
LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviation	Signification
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr 16S	ADN codant la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal
BAF	Facteur de bioaccumulation
BFC	Facteur de bioconcentration
BHSM	Bushnell and Haas Mineral Salt medium
BHIB	Bouillon Coeur Cervele
BET	Bromure d'éthidium
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C23O	L'enzyme catéchol 2,3-dioxygénase
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
pb	Paire de bases
pH	Potential d'hydrogène
PNUE	Programme des Nations Unies pour l'Environnement
UPS	Unité Pratique de Salinité
dNTP	Désoxyribonucléotides triphosphates
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
Glu	Glutamine
HAPs	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
His	Histidine
HMW	High molecular weight
LMW	Low molecular weight
MES	Matières en suspension
MT	Marqueur de taille
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
NCBI	National Centre for Biotechnology Information
ND	Non Déterminé
NED	N-(1-naphtyl)-ethylenediamine-dihydrochloride
NET	Noire d'Eriochrome T
NTU	Nephelometric Turbidity Unit

P	Pétrole
PDB	Protein data Bank
pH	Potentiel d'Hydrogène
Phe	Phénanthrène
ppm	partie par million
PCR	Polymerase Chain Reaction
qsp	Quantité suffisante pour
SDS	Sodium Dodécyl Sulfate
sp.	Espèce non précise
SS	<i>Salmonella-Shigella</i>
SMFC	Sedimentary microbial fuel cells
TBE	Tris-Borate-EDTA
TDS	Total des solides dissous
TH	Titre hydrométrique
Tris	Tris-hydroxy-méthyl-aminométhane
TSI	Test Triple Sugar Iron
UFC	Unité Formant Colonie
UV	Ultra-Violet
<u>Unités de mesure :</u>	
h, min, s	Heure, minute, seconde
l, ml, µl	Litre, millilitre, microlitre
mM	Milli-molaire
rpm	Rotation par minute
U	Unité
m/v	Masse à volume
ppt	Part Per Thousand ou ‰
UPS	Unité Pratique de Salinité
S/m	Siemens par mètre
v/v	Volume à volume
C°	Celsius
km, cm, mm, nm, µm	kilomètre, centimètre, millimètre, nanomètre, micromètre
g, mg, µg	Gramme, milligramme, microgramme

SOMMAIRE

I. INTRODUCTION	01
II. Partie 01 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	03
1. CARACTERISTIQUES DU BASSIN MEDITERRANEEN	04
2. LES FACTEURS ANTHROPIQUES DE LA POLLUTION MEDITERRANEENNE	04
- Littoralisation, urbanisation et industrialisation.....	04
3. PRESSION ENTROPIQUE SUR LE LITTORAL ALGERIEN	04
4. VOIX DE CONTAMINATION DU MILIEU MARIN	05
4.1. Trafic maritime.....	05
4.2. Tourisme et activités entropiques.....	06
5. POLLUANTS MAJEURS EN MEDITERRANEE	06
5.1. Les métaux et leurs sources en Méditerranée.....	07
5.2. Contaminations de la Méditerranée par les hydrocarbures.....	08
- Contamination du littoral Algérien par les hydrocarbures.....	09
6. Biodisponibilité des hydrocarbures	09
• Bioconcentration.....	10
• Bioaccumulation.....	11
• Bioamplification.....	11
7. LE PORT D'ORAN	11
8. LES HYDROCARBURES	13
8.1. Définition des hydrocarbures.....	13
8. 2. Sources des hydrocarbures en milieu marin.....	14
8. 2. 1. Les hydrocarbures naturels.....	14
8. 2. 2. Les hydrocarbures d'origine anthropique.....	15
A. Rejets industriels et domestiques des hydrocarbures.....	15
B. Activités pétrolières.....	15
C. Déversement accidentel des hydrocarbures.....	15
8.3. Les familles des hydrocarbures.....	17
8.3. 1. Les hydrocarbures aliphatiques.....	17
A. Les hydrocarbures aliphatiques saturés.....	17
B. Les hydrocarbures aliphatiques insaturés.....	17
C. Les hydrocarbures aliphatiques cycliques saturés.....	18
8.3.2. Les hydrocarbures aromatiques.....	18
- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs).....	18
8.3.3. Les asphaltènes.....	20
8.3.4. Les composés polaires (résines).....	21
8.4. Le pétrole brut.....	21

9. DEVENIR DES HYDROCARBURES EN MILIEU MARIN.....	23
Dispersion et dégradation biotiques et abiotiques des hydrocarbures.....	23
9.1. Facteurs abiotiques.....	23
• L'évaporation.....	23
• La photo-oxydation.....	23
• L'émulsification.....	23
• La dissolution.....	24
• La sédimentation.....	24
9.2. Facteurs biotiques.....	26
• La biodégradation.....	26
• Pénétration dans la chaîne alimentaire.....	26
10. CONSEQUENCES DE LA POLLUTION MARINE PAR LES	
HYDROCARBURES SUR LA BIOCENOSE.....	27
11. TOXICITE DES HAPS.....	28
12. BIOTECHNOLOGIES ACTUELLES POUR LA REMEDIATION DE LA	
CONTAMINATION PAR LES HAPS DANS L'EAU ET LES SEDIMENTS	
MARINS.....	28
12.2. Biostimulation.....	29
12.3. Bioaugmentation.....	30
12.4. Combinaison Biostimulation et Bioaugmentation.....	30
12.5. Phytoremédiation.....	30
12.6. Biorestauration des sédiments par l'amendement du charbon noir.....	33
12.7. Méthodes bioélectrochimiques pour la surveillance de la biorestauration in situ	
des sédiments.....	33
12.8. Restaurations des sédiments marins par combinaison de plusieurs méthodes...	34
13. TECHNOLOGIES D'INTERVENTION ACTUELLES EN CAS DE	
DEVERSEMENT D'HYDROCARBURES EN MILIEU MARIN.....	35
13.1. Stratégies physiques et chimiques actuelles (non microbiennes) pour les	
interventions d'urgence en cas de déversement d'hydrocarbures en milieu marin.....	36
13.2. Stratégies biotechnologiques (microbiennes) pour les interventions en cas de	
déversement d'hydrocarbures en milieu marin.....	38
14. PROCESSUS GENERAUX DE BIODEGRADATION DES HAPS.....	40
14.1. La dégradation primaire (Minéralisation).....	40
14.2. Le co-métabolisme des substrats.....	40
15. LES MECANISMES D'ACTION DES MICROORGANISMES.....	41
15.1. Les enzymes.....	41
15.1.1. Les oxygénases.....	42
Les dioxygénases.....	43
La catéchol 2,3-dioxygénase.....	44
15.1.2. Les enzymes lignolytiques.....	45
15.1.3. Les enzymes hydroxylases.....	47
15.2. Les biosurfactants.....	47
Le rôle des biosurfactants dans la biodégradation des hydrocarbures.....	48

