distribution des levures marines comprennent les courants, la migration des organismes marins et la contamination provenant de sources terrigènes (Van Uden et Branco, 1963; Fell, 1967; Vogel et *al.*, 2007; Kutty et Philip, 2008).

Les levures marines indigènes ont besoin de se développer sur ou dans un substrat marin. Cependant, la tolérance de salinité ne distingue pas les espèces marines des espèces terrestres parce que certaines espèces terrestres peuvent se développer dans des concentrations en chlorure de sodium supérieures à celles normalement présentes dans la mer (Yamagata et Fujita, 1970; Kutty et Philip, 2008).

Des études antérieures ont indiqué que les levures marines n'appartiennent pas à un genre ou à un groupe spécifique, mais elles sont représentées par une grande variété de genres bien connus tels que *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, et *Torulopsis* (Kutty et Philip, 2008). Relativement, peu d'études ont étudié les levures marines, et ce groupe de Mycota est encore mal compris (Kutty et Philip, 2008).

Il ya plusieurs décennies, des levures marines étaient isolées des estuaires et de sédiments côtiers à l'ouest de Taiwan (Cheng et Lin, 1977). Les genres de levures classés inclus *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Debaryomyces*, *Endomycopsis*, *Pichia*, *Kloeckera*, et *Rhodotorula*.

#### **2.4. Les moisissures terrestres en milieu marin**

Les moisissures terrestres sont fréquemment isolées du milieu marin. Cependant, leur rôle reste encore très discuté et peu reconnu par la communauté scientifique. En effet, la plupart des scientifiques considèrent que les moisissures ne sont présentes dans les écosystèmes marins qu'à l'état de spores.

Les champignons filamenteux sont connus depuis longtemps en milieu marin. Plusieurs espèces ont été isolées d'eaux côtières hawaïennes en utilisant une méthode de culture sur boîte (Steele, 1967). Les écosystèmes étudiés ont montré une abondance et une variation des populations fongiques en fonction des zones. L'auteur discuta les critères définissant les champignons marins en évoquant la difficulté de considérer les moisissures comme espèces marines, même si des études antérieures relataient une meilleure croissance de champignons filamenteux d'origine terrestre sur des milieux de culture salés (Gray et al., 1963).

Des études plus récentes ont été publiées sur les champignons filamenteux. Gonzalez et *al.* (1998) ont étudié l'abondance et la diversité de la microfonge arénicole de trois plages mexicaines. Les résultats obtenus ont montré une prédominance de l'espèce non marine *Cladosporium cladosporoides* sur les trois sites étudiés. La majorité de la microfonge présente dans les sédiments intertidaux était constituée de champignons non marins, en accord avec des travaux antérieurs réalisés au Danemark (Rees et Jones, 1985) et en Espagne (Genilloud et *al.*, 1994). Les auteurs insistent sur le fait que les moisissures décrites, par l'influence de facteurs écologiques, pourraient devenir actives et alors être considérées comme des espèces marines facultatives.

De même une étude de la microfonge d'une plage de Rio de Janeiro (Brésil) a révélé la présence de champignons filamenteux appartenant majoritairement aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, montrant ainsi que les écosystèmes côtiers représentent un vaste réservoir fongique (Moura Sarquis et de Oliveira, 1996).

Les travaux de Shaumann (1993) ont relaté la présence de moisissures en mer du Nord et en Atlantique nord. Les prélèvements de sédiments et d'eau de mer ont été effectués en haute mer, aux profondeurs sublittorale et abyssale. Les résultats obtenus indiquent que l'abondance et la diversité de la microfonge varient avec la profondeur mais dépendent également d'autres paramètres comme la nature du sol, la concentration en oxygène ou les courants.

## **2.5. Facteurs influençant la biodiversité des champignons marins**

L'écologie des champignons marins, leur préférence d'habitat, et les facteurs affectant et influençant leur croissance dans la mer sont examinés. La référence particulière est faite aux effets des habitats, disponibilité des substrats pour la colonisation, la répartition géographique et la température, la salinité, et la compétition d'inhibition. Cependant, ce sont seulement quelques uns des facteurs qui ont un effet sur l'occurrence et la distribution des mycètes marins. D'autres incluent les aliments organiques dissous, la concentration d'ion d'hydrogène, les effets osmotiques, la disponibilité de l'oxygène, les polluants, l'abondance de propagules dans l'eau, la

pression hydrostatique, la spécificité de substrat, la température et l'amplitude des marées, et peut être même la lumière (Booth et Kenkel, 1986).

La diversité des espèces de champignons marins est donc contrôlée par un amalgame de facteurs en interaction.

### **2.5.1. Habitats dans l'écosystème marin**

Cinq décennies de la mycologie marine ont clairement démontré que les champignons marins sont distincts de leurs homologues terrestres et d'eau douce, tant dans leur taxonomie, morphologie et adaptation à un habitat aquatique (Barghoom et Linder, 1944; Johnston et Sparrow, 1961; Jones, 1976; Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979; Meyers, 1996). Certains de ces micromycètes cependant, peuvent se reproduire dans l'eau de mer et dans les habitats d'eau douce ou terrestres. Cela est vu chez quelques espèces telles que : *Savoryella lignicola*, *Lignincola laevis* trouvées dans les habitats marins et d'eau douce, et *Leptosphaeria*, *Pleospora*, *Trematosphaeria* (Ascomycota), *Calathella* (Basidiomycota) et *Alternaria* (mitosporique) trouvées dans les habitats marins et terrestres (Kohlmeyer et Volkmann- Kohlmeyer, 1991).

Bien que le terme « marin » soit employé pour englober tous les champignons qui se reproduisent en mer, ils sont souvent appelés marins, océaniques, manglicoles, arénicoles ou estuariens.

Les champignons de mangroves, par exemple, peuvent être tout à fait distincts de ceux survenant de la mer profonde ou des eaux océaniques et côtières. *Antennospora quadricornuata*, *Torpedospora radiata* et les espèces d'*Arenariomyces* et de *Corollospora*, sont typiquement les micromycètes des eaux côtières et océaniques, tandis que *Hypoxylon oceanicum*, *Kallichroma tethys* et *Leptosphaeria australiensis* sont généralement trouvées sur des substrats de mangroves (Jones et Hyde, 1990). Certaines espèces, telles que *Lignincola laevis* et *Periconia prolifica* sont trouvées dans les deux habitats. Les champignons marins se reproduisant dans les habitats spécifiques peuvent être morphologiquement adaptés à ces derniers.

### **2.5.2. Disponibilité des substrats fongiques dans l'écosystème marin**

Une large gamme de substrats sont disponibles dans la mer et se sont révélés être colonisés par un certain nombre de micromycètes (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979; Jones et Mitchell, 1996). L'abondance du matériel pour la colonisation varie d'un site à l'autre. Les mangroves sont généralement riches en substrats avec une abondance de la litière de feuille de mangrove et le bois mort des arbres (Awang et Gan, 1989). D'autres habitats et localités peuvent avoir peu de bois disponible pour la colonisation des champignons, par exemple : les eaux de l'antarctiques (Pugh et Jones, 1986), et la côte de Koweït (Zainal et Jones, 1984), de sorte que la diversité fongique est faible avec 9 et 12 espèces respectivement.

### **2.5.3. Concurrence d'inhibition**

Les études sur la colonisation des blocs d'essai dans les eaux tempérés ont montré que les espèces de *Lulworthia* étaient communes et souvent dominantes (Jones, 1968; Byrne et Jones, 1974).

Miller et *al.* (1985) ont rapporté la même tendance avec 137 périthèces de *Lulworthia* par 10 mm<sup>2</sup> quand elles étaient les seules espèces sur les blocs d'essai. Cependant, quand *Ceriosporopsis halima* ou *Amylocarpus encephaloides* ont été présentes, le nombre de périthèces de *Lulworthia* a baissé sensiblement à 53 et à 3 par 10 mm<sup>2</sup> respectivement ( $p < 0,001$ ). Cette observation a conduit à un certain nombre d'études visant à examiner la concurrence d'interférence entre les espèces sélectionnées de champignons marins (Millers et *al.*, 1985) sur des milieux d'agar; (Strongman et *al.*, 1986) sur le petit essai de blocs.

Un index d'antagonisme a été élaboré et les données *in vitro* ont confirmées les observations *in vivo* pour *Lulworthia spp.*, *Ceriosporopsis halima* et *Amylocarpus encephaloides*. Cette observation sur la concurrence d'interférence a été examinée sous conditions quand *Corollospora maritima* a été inoculée sur des blocs d'essai de balsa et laissée les coloniser complètement.

Ils ont été alors exposés dans la mer et les mycètes sporulant sur le bois sont déterminés à 2, 6, 9 et 15 mois. Les blocs d'essai de contrôle ont été colonisés par un certain nombre de champignons marins : *Corollospora maritima*, *Halosphaeriopsis mediosetigera* et *Ceriosporopsis halima* à 2 mois, et *Ceriosporopsis halima*, *Halosphaeria appendiculata*, *Lulworthia sp*, et *Marinospora calyptrata* à 6 mois. Cependant, *Corollospora maritima* était la seule espèce à apparaître sur *Corollospora maritima* inoculée sur blocs jusqu'à 6 mois.

Suggérant que les mycètes produisaient des métabolites affectant autres mycètes présents dans l'eau environnante (Panebianco, 1991). Ceci montre clairement comment la colonisation rapide d'un substratum par une espèce peut nettement affecter la diversité fongique.

#### **2.5.4. Répartition géographique et température**

Un autre facteur principal qui régit la diversité fongique est la répartition géographiques et la température de la mer. Booth et Kenkel (1986) suggèrent que la température de la mer est le facteur le plus important dans la répartition géographique des mycètes marins. Un effet saisissant de la température est l'apparition du basidiomycète marin *Digitatispora marina* sur des blocs d'essai de *Fagus sylvatica* dans le port de Langstone, Portsmouth, Angleterre.

Quand la température chute eu dessous de 10°C, *Digitatispora marina*, apparu sur le bois, mais quand elle atteint 10°C, et plus, les mycètes arrêtent de fructifier sur le bois (Byrne et Jones, 1974).

Hughes (1974) était le premier à publier des cartes de distribution des mycètes marins et divise les océans en zones en fonction de leurs plages de températures moyennes durant l'année. Ceci a mené à un certain nombre de cartes montrant la distribution mondiale des champignons marins (Kohlmeyer, 1983, 1984; Jones, 1993; Kohlmeyer et Volkmann-Kohlmeyer, 1993; Hyde et Lee, 1995; Jones et Alias, 1997; Whalley et al., 2000). Bien que ces cartes aident, d'un coup d'œil, à indiquer les tendances dans la répartition géographique des mycètes marins, elles sont limitées dans la mesure où de

vastes secteurs n'ont pas été échantillonnés (par exemple l'Amérique du sud, côte occidentale de l'Afrique).

Peu de mycètes marins ont été récupérés des eaux antarctiques : *Thraustochytrium antarcticum*, *Leucosporidium anatartica* et *Spathulospora antartica*. Ceci peut être attribué à la basse température de l'eau de mer et la disponibilité des substrats appropriés (Pugh et Jones, 1986). Beaucoup d'autres mycètes ont été rassemblés seulement dans les eaux tropicales (exemple : *Adomia avicenniae*, *Antenospora quadricornuata*, *Massarina acrostichi*) (Hyde, 1989a; Jones, 1993; Panebianco, 1994), alors qu'il existe un groupe tempéré caractéristique des mycètes marins (exemple : *Ceriosporopsis trullifera*, *Lindra inflata* et *Ondiniella torquata*) (Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979; Jones, 1985; Jones et al., 1998). De nombreux champignons ont également une distribution cosmopolite (exemple : *Arenariomyces trifurcatus*, *Corollospora maritima* et *Torpedospora radiata*) (Kohlmeyer, 1983).

#### 2.5.5. Effets de la salinité

La salinité et la température sont les principaux facteurs affectant la diversité de champignons marins comme cela est bien illustré par les données de Booth et de Kenkel (1986).

Les premières études physiologiques des champignons marins concentrées sur leur exigence vis-à-vis de la salinité, ont révélés que ces derniers ont des exigences pour le chlorure de sodium à des concentrations voisines à celles retrouvées dans l'eau de mer (Jones et Jennings, 1964; Meyers, 1968; Jones et al., 1971; Byrne et Jones, 1975 a,b; Jones et Harrison, 1976; Jennings, 1983, 1986). En effet, les champignons zoosporiques tels que *Althornia*, *Haliphthoros*, *Thraustochytrium* ont une exigence de sodium pour la croissance au niveau des macronutriments (Alderman et Jones, 1971). Cependant, les espèces de *Schizochytrium* ont été récemment isolées dans des habitats de mangrove avec de faibles salinités, tandis que les espèces d'*Halophytophthora* présentent une grande tolérance à la salinité en milieu naturel et sous les conditions de laboratoire (Nakagiri et al., 1996; Leano et al., 1998).

Les champignons marins supérieurs ne semblent pas avoir une teneur exigeante en sodium aux niveaux des macronutriments (Jennings, 1983, 1986). Harrison et Jones (1975) ont clairement démontré que beaucoup de champignons saprolegniales d'eau douce ne peuvent pas se reproduire à des salinités supérieures à 30‰ et suggérant que c'est la raison majeure pour laquelle ces champignons ne se développent pas en mer.

Pendant la saison sèche quand les salinités sont élevées, les mycètes marins prédominent, à l'inverse dans la saison des pluies quand les salinités sont faibles, les champignons terrestres sont dominants (Sadaba, 1996).

La salinité a un autre effet sur la production des enzymes lignocellulolytiques. Les salinités élevées réduisent généralement la production des cellulases (Pointing et *al.*, 1999). La production de peroxydase a été favorisée à des salinités plus élevées, alors que l'activité de laccase était plus prononcée à des salinités inférieures (Pointing et *al.*, 1998). Ceci est un autre facteur qui peut jouer un rôle dans la détermination de la diversité des espèces dans l'environnement marin.

La force d'adaptation des champignons aux conditions salines fait que pour certains d'entre eux, la salinité peut devenir un facteur limitant, avec un ralentissement de la croissance lorsque la concentration en sel diminue. De plus, certains champignons ont montré une complète inhibition de leur développement sur des milieux appauvris en eaux salées.

L'isolement de champignons dans des échantillons d'eau de surface de la mer Morte (Buchalo et *al.*, 1998; Kis-Papo et *al.*, 2003) et d'eau salée de marais salants de la côte nord adriatique (Gunde-Cimerman et *al.*, 2001; Butinar et *al.*, 2005) montre l'importante capacité d'adaptation de ces microorganismes aux conditions salines extrêmes.

#### **2.5.6. Pression hydrostatique**

La pression hydrostatique pourrait être un paramètre important pour contrôler la croissance des champignons marins. Ces dernières années, différentes études ont été menées pour explorer la diversité des microeucaryotes et plus particulièrement la diversité fongique au sein d'environnements extrêmes. Peu de données sont

disponibles concernant les communautés fongiques des sédiments marins. On a longtemps considéré que cet environnement n'abritait pas d'activité microbienne significative du fait de la pression qui y règne (pression hydrostatique et lithostatique), du gradient de température, de l'absence de photosynthèse et de la diminution de la porosité avec la profondeur. Aujourd'hui, il est établi que les sédiments marins profonds abritent des microorganismes viables. Des champignons non sporulant et des champignons de l'espèce *Aspergillus* ont été isolés de sédiments prélevés dans le bassin central indien jusqu'à une profondeur de 50 cm (Damare et al., 2006). Des signatures moléculaires de *Phoma*, *Lodderomyces*, *Malassezia*, *Cryptococcus*, *Cylindrocarpon*, *Hortaea*, *Pichia*, *Aspergillus* et *Candida* ont été détectées dans des sédiments peu profonds et riches en hydrate de méthane, dans le sud de la mer de Chine (Li et al., 2007).

Raghukumar et Raghukumar (1998) ont prouvé que deux champignons filamenteux (*Aspergillus ustus* et *Graphium sp*), isolés à partir des coquilles calcaires récupérées à des profondeurs de 860 m et de 965 m, pouvaient germer, se développer et sporuler à une pression de 100 bar. La présence des champignons dans les sédiments marins à une profondeur de 5000 m a été signalée (Raghukumar et al., 2004; Damare et al., 2006; Damare et Raghukumar, 2008). Lorenze et Molitoris (1997) ont démontré que trois levures marines pourraient supporter les pressions rencontrées dans la mer profonde : deux tolèrent des pressions de 20 Mpa alors que la troisième a toléré 40 Mps, qui est équivalente à celle d'une profondeur de 4000 m.

## **2.6 Applications biotechnologiques**

Les champignons sont des sources importantes de métabolites actifs et de nouvelles structures chimiques, qui peuvent être utilisés en pharmacologie ou dans les processus industriels (Imhoff et al., 2011). Et les champignons marins en particulier sont d'un grand intérêt puisqu'ils ont le potentiel d'apporter une nouvelle diversité biosynthétique (Bugni et Ireland, 2004). Il a également été montré que certains champignons pourraient être utilisés en bioremediation pour leur activité enzymatique liée à la dégradation de la lignine (Hyde et al., 1998; Raghukumar, 2000). Des études sont

consacrées sur leur capacité à casser les hydrocarbures, ce qui pourrait être exploité pour dégrader les nappes de pétroles d'origine accidentelle (Jones, 2011).

L'utilisation pharmaceutique des espèces *Penicillium notatum* et *Penicillium chrysogenum* en particulier dans la production d'antibiotiques, de céphalosporine par *Cephalosporium acremonium*. Environ 22% des antibiotiques identifiés sont produits par les champignons filamenteux (Strohl, 1997). Il est à noter que la production de biomasse de *P. chrysogenum* sert aussi d'engrais ou d'aliment pour le bétail.

De nombreuses espèces des *Penicillium* sont utilisées au niveau industriel pour la fabrication de fromages et salaisons ou pour la production des différents métabolites d'intérêt : *Penicillium camembertii* est utilisé dans la fromagerie pour la fabrication des fromages à pâte molle et croûte fleurie; *Penicillium roquefortii* pour l'affinage des fromages à pâte persillée; *Penicillium nalgiovense* pour l'amélioration des qualités organoleptiques des saucissons; *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium griseofulvum*, *Penicillium notatum*, *Penicillium jensenii* (*P. nalgiovense*), sont utilisés pour l'obtention de différentes substances antibiotiques (Botton et al., 1990).

Certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la fermentation de divers substrats et la production d'enzymes ou d'acides organiques : *Aspergillus awamori*, agent lipolytique d'oléagineux, est utilisé fréquemment au Japon pour la fermentation alcoolique. *Aspergillus niger* est utilisé dans les processus biotechnologiques pour la synthèse de différents acides comme l'acide citrique et l'acide gluconique ainsi que pour la production d'enzymes : alpha-amylase, beta-glucanase, catalase, glucose oxydase, lipase, pectinase, polygalacturonase. *Aspergillus oryzae* est utilisé, dans les pays asiatiques, pour la fabrication de produits fermentés à base de soja. Il est utilisé aussi dans des processus biotechnologiques pour la production de certaines enzymes comme: alpha-amylase, beta-glucanase, lipase (Botton et al., 1990).

La technologie du champignon de la pourriture blanche est une technique de traitement utilisant des enzymes extracellulaires pour dégrader certains contaminants organiques.

Les enzymes en question, les ligninases ou les peroxydases sont produites par le champignon de la pourriture blanche (*Phanerochaete chrysosporium*) sous certaines conditions, notamment en milieu aéré (Turgeon et *al.*, 2008).

Le champignon de la pourriture blanche dégrade sans discrimination tous les éléments chimiques de mélanges complexes. Dans certains cas, ceci est dû à la non-spécificité de l'enzyme sécrété; dans d'autres cas, ce sont les différents mécanismes que le champignon utilise pour dégrader les éléments chimiques qui jouent un rôle important (Aust et Benson, 1998).

Les champignons ont également montré une grande affinité pour les ions métalliques, par rapport à d'autres microbes. Ceux-ci peuvent accumuler des métaux au moyen de mécanismes biologiques et physico-chimiques à partir de leur environnement externe (Cabuk et *al.*, 2004, Preetha et *al.*, 2005).

*CHAPITRE 1 :*

*PRESENTATION DES HYDROCARBURES*

---

## 1. Généralités

Les pétroles bruts sont constitués de différentes familles des composés dont la composition chimique varie énormément selon leur origine géographique et géologique (Tissot et Welte, 1984). Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts (Figure 3).

Les hydrocarbures sont des molécules composées uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène. On distingue trois séries distinctes d'hydrocarbures : la série aliphatique, la série alicyclique et la série aromatique (Arnaud, 1983). Les composés aliphatiques sont des chaînes linéaires d'atomes de carbones et d'hydrogènes. De manière générale, ces composés sont « relativement biodégradables et peu toxiques. Ils peuvent former jusqu'à 40 % d'un pétrole brut » (Sempels, 2008). Les hydrocarbures alicycliques peuvent également être saturés ou posséder une ou plusieurs doubles liaisons, on parle alors respectivement de cyclanes et de cyclènes (Arnaud, 1983). Enfin, la série aromatique ne comprend que des hydrocarbures insaturés. Elle rassemble tous les composés renfermant un ou plusieurs noyaux aromatiques. Ils constituent généralement entre 2 et 4 % d'un pétrole brut. Les hydrocarbures aromatiques contenant plusieurs noyaux aromatiques accolés sont appelés hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Gasperi, 2006).

Les produits pétroliers sont aussi introduits dans l'environnement marin sous forme de produits raffinés : carburants et huiles, leurs compositions dépendent de l'origine du pétrole et des opérations subies au cours du raffinage. On dénombre environ 230 composants pour l'essence et de l'ordre de 2000 pour un fuel lourd.



**Figure 3** : Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le pétrole brut (Soltani, 2004).

## 1.1. Structure des HAP

Les HAP sont des composés organiques aromatiques hydrophobes fréquemment retrouvés dans l'environnement. Ce sont des sous-produits issus de la combustion incomplète de la matière organique (Samanta *et al.*, 2002). Les HAP sont constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène formant au moins deux anneaux aromatiques condensés (Menzie *et al.*, 1992; Li et Chen, 2002). On compte quelques centaines de ces composés dans l'environnement (Srogi, 2007).

Les HAP se distinguent en deux grandes classes soit les HAP de faible poids moléculaires (HAP FPM) et les HAP de haut poids moléculaires (HAP HPM). Les HAP FPM comptent 2 à 3 cycles benzéniques fusionnés tandis que les HAP HPM comptent plus de 3 cycles benzéniques (Lafortune, 2007).

## 1.2. Origines et sources des HAP

Les HAP sont émis dans l'environnement par trois processus : la diagenèse, la combustion et la pyrolyse de matières carbonées ou par biogenèse. Ces processus sont généralement regroupés en deux sources principales : les sources naturelles et les sources anthropiques. Les sources naturelles se répartissent entre les combustions (essentiellement les feux de forêts sources de pyrène et de fluoranthène, et les éruptions volcaniques) et la formation géologique des combustibles fossiles tels que le pétrole et le charbon (processus de diagenèse) (Blumer, 1976; Burgess *et al.*, 2003; Wilcke, 2007). Dans la plupart des cas, la fraction des HAP à 3 cycles constitue au moins 90% des hydrocarbures aromatiques formés (Blumer, 1976; Wilcke, 2007). Plusieurs travaux ont aussi mis en évidence l'origine biogène de certains HAP tels que le naphthalène (Chen *et al.*, 1998; Daisy *et al.*, 2002; Wolfgang, 2000; Wolfgang *et al.*, 2003), le phénanthrène (Sims et Overcash, 1983; Wilcke *et al.*, 2000; Wilcke *et al.*, 2004), et le pérylène, produit de la dégradation naturelle de la chlorophylle (Guggenberger *et al.*, 1996; Wilcke *et al.*, 2000; Wilcke *et al.*, 2002). Il s'agit dans tous les cas de sources de contaminations mineures et diffuses (Wilcke, 2007).

Ces composés sont introduits dans le milieu marin soit lors de déversements pétroliers dus à l'activité humaine (naufages, dégazages, activité des plates-formes pétrolières), soit par des fuites de réservoirs naturels à travers l'écorce terrestre (GESAMP, 1993; U.S. National Academy of Sciences, 2003).

### **1.3. Propriétés physico-chimiques**

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 Harayamas, 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 du HAP. En fait, la stabilité moléculaire et l'hydrophobicité sont les deux plus importants facteurs qui contribuent à la persistance des HAP, principalement des HAP HPM, dans l'environnement.