16. MODE D'ACCESSION AUX HYDROCARBURES	49
16.1. La solubilisation.....	49
16.2. L'accension interfaciale.....	50
16.3. L'accension interfaciale facilitée (émulsification).....	50
16.4. Le transfert micellaire.....	50
17. LES ESPECES HYDROCARBONOCLATES	50
17.1. Les espèces Bactériennes.....	50
17.2. Les espèces fongiques.....	52
17.3. Les espèces d'algues et de microalgues.....	52
18. VOIES METABOLIQUES DE LA DEGRADATION DES HYDROCARBURES	52
18.1. Voies métaboliques de la dégradation aérobie des hydrocarbures aliphatiques.....	52
18.1.1. Dégradation des n-alcanes.....	52
a. L'oxydation monoterminale.....	52
b. Oxydation des n-alcanes par le système de dioxygénase.....	53
C. Oxydation des alcanes en alcènes.....	54
D. Oxydation subterminale.....	54
E. Oxydation diterminale.....	54
18.1.2. Biodégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques et des polyaromatiques (HAPs).....	55
A. Biodégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques à deux cycles aromatiques.....	57
B. Biodégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques à trois cycles aromatiques.....	58
C. Biodégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques à quatre cycles aromatiques.....	61
D. Biodégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques à cinq cycles aromatiques.....	61
E. Mécanisme métabolique des HAPs en coopération bactérienne en consortium (co-metabolisme).....	62
18.2. Voies biologiques anaerobies.....	64
19. FACTEURS PHYSIQUES ET CHIMIQUES AFFECTANT LA BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES	67
III. Partie 02 : MATERIEL ET MÉTHODES	68
1. ECHANTILLONNAGE	68
2. CARACTERISATION DU MILIEU ECOLOGIQUE	68
2.1. Analyses physico-chimiques.....	68
2.1.1. Température.....	69
2.1.2. Détermination du Potentiel d'Hydrogène (pH).....	69
2.1.3. Détermination de la conductivité.....	69

2.1.4. Mesure de la de la turbidité (Norme ISO 7027).....	69
2.1.5. Détermination des matières en suspension (Norme ISO 9001).....	69
2.1.6. Mesure le TDS (Total des solides dissous) (Norme ISO 9001).....	70
2.1.7. Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO) (Norme ISO 9001).....	70
2.1.8. Détermination de la demande biochimique en oxygène (DBO ₅) (Norme ISO 9001).....	71
2.1.9. Calcul du taux de biodégradation (Norme ISO 9 408).....	72
2.1.10. Oxydabilité par le permanganate de potassium (matières organiques) (Norme ISO 8467).....	73
2.1.11. Dosage des hydrocarbures totaux par chromatographie (GC-FID) (Norme ISO 9377-2).....	73
2.1.12. Détermination du titre d'alcalinité complet (TAC) (Norme ISO 9001).....	75
2.1.13. Titre hydrométrique (TH) (Norme ISO 9001).....	76
2.1.14. Dosage du nitrate (NO ₃ ⁻) (Norme ISO 9001).....	76
2.1.15. Dosage de nitrite (NO ₂ ⁻) (Norme ISO 6777).....	76
2.1.16. Détermination de la dureté calcique (Norme ISO 9001).....	77
2.1.17. Détermination du taux de Magnésium (Mg ²⁺) (Norme ISO 9001).....	78
2.1.18. Dosage des ions sulfate (SO ₄ ²⁻) (Norme ISO 9001).....	78
2.1.19. Dosage des ions chlorure (Cl ⁻) (Norme ISO 9001).....	78
2.2. Analyses microbiologiques.....	79
2.2.1. Dénombrement de la microflore totale.....	79
2.2.2. Production de la biomasse hydrocarbonoclaste et dénombrement.....	79
3. ETUDE DES BACTERIES HYDROCARBONOCLASTES	80
Enrichissement, présélection, isolement et purification des bactéries hydrocarbonoclastes.....	80
3.1. Examen macroscopique des colonies.....	81
3.2. Examen microscopique des colonies.....	81
Coloration de Gram.....	81
3.3. Conservation des bactéries hydrocarbonoclastes.....	81
4. CRIBLAGE DES SOUCHES POTENTIELLEMENT HYDROCARBONOCLASTES	82
Criblage moléculaire : Etude du polymorphisme des fragments de restriction (PCR-RFLP) du gène de l'ADNr 16S.....	82
4.1. Extraction de l'ADN génomique.....	83
4.2. Vérification de la qualité et de la quantité d'ADN.....	83
4.3. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose et visualisation.....	83
4.4. Amplification du gène de l'ARNr 16S par PCR.....	84
4.5. Double digestion enzymatique de l'ADNr 16S (RFLP).....	84
4.6. Électrophorèse des produits de PCR-RFLP.....	85
5. IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE, PHYSICOCHIMIQUE ET MOLECULAIRE DES SOUCHES HYDROCRBONOCLASTES SELECTIONNEES	85

5.1. Identification biochimique et physiologique des souches bactériennes sélectionnées.....	85
5.1.1. Études des enzymes respiratoires.....	86
a. Recherche de l'oxydase.....	86
b. Recherche de la catalase.....	86
5.1.2. Type respiratoire sur milieu viande-foie (VF) (Fluka).....	86
5.1.3. Test de mobilité (croissance sur milieu mannitol-mobilité).....	87
5.1.4. Test de fermentation du lactose, Glucose, saccharose et production de gaz sur milieu TSI (Triple Sugar Iron) (Fluka).....	87
5.1.5. Test d'utilisation de citrate (milieu citrate se Simmons) (Fluka).....	89
5.1.6. Croissance sur milieu King (King A et King B).....	89
5.1.7. Croissance sur milieu Chapman (Fluka).....	89
5.1.8. Croissance sur le milieu Bouillon lactosé au BCP (BCPL/ coche de Durham)..	90
5.1.9. Croissance sur milieu bouillon indole-mannitol (Schubert/cloche de Durham).	90
5.1.10. Croissance sur milieu bouillon infusion cœur cervelle (BHIB) (Fluka).....	91
5.1.11. Croissance sur le milieu SS (Gélose <i>Salmonella-Shigella</i>).....	91
5.2. Identification moléculaire et analyse phylogénétique des souches bactériennes hydrocarbonoclastes sélectionnées.....	91
5.2.1. Choix du gène de l'ADNr 16S.....	92
5.2.2. Extraction d'ADN génomique.....	92
5.2.3. Amplification de l'ADNr 16S, séquençage et analyse phylogénétique.....	92
6. ANALYSE BIOINFORMATIQUE ET THERMODYNAMIQUE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES FRAGMENTS D'ARNr 16S.....	93
7. ANALYSE FONCTIONNELLE DES ISOLATS SELECTIONNEES.....	93
7.1. Etude du gène codant pour l'enzyme catechol 2,3-dioxygénase (C23O).....	93
7.2. Analyses bioinformatiques et modélisation 3D de la structure de l'enzyme catechol 2,3-dioxygénase (C23O).....	95
8. OPTIMISATION DES SOUCHES HYDROCARBONOCLASTES SELECTIONNEES.....	95
8.1. Effet du pH.....	96
8.2. Effet de la température.....	96
8.3. Effet de la concentration en NaCl.....	96
9. CINETIQUE DE CROISSANCE DES SOUCHES SELECTIONNEES EN CULTURE SIMPLE ET EN CONSORTIUM DANS LE PETROLE BRUT....	96
10. ANALYSE ET TRAITEMENT DES RESULTATS.....	97
10.1. Traitements statistiques.....	97
10.2. Analyse des patterns moléculaires.....	97
IV. Partie 03 : RESULTATS ET DISCUSSION.....	98
1. CARACTERISATION DU MILIEU ECOLOGIQUE.....	98
1.1. Analyses physico-chimiques.....	98
1.2. Analyse bactériologique.....	105

Dénombrement de la microflore totale et de la microflore hydrocarbonoclaste.....	105
2. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES SOUCHES BIODEGRADANTES DES HYDROCARBURES.....	105
3. CRIBLAGE ET PRESELECTION DE SOUCHES BACTERIENNES HYDROCARBONOCALATES.....	108
4. SELECTION MOLECULAIRE DES SOUCHES HYDROCARBONOCALATES ISOLEES PAR PCR-RFLP.....	110
4.1. Extraction de l'ADN génomique et amplification de l'ADNr 16S.....	110
4.2. Double digestion enzymatique et mise en évidence du polymorphisme de restriction de l'ADN 16S amplifié.....	111
5. IDENTIFICATION DES QUATRE SOUCHES SELECTIONNEES.....	115
5.1. Etude morphologique.....	115
5.2. Caractérisation biochimique des isolats.....	119
5.3. Identification moléculaire des souches hydrocarbonoclastes sélectionnées par amplification et séquençage d'ADNr 16S.....	122
6. ANALYSE BIOINFORMATIQUE ET THERMODYNAMIQUE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES FRAGMENTS D'ARNr 16S.....	138
7. CARACTERISATION FONCTIONNELLE DES SOUCHES BACTERIENNES HYDROCARBONOCALATES SELECTIONNEES.....	143
7.1. Étude du gène codant pour l'enzyme catechol 2,3-dioxygénase (C23O).....	143
7.2. Analyse bioinformatique et modélisation de la structure 3D de l'enzyme catechol 2,3-dioxygénase (C23O).....	146
8. EFFET DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES SUR LA DEGRADATION DES HYDROCARBURES.....	151
8.1. Effet de température sur la croissance des souches sélectionnées.....	152
8.2. Effets du pH sur la croissance des souches hydrocarbonoclastes sélectionnées..	153
8.3. Tolérance des souches sélectionnées au NaCl.....	154
9. ETUDE DU POTENTIEL DE DEGRADATION.....	155
Cinétiques de croissance des souches bactériennes sélectionnées dans le pétrole brut en cultures simple et en consortium.....	155
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	158
VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	160
VII. ANNEXES.....	208
VIII. PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES.....	230

Introduction

INTRODUCTION

Le transport maritime dans les ports est source de composés toxiques pour les organismes vivants, de par leur dispersion dans la colonne d'eau et leur accumulation dans les sédiments marins. Ce sont principalement des composés organiques tels que les hydrocarbures (les fiouls, les essences, les carburants, gasoils, kérosène, et les huiles), qui se déversent suites à des manipulations de moteurs ou de procédures de nettoyage de réservoirs et autres installation ou alors d'accidents divers. Ces contaminants sont souvent absorbés sur des particules et enfouis dans les sédiments des ports, augmentant leur concentration par accumulation. Les sédiments agissent non seulement comme pièges à contaminants, mais peuvent également libérer lentement ces toxines par diffusion dans la colonne d'eau. Ils peuvent aussi être transportés vers les écosystèmes environnants, ce qui a un impact direct sur la vie autochtone. Et donc, impacte directement les activités humaines dans ces zones, y compris la pêche.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont les composés les plus récalcitrants et dangereux. Ces polluants sont mutagènes et cancérigènes (Li et *al.*, 2014 ; Muthusamy et *al.*, 2018 ; Meng et *al.*, 2019 ; McCarrick et *al.*, 2019).