Tout comme les hydrocarbures en général, les HAP sont très peu solubles dans l'eau et tendent à s'accumuler principalement dans les sédiments et les tissus graisseux (Srogi, 2007). Les HAP sont des composés hydrophobes et leur persistance dans les différents écosystèmes est due en très grande partie à leur faible solubilité dans l'eau (Cerniglia, 1992). le tableau permet d'observer à quel point la solubilité dans l'eau diminue lorsque le nombre de cycles benzéniques augmente chez différents HAP. Les HAP ont aussi tendance à s'adsorber à la matière organique des sédiments ce qui leur permet de persister longtemps dans l'environnement jusqu'à temps d'être dégradés, resuspendus, bioaccumulés, etc. (Cerniglia, 1992). En fait, ceci a l'avantage de limiter le déplacement des HAP, mais réduit du même coup considérablement leur biodégradabilité (Guiyesse et Viklund, 2005). Les HAP sont aussi des composés lipophiles, c'est-à-dire qu'ils peuvent s'accumuler dans les graisses. Il peut donc avoir un danger de bioaccumulation tout au long de la chaîne alimentaire. La lipophilie, la persistance dans l'environnement ainsi que la génotoxicité augmentent toutes lorsque le nombre de cycles benzéniques augmente chez les HAP. Il est donc très important de pouvoir dégrader les HAP HPM dans l'environnement.

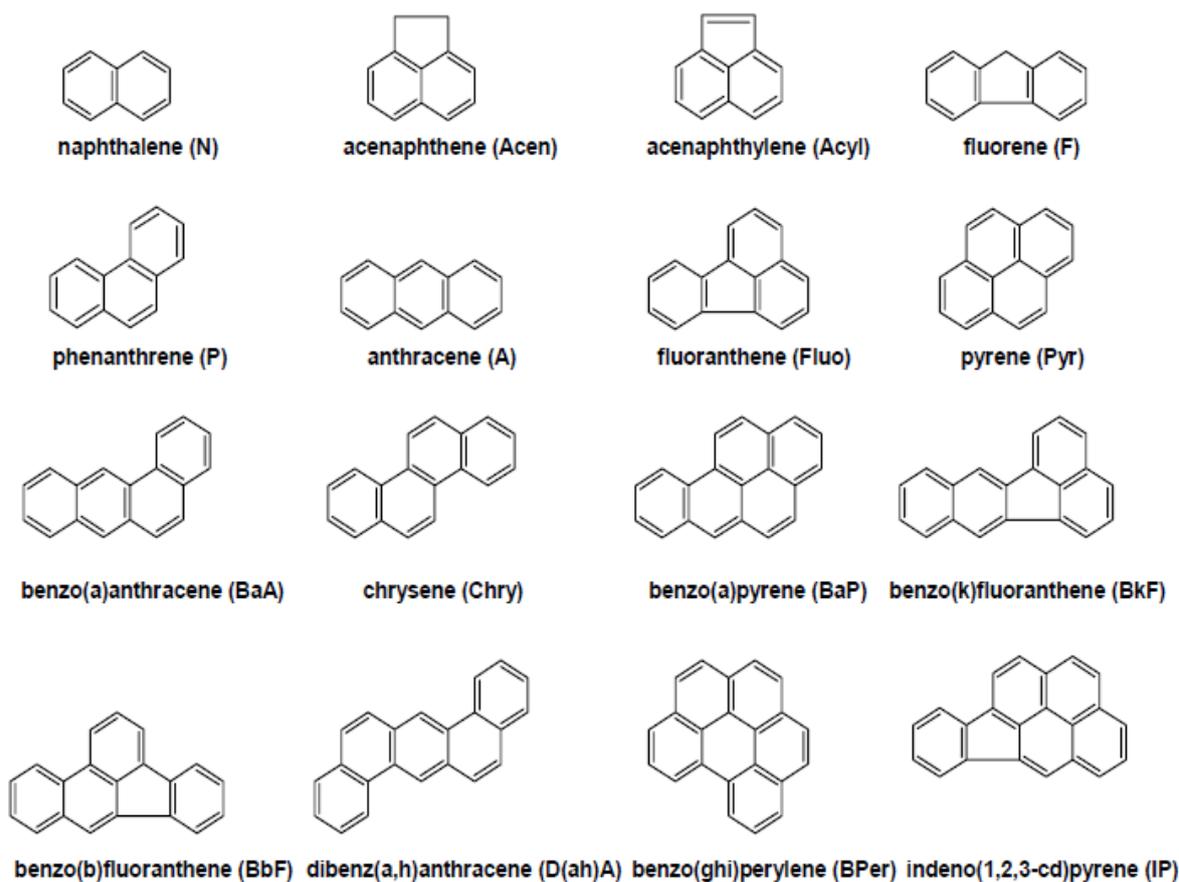
**Tableau 1** : Solubilité, poids moléculaire et nombre de cycles benzéniques de quelques HAP (adapté de Cerniglia, 1992; et Juhasz et Naidu, 2000; Daugulis et McCracken, 2003).

HAP	Nombre de cycles benzéniques	Poids moléculaire (g/mole)	Solubilité aqueuse à 25 C (mg/l)
Naphtalène	2	128.2	31.700
Phénanthrène	3	178.2	1.300
Pyrène	4	202.3	0.140
Chrysène	4	228.3	0.002
Benzo(a)pyrène	5	252.3	0.003

#### 1.4. Potentiel toxique

Tous les hydrocarbures ne sont pas toxiques, cependant, de nombreux auteurs s'accordent pour dire que 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). 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 (Gasperi, 2006).

Devant l'impossibilité de mesurer l'ensemble des molécules (il existe plus de 600 composés), l'Agence pour la Protection de l'Environnement Américaine (US-EPA) a incorporé 16 HAP à une liste de polluants prioritaires (Figure 4).



**Figure 4 :** 16 HAP de la liste prioritaire de l'US-EPA et abréviations communément utilisées.

Cependant, à ce jour, très peu d'études ont porté sur la bioremediation des HAP autres que ceux listés par l'USEPA, ces derniers demeurant les plus abondants dans l'environnement (Ma et *al.*, 2010b).

Les aromatiques, tels le benzène, le toluène, l'éthylbenzène, le xylène (BTEX) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont les composés les plus toxiques et cancérigènes pour l'environnement aquatique (Id, 2008). Heureusement, ces composés sont très volatils. Ils sont donc rapidement évaporés lors d'un déversement (Lougheed et *al.*, 2002). Quoique les produits pétroliers ne soient que faiblement solubles dans l'eau, les composés les plus volatils sont également les plus solubles. « La concentration en hydrocarbures dissous contribue de façon importante au niveau de toxicité d'un déversement » (Sempels, 2008). Leur seuil de toxicité aigüe chez

plusieurs organismes marins côtiers peut être atteint à des concentrations se situant entre 10 et 100 parties par millions (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 (Sempels, 2008 et Lougheed et *al.*, 2002). Lorsque des côtes marines sont affectées par un déversement pétrolier, il est possible d'y mesurer des concentrations en hydrocarbures pétroliers dissous se situant entre 100 et 1000 parties par milliard (ppb), lesquelles sont « les concentrations les plus élevées, la plupart du temps, retrouvées près de la surface » (Sempels, 2008).

La toxicité des hydrocarbures aliphatiques est moins importante que celle des HAP. La présence de forte concentration d'hydrocarbures à la surface d'un milieu aquatique peut, par engluement, causer une perte d'isolation thermique et de flottabilité chez les mammifères et les oiseaux, ainsi qu'affecter le plancton, les algues et la faune microscopique (Jauzein et *al.*, 1995).

## **2. Comportement des HAP dans le milieu marin**

Du fait de leurs propriétés physico-chimiques, les HAP introduits dans le milieu marin ont tendance à s'associer à la matière organique dissoute ou à s'adsorber sur la matière en suspension présente dans l'eau (Knezovich et *al.*, 1987; Landrum et Robbins, 1990) et à sédimenter.

Ils peuvent également se concentrer dans le film hydrophobe présent à la surface de l'eau (Cincinelli et *al.*, 2001). Lors de leur sédimentation, les HAP peuvent également être photo-oxydés dans la zone photique (Zepp et Schlotzhauer, 1979; Mill et *al.*, 1981) ou bien être biodégradés par des bactéries (Ravelet et *al.*, 2000; Yuste et *al.*, 2000; Grishchenkov et *al.*, 2000). La sédimentation aboutit à l'incorporation des HAP dans les sédiments qui constituent un compartiment de stockage important des contaminants hydrophobes (James et Kleinow, 1994). En 1997, une étude de Lipiatou et *al.* concernant la zone ouest de la Méditerranée a estimé que 50 % des HAP

introduits dans cette zone finissent incorporés dans les sédiments côtiers (0-200m de profondeur) et près de 13% dans les sédiments compris entre 1000 et 2000m de profondeur.

Des phénomènes de biodégradation peuvent également avoir lieu dans les sédiments et affectent particulièrement les HAP de faible poids moléculaire (Venosa et *al.*, 1996; Sugiura et *al.*, 1997). Les HAP peuvent également être libérés dans la colonne d'eau par des phénomènes de remise en suspension dus aux courants marins ainsi que par la bioturbation (McElroy et *al.*, 1990).

Deux types d'émulsions peuvent se former : eau-dans-huile appelée "mousse 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, alors que les émulsions huile dans- eau facilitent l'élimination des hydrocarbures (Soltani, 2004).

Au cours de ces cycles géochimiques, les HAP peuvent être ingérés par les organismes marins. La disponibilité des HAP pour ces organismes dépend de leur état dans le milieu. Ainsi, les HAP dissous sont plus biodisponibles que les HAP adsorbés (Neff, 1985). Du fait de leur hydrophobicité et de leur poids moléculaire relativement faible, une fois absorbés, les HAP peuvent être transférés et piégés dans les organes riches en lipides des organismes par diffusion passive à travers les membranes. On parle alors de bioaccumulation.

La biodisponibilité des HAP varie également en fonction du mode de vie de l'organisme. Ainsi, les organismes vivant dans la zone intertidale sont en général davantage exposés aux HAP que ceux de l'océan profond. Le comportement migratoire, le régime alimentaire et la localisation dans la colonne d'eau des espèces gouvernent aussi leur exposition. Des organismes fixés, dit « filtreurs », c'est-à-dire qui se nourrissent en filtrant l'eau, comme les moules, accumulent les contaminants hydrophobes dans leurs tissus (Meador, 2003). Des poissons vivant en contact avec les sédiments comme les poissons plats ou ceux se nourrissant d'organismes benthiques sont ainsi particulièrement exposés aux HAP de haut poids moléculaire.

Chez les organismes invertébrés, les HAP peuvent être accumulés dans les tissus puis transférés au maillon supérieur du réseau trophique (Rice et *al.*, 2000). Cependant, les vertébrés marins n'accumulent que faiblement les HAP, empêchant la bioamplification de ces composés aux niveaux supérieurs de la chaîne alimentaire (Meador, 2003).

### **3. Pénétration des hydrocarbures dans la chaîne alimentaire**

Les produits pétroliers rejetés dans l'environnement ont des répercussions sur les plantes, animaux et êtres humains. Les conséquences de la contamination dépendent des organismes eux-mêmes et de la structure chimique des hydrocarbures. Certaines espèces éprouvent des changements de comportement à peine perceptibles ou des problèmes de santé à court terme. Certaines d'entre elles éprouvent des effets toxiques instantanés et aigus parfois mortels, tandis que chez d'autres espèces, les répercussions se manifestent lentement à long terme (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, communiqué de presse, 6 Janvier 2000). Face à ces polluants, les organismes susceptibles d'être contaminés doivent être considérés en fonction de leur capacité de réponse spécifique.

Les bactéries, nourriture de nombreuses espèces aquatiques, peuvent être des vecteurs de contamination par lesquels les hydrocarbures peuvent entrer dans la chaîne alimentaire (Bertrand et Mille, 1989).

Les connaissances les plus nombreuses portent sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dont la toxicité la plus souvent rapportée correspond à leur potentiel carcinogène.

### **4. Microorganismes dégradant les hydrocarbures**

Plusieurs microorganismes peuvent dégrader partiellement ou complètement les HAP. Ce sont principalement des bactéries qui participent à cette dégradation, par contre certains champignons et algues ont aussi démontré qu'ils pouvaient dégrader ces composés.

## 4.1. Bactéries

Plusieurs bactéries, appartenant à différents genres, peuvent utiliser les HAP comme source de carbone et d'énergie. Les genres bactériens les plus souvent rencontrés dans la littérature sont *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia* et *Flavobacterium* (Cerniglia, 1992; Juhasz et Naidu, 2000). Les bactéries sont capables de minéraliser certains HAP, de les dégrader en produits moins toxiques ou les dégrader par cométabolisme. La minéralisation consiste en la dégradation complète du composé en CO<sub>2</sub> et en H<sub>2</sub>O. Le cométabolisme quant à lui est un phénomène par lequel un composé est dégradé de façon fortuite sans servir de source de carbone et d'énergie pour le microorganisme. Plusieurs études ont démontré la capacité de nombreux microorganismes à dégrader les HAP FPM et les HAP HPM.

## 4.2. Les champignons

Les champignons peuvent transformer les HAP de façon cométabolique en métabolites moins toxiques par l'action de peroxydases et de monooxygénases. Un des champignons les plus étudiés pour ses capacités de dégradation est *Phanerochaete chrysosporium* (Boonchan et al., 2000). Ce basidiomycète de type pourriture blanche a la capacité de dégrader une grande variété de polluants persistants dans l'environnement comme les HAP, les biphényles polychlorés ou les pesticides. Cette capacité de dégradation serait reliée au système d'enzymes ligninolytiques extracellulaires sécrétées dans l'environnement (Kanaly et Hur, 2006). Les champignons dégradant les HAP qui sont les plus fréquemment retrouvés dans la littérature appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Trametes*, *Fusarium*, *Sacharomyces* et *Bjerkandera*.

L'utilisation de champignons d'origine marine dans la bioremédiation des milieux salins pollués est facilitée par leur tolérance à la salinité.

### **4.3. Algues**

Quelques recherches ont aussi démontré la dégradation de certains HAP par des algues. En effet, *Selenastrum capricornutum*, une algue verte, peut dégrader le fluoranthène (FLA), le pyrène (PYR) (Lei et al., 2007) et le benzo(a) pyrène (Cerniglia, 1992; Warshawsky et al., 1995; Juhasz et Naidu, 2000; Lei et al., 2007). La dégradation du BAP par cette algue a mené à la formation de dihydrodiols par la voie enzymatique d'une dioxygénase (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).

### **5. Voie de dégradation des HAP chez les champignons**

Chez les champignons, l'attaque initiale du cycle aromatique se fait de façon différente si l'on compare aux bactéries. Chez les champignons non-ligninololytiques, ils ont la capacité d'oxyder les HAP. Par exemple, chez *Cunninghamella elegans*, on retrouve une enzyme de type cytochrome p-450 monooxygénase qui est utilisé pour incorporer un atome d'oxygène dans le cycle aromatique. Cette oxydation mène à la formation d'un oxyde d'arène. Ce composé peut être par la suite transformé par une époxyde hydrolase pour générer un trans-dihydrodiol. L'oxyde d'arène peut aussi être réarrangé de façon non enzymatique et former du phénol (Cerniglia, 1992). D'autres recherches se sont portées sur les champignons de la pourriture blanche qui ont eux aussi démontré une capacité à dégrader les HAP. Ces champignons produisent plutôt des enzymes extracellulaires comme la lignine peroxydase qui, en plus de dégrader les composés ligneux, peut catalyser l'oxydation des HAP en quinones (Cerniglia, 1992).

### **6. Facteurs physiques et chimiques affectant la biodégradation des hydrocarbures**

La biodégradation des hydrocarbures est l'un des premiers mécanismes conduisant à la transformation de ces polluants en produits moins toxiques. Les travaux de recherche sur l'oxydation des hydrocarbures par les microorganismes ont montré que ce processus dépend de la structure chimique des hydrocarbures et des conditions environnementales. Les facteurs physico-chimiques influant sur la vitesse de

biodégradation microbienne sont: la température, l'oxygène disponible, le pH, la salinité, les éléments nutritifs, l'osmose et la pression hydrostatique (Atlas, 1981; Leahy et Colwell, 1990) (Tableau 2).

**Tableau 2 :** Récapitulatif des paramètres influençant la biodégradation des HAP (Ferrai et Planque, 2003).

<b>Facteurs de biodégradation</b>	<b>Bilan des données recensées</b>
<b>Le pH</b>	7-7,8
<b>Le contenu en nutriments</b>	C/N/P=120/10/1
<b>Le contenu en oxygène</b>	Pour la voie aérobie
<b>La température</b>	20-30°C
<b>Le taux d'humidité</b>	20-90°C
<b>La présence d'accepteurs d'électrons</b>	Nitrate, fer, sulfate, CH <sub>4</sub> , pour la voie anaérobie
<b>La biodisponibilité des HAP</b>	Taux MO faibles
<b>L'âge de la pollution</b>	Pollution récente (< à 50 ans)

### 6.1. 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 cycloalcanes (naphtènes). Les alcanes normaux ou à chaînes linéaires sont les plus abondants (10 à 40 % des hydrocarbures totaux dans le cas du pétrole léger et peuvent atteindre dans certains cas 60 %) 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*-alcanes 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.*, 1994, 1995). Les expériences montrent de façon non équivoque que la biodégradation des cycloalkanes 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 (Perry, 1979; Bertrand et *al.*, 1983; Rontani et *al.*, 1985; Leahy et Colwell, 1990).

Les hydrocarbures aromatiques constituent généralement 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier (Bertrand et Miller, 1989). Des études sur la transformation de ces hydrocarbures par les microorganismes ont montré leur toxicité cellulaire (Sikkema et *al.*, 1995). Les hydrocarbures aromatiques de faible poids moléculaires constituent généralement 2 à 20 % des hydrocarbures des pétroles légers et moins de 2 % des hydrocarbures des pétroles lourds (Congress of the United States, Office of Technology Assessment, 1991), tels que les alkyl-benzènes 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 substituants méthyle empêche l'oxydation initiale (Cooney et Summers, 1976; Atlas et *al.*, 1981). Les polyaromatiques 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. Ces hydrocarbures aromatiques lourds constituent 2 à 10 % des hydrocarbures des pétroles légers et plus de 35 % des hydrocarbures des pétroles lourds.

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. Cette dernière classe de composés pétroliers n'est pas biodégradable ou très lentement dégradable.

La biodégradabilité des pétroles bruts est très fortement dépendante de leur composition (Atlas, 1975); à une température déterminée, un pétrole léger est plus susceptible d'être biodégradé qu'un pétrole lourd.

Par exemple, un brut à très faible teneur en soufre et très riche en composés saturés sera facilement biodégradé, contrairement à un fuel de type "Bunker C", à très haute teneur en soufre et composés aromatiques. Nous signalons également que les *n*-alcane contenus dans un pétrole provenant du Venezuela sont moins bien dégradés que ceux présents dans un pétrole de type "Léger d'Arabie", par suite de la présence de produits à plus longue chaîne.

Ratledge (1978) a rassemblé des règles qui ont une application générale à l'ensemble des micro-organismes:

- 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*-alcane à chaînes courtes, tel que le *n*-nonane ne sont pas toujours assimilés, mais peuvent être oxydés. Seules quelques bactéries ont la capacité de croître sur des alcane 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.

## 6.2. Etat physique et concentration des hydrocarbures ou du pétrole

Les hydrocarbures tendent à se dissiper dans l'eau formant ainsi des marées noires. Sous l'action du vent et des vagues, le pétrole dans l'eau et l'eau dans le pétrole peuvent former des émulsions, ce qui augmente la surface du pétrole et par conséquent favorise l'attaque microbienne. Par contre les grandes masses ou les nappes de mousse pétrolière de viscosité très importante et qui ont un rapport surface/volume faible inhibent la croissance.

La formation d'émulsions par la production et la sécrétion de biosurfactants est un processus très important dans l'assimilation des hydrocarbures par les bactéries (Broderick et Cooney, 1982; Pines et Gutnick, 1986; Kaplan et *al.*, 1987; Goswani et Singh, 1991; Zhang et Miller, 1992; Hommel, 1994).

La dispersion artificielle a été étudiée comme moyen d'augmentation de la surface de contact entre les hydrocarbures et les membranes cellulaires des microorganismes, cependant, les dispersants sont dans la plupart du temps toxiques et peuvent conduire à des dommages dans la faune et la flore, et ils peuvent aussi inhiber le processus microbien (Leahy et Colwell, 1990).

Les hydrocarbures à faibles poids moléculaires sont considérés comme des composés toxiques pour les microorganismes à cause de leur grande solubilité et par conséquent leur concentration très élevée dans les phases aqueuses. Ratledge (1978) rapporte que les *n*-alcane de courtes chaînes (< C9) sont très toxiques pour les microorganismes alors que ceux plus longs que le *n*-nonane, les alcènes > C12, les alkyle-bromides > C10, et les alcanols > C14 ne sont toxiques pour aucun microorganisme. Broderick et Cooney (1982), ont montré que la dégradation des *n*-alcane longs ( $\geq$  C12), pour lesquels les solubilités sont inférieures à 0,01 mg/l s'effectue à des vitesses qui dépassent les vitesses de dissolution des hydrocarbures et sont fonction de la surface des hydrocarbures disponibles pour l'émulsification et leur fixation par les cellules.

### **6.3. Influence de la température**

La température est un paramètre pouvant influencer la biodégradation du pétrole en modifiant son état physique, sa composition chimique, l'activité physiologique des microorganismes et par conséquent la vitesse de dégradation des hydrocarbures, ainsi que la nature et la concentration des espèces microbiennes présentes (Atlas, 1981; Leahy et Colwell, 1990).

A basse température, la viscosité du pétrole augmente, la volatilisation des composés toxiques pour les microorganismes tels que les alcanes de faibles poids moléculaires est réduite et leur solubilité dans l'eau augmente par diminution de leur volatilisation, ce qui entraîne un ralentissement du métabolisme des microorganismes (Atlas et Bartha, 1972; Atlas, 1975). Une diminution de la température est généralement 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 (Walworth et *al.*, 2001; Sandvik et *al.*, 1986; Song et *al.*, 1990). Si l'oxydation des hydrocarbures a été observée à des températures inférieures à 0 °C (Rike et *al.*, 2003), ou élevées 70-80 °C (Annweiler et *al.*, 2000), le maximum de l'activité métabolique des microorganismes est généralement observé à une température comprise entre 30 et 40 °C (Bossard et Bartha, 1984). 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. Röling 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*, *Archeaoglobus*) dans des puits de pétrole où la température peut atteindre 100°C.

### **6.4. Influence de l'oxygène**

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; Zobell (1969), a calculé que la quantité d'oxygène dissoute dans 320 m<sup>3</sup> d'eau de mer est nécessaire pour l'oxydation de 1 l de pétrole brut.

Dans un site très pollué, on aboutira fréquemment à un ralentissement de la biodégradation par suite d'une carence en oxygène. Marin et al. (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 al. (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 concentration en oxygène a été identifiée comme une variable limitante de la vitesse de la biodégradation du pétrole dans les sols (Hurst et al., 1996, El-Kadi, 2001) et les eaux souterraines (Boyd et al., 2001).

La dégradation anaérobie des hydrocarbures par les microorganismes peut se produire mais à des vitesses négligeables et son importance écologique est considérée comme de moindre importance (Soltani, 2004).

## **6.5. Influences des éléments nutritifs**

Le rejet des hydrocarbures dans les environnements aquatiques, qui contiennent des éléments nutritifs inorganiques en faibles concentrations, conduit généralement à des rapports carbone/azote et carbone/phosphore très élevés, défavorables pour la croissance microbienne (Leahy et Colwell, 1990). Le pétrole lui-même contient de tels nutriments en petites quantités, mais ils sont toujours présents sous forme de composés hétérocycliques (exemple: dérivés de la pyridine et du pyrrole pour l'azote) ou organométalliques complexes; ils ne sont donc pas utilisables par les microorganismes (Bertrand et Mille, 1989). Les sources d'azote et de phosphore sont toujours faibles, surtout pendant les périodes de forte activité des organismes photosynthétiques.

L'azote et le phosphore sont aussi des facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures dans les sols (Mohn et Stewart, 2000; Walworth et *al.*, 2001, 2003).

## **6.6. Effet de la salinité et du pH**

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). Quand la concentration en chlorure de sodium dépasse 1 M, l'élimination du pétrole brut diminue rapidement. Pour ce type de substrat, les fortes salinités constituent donc une barrière naturelle pour la biodégradation (Tagger et *al.*, 1976; Al Mallah, 1988; Bertrand et *al.*, 1990). Bertrand et *al.* (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. Ward et Brock (1978) ont montré que la vitesse de la biodégradation des hydrocarbures décroît lorsque la salinité passe de 3,3 à 28,4%, et ils ont attribué ces résultats à une réduction générale des vitesses métaboliques des microorganismes.