Les moyens d'élimination chimiques et physiques ont leurs limites du fait de leur coût et de leur impact secondaire, parfois aggravant sur l'environnement. En effet, le dragage par exemple, souvent préconisé pour le nettoyage des ports, remettrait en suspension les toxines enfuis dans les sédiments.

L'élimination naturelle de ces polluants xénobiotiques, essentiellement par les microorganismes, existe dans ces milieux, mais est inhibée de par la forte concentration et accumulation de ces substances, surtout au niveau de ces espaces confinés que sont les ports et pêcheries, où le renouvellement des eaux reste très faible. La bioremédiation est une stratégie importante, utilisant des activités biologiques pour l'élimination rapide et efficace des polluants environnementaux, mais reste tributaire du seuil de concentration en polluants, et du type de microorganismes présents dans le milieu.

Lors de ce travail nous nous sommes intéressés au port d'Oran. On a fait d'abords une étude physico-chimique des sédiments du port d'Oran, afin d'évaluer l'état de contamination du milieu, puis nous nous sommes attelés à mettre en évidence les bactéries présentes dans ce milieu et pressentant des activités hydrocarbonoclastes. Une fois isolées, ces microorganismes ont été identifiés et leur physiologie est caractérisée et suivie, en vue d'optimiser leur utilisation

seules ou en culture mixte en bioremédiation.

A l'heure où une large conscience écologique se développe dans notre société, la connaissance des propriétés de biodégradabilité des bactéries indigènes apparaît comme un enjeu essentiel, pour permettre l'utilisation de ces microorganismes pour la biorestauration des sites contaminés. Notre thèse s'inscrit dans cette optique.

Partie 01

Synthèse bibliographique

1. CARACTERISTIQUES DU BASSIN MEDITERRANEEN

La mer Méditerranée est un bassin semi-fermé constituant un espace étroit avec une superficie de 2,6 millions de km², soit 0,8% de la surface des eaux océaniques. La Méditerranée est entourée de trois continents ; l'Europe, l'Asie et l'Afrique, dont les côtes accueillent 22 pays et plus de 460 millions d'habitants, desquels 130 millions environ, c'est-à-dire 35%, vivent dans les zones côtières (PNUE/PAM-Plan Bleu, 2009). Elle est délimitée par un littoral qui se déroule sur environ 46000 km (EEA, 2006). La mer Méditerranée est quasi fermée dont les seules liaisons sont le détroit de Gibraltar avec l'océan Atlantique, les détroits des Dardanelles et du Bosphore, avec la mer Noire, et le canal de Suez, ouverture artificielle, vers la mer Rouge (Fig. 01). Sa profondeur atteint rapidement plus de 2000 m sur l'ensemble du bassin maritime avec des fosses de plus de 5000 m (OPECST, 2011).

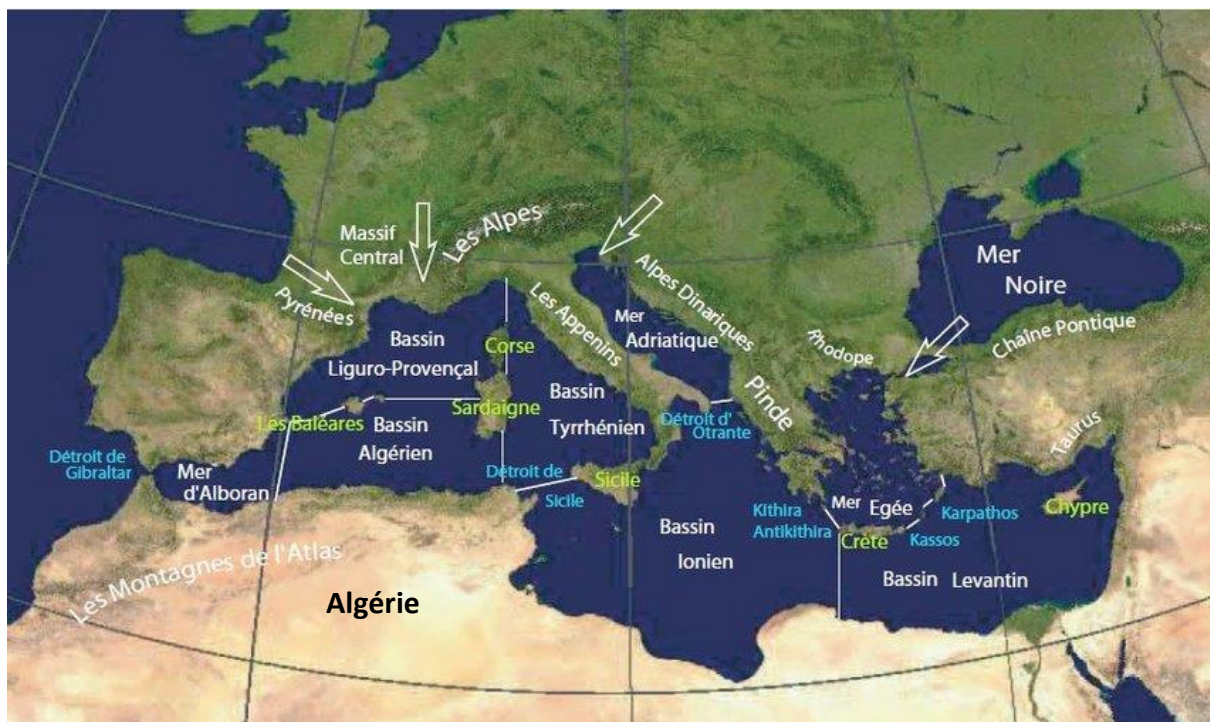


Figure 01 : Carte de la mer Méditerranée.