L'effet de la concentration en NaCl sur la biodégradation dépend de la nature du substrat utilisé comme source de carbone (Bertrand et *al.*, 1993); Fernandez et *al.* (1996) ont montré que la souche *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*, bactérie marine halotolérante dégrade l'eicosane, avec un taux de biodégradation de 90% pour des concentrations en chlorure de sodium comprises entre 0,2 et 2,5 M.

L'influence du pH a été très peu étudiée, mais il ne semble jouer qu'un rôle relativement mineur en milieu marin. Contrairement à la plupart des écosystèmes aquatiques, les sols peuvent avoir des valeurs de pH très variables, allant de 2,5 à 11. Des valeurs extrêmes de pH, ce qui est le cas pour quelques types de sols, pourraient avoir une influence négative sur la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures. La croissance des bactéries hétérotrophes et des champignons étant favorisée par un pH proche de la neutralité (Leahy et Colwell, 1990). Dibble et Bartha (1979) et Hambrick et *al.* (1980) ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des conditions légèrement basiques.

Quel qu'il soit, le pH des milieux marins n'atteint jamais des valeurs suffisamment extrêmes pour inhiber la biodégradation.

Rapport-gratuit.com   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

## 6.7. Effet de la pression

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 *al.* (1974, 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

Rapport-gratuit.com   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

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.

## **7. Les sources des hydrocarbures en milieu marin**

Les hydrocarbures pétroliers qui arrivent dans l'environnement marin peuvent avoir quatre origines majeures: les sources géochimiques, l'extraction de pétrole, le transport et la consommation. La part des sources géochimiques dues à des fuites naturelles qui apparaissent au fond des océans s'élève à 47 %. Les 53 % restant se répartissent ainsi: 38 % proviennent des rejets suite à la consommation (exemple: rejets d'industries basées à terre et des grandes agglomérations urbaines), 12 % sont dus au transport et 3 % à la production pétrolière offshore.

Il faut enfin signaler qu'une quantité non négligeable d'hydrocarbures peut provenir de l'activité de nombreux microorganismes et des plantes (Albro, 1976; Saliot, 1981; Bachofen, 1982).

Les impacts de la pollution par les hydrocarbures sont multiples. Les aspects les plus évidents sont les grandes catastrophes très médiatisées comme les marées noires: forte mortalité de la faune aquatique, bords de mer englués, Il ne faut pas négliger les conséquences économiques de ces événements pour les riverains vivant de la pêche ou du tourisme ainsi que pour les collectivités territoriales et l'état. Mais, les effets à court terme comme à très long terme sur les écosystèmes terrestres et aquatiques sont mal connus (Soltani, 2004).

## **8. Impacts des hydrocarbures en milieu marin**

Les effets des hydrocarbures sur les organismes et les écosystèmes marins sont divers. Lorsqu'ils sont déversés en grande quantité, les hydrocarbures 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 les processus de

photosynthèse (Kaiser, 2001). D'autres 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 (Warwick, 2004). Ce phénomène a aussi été observé par Gómez 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, les chercheurs ont 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).

***CHAPITRE 2 :***

***MATERIEL ET METHODES***

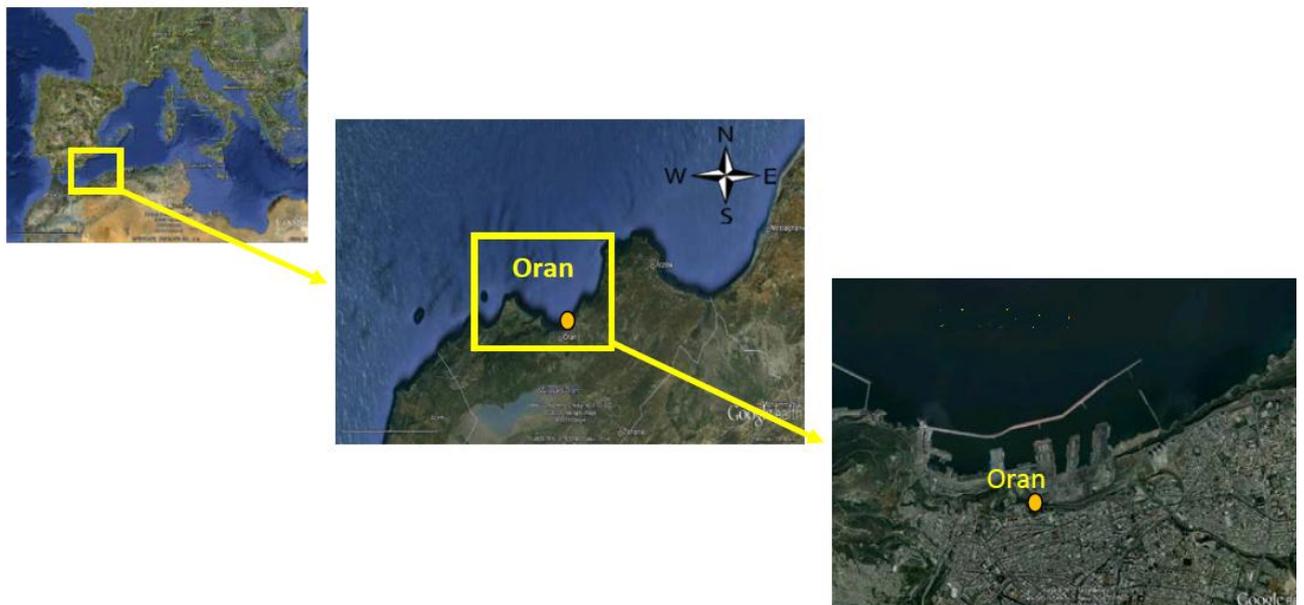
---

## 1. Matériel et méthodes

Dans le volet « Matériel et méthodes » de cette étude, nous aborderons dans un premier temps la technique suivie lors du prélèvement, les différentes méthodes utilisées pour l'isolement et l'identification des souches fongiques. Dans un second temps, les techniques ayant permis de déterminer leurs capacités dans la dégradation du pétrole brut.

### 1.1. Les prélèvements

Les prélèvements des échantillons d'eau de mer pour la recherche des champignons microscopiques, ont été effectués au niveau du port d'Oran à raison d'un échantillonnage par mois pendant une durée de six mois (décembre 2013-mai 2014) (Figure 5).



**Figure 5 :** Site d'échantillonnage (Google,2014).

## 1.2. Lieu de prélèvement

Les prélèvements des échantillons d'eau de mer ont été réalisés au niveau du port d'Oran :

### 1.2.1. Port d'Oran

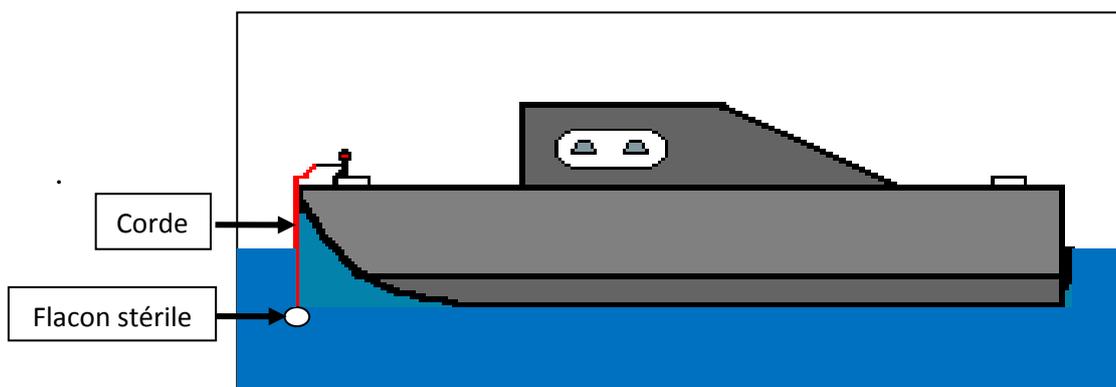
Le port d'Oran est situé au milieu d'une baie large de 28km, entourée de falaises. Il est situé au sein d'un golfe qui occupe la partie centrale du littoral oranais et qui dessine un arc plus au moins régulier depuis le cap Falcon, au nord ouest d'Ain El Turk, jusqu'à la pointe de l'Aiguille à l'est ( $00^{\circ}39'09''\text{W}35^{\circ}43'00''\text{N}$ ). Il offre un plan d'eau de 122 hectares réparties en huit bassins, c'est un port à vocation mixte industrielle, avec deux darses de pêcheurs dont le linéaire de quai est de 750m.

Le port d'Oran est un port mixte : commercial ainsi qu'un grand port de pêche. Il occupe la partie centrale de la baie d'Oran (Figure 6).



**Figure 6:** Port de pêche d'Oran.

L'échantillonnage a été effectué à une profondeur de 10-20 cm d'eau de mer d'où il ya un déversement des déchets d'hydrocarbures qui proviennent des navires pétroliers. Les prélèvements ont été effectués au moyen de flacons stériles, la méthode consiste à tenir la bouteille près de sa base, de l'introduire sous la surface de l'eau, et de retirer son bouchon afin de pouvoir la remplir d'eau, pousser doucement la bouteille dans l'eau pendant le remplissage pour éviter toute contamination de la main de la personne chargée du prélèvement. Afin d'éviter toute contamination extérieure (Moufok, 2005). Les échantillons ont été conservés à une température de 4<sup>0</sup>C jusqu'à l'utilisation.



**Figure 7 :** Petite embarcation utilisé lors de l'échantillonnage.

### **1.3. Milieu de culture utilisé**

Le milieu de culture gélosé choisi pour l'isolement est le milieu Sabouraud par addition d'eau de mer naturelle pour se rapprocher des conditions marines, non seulement en ce qui concerne la salinité, mais aussi pour l'ensemble des éléments qu'elle contient.

Le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 min et additionné de chloramphénicol à une concentration de 50 mg/l afin d'éviter la prolifération bactérienne qui pourrait inhiber ou gêner celle des champignons.

Pour l'isolement, les cultures ont été faites en boites de pétri en verre de 18 cm de diamètre, contenant 125 ml de milieu chacune.

#### **1.4. Mise en culture de l'échantillon**

Sur la surface de la gélose, l'ensemencement a été réalisé suivant la méthode du râteau en concentration décroissante d'eau de mer :

**Première boîte** : Etalement d'un volume de 1ml d'eau de mer.

**Deuxième boîte** : Etalement d'un volume de 2ml d'eau de mer.

**Troisième boîte** : Etalement d'un volume de 3ml d'eau de mer.

Les boites de pétrieensemencés sont fermés avec un ruban adhésif et mises à incuber à 27°C, la croissance de la microfonge est suivie pendant quelques jours.

#### **1.5. Isolement et purification des souches**

Au fur et à mesure de leur apparition, les colonies fongiques filamenteuses d'aspect macroscopique différent ont été isolées et repiquées sur des boites pétri (9 cm Ø) (milieu Sabouraud-Chloramphénicol).

À l'aide d'une pince 1 cm<sup>3</sup> de souches fongiques est déposées au centre de la boîte. L'incubation se fait à 27 °C, jusqu'à l'envahissement de la surface de la gélose (8 jours). Les souches pures ainsi obtenues sont identifiées.

#### **1.6. Identification**

Les champignons microscopiques présentent une grande variabilité d'ordre physiologique en fonction des conditions de culture (nature du milieu de culture utilisé et température d'incubation), mais aussi une grande variabilité génétique.

Conventionnellement, l'identification des genres fongiques repose sur l'observation de critères morphologiques : d'une part par l'observation macroscopique du mycélium (aspect, couleur et taille des colonies) et d'autre part, par une observation microscopique des structures reproductrices.

### 1.6.1. Observations macroscopiques

L'observation macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation (aspect des colonies et de leurs revers, la taille et la couleur).

### 1.6.2. Observations microscopiques

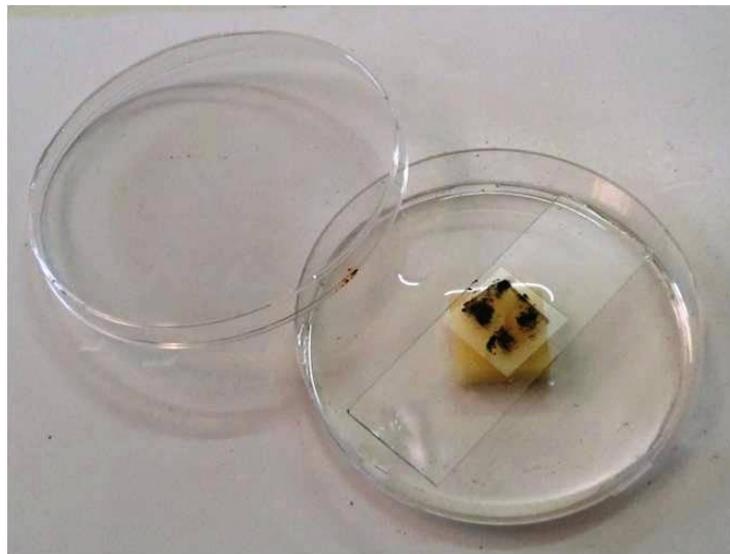
L'identification des genres a été réalisée par observation directe en pratiquant la technique du drapeau de Roth (Figure 8) qui utilise un petit morceau de papier adhésif qui, par contact avec la colonie, permet de prélever une faible quantité des spores ainsi que des filaments nécessaires à l'identification. Les colorants utilisés sont le bleu de coton et le rouge Congo qui colorent le mycélium et les parois fongiques.



**Figure 8 :** La technique du drapeau de Roth.

Afin de pouvoir examiner les organes de fructification qui sont souvent difficiles à observer nous avons réalisé également des cultures sur lame (Figure 9) qui consiste à fixer sur une lame porte objet un petit carré de gélose Sabouraud d'environ 5mm d'épaisseur qui est ensuite inoculé avec de petits fragments de la culture à examiner. L'ensemble est recouvert d'une lamelle et déposé dans une boîte de pétrie contenant un peu d'eau distillée stérile. La boîte est refermée et placée à l'étuve à 27°C.

Lorsque la culture est sporulée, la lamelle est prélevée et déposée sur une goutte de bleu coton ou du rouge Congo posée sur une lame.



**Figure 9 :** Culture sur lame pour observation des organes de fructifications.

## **1.7. Conservation des souches**

Les souches isolées doivent être conservées pour des études ultérieures. Il existe plusieurs méthodes de conservation et qui vont aider dans la construction d'une mycothèque.

### **1.7.1. Conservation à 4°C**

Ces souches sont conservées dans une chambre froide à 4 °C. Cette méthode présente un intérêt de conserver l'aspect des colonies et l'utilisation de la souche par repiquage direct, mais elle nécessite des repiquages fréquents, tous les 6 mois environ.

### **1.7.2. Conservation de longue durée sous huile de paraffine**

Lorsque la souche s'est suffisamment développée sur un culot de gélose en tube, elle est recouverte de quelques millimètres d'huile de paraffine stérile. Pour une conservation jusqu'à 5 années à température ambiante. Mais elle nécessite un repiquage préalable avant réutilisation de la souche.

### 1.7.3. Conservation dans l'eau distillée

Un fragment de colonie est prélevé sur une culture en milieu solide et immergé dans des tubes à hémolyse contenant quelques millilitres d'eau stérile. Cette méthode permet une conservation de longue durée (plusieurs années).elle nécessite un repiquage avant de réutiliser les souches.

### 1.7.4. Conservation de très longue durée en cultures congelées

La congélation à  $-24^{\circ}\text{C}$ , elle permet une conservation de longue durée, jusqu'à une dizaine d'années. Cette méthode permet, de conserver l'aspect macroscopique des colonies et de les repiquer directement.

### 1.7.5. Conservation de courte durée à température ambiante

La culture sur une gélose inclinée est laissée à température ambiante, ce qui entraîne son dessèchement 2 à 3 semaines par la suite. Les souches sont ainsi directement disponibles mais durant quelques semaines seulement.

## 7. Détermination de l'index d'émulsion $E_{24}$

L'index d'émulsion permet de vérifier la capacité des souches à émulsionner une phase hydrophobe (le pétrole brut) dans une phase hydrophile (le milieu de culture).

Le test consiste à mélanger 3 ml du milieu de culture (de fermentation) avec 3 ml de pétrole brute dans des tubes stériles. Les tubes sont agités au vortex pendant 3 min.

Après homogénéisation des deux phases, on procède au calcul de l'index d'émulsion ( $E_{24}$ ) selon la relation suivante :

$$E_{24} = (he / ht) 100$$

**he** : hauteur de l'émulsion

**ht** : hauteur totale du mélange

Les tubes sont laissés au repos pendant 24 heures à température ambiante. Puis le calcul de  $E_{24}$  est refait une deuxième fois pour vérifier la stabilité de l'émulsion (Bodour et *al.*, 2004).



## 8.1. Test préliminaire de sélection des souches fongiques

Tous les champignons purs isolés sont sélectionnés pour leur possibilité d'utiliser le pétrole brut par une évaluation visuelle de leur croissance sur un milieu sélectif.

Les isolats fongiques ont été cultivés selon Santos et *al.*, (2008) dans un milieu contenant des sels minéraux comme suit (en g / l):

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	0,05 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .....	0,05 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	0,05 g
Agar.....	15 g

Toutes ces substances sont dissoutes dans un litre d'eau de mer (pour se rapprocher des conditions marines).

Le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 min et pour inhiber toute prolifération bactérienne, 50 mg/l de chloramphénicol est incorporé à ce milieu puis complété avec 1% de pétrole brut comme seule source de carbone. Un flacon contenant le même milieu mais sans addition du pétrole brut a servi de témoin.

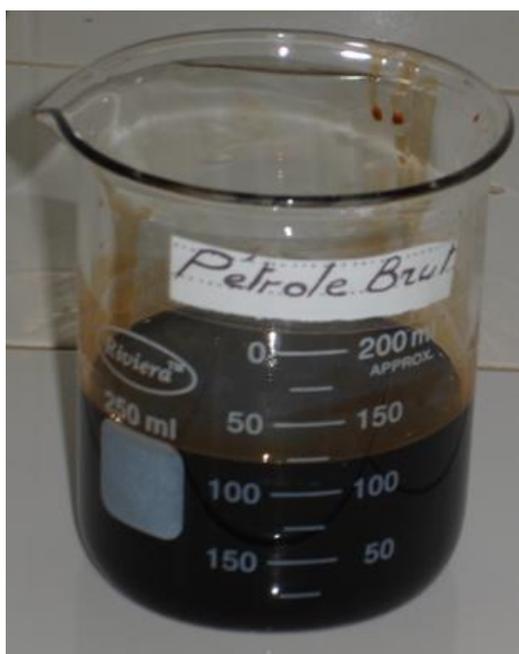


Figure 10 : Pétrole brut.

Ce milieu est ensuite coulé dans des boîtes de pétrie (9 cm de Ø) et inoculé par 1 cm<sup>3</sup> des souches fongiques déposés au centre de la boîte. Les boîtes sont placées dans un incubateur à 27°C pendant une période de 7 jours.

Les souches de champignons qui présentent une croissance visible et / ou une sporulation et un plus grand diamètre de la colonie ont été considérés comme potentiellement les meilleurs d'entre eux qui sont capables de dégrader des hydrocarbures de pétrole et de ses constituants et ont été sélectionnés pour des examens plus approfondi.

## 8.2. Bio-test ou le test biologique

Les souches fongiques sélectionnées lors du test préliminaire sont testées pour leurs capacités dans le processus de la biodégradation des hydrocarbures dans différents volumes de pétrole brut.

Le milieu de culture utilisé est un milieu sélectif qui contient seulement des sels minéraux et l'agar. Sa composition est la suivante :

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	5,7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	2 g
MgSO <sub>4</sub> .....	2 g
Agar.....	20 g
Eau de mer stérile.....	1000 ml

Les flacons contenant le milieu de culture sont stérilisés à 120°C pendant 20 min. Après refroidissement et pour inhiber toute prolifération bactérienne, 50mg/l d'antibiotique qui est le chloramphénicol est incorporé à ce milieu puis des volumes différents de pétrole brut dans chaque flacon. Les volumes ajoutés sont les suivants : 20ml, 10ml, 5ml, 1ml. Un flacon contenant le même milieu mais sans addition du pétrole brut a servi de témoin. Une agitation manuelle est effectuée.

Le milieu de culture est coulé dans des boîtes de pétri (9 cm de Ø). Trois boîtes sont utilisées pour chaque flacon et pour chaque volume ajouté. Les boîtes sont inoculées par 1 cm<sup>2</sup> des souches fongiques déposés au centre de la boîte et incubé pendant 20 jours a 27°C .

### **8.3. Dégradation du pétrole brut en milieu liquide et production de biosurfactants**

la dégradation du pétrole brut s'effectue dans un flacon de 250 ml contenant 100 ml de milieu Czapek-Dox (voir annexe) préalablement autoclavé et additionné de 1 % de pétrole brut comme seule source de carbone. Ce milieu est inoculé par 1 cm<sup>2</sup> de cultures fongiques précédemment cultivées pendant 7 jours sur milieu Sabouraud. Les expériences ont été effectuées en triple pour chacun des isolats. Les témoins ont été incubés en suivant les mêmes conditions de culture mais sans addition de pétrole brut.

L'incubation s'effectue à température ambiante dans un système à agitation pendant une période de 30 jours (Figure 11). Le contenu de chaque culture, y compris le contrôle ont été récoltés et soumis à une analyse des hydrocarbures (Husaini *et al.*, 2008).



**Figure 11** : Production de biosurfactants et dégradation du pétrole brut en milieu liquide sous agitation.

***CHAPITRE 3 :***  
***RESULTATS ET DISCUSSION***

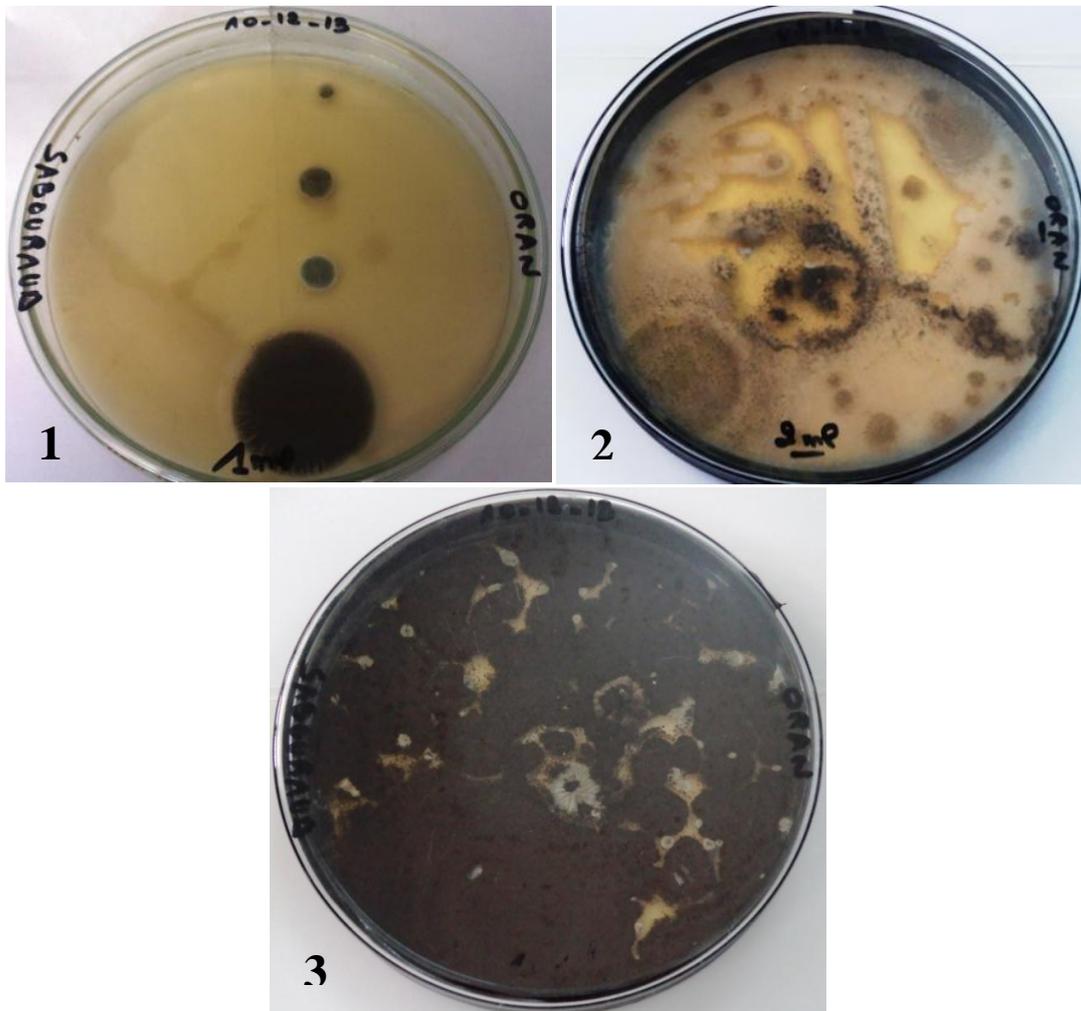
---

# I. Résultats

## 1. Isolement et identification des souches fongiques

L'isolement et l'identification des souches fongiques à partir de l'eau de mer prélevée du port d'Oran a permis de répertorier 5 genres de champignons filamenteux.