Le rapport entre le volume aquatique de la mer Méditerranée et ses débits permet d'estimer un taux de renouvellement total des eaux à une moyenne de 100 ans (OPECST, 2011). Ces mouvements hydriques créent des courants dont la mécanique est liée principalement aux différences de température et de salinité : les eaux les plus salées ou les plus froides circulent en profondeur.

La mer Méditerranéenne présente une grande diversité biologique avec plus de 25000 espèces

de végétaux, 650 espèces d'animaux marins soit 7 à 8 % des espèces marines connues dont 19 des 80 espèces connues de cétacés. L'inventaire effectué par la FAO y dénombre 1526 espèces d'utilisation alimentaire dont 240 poissons osseux, 55 crustacés, 51 végétaux marins, 46 bivalves (PNUE/PAM-Plan Bleu, 2009 ; OPECST, 2011). Cette richesse reste cependant fragile, de par l'agression permanente de cet écosystème par les polluants d'origine divers. Les hydrocarbures et les composés d'origine pétrolière, tout particulièrement les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), sont parmi les contaminants les plus toxiques et les plus abondants dans la nature où ils s'accumulent dans les sédiments. Les zones côtières constituent de véritables réservoirs de polluants menaçant les écosystèmes et la santé humaine.

La mer Méditerranée est l'un des bassins semi-fermés les plus pollués au monde. Des millions de tonnes de déchets toxiques sont jetés directement en mer par l'industrie. D'autres facteurs tel que le transport maritime, la pollution urbaine et agricole avec les effets du tourisme contribuent à la dégradation de ce bassin engendrant des effets nuisibles sur la faune et la flore (Grimes, 2003 ; Mille et *al.*, 2007 ; Grimes, 2010). La côte algérienne étant le deuxième plus grand balcon sur la méditerranée après la Libye n'y est pas épargnée.

2. LES FACTEURS ANTHROPIQUES DE LA POLLUTION MEDITERRANEENNE

Littoralisation, urbanisation et industrialisation

De 1970 à 2000, la population méditerranéenne est passée de 285 millions à 427 millions d'habitants soit une croissance de 50% en 30 ans dont 14 % pour les pays de la rive Nord et 101% de croissance pour les pays des rives Est et Sud (OPECST, 2011).

Le processus de littoralisation, soit la concentration des hommes et des activités sur les littoraux, est initialement engagé par la migration des populations rurales des arrière-pays vers les zones côtières. Cette densification des littoraux atteint aujourd'hui des stades avancés sur certains rivages des côtes méditerranéennes (Liziard, 2013), notamment les pays nord-africains du sud de la méditerranée dont les déserts sahariens restent difficilement habitables surtout en ces périodes de réchauffement climatique. Cette pression démographique et tous les aménagements qui en découlent impliquent la fragilisation des milieux naturels et notamment le milieu marin.

3. PRESSION ENTROPIQUE SUR LE LITTORAL ALGERIEN

Au cours de ces dernières années, la population algérienne a augmenté de 50 %, avec 22 millions d'habitants en 1985 et 33 millions en 2005 et 42,23 millions en 2018 (Perspective monde ; <http://perspective.usherbrooke.ca>). Environ 45% de cette population est concentrée sur une très petite ligne du littoral, en particulier dans les zones industrielles et portuaires, comme

Oran, Arzew, Alger, Annaba et Skikda (Grimes, 2005 ; Grimes et *al.*, 2010). La côte a une densité de population de 281 habitants / km² par rapport à la densité de population nationale, qui est de 12,2 habitants / km². De plus, cette population côtière augmente considérablement pendant la période estivale, en particulier dans les zones côtières, d'Oran, Mostaganem, Jijel, Bejaia, Ain Temouchent, Tipaza et Boumerdès (Grimes et *al.*, 2010).

Les sources de pollution les plus importantes sont : i) les déchets domestiques ; ii) rejets industriels chimiques et pétrochimiques, y compris les métaux lourds, les hydrocarbures et les composés organiques (par exemple, acide sulfurique, chlore, substances chromiques, azote, cyanide, chlore, soude, pesticides) ; iii) décharge de centrales thermiques, y compris eau chaude et chlore ; et iv) les apports de sol provenant des grandes surfaces agricoles (Grimes, 2003 ; Grimes et *al.*, 2010).

4. VOIX DE CONTAMINATION DU MILIEU MARIN

4. 1. Trafic maritime

La situation géographique de la mer Méditerranée fait d'elle un carrefour d'échanges maritimes entre l'Europe, l'Asie et l'Afrique. Cette route maritime permet le transport des personnes et des marchandises surtout les produits pétrochimiques et énergétiques alimentant le vieux continent à partir des pays du Golfe (Ghiara et Caminati, 2017 ; Moura et *al.*, 2018). En effet, la Méditerranée concentre 30 % du commerce maritime mondial (Rosa-Jiménez et *al.*, 2018). Les capacités de transport maritime en circulation en Méditerranée ont augmenté de plus de 50%, entre 1997 et 2006 (Plan Bleu, 2010 ; PSEM, 2013), et de 18 % entre 2006 et 2015 (CNUCED, 2016). La croissance annuelle du transport de pétrole s'est élevée à 6 % du transport maritime ; elle est de 7 à 8 pour le transport de gaz naturel liquéfié, et de 10 % pour les conteneurs. Le fort taux de croissance du trafic des conteneurs est dû au développement des échanges avec l'Europe et l'Asie (Plan Bleu, 2010).