Le taux de croissance des champignons est différent dans les trois boîtes ensemencées (Figure 12). La boîte de pétri contenant 1 ml d'eau de mer présente une faible croissance des souches fongiques par rapport à la deuxième boîte qui contient 2 ml, tandis que la troisième boîte avec 3 ml d'échantillons présente le nombre le plus important des micromycètes isolés.



**Figure 12** : Culture sur gélose Sabouraud âgée de 8 jours  
boîte 1ml (1) boîte 2ml (2) boîte 3 ml (3).

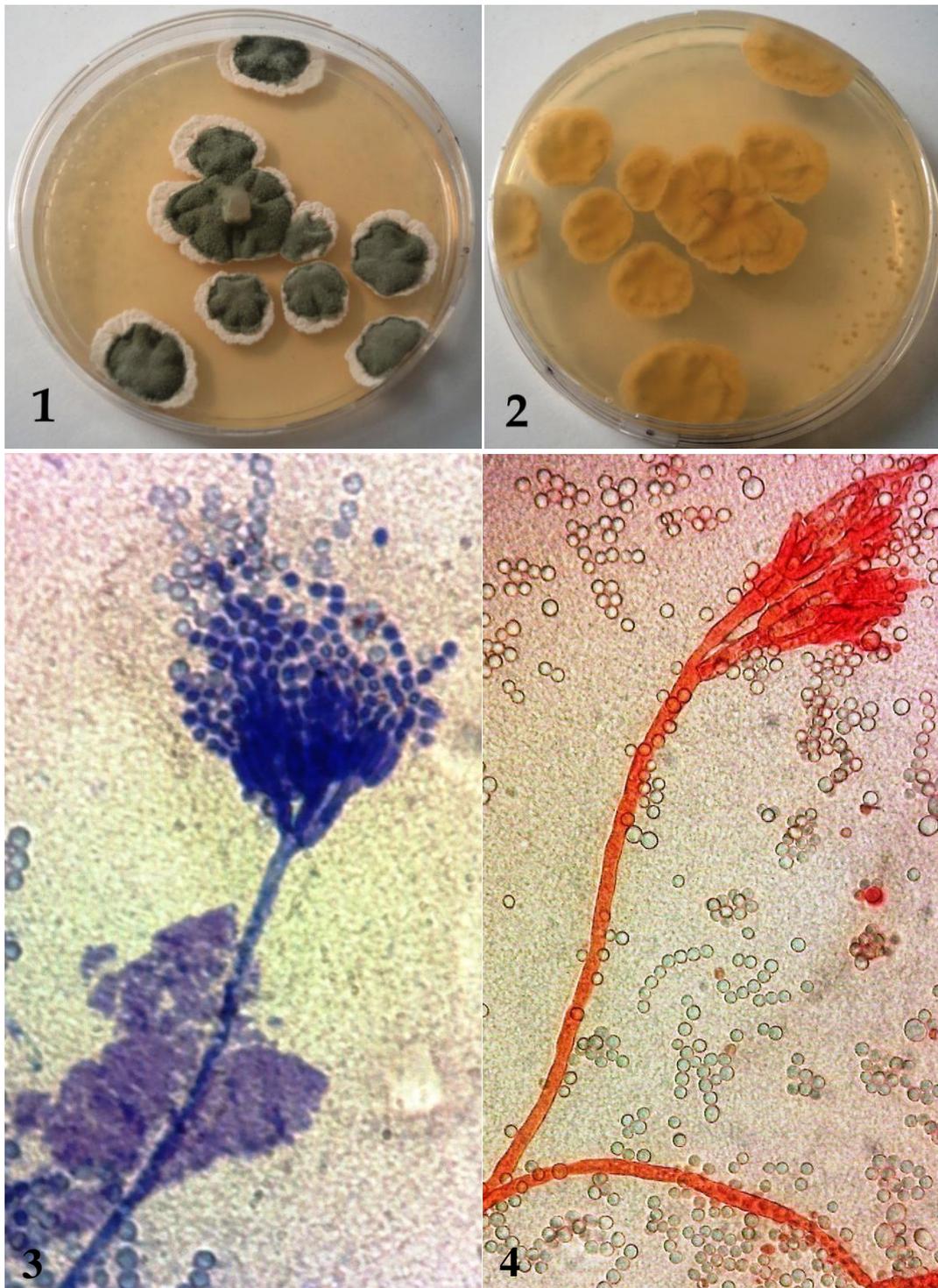
## 2. Description et illustration des différents genres et espèces isolés

### 2.1. Le genre *Penicillium*

Ce genre réunit des champignons filamenteux, appartenant au phylum des *Ascomycètes*. Ce genre comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (Pitt, 1988). Les *Penicillium* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, polyphages, pouvant être responsables de nombreuses dégradations.

Les *Penicillium* se développent rapidement et facilement sur les milieux de culture utilisés en routine (géloses au malt, Sabouraud). Ils se développent à des températures modérées de l'ordre de 20-27°C. Après 2 jours d'incubation, on observe des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens, habituellement blancs. Après 3-4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu mais aussi, pour certaines espèces, jaune, orange, chamois, rose, ou rouge. Cette couleur permet une première orientation dans l'identification d'espèces. Le revers de colonies peut être incolore, jaune, rouge, brun ou noir et parfois le pigment diffuse dans le milieu de culture (Chermette et Bussieras, 1993). Les *Penicillium* peuvent former des colonies floconneuses, funiculeuses, granuleuses, veloutées.

Au point de vue morphologique les *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau. Le thalle, formé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores lisses ou granuleux, simples ou ramifiés qui se terminent par un pénicille. Les conidiophores peuvent être isolés, groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien individualisés (Figure 13). Les conidies sont des spores unicellulaires, globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres (Botton *et al.*, 1990). Les caractères des pénicilles servent à la différenciation des groupes et des espèces. Certaines espèces peuvent présenter une reproduction sexuée avec la formation d'ascocarpes.



**Figure 13 :** *Penicillium sp.*

Culture sur gélose de Sabouraud âgée de 8 jours (1 et 2).

Observation microscopique colorée au bleu de coton GR X 1000 (3) et au rouge Congo GR X 400 (4).

## **2.2. Le genre *Aspergillus***

C'est un genre appartenant à la classe des *Ascomycètes*. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Raper et Fennell, 1965). Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Raper et Fennell, 1965 ; Botton et *al.*, 1990 ; Roquebert, 1998). Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines. Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

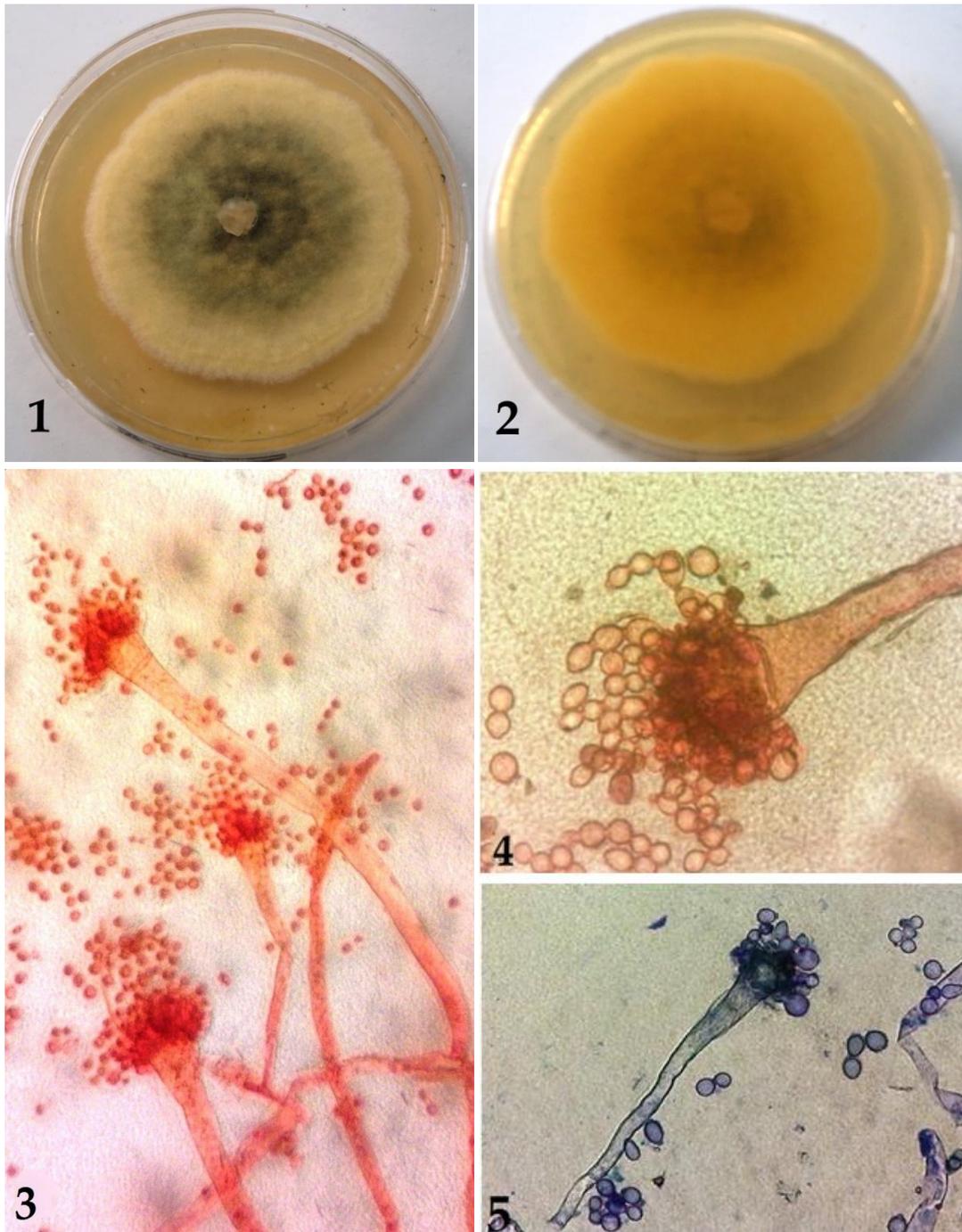
De nombreuses espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont connues pour leur capacité à produire certaines mycotoxines (Pitt, 2000). Enfin, certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes, d'acides organiques (Botton et *al.*, 1990).

### **2.2.1. *Aspergillus nidulans***

Ce champignon se distingue des autres *Aspergillus* par ses colonies duveteuses à poudreuses de couleur habituellement vert foncé ou vert cresson, jaunâtre pour les souches productrices de cléistothèces (Figure 14). Ses conidiophores courts et bruns, ses têtes en colonne bisériées et la présence de « Hülle cells » (Chabasse et *al.*, 2002).

### **2.2.2. *Aspergillus versicolor***

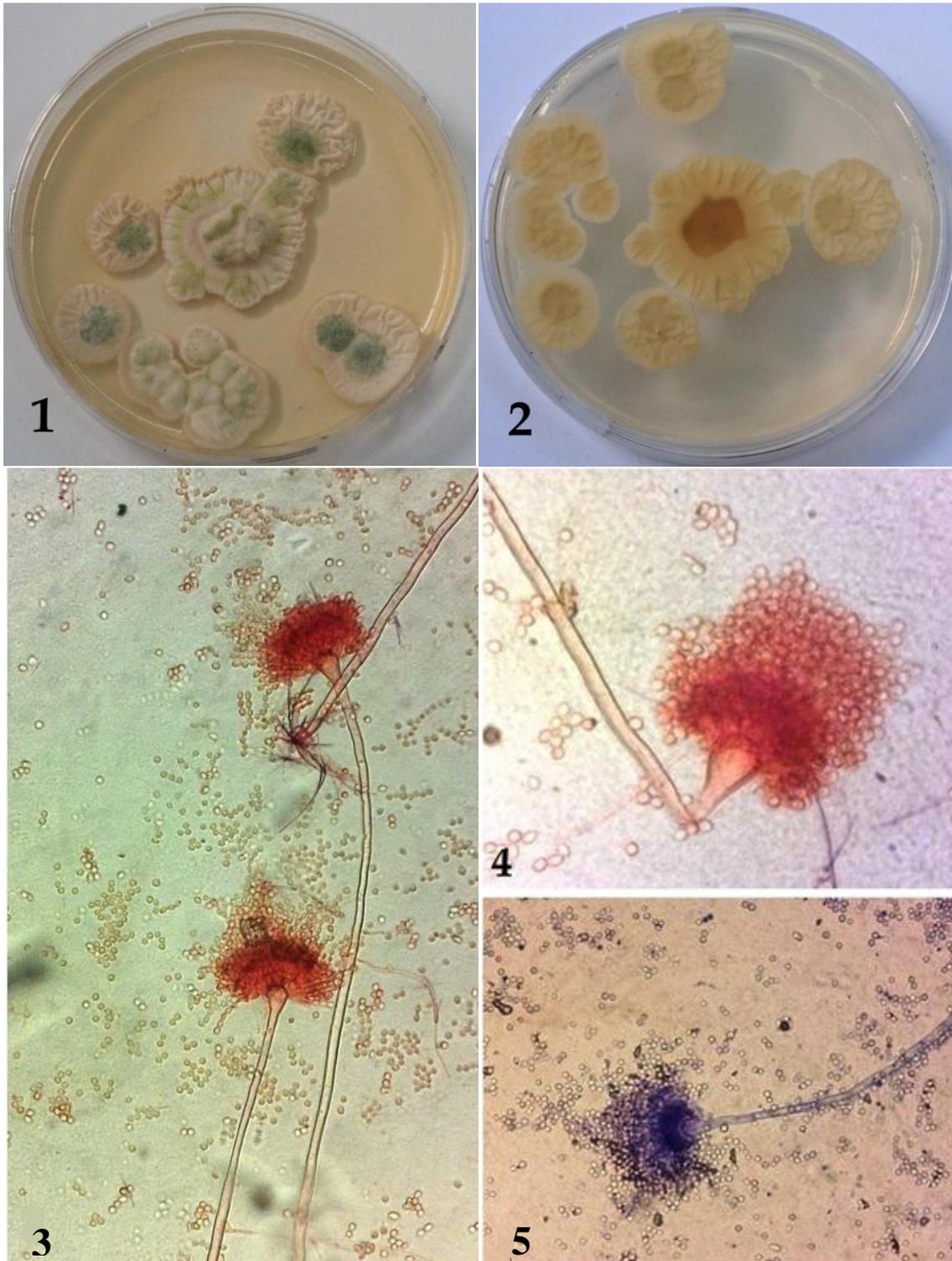
En recto, les colonies sont peu extensives d'abord blanches, puis de couleur variée, rosée, jaunâtres, ocre verte, parfois sur une même colonie, le verso est incolore ou variant du jaune au brun rougeâtre (Figure 15). La tête aspergilaire est bisériée, radiée. Il est exceptionnellement retrouvé dans des tissus profonds chez l'immunodéprimé. Par contre, il est fréquemment isolé dans des prélèvements de peau et de phanères, parfois en tant qu'agent d'onychomycoses (Chabasse et *al.*, 2002).



**Figure 14 :** *Aspergillus nidulans*.

Culture sur gélose de Sabouraud âgée de 8 jours (1 et 2).

Observation microscopique colorée au rouge Congo GR X 400 (3) et GR X 1000 (4) et au bleu de coton GR X 400 (5).



**Figure 15 :** *Aspergillus versicolor*.

Culture sur gélose de Sabouraud âgée de 8 jours (1 et 2).

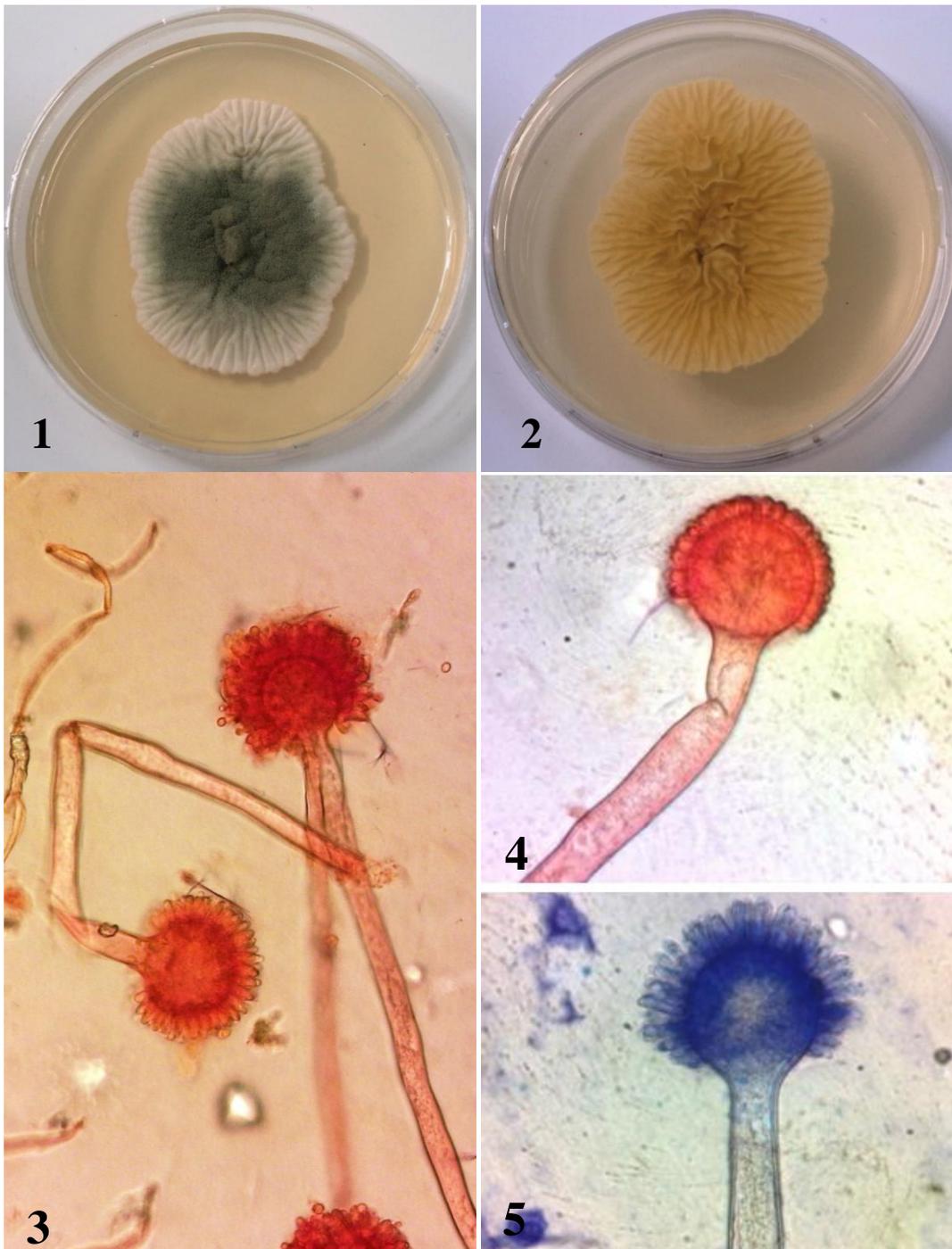
Observation microscopique colorée au rouge Congo GR X 400 (3) et GR X 1000 (4) et au bleu de coton GR X 400 (5).

### **2.2.3. *Aspergillus flavus***

Le champignon se développe rapidement sur les milieux classiques (géloses au malt et Sabouraud) à 22-25°C. La température optimale de croissance est 37°C. Sur le milieu de culture *A. flavus* forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaune, puis vert-jaune (Figure 16). Le revers peut être incolore, rosâtre ou brun-rouge foncé pour les souches productrices de sclérotés. Les têtes conidiennes, unisériées ou bisériées, d'abord radiées, puis reparties en plusieurs colonnes de spores mal individualisées, jaunâtres au début, puis vert-jaune foncé. Les conidiophores hyalins, verruqueux, atteignent 1 à 2,5 mm de long. Les vésicules sont sub-globuleuses. Les phialides sont insérées directement sur la vésicule ou portées par des métules. *Aspergillus flavus* est responsable d'aspergilloses pulmonaires ou généralisées principalement chez les patients immunodéprimés (Baculard et Tournier, 1995).

### **2.2.4. *Aspergillus fumigatus***

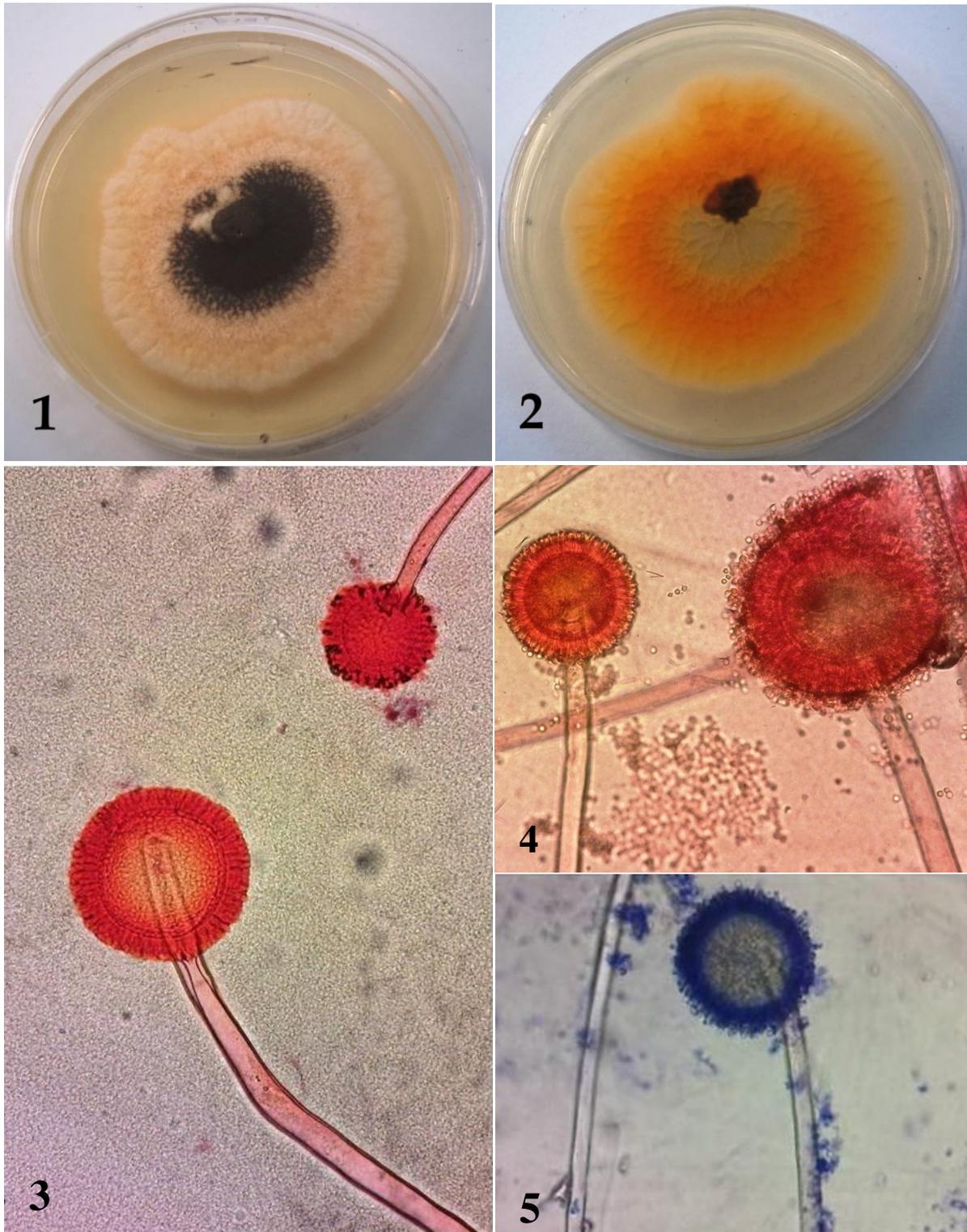
Mycélium à croissance rapide sur les milieux de culture classiques à 37°C. *A. fumigatus* est une espèce thermotolérante dont la température de croissance est comprise entre 15 et 48°C; la température optimale étant située aux alentours de 40 et 42°C. Cette espèce peut se développer jusqu'à 57°C (Morin, 1994). *A. fumigatus* forme des colonies d'abord blanches, puis bleu-vertes et enfin vert foncé à gris noirâtre. Le revers peut être incolore, jaune, vert ou brun-rouge suivant les souches (Figure 17). Les têtes conidiennes, strictement unisériées, en colonne compacte sont d'abord bleu-vert puis virant au vert bronze. Les conidiophores sont courts (300-500 µm), lisses, s'élargissent insensiblement au sommet en formant des vésicules sub-hémisphériques. Ces dernières (20-30 µm en diamètre), vertes, sont fertiles dans leur moitié supérieure. Les phialides dressées, sont densément groupées, de couleur verte. *Aspergillus fumigatus* synthétise plusieurs métabolites très toxiques comme la fumagiline, l'acide helvolique, la gliotoxine, les dérivés quinoniques, des alcaloïdes. Il est considéré comme le principal agent d'aspergillose aviaire et humaine (représentant 80-90% des aspergilloses humaines) (Morin, 1994).



**Figure 16 :** *Aspergillus fumigatus*.

Culture sur gélose de Sabouraud âgée de 8 jours (1 et 2).

Observation microscopique colorée au rouge Congo GR X 400 (3) et GR X 1000 (4) et au bleu de coton GR X 1000 (5).



**Figure 17 :** *Aspergillus flavus*.

Culture sur gélose de Sabouraud âgée de 8 jours (1 et 2).

Observation microscopique colorée au rouge Congo GR X 400 (3) et GR X 1000 (4) et au bleu de coton GR X 400 (5).

### 2.2.5. *Aspergillus niger*

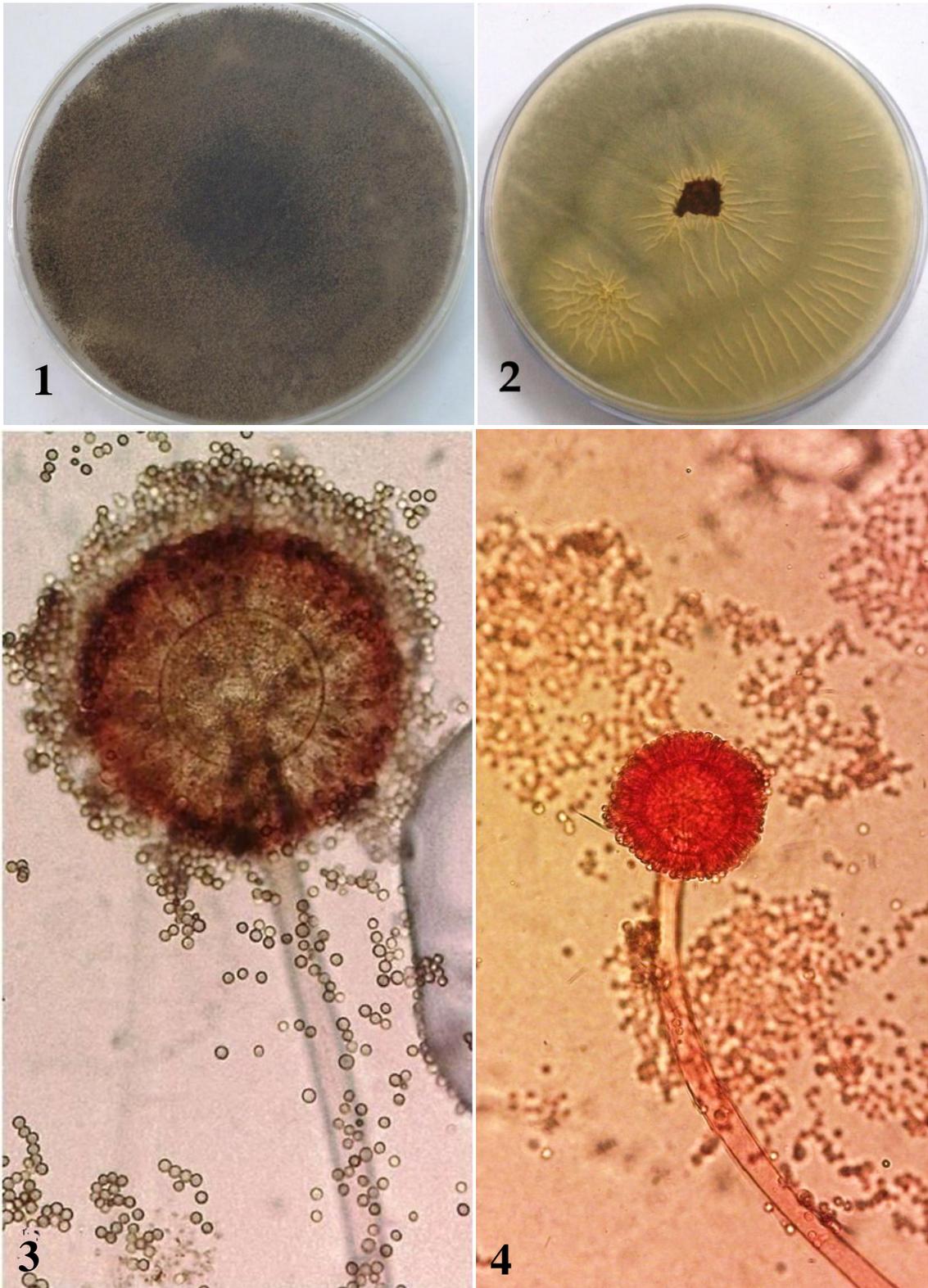
Ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais *A. niger* peut se développer jusqu'à 42°C. Les colonies d'*A. niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et, à maturité, elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle. Sur le milieu Czapek, *A. niger* forme des colonies à mycélium blanc ou jaune, et revers souvent incolore (Figure 18).

Les têtes conidiennes, bisériées, radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres ou noires. Les conidiophores sont longs atteignant 1,5-3 mm, lisses, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure. Les vésicules sont globuleuses et entièrement fertiles. Les phialides (7-10 x 3-3,5 µm) sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables. Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties. Elles mesurent 3,5-5 µm de diamètre, sont brunes, échinulées à très verruqueuses. Les sclérotés parfois différenciés, sont crème à chamois foncé au début, puis virent au chamois vinacé.

*Aspergillus niger* peut produire de l'acide oxalique, des malformines et, certaines souches, des aflatoxines.

*Aspergillus niger* rarement rencontré chez l'immunodéprimé; chez le sujet non immunodéprimé il peut provoquer des aspergilloses, des otites et des sinusites; il est aussi à l'origine d'infections cutanées, pulmonaires et généralisées (Morin, 1994).

*Aspergillus niger* est utilisé dans les processus biotechnologiques pour la synthèse de différents acides comme l'acide citrique et l'acide gluconique ainsi que pour la production d'enzymes : alpha-amylase, beta-glucanase, catalase, glucose oxydase, lipase, pectinase, polygalacturonase.



**Figure 18** : *Aspergillus niger*.

Culture sur gélose de Sabouraud âgée de 8 jours (1 et 2).

Observation microscopique colorée au rouge Congo GR X 400 (3 et 4).

### **2.3. Le genre *Cladosporium***

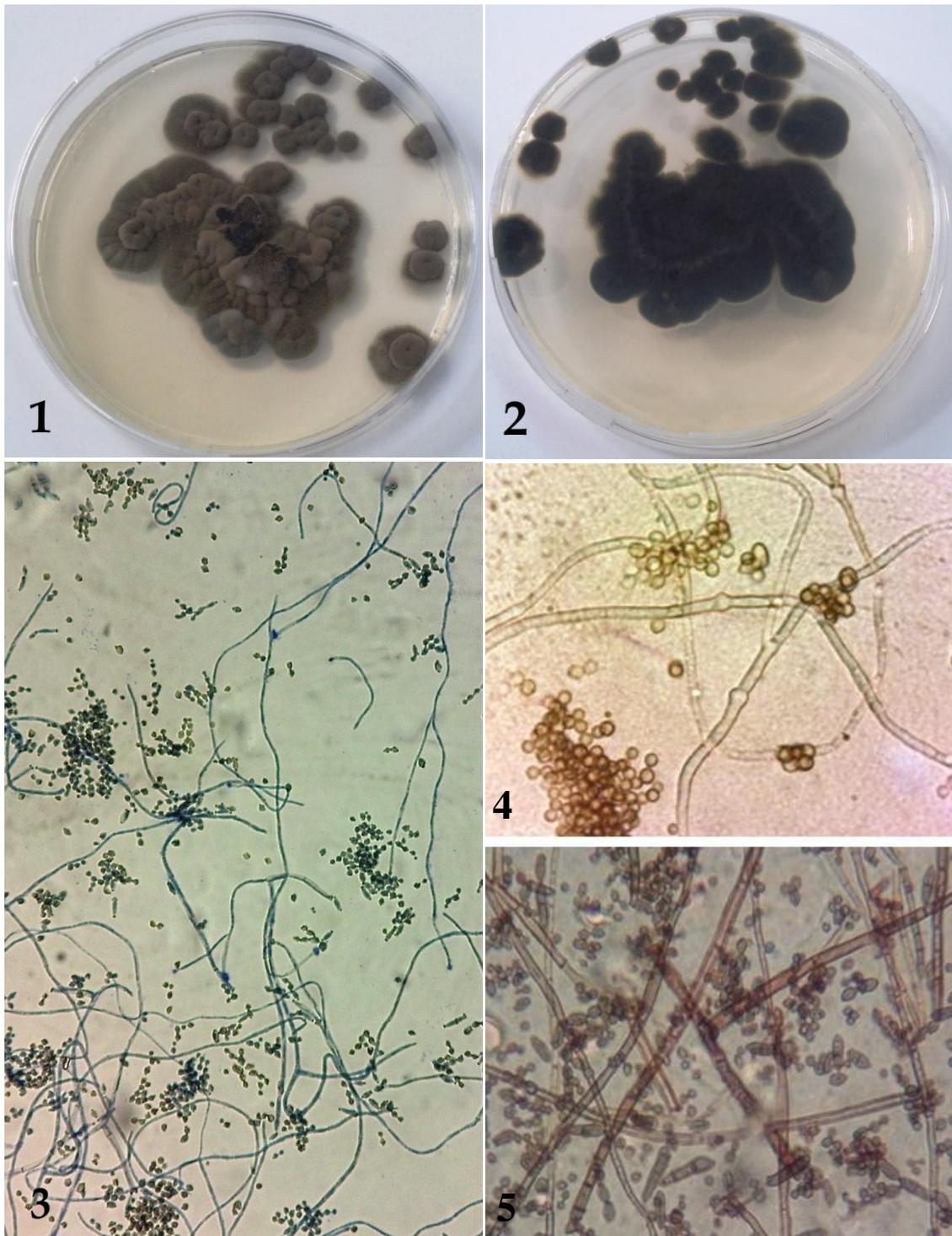
Ce genre est mondialement répandu. Il comprend plus de 30 espèces parasites de végétaux ou saprophytes très communs (Botton et *al.*, 1990). Certaines espèces sont cependant incriminées dans des lésions humaines (Figure 19). *Cladosporium carrionii*, rebaptisé *Cladophialophora carrionii*, est le principal agent de la chromomycose. *Cladosporium bantianum*, rebaptisé *Cladophialophora bantiana*, thermophile, est un redoutable pathogène du système nerveux central (Chabasse et *al.*, 2002).

### **2.4. Le genre *Alternaria***

Les colonies sont de croissance rapide sur le milieu Sabouraud, de couleur, blanc-gris au départ, deviennent rapidement foncées (vert foncé à noires) au recto comme au verso (Figure 20). La texture est duveteuse à laineuse. Les *Alternaria* sont des saprophytes ou des parasites de plantes très répandus. Chez les immunodéprimés, ils sont impliqués dans les lésions de phaeohyphomycoses cutanées ou sous-cutanées. Ce sont très rarement des agents des onychomycoses (Chabasse et *al.*, 2002).

### **2.5. Le genre *Acremonium***

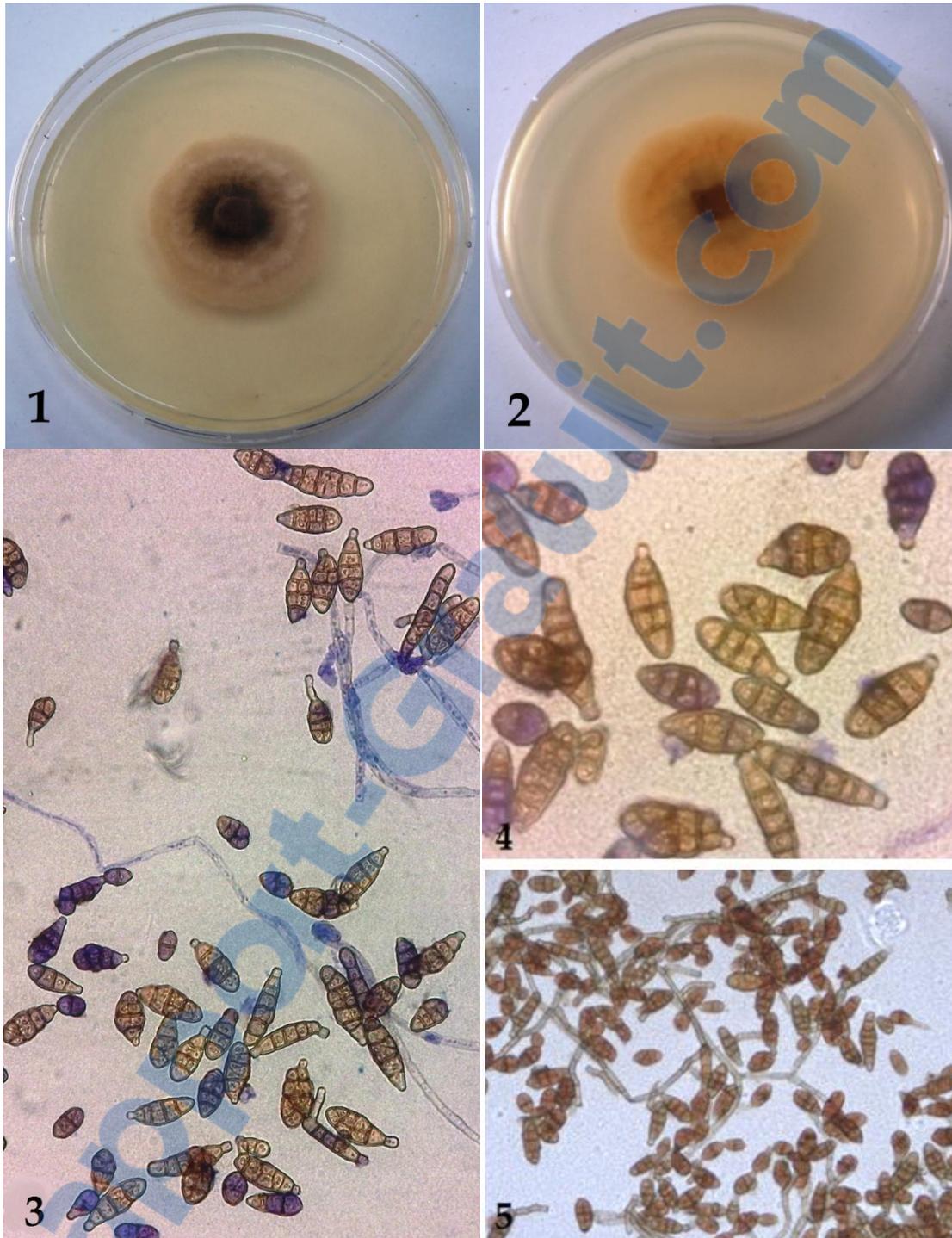
Les colonies sont parfois finement poudreuses, le plus souvent humides, muqueuses. La couleur varie du blanc au rose orangé. La température optimale de croissance varie de 25 à 37, et la croissance est restreinte. Le thalle végétatif est constitué de filaments septés, isolés ou disposés parallèlement les uns aux autres (Figure 21). Les conidies cylindriques ou elliptiques, regroupée en amas à l'extrémité des phialides. Elles sont généralement unicellulaires. Certaines espèces d'*Acremonium* sont impliquées en pathologie humaines, elles peuvent être responsables d'onyxis du gros orteil (Chabasse et *al.*, 2002).



**Figure 19 :** *Cladosporium sp.*

Culture sur gélose de Sabouraud âgée de 8 jours (1 et 2).

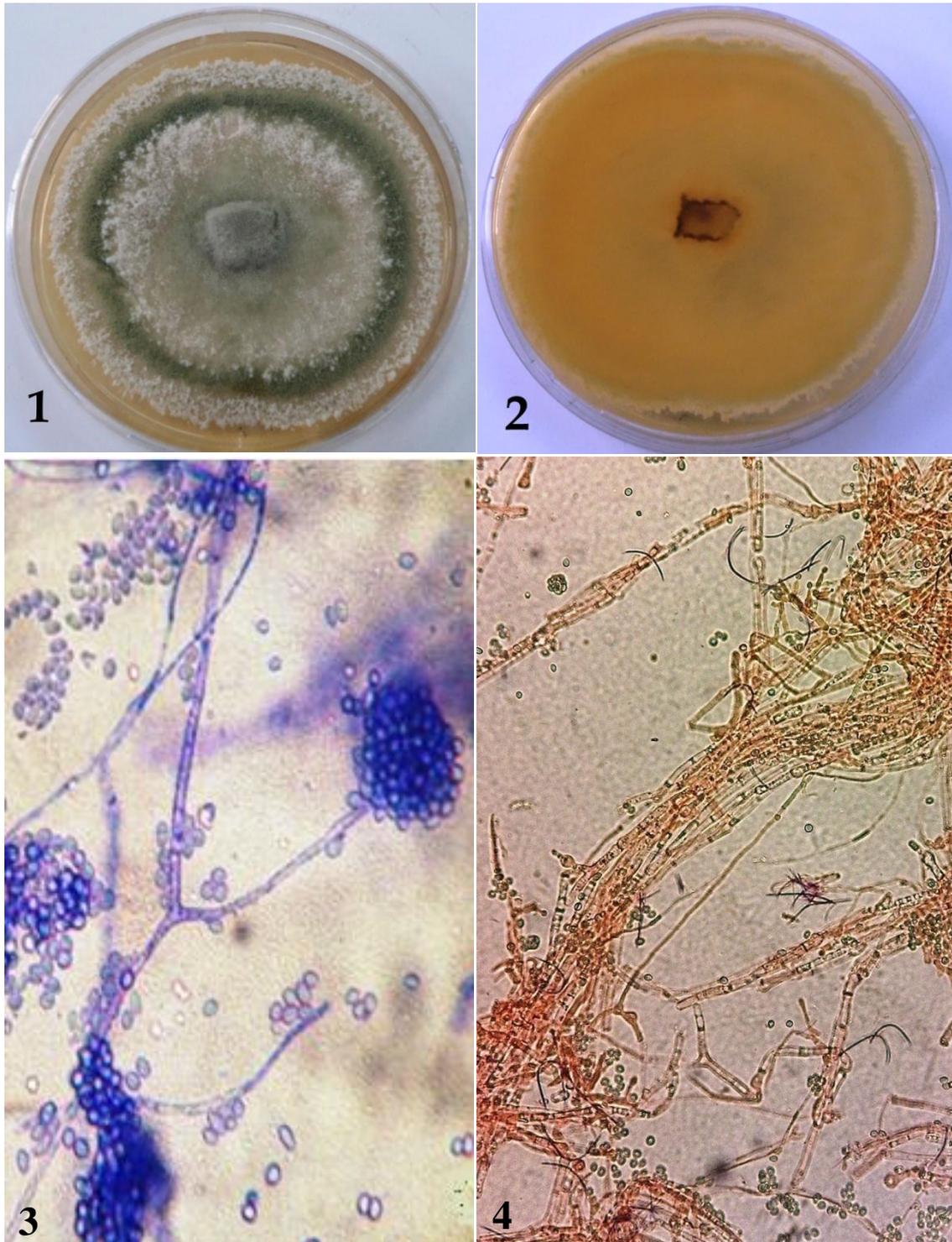
Observation microscopique colorée au bleu de coton GR X 400 (3) et au rouge Congo GR X 1000 (4) et GR X 400 (5).



**Figure 20 :** *Alternaria* sp.

Culture sur gélose de Sabouraud âgée de 8 jours (1 et 2).

Observation microscopique colorée au bleu de coton GR X 400 (3) et GR X 1000 (4) et au rouge Congo GR X 400 (5).



**Figure 21 :** *Acremonium sp.*

Culture sur gélose de Sabouraud âgée de 8 jours (1 et 2).

Observation microscopique colorée au bleu de coton GR X 400 (3) et au rouge Congo GR X 400 (4).

### 3. Détermination de l'index d'émulsion E<sub>24</sub>

Afin d'estimer la production des biosurfactants par les souches isolés, nous avons réalisé le test d'émulsification (E<sub>24</sub>) qui consiste à homogénéiser 3 ml de milieu de culture avec 3ml de pétrole brut (Figure 22).



Figure 22 : Calcul de l'index d'émulsion E<sub>24</sub>.

Les résultats obtenus sont restitués dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Indices d'émulsion E<sub>24</sub> pour les souches testées.

souches	Equation	L'indice E <sub>24</sub>
<i>Penicillium sp</i>	$(1.1/2.6) \times 100$	42.3
<i>Cladosporium sp</i>	$(0.3/2.6) \times 100$	11.53
<i>Aspergillus nidulans</i>	$(0.8/2.6) \times 100$	30.7
<i>Aspergillus niger</i>	$(0.6/2.6) \times 100$	23.07
<i>Aspergillus flavus</i>	$(0.1/2.6) \times 100$	3.83
<i>Aspergillus fumigatus</i>	$(0.2/2.6) \times 100$	7.69
<i>Aspergillus versicolor</i>	$(0.35/2.6) \times 100$	13,46
<i>Acremonium sp</i>	$(0.5/2.6) \times 100$	19.23
<i>Alternaria sp</i>	$(0.1/2.6) \times 100$	3.83

Le genre *Penicillium*, *Acremonium* et l'espèce *Aspergillus nidulans* et *Aspergillus niger* présentent un indice d'émulsification remarquable.

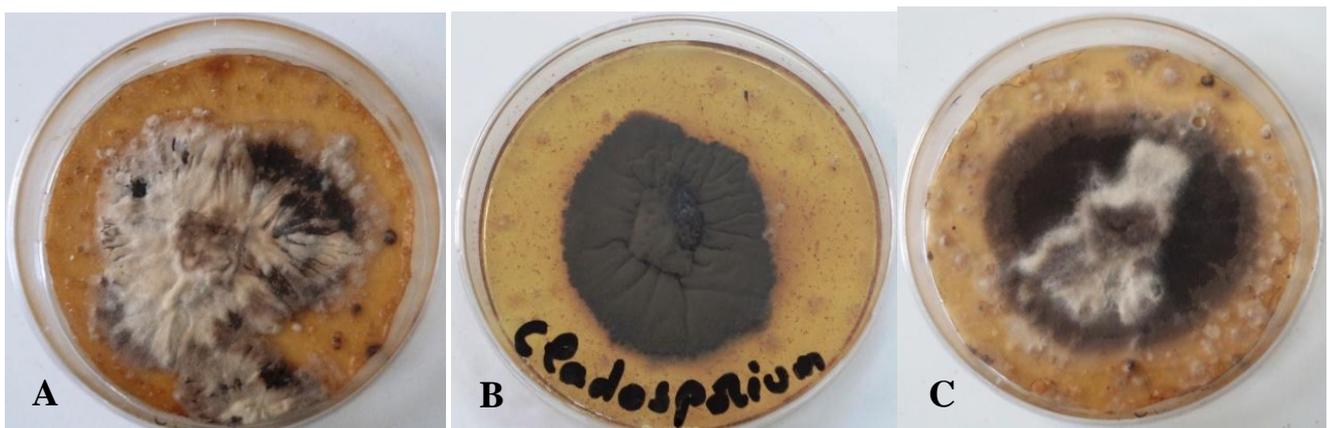
Ces résultats montrent que les isolats présentant cette aptitude ont un intérêt industriel important grâce à leur production de ces composés à activité émulsifiante.