En outre, environ 150 Mt de pétrole partent d'Afrique du Nord (Libye, Algérie) vers, principalement, la France et l'Italie. L'Algérie et la Libye sont aussi deux gros exportateurs de gaz par navires méthaniers et par gazoducs (PSEM, 2013).

Le transport maritime représente l'une des plus importantes sources de pollution par les hydrocarbures. Outre, la nature des produits concernés, la pollution chronique par les hydrocarbures et la menace réelle d'un accident pétrolier majeur dans une mer semi-fermée font qu'il constitue un facteur de risque non négligeable. Les rejets des bateaux en mer peuvent être volontaires ou accidentels du fait de collisions, d'avaries, d'échouages, de chute de

conteneurs ou de pertes de filets, de cordes et de lignes. Les rejets volontaires sont dus au fonctionnement des navires. Ils peuvent être licites ou non, et concernent tous types de produits dont surtout des hydrocarbures (CGDD-SOeS, 2011). Il est estimé qu'environ 220000 navires de plus de 100 tonnes se croisent en Méditerranée chaque année, déversant 250000 tonnes d'hydrocarbures (EEA, 2006). Ce déversement est le résultat d'opérations de navigation telles que :

- **le dégazage** : opération consistant à débarrasser une cuve de carburant ou de pétrole brut, des gaz et traces de produit qui subsistent une fois la cuve vidée ;
- **le déballastage** : vidange des ballasts pour corriger l'assiette d'un navire. Ces ballasts pouvant être des cuves à carburant remplies d'eaux souillées ;
- **le rejet des résidus d'huile et de carburant** : résidus dus au filtrage du fioul lourd avant son utilisation comme carburant, eaux huileuses provenant des séparateurs...

Environ 80000 tonnes d'hydrocarbures ont été déversées accidentellement dans la mer Méditerranée et dans ses parages durant la période 1990-2005 en raison d'accidents de la navigation (EEA, 2006).

4.2. Tourisme et activités entropiques

Les écosystèmes marins méditerranéens sont particulièrement sensibles aux apports anthropiques de contaminants et de particules en raison de la nature oligotrophe de ses eaux. Cette oligotrophie est toutefois responsable de la qualité de l'eau qui, associée aux températures et à la position géographique, confère à certaines parties des côtes méditerranéennes d'importantes ressources touristiques. Le tourisme peut devenir l'une des principales sources de bien-être socio-économique dans certaines zones de la Méditerranée qui attirent une forte concentration d'industries liées au tourisme sur des points spécifiques. Ces activités développées au cours des cinquante dernières années se sont développées de manière incontrôlée, affaiblissant la santé des écosystèmes environnants (Plan PNUE / PAM, 2009).

5. POLLUANTS MAJEURS EN MEDITERRANEE

La pollution du bassin méditerranéen est causée par les rejets d'origine naturelle ou anthropique arrivant en mer par les fleuves, l'air, le drainage des territoires littoraux ou par rejet direct en mer (navires et émissaires de rejet en mer). Les polluants ont des origines diverses et prennent différentes formes : sacs plastiques, conteneurs tombés d'un navire, nappes d'hydrocarbures, matières organiques, nitrates, métaux lourds, substances pharmaceutiques, pesticides...

Les rivières, les estuaires, les mers côtières et les abysses forment un continuum écologique où les polluants transitent. D'après le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE), plus de 80 % de la pollution des mers proviennent de la terre via les fleuves ou par ruissellement et déversement à partir des zones côtières. Près de 20 % des pollutions marines ont pour origine les activités en mer dont les rejets d'hydrocarbures ou d'autres substances chimiques, les pertes de cargaison ou les immersions de déchets et les rejets atmosphériques (CGDD-SOeS, 2011).

Le faible renouvellement des eaux rend la mer Méditerranée un écosystème très vulnérable à l'accumulation de ces polluants. Les apports en polluants y sont, en dehors d'accidents ponctuels, de nature diffuse et chronique (González-Fuenzalida *et al.*, 2019). Parmi les nombreux composés arrivant dans le milieu marin, les micropolluants, composés métalliques et organiques présents à l'état de traces, sont susceptibles d'avoir une action toxique pour les organismes présents (Hu *et al.*, 2019). Bien que ces molécules soient présentes à de faibles concentrations, certains composés récalcitrants, en raison de leur nature et de leurs propriétés, peuvent alors s'accumuler dans les sédiments, pour devenir persistants dans l'environnement et fortement bioaccumulables au travers de la chaîne trophique (Gu *et al.* 2019). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), et les métaux lourds sont parmi les polluants les plus fréquemment rencontrés dans ces environnements côtiers (Tang *et al.*, 2018).

5.1. Les métaux et leurs sources en Méditerranée

A la différence de la plupart des contaminants organiques, les métaux lourds sont des constituants naturels dans les roches et dans les gisements minéraux. Ces composés sont souvent retrouvés à l'état de traces (moins de 0,1%) dans l'environnement (Alloway et Ayres, 1997 ; Callender, 2003 ; Elmorsi *et al.*, 2019), dans lequel ils sont introduits par l'intermédiaire de phénomènes naturels tels que l'érosion, l'activité volcanique ou les dépôts atmosphériques. Par ailleurs, les propriétés thermiques et électriques de ces composés en font des éléments de choix dans de nombreuses activités humaines, favorisant ainsi leur dispersion dans l'environnement (Callender, 2014 ; Giovanella *et al.*, 2019).