#### 4. Test préliminaire de sélection des souches fongiques

Tous les isolats fongiques ont été sélectionnés pour leur capacité à dégrader le pétrole brut en fonction de leur taux de croissance sur un milieu sélectif additionné avec 1% de pétrole brut.

Les isolats fongiques qui ont donné le plus grand diamètre de la colonie, et la formation d'un mycélium aérien abondant ont été choisies pour une analyse plus approfondie sur leur capacité à utiliser le pétrole brut. Dans cette étude, *Penicillium sp*, *Cladosporium sp* et *Aspergillus niger* ont démontré un taux de croissance élevé et semblaient être mieux adaptés à l'état de culture par rapport aux autres isolats fongiques qui ont connu une croissance très faible.

*Penicillium sp*, *Cladosporium sp* et *Aspergillus niger* sont sélectionnés pour le biotest et le test dégradation en milieu liquide (Figure 23).



**Figure 23 :** Les trois souches fongiques sélectionnées.

(A) *Penicillium sp*, (B) *Cladosporium sp*, (C) *Aspergillus niger*.

## **5. Bio-test ou le test biologique**

Le bio-test a été réalisé uniquement sur les trois champignons filamenteux *Penicillium sp*, *Cladosporium sp* et *Aspergillus niger* sélectionnés lors du test préliminaire.

La capacité biodégradable du pétrole brut par ces micromycètes isolés de l'eau de mer a été étudiée en fonction de deux paramètres : le volume du pétrole brut et le temps.

### **5.1. Le volume**

Pour ce test différents volumes de pétrole brut sont incorporés au milieu de culture : 1ml, 5ml, 10ml, 20ml. Un flacon est resté témoin contenant 1ml d'eau distillé.

Le pouvoir biodégradable des trois champignons filamenteux a été testé en utilisant des volumes différents de pétrole brut. Les résultats montrent que la plus grande capacité à dégrader le pétrole est atteinte à un volume de 1 ml, 5 ml et 10 ml pour *Penicillium sp*, et une biodégradation importante a été également observée à 20 ml (Figure 24).

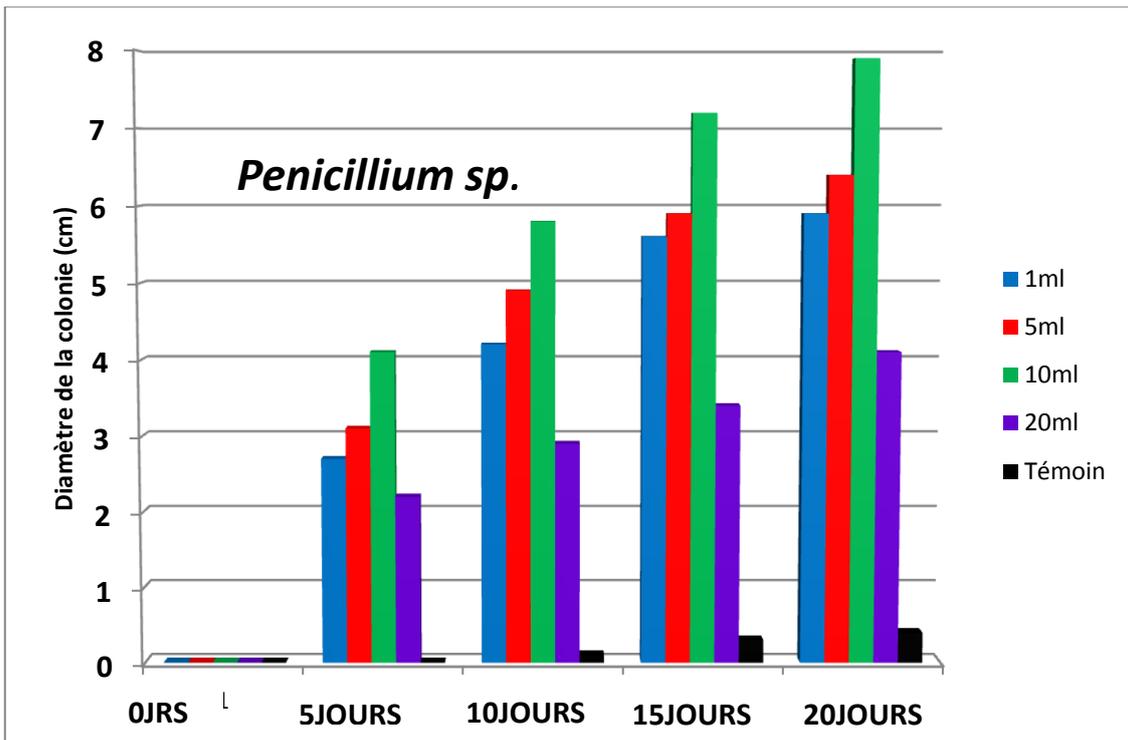
Pour *Cladosporium sp* la plus grande capacité à dégrader le pétrole est atteinte à un volume de 1ml, 5 ml tandis que la plus faible capacité a été enregistrée à un volume de 10 ml et aucune croissance n'a été observée à 20 ml (Figure 25).

L'espèce *Aspergillus niger* présente un degré élevé de biodégradation a un volume de 1 ml et 5ml et une biodégradation moins importante à 10 ml et 20 ml (Figure 26).

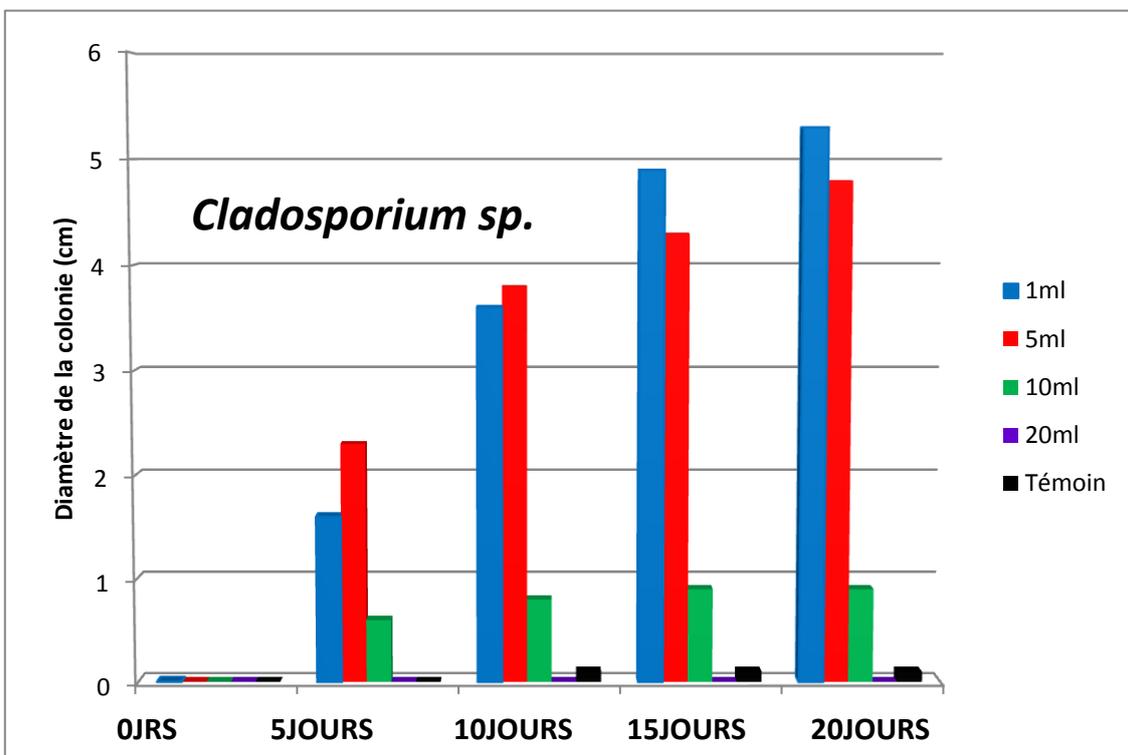
### **5.2. Le temps**

Le suivi de la prolifération fongique des trois souches séparément : *Penicillium sp*, et *Cladosporium sp* et *Aspergillus niger* a été effectué pendant une durée de 20 jours pour les différents volumes. La lecture a été réalisée tous les 5 jours.

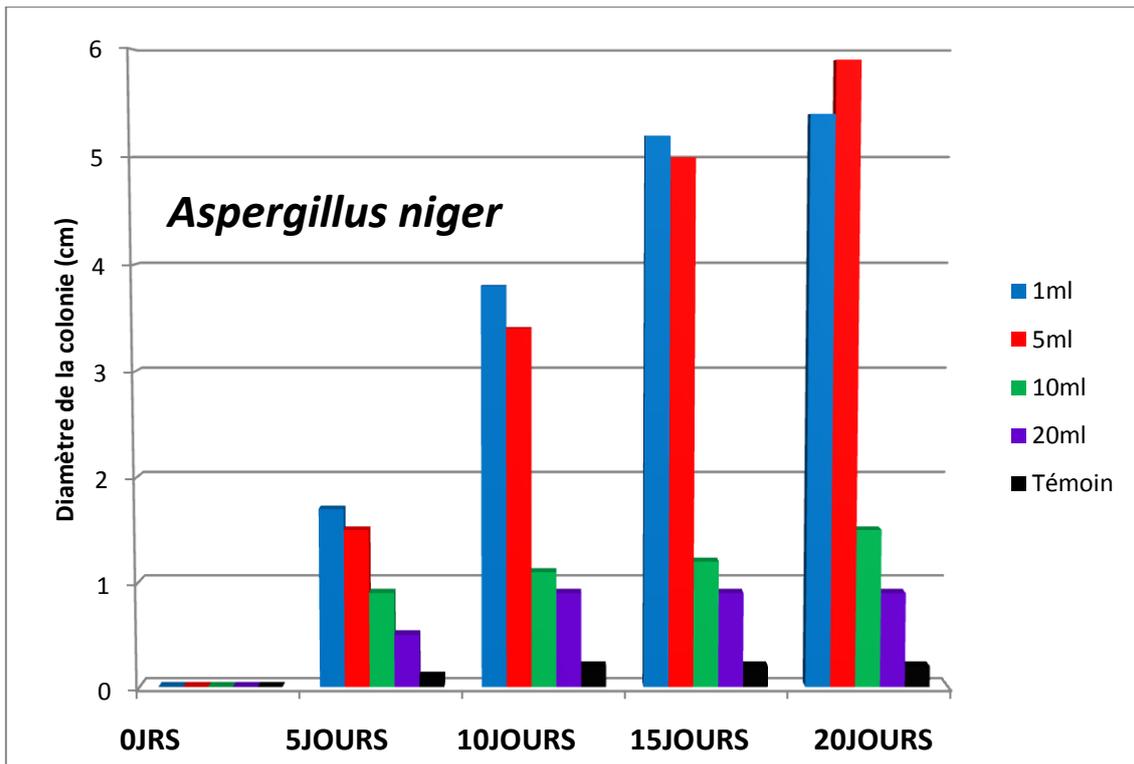
Les résultats présentés dans la figure 24, 25 et 26 montrent que le taux de la dégradation du pétrole par les trois souches fongiques est variable d'un jour à l'autre.



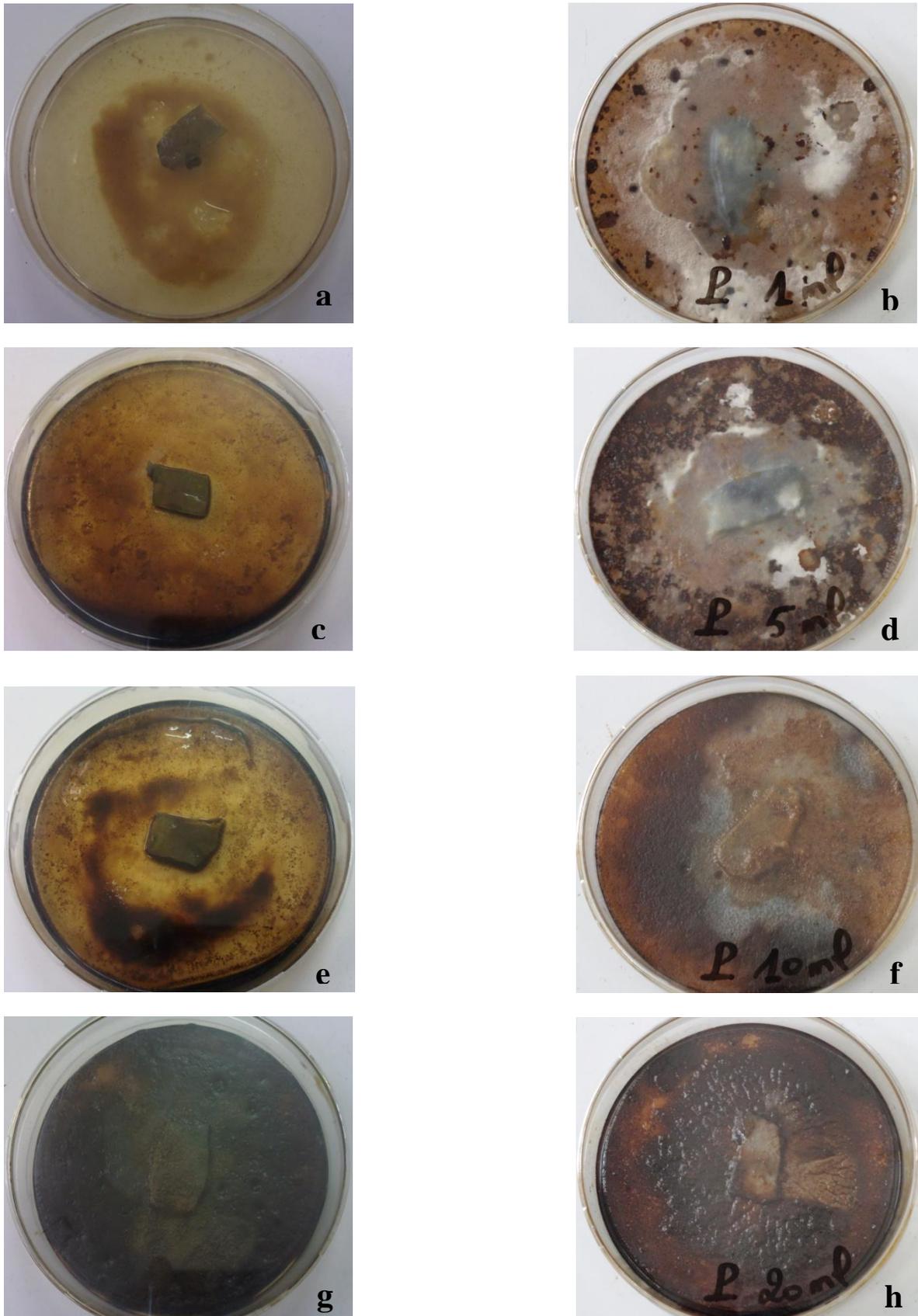
**Figure 24 :** Biodégradation du pétrole brut par *Penicillium sp* en fonction du volume.



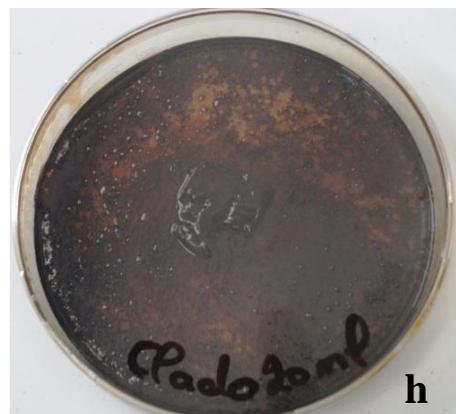
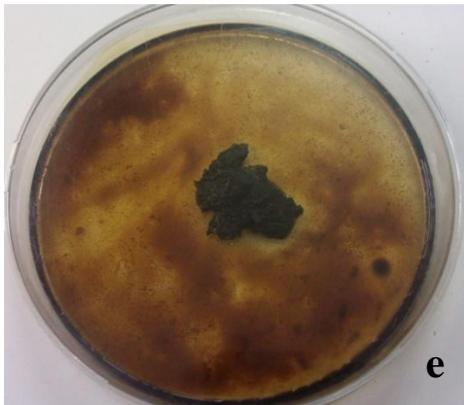
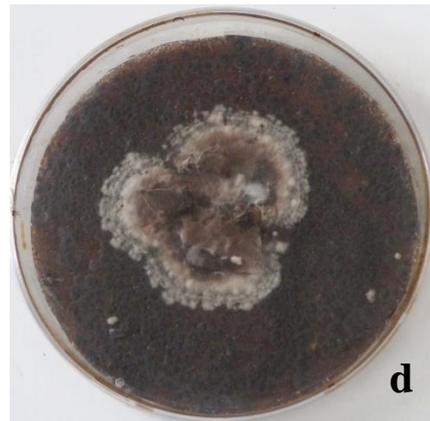
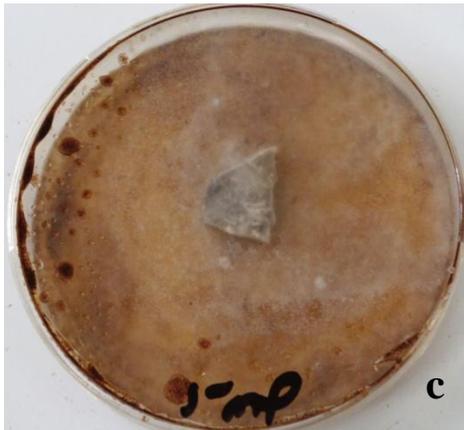
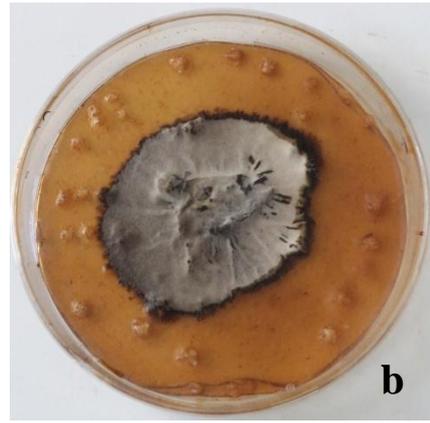
**Figure 25 :** Biodégradation du pétrole brut par *Cladosporium sp* en fonction du volume.



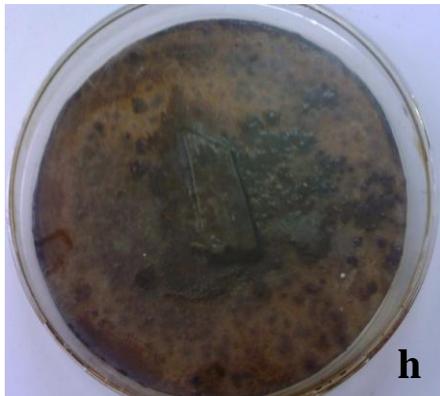
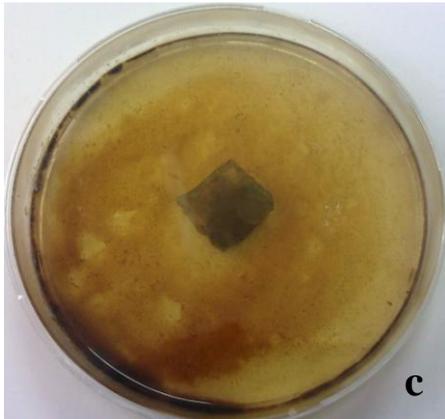
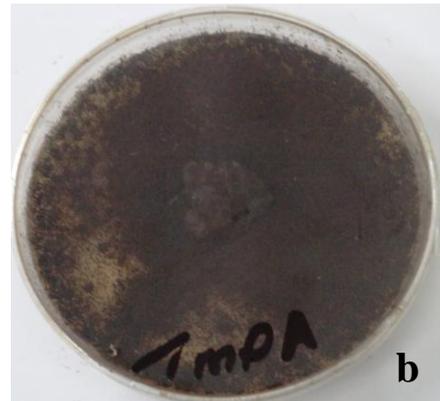
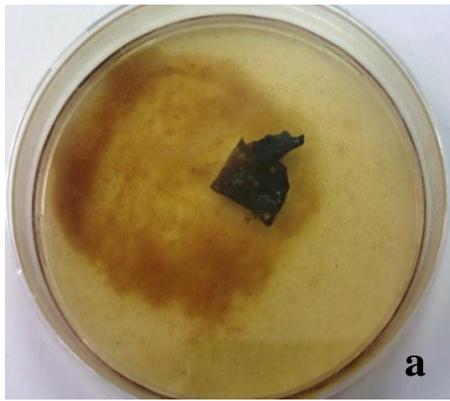
**Figure 26 :** Biodégradation du pétrole brut par *Aspergillus niger* en fonction du volume.



**Figure 27 :** Biodégradation du pétrole brut par *Penicillium sp* en fonction du temps.  
Premier jour d'incubation (a,c,e,g)      20 jours d'incubation (b,d,f,h)



**Figure 28** : Biodégradation du pétrole brut par *Cladosporium sp* en fonction du temps.  
Premier jour d'incubation (a,c,e,g)      20 jours d'incubation (b,d,f,h)



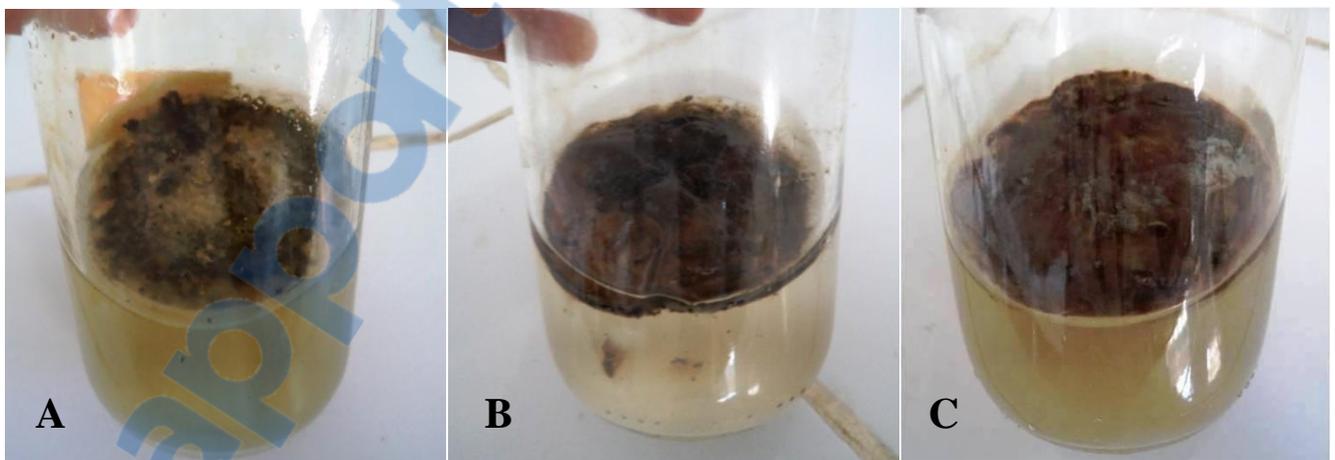
**Figure 29** : Biodégradation du pétrole brut par *Aspergillus niger* en fonction du temps.  
Premier jour d'incubation (a,c,e,g)      20 jours d'incubation (b,d,f,h)

## 6. Dégradation du pétrole brut en milieu liquide et production de biosurfactants

Après incubation à température ambiante et sous agitation (200 rpm) pendant 30 jours, les deux isolats fongiques se sont distingués par leur pouvoir de dégradation comme le montre la figure 30.

Différences morphologiques caractéristiques ont été observées entre le mycélium des isolats fongiques inoculés dans le milieu Czapek-Dox additionné avec 1% de pétrole brut par rapport à ceux inoculés en milieu Czapek-Dox sans addition de pétrole brut.

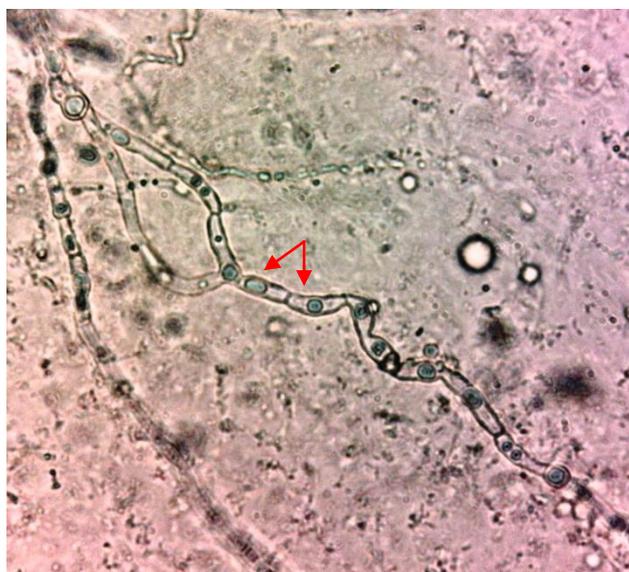
Basé sur l'observation visuelle, le mycélium de tous les isolats fongiques qui a été cultivée dans un milieu Czapek-Dox additionné avec 1% de pétrole brut, est apparu à s'agglutiner après 2 semaines. Avant d'être inoculés avec des isolats fongiques, le milieu Czapek-Dox additionné avec 1% de pétrole brut était initialement transparent mais après 1 mois d'incubation avec les isolats fongiques sélectionnés, la couleur du milieu Czapek-Dox avait changé à la lumière jaunâtre chez *Penicillium* et *Aspergillus niger* signifiant la production de biosurfactants et ceci en ayant un pouvoir de dégradation des hydrocarbures.



**Figure 30** : Dégradation du pétrole brut, production de biosurfactants et agglutination du mycélium en milieu liquide (A) *Penicillium* sp, (B) *Cladosporium* sp, (C) *Aspergillus niger*.

Les résidus du pétrole brut qui s'observaient initialement à la surface du milieu ont aussi clairement disparu après une incubation de 3 semaines. Ceci suggère que les résidus du pétrole brut avaient adhérents et emprisonnés dans le mycélium.

Les observations au microscope optique des isolats fongiques sélectionnés ont montré la formation d'hyphes gonflés après 1 mois d'incubation. Le genre *Cladosporium* avait des hyphes plus gonflés par rapport aux autres souches. Le pétrole brut utilisé était pris au piège entre le mycélium et des vacuoles ont été trouvées dans les cloisons des hyphes (Figure 31). Cependant, il n'y avait pas de changements morphologiques apparents pour *Penicillium sp* et *Aspergillus niger*. Le mycélium des deux isolats a semblé être très bien, mince et lisse.



**Figure 31 :** Observation microscopique des hyphes gonflés de *Cladosporium sp* cultivés sur milieu Czapek-Dox additionné avec 1% de pétrole brut après 1 mois d'incubation.

## II. Discussion

L'isolement et l'identification des champignons à partir des échantillons d'eau de mer prélevés du port d'Oran ont montré une biodiversité mycoflorale au niveau de cette zone. 5 genres de champignons filamenteux ont été discernés : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria* et *Acremonium*. *Penicillium* et *Aspergillus* étaient les genres les plus dominants. La présence de ces champignons dans l'eau de mer explique le niveau de la pollution de la zone d'Oran qui est dû certainement à

l'existence d'une grande quantité de matière organique qui provient des déversements des déchets pétroliers et éventuellement les hydrocarbures.

Notre étude a été consacrée uniquement pour les champignons filamenteux « *Penicillium sp*, *Cladosporium sp* et *Aspergillus niger* ». Selon les résultats, on déduit que les trois micromycètes isolés ont un pouvoir biodégradable des hydrocarbures plus ou moins important. La présence du pétrole va influencer la croissance des souches fongiques qui l'utilisent comme source de carbone.

On remarque que le genre *Penicillium* à une capacité de dégradation plus importante que le *Cladosporium* et l'espèce *Aspergillus niger* et notamment dans les différents volumes étudiés. Des résultats similaires ont été trouvés par Judith et *al.* (2012) qui ont montré que le *Penicillium* dégrade les hydrocarbures aromatiques via la génération de dioxyde de carbone, ce champignon filamenteux a un pouvoir exceptionnel d'adaptation.

Elshafie et *al.* (2007) en étudiant la biodégradation des hydrocarbures par des souches fongiques isolées de boules de goudron recueillies à partir des plages d'Oman ont été testés pour leur capacité à croître et à dégradé les hydrocarbures. Les résultats ont démontré que *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus* et *Penicillium chrysogenum* sont très efficaces dans la dégradation de très récalcitrants hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Beatriz et *al.* (2010) en cultivant des souches fongiques et en utilisant également le pétrole brut comme source de carbone et d'énergie ont rapporté que le taux de la biodégradation a atteint 78.5% après 24 jours d'incubation avec un suivi quotidien. Dans cette étude, les mêmes genres de champignons identifiés dans notre investigation ont été testés. Ces auteurs sont arrivés a démontré que les deux souches fongiques *Penicillium* et *Cladosporium* ont une capacité dans la dégradation des hydrocarbures. Cette capacité est due à la production et sécrétion des enzymes de métabolisme durant la période de la croissance.

Par ailleurs, il est connu que la flore microbienne a besoin d'éléments minéraux pour sa croissance, en particulier l'azote, dont les proportions optimales, généralement admises, sont de 10g d'azote et 1g de phosphore pour 100g de carbone (Ballerini, 1999). Ces éléments rentrent dans l'édification des constituants cellulaires lors de la multiplication des microorganismes (synthèse d'ADN, protéines etc...).

Nos tests sur la biodégradabilité des hydrocarbures par les champignons filamenteux ont permis de constater que le pétrole est peu dégradable dans les conditions d'expérimentation. Plusieurs hypothèses peuvent être suggérées. Cela est du soit à la nature du pétrole qui est composé de plusieurs types d'hydrocarbures constitués de différentes familles assimilables par les microorganismes (Ould Boudia et *al.*, 2011) soit à la durée d'incubation qui joue un rôle très important dans ce mécanisme.

Les champignons présentent une très grande diversité et l'adaptabilité de l'utilisation de différentes molécules organiques en tant que source de carbone mais leur capacité à dégrader un hydrocarbure spécifique en tant que source d'énergie et / ou de la biomasse peuvent être différentes. La composition chimique d'un pétrole brut peut également être un facteur dans la détermination du type de champignons, qui peuvent le dégrader (Davies et Westlake, 1979).

***CONCLUSION GENERALE ET  
PERSPECTIVES***

---

## Conclusion générale

Les objectifs de cette étude étaient d'identifier et de caractériser les souches fongiques isolées de l'eau de mer du port d'Oran, notamment le pouvoir de dégradation du pétrole brut, et la capacité de produire des biosurfactants.

La première partie de notre travail de recherche a montré une variabilité importante et complexe de champignons filamenteux au niveau de cette zone (port d'Oran), 5 genres ont été identifiés : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria* et *Acremonium*. Cette flore autochtone contribue dans le pouvoir autoépurateur de l'eau de mer.

La seconde partie de l'étude a permis d'évaluer l'efficacité de ces souches fongiques dans la biodégradation du pétrole brut par un test préliminaire de sélection. *Penicillium sp*, *Cladosporium sp* et *Aspergillus niger* sont les trois souches qui ont démontré un réel potentiel de dégradation du pétrole brut et ont été sélectionnés pour le biotest et le test de dégradation en milieu liquide.

Le biotest est réalisé durant 20 jours d'incubation, en fonction de deux paramètres : le temps et la concentration du pétrole brut. *Penicillium sp* présente un pouvoir de biodégradation plus élevé que celui d'*Aspergillus niger* et *Cladosporium sp* pour les différentes concentrations de pétrole brut.

L'utilisation des matériaux biologiques pour la dépollution des milieux contaminés par les hydrocarbures a gagné une grande crédibilité ces dernières années, à cause de leur bonne performance et leur coût très bas.

Les résultats obtenus dans ce travail montrent clairement l'efficacité de ces champignons pour la bioremédiation des milieux salins, comme l'océan et les sédiments marins contaminés par des hydrocarbures et encouragent le développement d'autres études concernant le métabolisme, la toxicologie et la bioremédiation des hydrocarbures par les champignons marins.

A la lumière des résultats obtenus, il est souhaitable de compléter cette étude par des approches plus approfondies, à savoir :

- La multiplication des sites de prélèvement et du nombre d'échantillonnage.
- Une approche moléculaire par le séquençage de nos souches isolées aiderait à déterminer de façon précise leur affiliation phylogénique.
- Une analyse quantitative détaillée de la biodégradation pour chaque souche par une chromatographie en phase gazeuse.
- Production, extraction et étude de propriété biologique des biosurfactants issus de l'activité métabolique de différentes souches et ceci vis-à-vis de plusieurs substrats.

# ***REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

**Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Janvier 2000.** Communiqué de Presse: Contamination des produits de la mer par les hydrocarbures suite au naufrage de l'Erika. Premières recommandations de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments.

**Albro, P.W., (1976).** In: Chemistry and biochemistry of natural walls (Colattukudy, P.E., Eds). Elsevier, Amsterdam.

**Al-Mallah, M., (1988).** Biodégradation des hydrocarbures dans les milieux sursalés. Thèse de Doctorat de l'Université d'Aix Marseille II. 192 p.

**Alker, AP., Smith, GW., & Kim, K., (2001).** Characterization of *Aspergillus sydowii* (Thom & Church), a fungal pathogen of Caribbean sea fan corals. *Hydrobiologia* 460: 105-111.

**Annweiler, E., Richnow, H.H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., Francke, W. and Michaelis, W., (2000).** Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermoleovorans*. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 518-523.

**ANOFEL (Association française des enseignants de parasitologie). (2007).** Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. Ed. Masson, Paris.321p.

**Arnaud P. (1983).** "Cours de Chimie Organique." Enseignement de la Chimie, Tome 1, 505 p.

**Atlas, R.M., (1975).** Effect of the temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. *Applied Microbiology* 30, 396-403.

**Atlas, R.M., (1981).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbial Reviews* 45, 180-209.

- Atlas, R.M., Boehm, P.D. and Calder, J.A., (1981).** Chemical and biological weathering of oil from the Amoco Cadiz oil spillage in the littoral zone. Estuarine and Coastal Marine Science in press.
- Aust, S. D. et Benson, J. T. (1998).** The Fungus among Us: Use of White Rot Fungi to Biodegrade Environmental Pollutants. In National Institute of Environmental Health Sciences.
- Barghoorn ES & Linden DH (1944).** Marine fungi: Their taxonomy and biology. *Farlowia* 1: 395-467.
- Bachofen, R., (1982).** Production of hydrocarbons by *Botryococcus braunii*. *Experientia* 38, 47-49.
- Baculard A., Tournier G., (1995),** Aspergilloses broncho-pulmonaires et mucoviscidose, *Rev. Pneumol. Clin.*, 51, 159-162.
- Bertrand, J.C., Rambeloarisoa, J.F., Rontani, J.F., Giusti, G. and Mattei, G., (1983).** Microbial degradation of crude oil in sea water in continuous culture. *Biotechnol. Lett.* 5, 567-572.
- Bertrand, J.C. et Mille, G., (1989).** Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures. In: Bianchi, M., Marty, D., Bertrand, J.C., Caumette, P. et Gauthier, M.J. (Eds.), *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Masson (Paris), Chapitre 13, pp. 343-385.
- Bertrand, J.C., Al Mallah, M., Acquaviva, M. and Mille., (1990).** Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. *Letters in Applied Microbiology* 11, 260-263.
- 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, 125-138.

- Bélanger, D. (2009).** Utilisation de la faune macrobenthique comme bioindicateur de la qualité de l'environnement marin côtier. P27.
- Beatriz P., Daniel M., Maria C., Joel A., Refugio R. (2010).** Filamentous fungi remove weathered hydrocarbons from polluted soil of tropical Mexico, *Rev. Int. contam. Ambie*, 26 (3), 193-199.
- Blackwell M., Vilgalys R., Taylor J.W.(1998).** Fungi, Eumycota. In the tree of life, D.R. Maddison and w.p. Maddison editor, University of Arizona.
- Blackwell M (2011).** The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98: 426–438.
- Bossard, I. and Bartha, R., (1984).** The fat of petroleum in soil ecosystems. In: Atlas, R.M. (Ed.), *Petroleum Microbiology*. Macmillan, New York, pp. 440-445.
- Booth T & Kenkel N. (1986).** Ecological studies of lignicolous marine fungi: a distribution model based on ordination and classification. In: *the biology of marine fungi* (ed. S.T. moss). Cambridge University Press, Cambridge, 297-310.
- Botton B., Breton A., Fèvre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P., (1990),** Moisissures utiles et nuisibles, Importance industrielle, *Ed. Masson*, Paris.
- Boonchan, S., M. L. Britz et G. A. Stanley (2000).** “Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures.” *Appl Environ Microbiol* 66 (3):1007-1019.
- Boyd, T.J., Montgomery, M.T., Spargo, B.J., Smith, D.C., Coffin, R.B., Kelley, C.A. and Mueller, J.G., (2001).** Effects of oxygenation on hydrocarbon biodegradation in a hypoxic environment. *Bioremediation. Journal* 5, 145-157.
- Bodour A.A, Gerrero-Barajas C. and Maier M., (2004).** Biosurfactants and Their importance, *current science*, Vol.77, No.1,p.116-126.

- Broderick, L.S. and Cooney, J.J., (1982).** Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. *Dev. Ind. Microbiol.* 23, 425-434.
- Blumer, M. (1976).** Polycyclic aromatic compounds in nature. *Scientific America*, 234(3), 35-45.
- Bumpus JA, Tien M, Wright D, Aust SD (1985).** Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* 228:1434–1436.
- Burgess, R. M., Ahrens, M. J. & Hickey, C. W. (2003).** Geochemistry of PAHs in Aquatic Environments: Source, Persistence and Distribution. John Wiley & Sons, Ltd.
- Bugni TS & Ireland CM. (2004).** Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports* 21: 143–163.
- Carlile M.J., Watkinson S.C. (1994).** *The Fungi.* (Academic Press eds).
- Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A., (2002),** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc.
- Cabuk A., Ilhan S., Filik C., Caliskan F., (2004).** Pb<sup>2+</sup> biosorption by pretreated fungal biomass, *Turk. J. Biol.*, 29, 23-28.
- Cerniglia, C.E. (1992).** “Biodegradation of polycyclic aroamatic hydrocarbons” *Biodegradation* 3: 351-368.
- Chermette R., Bussieras J., (1993),** Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.
- Cheng Y.C., Lin L.P. (1977).** Microbiological studies on western coast of Taiwan. I: enumeration, isolation and identification of marine-occurring yeasts. *Acta Oceanogr Taiwan*, 7, 216-228.

- Chen, J., Henderson, G., Grimm, C. C., Lloyd, S. W. & Laine, R. A. (1998).**  
Termites fumigate their nests with naphthalene. *Nature*, 392(6676), 558-559.
- Chabasse D., Bouchara J.P., De gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P. (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation n°25, Bioforma. 159p.
- Cincinelli A, Stortini AM, Perugini M, Checchini L and Lepri L, (2001).** Organic pollutants in sea-surface microlayer and aerosol in the coastal environment of Leghorn— (Tyrrhenian Sea). *Mar. Chem.*, 76 : 77-98.
- Cooney, J.J. and Summers, R.J., (1976).** Hydrocarbon-using microorganisms in three freshwater ecosystems, p. 141-156. In: Sharpley, J.M. and Kaplan, A.M. (Eds.), Proceeding of the the third International Biodegradation Symposium. Applied Sciences Publishers, Ltd., London.
- Congress of the United States- Office of Technology assessment, (1991).**  
Bioremediation of the marine oil spills.
- Cuomo V., Palomba L. Perretti A.,Guerriero A., D'ambrosio M., et Pietra F., (1995).** Antimicrobial activities from marine fungi. *J. Mar. Biotechnol.*,6, 199-204.
- Davies, J.S., Westlake, D.W.S., (1979).** Crude oil utilization by fungi. *Can. J. Microbiol.* 25, 146–156.
- Daisy, B. H., Strobel, G. A., Castillo, U., Ezra, D., Sears, J., Weaver, D. K. & Runyon, J. B. (2002).** Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 148(11), 3737-3741.
- Daugulis, A. J. et C. M. Mccracken (2003).** « Microbial degradation of high and low molecular weight polyaromatic hydrocarbons in a two-phase partitioning bioreactor by two strains of *Sphingomonas* sp.» *Biotechnol Lett* 25 (17): 1441-1444.
- Dean-Ross, D., Moody, J.D., Freeman, J.P., Doerge, D.R., Cerniglia, C.E., (2001).** Metabolism of anthracene by a *Rhodococcus* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 205–211.

- Dibble, J.T. and Bartha, R., (1979).** Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 729-739.
- El-Kadi, A.I., (2001).** Modeling hydrocarbon biodegradation in tidal aquifers with water-saturation and heat inhibition effects. *Journal of Contaminant hydrology* 51, 97-125.
- El –Sayed M. El-Morsy. (2005).** Evaluation of microfungi for the bioremediation of diesel oil in egypt. *Land Contamination & Reclamation*, 13(2).147-159.
- Elshafie Abdulkadir., AlKindi Abdulaziz Yahya., Al-Busaidi Sultan., Bakheit Charles., Albahry S.N.,(2007).** Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman. *Marine Pollution Bulletin* 54:1693.
- Emtiazi, G., Hassanshahian, M., Golbang, N., (2005).** Development of a microtiter plate method for determination of phenol utilization, biofilm formation and respiratory activity by environmental bacterial isolates. *Int. Biodeter. Biodegr.* 56, 231–235.
- Fell J.W. (1967).** Distribution of yeasts in the Indian Ocean. *Bull Mar Sci*,17,454-470.
- Fernandez-Linares, L., Acquaviva, M., Bertrand, J.C. and Gauthier, M., (1996).** Effect of sodium chloride concentration on growth and degradation of eicosane by marine halotolerant bacterium. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus*. *Systematic and Applied Microbiology* 19, 113-120.
- Ferrai B., Planque J.F. (2003).** Protocole d'étude d'impact du sentier sous marin de banyuls. *Rencontres sur les sentiers sous marins. Les actes. Hyères, 27/30 mars 2002, Montpellier.*116p.

**Galagan J.E.,** Calvo S.E., Borkovich K.A., Selker E.U., Read N.D., Jaffe D., FitzHugh W., Ma L.J., Smirnov S., Purcell S., Rehman B., Elkins T., Engels R., Wang S., Nielsen C.B., Butler J., Endrizzi M., Qui D., Ianakiev P., Bell-Pedersen D., Nelson M.A., Werner-Washburne M., Selitrennikoff C.P., Kinsey J.A., Braun E.L., Zelter A., Schulte U., Kothe G.O., Jedd G., Mewes W., Staben C., Marcotte E., Greenberg D., Roy A., Foley K., Naylor J., Stange-Thomann N., Barrett R., Gnerre S., Kamal M., Kamvysselis M., Mauceli E., Bielke C., Rudd S., Frishman D., Krystofova S., Rasmussen C., Metzenberg R.L., Perkins D.D., Kroken S., Cogoni C., Macino G., Catcheside D., Li W., Pratt R.J., Osmani S.A., DeSouza C.P., Glass L., Orbach M.J., Berglund J.A., Voelker R., Yarden O., Plamann M., Seiler S., Dunlap J., Radford A., Aramayo R., Natvig D.O., Alex L.A., Mannhaupt G., Ebbole D.J., Freitag M., Paulsen I., Sachs M.S., Lander E.S., Nusbaum C., Birren B. (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. 422: 859-868.

**Gao Z, Li B, Zheng C & Wang G (2008).** Molecular detection of fungal communities in the Hawaiian marine sponges *Suberites zeteki* and *Mycale armata*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 6091–6101.

**Gao Z, Johnson ZI & Wang G (2010).** Molecular characterization of the spatial diversity and novel lineages of mycoplankton in Hawaiian coastal waters. *The ISME journal* 4: 111–120.

**GESAMP** (Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection), (1993). Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment. GESAMP Report 50.

**Genilloud O., Pelaez F., Gonzalez I., Diez M. T. (1994).** Diversity of actinomycetes and fungi on seaweeds from the Iberian coasts *Microbiologia* vol.10,n4, pp.413-422(20ref).

**Ghanavati, H., Emtiazi, G., Hassanshahian, M., (2008).** Synergism effects of phenol degrading yeast and ammonia oxidizing bacteria for nitrification in coke wastewater of Esfahan Steel Company. *Waste Manage. Res.* 26 (2), 203–208.

- Gleason FH & Lilje O (2009).** Structure and function of fungal zoospores: ecological implications. *Fungal Ecology* 2: 53–59.
- Goswani, P. and Singh, D.H., (1991).** Different modes of hydrocarbons up-take by two *Pseudomonas* species. *Biotechnology and Bioengineering* 37, 1-11.
- Gonzalez M.C., Herrera t., Ulloa M., Hanlin R.T. (1998).** Abundance and diversity of microfungi in three coastal beaches of Mexico. *Mycoscience*, 39, 115- 121.
- Gómez Gesteira, J.L. et Dauvin, J.-C. (2000).** Amphipods are good bioindicators of the impact of oil spills on soft-bottom macrobenthic communities. *Marine pollution bulletin* 40, 1017-1027.
- Golubic S, Radtke G & Le Campion-Alsumard T (2005).** Endolithic fungi in marine ecosystems. *Trends in Microbiology* 13: 229–235.
- Gray,W.D, Pinto,P.V.C et Pathek, SG.(1963).** Growth of fungi in sea water medium. *Appl.Microbiol.*, 11,501-505.
- Grishchenkov VG, Townsend RT, McDonald TJ, Autenrieth RL, Bonner JS and Boronin AM, (2000).** Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochem.*, 35(9) : 889-896.
- Guggenberger, G., Pichler, M., Hartmann, R. & Zech, W. (1996).** Polycyclic aromatic hydrocarbons in different forest soils : Mineral horizons. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 159(6), 565-573.
- Guieyesse, B. et G. Viklund (2005).** « sequential UV-biological degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in two-phases partitioning bioreactors” *Chemosphere* 59(3): 369-376.
- Gutiérrez MH, Pantoja S, Tejos E & Quinones RA (2011).** The role of fungi in processing marine organic matter in the upwelling ecosystem off Chile. *Marine Biology* 158: 205-219.

- Hambrick, G.A., DeLaune, R.D. and Patrick, W.H.Jr., (1980).** Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation. *Applied Environmental Microbiology* 40, 365-369.
- Hawksworth D.L., sutton B.C., Ainsworth G.C (1995).** Ainsworth and bisby's dictionary of the fungi. Commonwealth mycological institute, kew.
- Hassanshahian Mehdi., Tebyanian Hamid., Cappello Simone (2012).** Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin* 64. 1386–1391.
- Hommel, R.K.,(1994).** Formation and function of biosurfactant for degradation of water insoluble substrates. In: Ratledge, C. (Ed.). *Biochemistry of microbial degradation*. Dordrecht, Boston. Kluwer Academic Publisher, 63-87.
- Hughes, G., Hughes, C. (1975).** Studies of fungi in oceans and estuaries since 1961. 1. Lignicolous, Caulicolous and Follicolous species. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 13: 69-180.
- Hurst, C.J., Sims, R.C., Sims, J., Sorensen, D.L., McLean, J.E. and Huling, S., (1996).** Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation as a function of oxygen tension in contaminated soils. *Journal of Hazardous materials* 51, 193-208.
- Husaini .A , Roslan H. A, Hii K. S. Y, Ang C. H (2008).** Biodegradation of aliphatic hydrocarbon by indigenous fungi isolated from used motor oil contaminated sites. *World J Microbiol Biotechnol* 24:2790–2791.
- Hyde KD, Jones EBG, Leana E, Pointing SB, Poonyth AD et al. (1998)** Role of fungi in marine ecosystems. *Biodiversity and Conservation* 7: 1147–1161.
- Hyde, K.D.; Gareth-Jones, E.B.; Leano, E.; Pointing, S.B.; Poonyth, A.D.& Vrijmoed, L.L.P. (1998).** Role of fungi in marine ecosystems. *Biodivers. Conserv.*, 7: 1147-1161.