D'après l'inventaire « National Baseline Budget » (Bilan Bases Nationales, BBN), mené dans les pays méditerranéens, les émissions atmosphériques de métaux sont principalement liées à l'industrie cimentière (Hg, Cu), à la production d'énergie (As, Cd, Ni), et à la métallurgie (Pb, Zn). Les rejets aquatiques semblent être principalement liés à l'industrie des engrais (Hg, As, Pb), à la métallurgie (Ni, Zn) et aux usines de traitements des eaux usées (Cd, Cu), auxquels s'ajoute une part non négligeable provenant du secteur de l'énergie et de l'industrie chimique.

Quant au raffinage pétrolier, il représente la principale source de rejet de chrome dans l'eau comme dans l'atmosphère (UNEP/MAP/MED POL, 2012).

Les métaux rencontrés dans l'environnement peuvent être classés selon leur caractère essentiel ou non. Un métal est considéré comme essentiel lorsqu'il remplit des fonctions biochimiques bien précises dans l'organisme et que son absence entraîne l'apparition de symptômes pathologiques qui disparaissent lorsque le composé est à nouveau présent (Kucuksezgin et *al.*, 2006 ; Elmorsi et *al.*, 2019). Inversement, un élément métallique est dit non-essentiel lorsqu'on ne lui connaît aucune fonction biologique particulière. Généralement ces composés entraînent des effets toxiques délétères à partir de concentrations pouvant être très faibles (Ben Ghnaya et *al.*, 2009 ; Hu et *al.*, 2019).

5.2. Contaminations de la Méditerranée par les hydrocarbures

Les hydrocarbures et les composés d'origine pétrolière, tout particulièrement les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), sont parmi les contaminants les plus toxiques et les plus abondants dans la nature où ils s'accumulent dans les sédiments. Les zones côtières constituent de véritables réservoirs de polluants menaçant les écosystèmes et la santé humaine (Murray et Penning, 2018 ; Drwal et *al.*, 2019). Ainsi, L'environnement marin est le compartiment le plus touché par la pollution aux hydrocarbures. Ces composés xénobiotiques constituent le polluant organique le plus abondant dans les mers et les océans, qui induit une contamination des écosystèmes, qu'elle soit ponctuelle (accidents de marées noires) ou chronique (rejets industriels et urbains, apports agricoles, combustion de produits pétroliers, charbon, bois) (Sun et *al.*, 2018 ; Hsieh et *al.*, 2019).

La Méditerranée est considérée comme une des surfaces marines les plus affectées par la contamination pétrolière. Le littoral méditerranéen est notamment le siège d'une pollution récurrente inquiétante par les hydrocarbures pétroliers, car il reçoit le quart des rejets pétroliers mondiaux (environ 80 000 tonnes /an). Ce chiffre équivaut à une quantité de pétrole cumulée équivalente à environ 11 catastrophes du Prestige par an, concernent cette mer quasi-fermée, dont le taux de renouvellement des eaux est d'environ 100 ans (Mille et *al.*, 2007). Par conséquent, les activités anthropiques conduisent à leur dispersion dans les environnements marins, provoquant des modifications de l'environnement aquatique, ainsi que des conséquences graves sur les écosystèmes et la santé humaine (Tang et *al.*, 2018 ; Yu, et *al.*, 2019).

Ainsi, la pollution par les métaux lourds et les hydrocarbures présentent des dangers certains

pour la Méditerranée à court et à long terme (Chatzinikolaou et *al.*, 2018 ; González-Fuenzalida et *al.*, 2019).

Contamination du littoral Algérien par les hydrocarbures

Plus de 10.000 navires traversent chaque année les côtes Algériennes. Certes, ils sont une source de revenus inestimable pour les économies de tous les pays, mais ils sont aussi responsables de la pollution qui risque de provoquer un véritable « désastre écologique » au niveau du littoral maghrébin, en général, et algérien en particulier. L'Algérie, dont les côtes s'étendent sur environ 1200 km, est exposée aux risques de déversement d'hydrocarbures et d'autres fuites de substances nocives ou dangereuses (Grimes et *al.*, 2010). Ainsi, 150 millions de tonnes d'hydrocarbures y sont transportées chaque année sur les 500 millions de tonnes/an d'hydrocarbures transportées au total en mer méditerranée, ce qui correspond au transit de 1800 pétroliers par an. Aussi, plus de 50 millions de tonnes d'hydrocarbures empruntent chaque année les terminaux pétroliers des principaux ports algériens (Arzew, Bethioua, Bejaia et Skikda), avec d'importantes fuites en mer (10 000 tonnes/an) (Feknous et *al.*, 2017).

De plus, pas moins de 30 % du trafic maritime mondial passent par la mer Méditerranée, ce qui pourrait constituer l'un des premiers risques de pollution de l'eau de mer par des hydrocarbures, et que 50 % des accidents en mer sont liés à des hydrocarbures, alors que 300 accidents ont été enregistrés au cours des 20 dernières années en Méditerranée (28 novembre 2018, <http://www.ministerecommunication.gov.dz>).

En outre, il est à noter que le "dé-mazoutage" et le déballastage et la vidange des huiles et lubrifiants des bateaux se pratiquent à proximité du littoral sans contrôle sérieux. Il est fréquent en effet de constater la présence du gasoil et autres produits hydrocarbures sur les plages algériennes. Mais heureusement, il n'y aurait jamais eu de marées noires ni de déversements de produits chimiques spectaculaires près des côtes algériennes (Algérie, Ministère de la communication, 28 novembre 2018, <http://www.ministerecommunication.gov.dz>).