- Hyde KD, Bussaban B, Paulus B, Crous PW, Lee S et al. (2007)** Diversity of saprobic microfungi. *Biodiversity and Conservation* 16: 7–35.
- Imhoff JF, Labes A & Wiese J (2011)** Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. *Biotechnology Advances* 29: 468–482.
- Isabelle lafortune, (2007)**,étude de la diversité d'un consortium bactérien capable de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans un système biphasique,p6.
- Jebaraj CS & Raghukumar C (2009)** Anaerobic denitrification in fungi from the coastal marine sediments off Goa, India. *Mycological Research* 113: 100–109.
- James MO and Kleinow KM, (1994)**. Trophic transfert of chemicals in the aquatic environment. In *Aquatic toxicology: Molecular, biochemical and cellular perspectives* (Malins DC and Ostrander GK, eds), 69-92. Lewis, London.
- Jauzein M., Feix I. et Wiart J. (1995)**. "Les micropolluants organiques dans les boues résiduairees des stations d'épuration urbaines." ADEME Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, Angers, 115 p.
- Jennings D.H., Lysek G. (1996)**. Fungal biology: understanding the fungal lifestyle. (Bios Scientific publishers eds).
- Johnny GASPERI. (2006)**. « Introduction et transfert des hydrocarbures à différentes échelles spatiales dans le réseau d'assainissement parisien.» p : 21-22.
- Jones EBG (2011)** Fifty years of marine mycology. *Fungal Diversity* 50: 73–112.
- Juhasz, A. L. et R. Naidu (2000)**. « Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons : a review of the microbial degradation of benzo(a) pyrène.» *Int Biodeterior Biodegradation* 45:57-88.
- Judith L., Andrea C., Valeria S., Andriana S., Maria Let Ronaldo S. (2002)**. petroleum degradation by filamentous fungi. Centre de technologie mineral. Rio de Janeiro. Brésil.

- Kawakita S., Van uden N. (1965).** Occurrence and population densities of yeast species in the digestive tracts of gulls and terns. *J Gen Microbial*,39,125-129.
- Kaplan, N., Zosim, Z. and Rosenberg, E., (1987).** Reconstitution of emulsifying activity of *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 Emulsan by using pure polysaccharide and protein. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 440-446.
- Kanally, R. A. et S. Harayama (2000).** “ Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria” *J Bacteriol* 182(8): 2059-2067.
- Kanally, R.A. et H.G. Hur (2006).** « Growth of *Phanerochaete chrysosporium* on diesel fuel hydrocarbons at neutral pH.” *Chemosphere* 63 (2): 202-211.
- Kaiser, J. (2001).** *Bioindicators and Biomarkers of Environmental Pollution and Risk Assessment* (Enfield: Sciences publishers inc.).
- Kerry BR (2000)** Rhizosphere interactions and three exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 38:423- 441.
- Khudyakova, Y.V.; Pivkin, M.V.; Kuznetsova, T.A. et Svetashev V.I. (2000).** Fungi in sediments of the sea of Japan and their biologically active metabolites. *Microbiology*, 69 (5): 722-726.
- Knezovich JP, Harrison FL and Wilhelm RG, (1987).** The bioavailability of sediment-sorbed organic chemicals: a review. *Water Air Soil Pollut.*, 32 : 233-45.
- Kohlmeyer, J. et Kohlmeyer, E. (1979).** *Marine mycology: the higher fungi*. New York: Academic press, 689p.
- Kohlmeyer, J. et Kohlmeyer, E. (1995).** Decomposition of mangrove wood by marine fungi and teredinids in Belize. *Mar.Ecol.*, 16 (1): 27-39.
- Kutty S.N., Philip R. (2008).** Marine yeasts-a review. *Yeast*, 25,465-483.

- Kwon-chung K.J., Bennet J.E. (1992).** Medical mycology. Lea and febiger, Philadelphia.
- Landrum PF and Robbins JA, (1990).** Bioavalibility of sediment-associated contaminants to benthic invertebrates. In Sediments: Chemistry And Toxicity of In-place Pollutants (Bando R, Giesy JP Jr and Muntau H, eds), , 237–263. Lewis Publishers, Inc, Ann Arbor.
- Lan H. T. (2009).** Destruction par voie électrochimiques d’hydrocarbures aromatiques polycycliques contenus dans des matrices fortement contaminées. Thèse de doctorat. Univ. Québec. Canada.
- Leahy, J.G. and Colwell, R.R., (1990).** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews 54, 305-315.
- Lei, A. P., Z. L. Hu, Y. S. Wong et N. F. Tam (2007).** « Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. » Bioresour Technol 98 (2): 273-280.
- Liberra et Lindequist,(1995).** Liberra, K. & Lindequist, U. Marine fungi-A profilic resource of biologically active natural products. Pharmazie, 1995,50: 583-588.
- Lipiatou E, Tolosa I, Simo R, Bouloubassi I, Dachs J, Marti S, Sicre MA, Bayona JM, Grimalt J O, Saliot A and Albaige’s J, (1997).** *Deep-Sea Res.* Part II, 4 : 881-905.
- Li J. et Chen B.H, (2002),** Solubilization of model polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants, *Chemical Engineering Science*, 57, (14), 2825-2835.
- Lougheed, L.W., Edgar, G.J. and Snell, H.L. (2002).** *Biological impacts of the Jessica oil spill on the Galápagos environment.* Puerto Ayora, Galápagos, Ecuador, Charles Darwin Foundation, 127 p.

- Lutzoni F., Kauff F., Cox C.J., McLaughlin D., Celio G., Dentinger B., Padamsee M., Hibbett D., James T.Y., Baloch E., Grube M., Reeb V., Hofstetter V., Schoch C., Arnold A.E., Miadlikowska J., Spatafora J., Johnson D., Hambleton S., Crockett M., Shoemaker R., Sung G.H., Lücking R., Lumbsch T., O'Donnell K., Binder M., Diederich P., Ertz D., Gueidan C., Hansen K., Harris R.C., Hosaka K., Lim Y.W., Matheny B., Nishida H., Pfister D., Rogers J., Rossman A., Schmitt I., Sipman H., Stone J., Sugiyama J., Yahr R., Vilgalys R.** Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. (2004). *American Journal of Botany*. 91: 1446–1480.
- Marin, M., Pedregosa, A., Rios, S. and Laborda, F., (1996).** Study of factors influencing the degradation of heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. *International Biodeterioration and Biodegradation* 27, 69-75.
- Manee, P., Prayad, P., Edward, S., Upatham, A., Ladda, T., (1998).** Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic. *Biodegradation* 9, 83–90.
- Ma, B., Chen, H., Xu, M., Hayat, T., He, Y. & Xu, J. (2010b).** Quantitative structure-activity relationship (QSAR) models for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) dissipation in rhizosphere based on molecular structure and effect size. *Environmental Pollution*, 158(8), 2773-2777.
- Mahé S., (2012),** Diversité des branches évolutives basales du règne des champignons dans les écosystèmes hydrothermaux marins profonds. P17.
- McElroy AE, Farrington JW and Teal JM, (1990).** Influence of mode of exposition and the presence of a tubicolous polychaete on the fate of benz[a]anthracene in the benthos. *Environ. Sci. Technol.*, 24(11) : 1648-1655.
- McNeill J, Barrie FR, Burdet HM, Demoulin V, Hawksworth *et al.* (eds.) (2006)** International Code of Botanical Nomenclature (Vienna Code): adopted by the Seventeenth International Botanical Congress Vienna, Austria, July 2005. *Regnum Vegetabile* 146, A.R.G. Gantner Verlag KG, Ruggell, Liechtenstein.: [i]-xviii, 1-568.

- Menzie C.A., Potocki B.B. et Santodonato J., (1992)**, Exposure to carcinogenic PAHs in the environment, *Environ. Sci. Technol.*, 26, (7), 1278-1284.
- Meador JP, (2003)**. Bioaccumulation of PAHs in marine invertebrates. In (Douben PET ed) *PAHs: An ecotoxicological perspective*, 147-172. *Ecological and Environmental Toxicology Series*, Wiley, UK.
- Mesbaiah FZ & Badis A ,(2013)**. Traitement biologique des milieux aquatiques contaminés par les hydrocarbures aromatiques polycycliques. *Revue scientifique et technique*. p49.
- Mill T, Mabey WR, Lan BY and Baraze A, (1981)**. Photolysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Chemosphere*, 10 : 1281-1290.
- Morin O., (1994)**, *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encycl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), *Maladies infectieuses* 8-600-A-10.
- Mohn, W.W. and Stewart, G.R., (2000)**. Limiting factors for hydrocarbons at low temperature in Arctic soils. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1161-1172.
- Moufok. N. (2005)**. Etat de la pollution bactériologique de la corniche oranaise, cas des plages d'Ain El Turck, de Bousfer, et de Maddagh. Mémoire de Magister, Université d'Oran, 93p.
- Moody, J.D., Freeman, J.P., Cerniglia, C.E., (2005)**. Degradation of benz[a]anthracene by *Mycobacterium vanbaalenii* strain PYR-1. *Biodegradation* 16, 513–526.
- Mueller GM & Schmit JP (2007)** Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation* 16: 1–5.
- National Research Council (U.S.), (2002)**. Oil in the sea: inputs, fates and effects. National Academy of Science, Washington DC.

- Neff JM, (1985).** Polycyclic aromatic hydrocarbons. In *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications* (Rand GM and Petrocelli SR, eds), 416-454. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA.
- Notar M., Leskovsek H. et 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): 36-44.
- Ould Boudia A., Hammad K. (2011).** Biodégradation du pétrole brut en mer par enterobacter cloacae, eschaerchia coli et pseudomonas spp. *Rev. Microbiol. Ind. San et environn.* Vol 5, n1, 133-146.
- Parniske M. (2008).** **Arbuscular mycorrhiza:** the mother of plant root endosymbioses. *Nature reviews. Microbiology* 6: 763–775.
- Passarini Michel R.Z.; Rodrigues Marili V.N.; da Silva Manuela., Sette Lara D. (2011).** Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. *Marine Pollution Bulletin* 62:364–370.
- Perry, J.J., (1979).** Microbial cooxidation involving hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 43, 59-72.
- Peay KG, Kennedy PG & Bruns TD (2008)** Fungal community ecology: A hybrid beast with a molecular master. *BioScience* 58: 799–810.
- Pines, O. and Gutnick, D., (1986).** Role of emulsan in Growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on crude oil. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 661-663.
- Prince, R.C., (1993).** Petroleum spill bioremediation in marine environment. *Crit. Rev. Microbiol.* 19 (4), 217–242.
- Pitt J.I., (1988),** Laboratory guide to common *Penicillium* species, Academia Press editor, London.
- Pitt J.I., (2000),** Toxicogenic fungi and mycotoxins, *Br. Med. Bull.*, 56 (1), 184 – 192.



- Polglase, J.L.; Alderman, D.J. & Richards, R.H. (1986).** Aspects of the progress of mycotic infections in marine animals, In: The biology of marine fungi. Londres: Moss, S.T., Cambridge University Press, pp.155-164.
- Powell MJ (1993)** Looking at mycology with a Janus face – A glimpse at Chtridiomycetes active in the environment. *Mycologia* 85: 1-20.
- Preetha B. and Viruthagiri T., (2005).** Biosorption of zinc (II) by *Rhizopus arrhizus*: equilibrium and kinetic modeling, *Afr. J of Biotech.*, 4(6), 506-508.
- Raper K., Fennell D.J., (1965),** The genus *Aspergillus*”, Williams and Wilkins editors, Baltimore.
- Ratledge, C., (1978).** Degradation of aliphatic hydrocarbons. In: Watkinson, R.J.(Ed.), Development in biodegradation of hydrocarbons. Applied Sciences Publishers. Vol. 1., pp 1-46. London.
- Raghukumar C (2000)** Fungi from marine habitats: an application in bioremediation. *Mycological research* 104: 1222-1226
- Ravelet C, Krivobok S, Sage L and Steiman R, (2000).** Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere*, 40: 557-563.
- Rees,G. et Jones, E.B.G. (1985).**The fungi of a coastal sand dune system. *Bot. Mar.*, 28,213-220.
- Redecker D (2002)** New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil record. *Research in Microbiology* 153: 125–130.
- Rinaldi M. G. (1989).** Emerging opportunists. *Infectious Disease Clinics of North America*. 3: 65-76.
- Rice CA, Myers MS, Willis ML, French BL and Casillas E, (2000).** From sediment bioassay to fish biomarker - connecting the dots using simple trophic relationships. *Mar. Environ. Res.*, 50 : 527-533.

- Rike, A.G., Haugen, K.B., Borrensen, M., Engene, B. and Kolstad, P., (2003).** In situ biodegradation of petroleum hydrocarbons in frozen arctic soils. *Cold Region Science and technology* 907, 1-24.
- Richards TA., Jones MDM., Leonard G & Bass D (2012)** Marine fungi: their ecology and molecular diversity. *Annual Review of Marine Science* 4: 495–522.
- Rontani, J.F., Bosser-Joulak, F., Rambeloarisoa, E., Bertrand, J.C., Giusti, G. and Faure, R., (1985).** Analytical study of Ashtart crude oil asphaltenes biodegradation. *Chemosphere* 14, 1413- 1422.
- Roquebert M.F, (1998),** Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d’observation ; Identification”, in “*Moisissures des aliments peu hydratés*”, Ed. Tec & Doc, 39-95.
- Röling, W.F.M., Head, I.M. and Larter, S.R., (2003).** The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Research in Microbiology* 154, 321-328.
- Rossmann A., Schmitt I., Sipman H., Stone J., Sugiyama J., Yahr R., Vilgalys R. (2004).** Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American Journal of Botany*. 91: 1446–1480.
- Saliot, A., (1981).** Natural hydrocarbons in sea water. In : Duursma, E.K. and Dawson, R. (Eds.), *Marine organic chemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp. 327-374.
- Sandvik, S., Lode, A. and Pederson, T.A., (1986).** Biodegradation of oily sludge in Norwegian soils. *Applied Microbiology Biotechnology* 23, 297-301.
- Sallenave, C. (1999).** Etude de la flore fongique des zones conchylicoles de l’estuaire de la Loire, recherché de souches toxigènes. Th. : Pharmacie : Université de Nantes, 1999, 194 p.
- Samanta S.K., Singh O.M. et Jain R.K., (2002),** Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation – review, *Trends in Biotechnology*, 20, (6), 243- 248.

- Saraswathy A, Hallberg R (2005).** Mycelial pellet formation by *Penicillium ochrochloron* species due to exposure to pyrene. *Microbiol Res* 160:375–383.
- Santos EO, Centeno da Rosa CF, dos Passos CT, Sanzo AVL, de Medeiros Burkert JF, Kalil SJ et al (2008)** Pre-screening of filamentous fungi isolated from a contaminated site in Southern Brazil for bioaugmentation purposes. *Afr J Biotechnol* 7(9):1314–1317.
- Schwarz, J.R., Walker, J.D. and Colwell, R.R., (1974).** Hydrocarbon degradation at ambient and in situ Pressure. *Applied Microbiology* 28, 982-986.
- Schwarz, J.R., Walker, J.D. and Colwell, R.R., (1975).** Deep-sea bacteria: growth and utilization of nhexadecane at in situ temperature and pressure. *Canadian Journal of Microbiology* 21, 682- 687.
- Schaumann, K. (1993)** Marine pilze. In : *Mikrobiologie des meeresbodens*. Meyer-Reil L.A. und Köster M. Jena : Gustav Fischer Verlag, 144-195.
- Sempels, J.-M. (2008).** Les hydrocarbures et les côtes. In Laforest, S., *Technique d'évaluation et de restauration des rives* (chap. 4-7). Îles-de-la-Madeleine (Québec). Montréal, Environnement Canada, Section des urgences environnementales, multi pagination.
- Sims, R. C. & Overcash, M. R. (1983).** Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. . *Residue Reviews*(68), 1-68.
- Sikkema, J., de Bont, J.A.M. and Poolman, B., (1994).** Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal of Bacteriology* 269, 8022-8028.
- Smith S.E., Read D.J. (1997).** Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, Cambridge.
- Smith SE, Facelli E, Pope S & Smith FA (2010)** Plant performance in stressful environments: interpreting new and established knowledge of the rôles of arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* 326: 3-20.

- Song, H.G., Wang, X. And Bartha, R., (1990).** Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 652-656.
- Soclo H. H., Garrigues P. et 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): 387-396.
- Soltani Mohamed,(2004),** Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone,p 23.
- Sridhar, K.R.& Prasannarai, K. (2001).** Biogeography and biodiversity of higher marine fungi in tropics-A review. *Ecol. Env.& Cons.*, 7(3): 219-234.
- Srogi, K. (2007).** Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters* 5, 169-195.
- Steele C. W. (1967).** Fungus populations in marine waters and coastal sands of Hawaiian, Line, and Phoenix Islands. *Pac. Sci*, 21, 317-331.
- Stanley, S.J. (1992).** Observations on the seasonal occurrence of marine endophytic and parasitic fungi. *Can. J. Bot.*, 70: 2089-2096.
- Strohl W. (1997).** Industrial antibiotics : today and the futur. In WR. Ed *Bio/technology of antibiotics*. Marcel Dekkr, New York. 1-47.
- Stajich JE, Berbee ML, Blackwell M, Hibbett DS, James TY et al. (2009)** The fungi. *Current Biology* 19: R840–R845.
- Sugiura K, Ishihara M, Shimauchi T and Harayama S, (1997).** Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci. Technol.*, 31: 45-51.
- Sutton D.A., Fothergill A. W., Rinaldi M.G. (1998).** Guide to clinically significant fungi. Williams and wilkins, Baltimore. 417p.

- Taysi I., Van uden N. (1964).** Occurrence and population densities of yeast species in an estuarine- marine area. *Limnol oceanogr*, 9, 42-45.
- Tagger, S., Deveze, L. and LePetit, J., (1976).** The conditions for biodegradation of petroleum hydrocarbons at sea. *Marine Pollution Bulletin* 7, 172-174.
- Tabuc C., (2007),** flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines, p16.
- Turgeon, M., Delisle, S., & Drouin, K. (2008).** Champignon de la pourriture blanche. Unpublished manuscript.
- U.S. National Academy of Sciences, (2003).** Oil in the sea III: inputs, fates, and effects. National Research Council. The National Academies Press.
- Van uden N., Branco R.C.(1963).** Distribution and population densities of yeast species in pacific water, air, animals, and kelp off southern California. *Limnol oceanogr*, 8, 323-329.
- Van Dover CL, Ward ME, Scott JL, Underdown J, Anderson B et al. (2007)** A fungal epizootic in mussels at a deep-sea hydrothermal vent. *Marine Ecology* 28: 54–62.
- Venosa AD, Suidan MT, Wrenn BA, Strohmeier KL, Haines JR, Eberhart BL, King D and Holder E, (1996).** Bioremediation of an Experimental Oil Spill on the Shoreline of Delaware Bay. *Environ. Sci. Technol.*, 30 : 1764-1775.
- Verdin, A., Sahraoui, A.L., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A., Durand, R., (2006).** Effect of the high polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo[a]pyrene, on the lipid content of *Fusarium solani*. *Mycological Research* 110, 479–484.
- Vogel C., Rogeron A., Schatz S., Laubach H., Taliman A., Fell J. (2007).** Prevalence of yeasts in beach sand at three bathing beaches in south Florida. *Water Res*, 41, 1915-1920.

- Ward, D.M. and Brock, T.D., (1978).** Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology* 35, 353-359.
- Wardle DA & Van der Putten WH (2002)** Biodiversity, ecosystem functioning and above-groundbelow- ground in *Biodiversity and ecosystem functioning: synthesis and perspectives*. Loreau M, Naeem S & Inchausti P, eds. Oxford University Press.
- Walworth, J., Braddock, J. and Woolard., (2001).** Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soil. *Cold Region Science and Technology* 32, 85-91.
- Walworth, J.L., Woolard, C.R and Harris, K.C., (2003).** Nutrient amendments for contaminated periglacial soils: use of code bone meal as a controlled release nutrient source. *Cold Region Science and Technology* 430, 1-8.
- White MM, James TY, O'Donnell K, Cafaro MJ, Tanabe Y & Sugiyama J (2006)** Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. *Mycologia* 98: 872–884.
- Wilcke, W., Amelung, W., Martius, C., Garcia, M. V. B. & Zech, W. (2000).** Biological Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Amazonian Rain Forest. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163(1), 27-30.
- Wilcke, W., Krauss, M. & Amelung, W. (2002).** Carbon isotope signature of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): evidence for different sources in tropical and temperate environments? *Environmental Science & Technology*, 36(16), 3530-5.
- Wilcke, W., Krauss, M., Lilienfein, J. & Amelung, W. (2004).** Polycyclic aromatic hydrocarbon storage in a typical Cerrado of the Brazilian savanna. *Journal of Environmental Quality*, 33(3), 946-55.

- Wilcke, W. (2007).** Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. *Geoderma*, 141(3-4), 157-166.
- Woese C., Fox G. (1977).** “Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms”. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74 (11), 5088-90.
- Wolfgang, W. (2000).** SYNOPSIS Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soil - a Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163(3), 229-248.
- Wolfgang, W., Martin, K., Gabriela, B., ccaron & iková. (2003).** Persistent organic pollutant concentrations in air- and freeze-dried compared to field-fresh extracted soil samples of an eastern Slovak deposition gradient. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 166(1), 93-101.
- Wu Yi-Rui, Luo Zhu-Hua, Vrijmoed I.I.p. (2010).** Biodegradation of anthracene and benz[a]anthracene by two *Fusarium solani* strains isolated from mangrove sediments. *Bioresource Technology*, 101, 9666–9672.
- Yuste L, Corbella ME, Turiégano MJ, Karlson U, Puyet A and Rojo F, (2000).** Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS Microbiology Ecology*, 32(1): 69-75.
- Yamagata K., Fujita T. (1970).** Studies on yeasts isolated from sake-cake pickle and soya-mash: (I) Identification and salt-tolerance of yeasts. *Ferment Technol*, 48, 485-492.
- Zepp RG and Schlotzhauer PF, (1979).** Photoreactivity of selected aromatic hydrocarbons in water. In *Polynuclear aromatic hydrocarbons* (Jones PW and Leber P, eds), 141-158. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI.
- Zhang, Y. and Miller, R.M., (1992).** Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* Rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3276-3282.
- Zinjarde S.S and Pant A.A. (2002).** Hydrocarbon degraders from tropical marine environments. *Marine Pollution Bulletin* 44: 118–121.

**ZoBell, C.E., (1969).** Microbial modification of crude oil in the sea. In: Proceedings of joint conferences on prevention and control of oil spills. American. Petroleum. Institute. Washington, D.C., pp. 317-326.

Rapport-gratuit.com   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

# ANNEXE

---

## Milieu d'isolement

### ▪ Milieu Sabouraud-chloramphénicol

Glucose.....	40 g
Peptone.....	10 g
Agar .....	15 g
Chloramphénicol.....	0,5g
Eau de mer .....	1000 ml

Ph = 5,6

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes

Milieu prêt à l'emploi

## Milieu pour la dégradation en milieu liquide

### ▪ Milieu Czapek-Dox modifié

NaNO <sub>3</sub> .....	3 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1 g
MgSO <sub>4</sub> .....	0,5 g
KCl.....	0,5 g
FeSO <sub>4</sub> .....	0,01 g
Eau de mer.....	1000 ml

Ph = 7,3

Autoclavage : 120°C pendant 20 minutes.

## Résumé

L'élimination du pétrole de l'environnement marin nécessite l'intervention de différents facteurs biotiques et abiotiques. Parmi ces facteurs, la biodégradation par les microorganismes et en particulier les champignons. L'objectif de notre travail est d'isoler et d'identifier les souches fongiques présentes dans l'eau de mer prélevées du port d'Oran, puis étudier leurs capacités dans la biodégradation des hydrocarbures. Les prélèvements ont été effectués mensuellement pendant une durée de 6 mois. 5 genres de champignons filamenteux ont été identifiés : *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria* et *Acremonium*. Tous les isolats fongiques purs obtenus et identifiés, ont été soumis à l'examen préalable en évaluant le taux de croissance de chacun des isolats fongiques sur un milieu contenant 1% de pétrole brut. *Penicillium*, *Cladosporium* et *Aspergillus niger* sont les seules souches qui ont démontré une croissance importante. Ces dernières souches fongiques ont été aussi sélectionnées pour leur potentiel de biodégradation des hydrocarbures et soumises à un biotest et un test de dégradation en milieu liquide. Le biotest est réalisé durant 20 jours d'incubation, en fonction de deux paramètres : le temps et la concentration du pétrole brut. Le test de dégradation en milieu liquide avec le pétrole brut comme seule source de carbone est effectué pendant une période de 30 jours. Parmi ces trois isolats fongiques sélectionnés, le genre *Penicillium* présente un degré élevé de biodégradation que celui de *Cladosporium* et d'*Aspergillus niger*. Les résultats démontrent que les champignons isolés peuvent être exploités dans la biodégradation du pétrole brut et sont considérées comme des cibles intéressantes pour la bioremédiation des milieux salins, comme l'océan et les sédiments marins contaminés par des hydrocarbures.

### Mots clés :

Biodégradation; Pétrole Brut; Champignons Filamenteux; *Penicillium*; *Cladosporium*; *Aspergillus Niger*; Biotest; Biosurfactant; Eau De Mer; Port d'Oran.