6. Biodisponibilité des hydrocarbures

La biodisponibilité des hydrocarbures dépend des propriétés intrinsèques des molécules et des caractéristiques physico-chimiques du milieu. Dans l'eau, les hydrocarbures sont présents sous forme dissoute, sous forme adsorbée et/ou complexée sur la matière organique dissoute et sous forme adsorbée sur les particules en suspension (Yunker et *al.*, 2015 ; Li et *al.*, 2019). Les matières organiques présentes en milieu marin peuvent avoir une origine naturelle ou anthropique. Par conséquent, elles ont différentes natures et peuvent avoir ainsi différentes

influences sur la biodisponibilité des hydrocarbures qui leurs sont adsorbés. La matière organique naturelle est constituée principalement de substances humiques et elle est faiblement dégradable, alors que celle d'origine anthropique, moins hydrophobe et moins stable, est plus facilement dégradée, ce qui peut rendre les hydrocarbures plus biodisponibles (Lu et *al.*, 2019 ; et Maletić *al.*, 2019). La biodisponibilité des hydrocarbures varie à travers la colonne d'eau, et entre des systèmes peu ou très profonds. Les hydrocarbures, en raison de leur caractère hydrophobe, ont tendance à s'accumuler facilement dans les sédiments où ils peuvent atteindre des concentrations 3 à 4 fois plus élevées que dans les eaux surnageantes (Notar et *al.*, 2001). La séquestration des hydrocarbures dans les sédiments a été mise en évidence dans différentes études (Perelo et *al.*, 2010 ; González-Fuenzalida et *al.*, 2019 ; Kahkashan et *al.*, 2019). Pour les HAPs, Elle se fait par piégeage dans les micropores et par les interactions avec les couches aromatiques de la matière organique (Jonker et Koelmans, 2002). Les composés de faible masse moléculaire (origine pétrogénique) se retrouvent plutôt en phase dissoute et ceux de haut poids moléculaire (origine pyrolytique) sont préférentiellement adsorbés sur la phase particulaire réduisant ainsi leur disponibilité envers les organismes (Cailleaud et *al.*, 2007 ; Yakan et *al.*, 2017). La granulométrie peut influencer les phénomènes d'adsorption des hydrocarbures sur le sédiment et donc influencer leur distribution relative. Les particules les plus fines sont généralement enrichies en HAPs de plus grande masse moléculaire relativement aux fractions de sédiment plus grossières enrichies en HAPs de plus faible masse moléculaire (Dachs et *al.*, 1997).

Les hydrocarbures sont majoritairement présents dans la phase particulaire de la colonne d'eau. Cependant, certains facteurs peuvent augmenter la solubilité de ces contaminants comme la température, la présence de matière organique dissoute, les phénomènes de photo-oxydation ou la présence de microorganismes dégradant ces composés en une forme plus soluble. Par conséquent, tous les paramètres ayant un effet sur ces processus comme le pH ou la salinité auront également un impact sur la solubilité des hydrocarbures (Hsieh et *al.*, 2019).

- **Bioconcentration**

La voie de pénétration la plus rapide étant une pénétration par simple absorption des polluants se trouvant dans l'eau de mer à travers la surface de contact et de respiration (branchies, siphons respiratoires) (Fisher, 1995). Une bioconcentration de ces polluants au niveau tissulaire est ainsi possible. Le facteur de bioconcentration (BFC) peut être définie comme le rapport de la concentration d'un polluant dans un organisme à sa concentration dans l'eau : dans le cas des hydrocarbures (HC) par exemple, on aura : $BFC = [HC]_{\text{organisme}} / [HC]_{\text{eau}}$. Il n'y a

véritablement bioconcentration que si $BFC > 1$. Ce facteur dépend de la nature des contaminants et particulièrement de leur caractère hydrophobe (Zarco-Fernández et *al.*, 2018).

- **Bioaccumulation**

Le facteur de bioaccumulation (BAF) est calculé pour estimer la fraction d'un contaminant issu du sédiment accumulé par un organisme (rapport entre la concentration du contaminant dans l'organisme et la concentration du contaminant dans le sédiment). Dans le cas des contaminations en HAPs, les particules les plus fines sont les plus enrichies en HAPs de haut poids moléculaire. Les organismes benthiques, vivant au contact ou à proximité des sédiments, seront exposés à un milieu enrichi en HAPs de plus haut poids moléculaire et les moins solubles (Yakan et *al.*, 2017 ; Jiang et *al.*, 2019 ; Yu et *al.*, 2019).

- **Bioamplification**

Si la concentration du contaminant connaît un accroissement au fur et à mesure qu'il circule vers les maillons supérieurs d'un réseau trophique on parle de bioamplification qui peut être considérée comme un cas particulier de la bioaccumulation (Fisher, 1995).

7. LE PORT D'ORAN

Le port d'Oran (Fig. 02) est à vocation mixte : commercial ainsi qu'un grand port de pêche. Il occupe la partie centrale de la baie d'Oran. Ce port comprend 8 bassins et une imposante digue artificielle de 3.3 km de longueur. Le port d'Oran est le premier à accès maritime à grande profondeur (Benali et *al.*, 2015) .



Figure 02 : Vue panoramique du port d’Oran.

La ville d’Oran a connus une forte pression entropique et un élargissement remarquable de puis 1970 à l’heure actuelle (Buform et *al.*, 2019), ce qui aggrave la pollution marine et particulièrement celle du port d’Oran, et la rend chronique par les rejets urbains qui déversent directement dans le port. En effet, au niveau du port d’Oran il y’a des points important de rejets. On dénombre huit émissaires urbains déversant à l’intérieur du port d’Oran, et trois autres points de déversement plus important débouchant à l’extérieur du port (Fig. 03). Outre que le flux important de navires qui déversent des quantités importantes d’hydrocarbures dans le port d’Oran, les déversements urbains accroit la pollution en hydrocarbures, et particulièrement les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Ces composés xénobiotiques toxiques et cancérigènes, d’une grande lipophilicité, sont très persistants et récalcitrant à la dégradation, tendent à s’accumuler dans les sédiments marins, mettant en danger tous l’écosystème marin (Bouloubassi et *al.*, 2006 ; Marini et Frapiccini, 2013 ; Kumar et *al.*, 2017 ; Ma et *al.*, 2017).

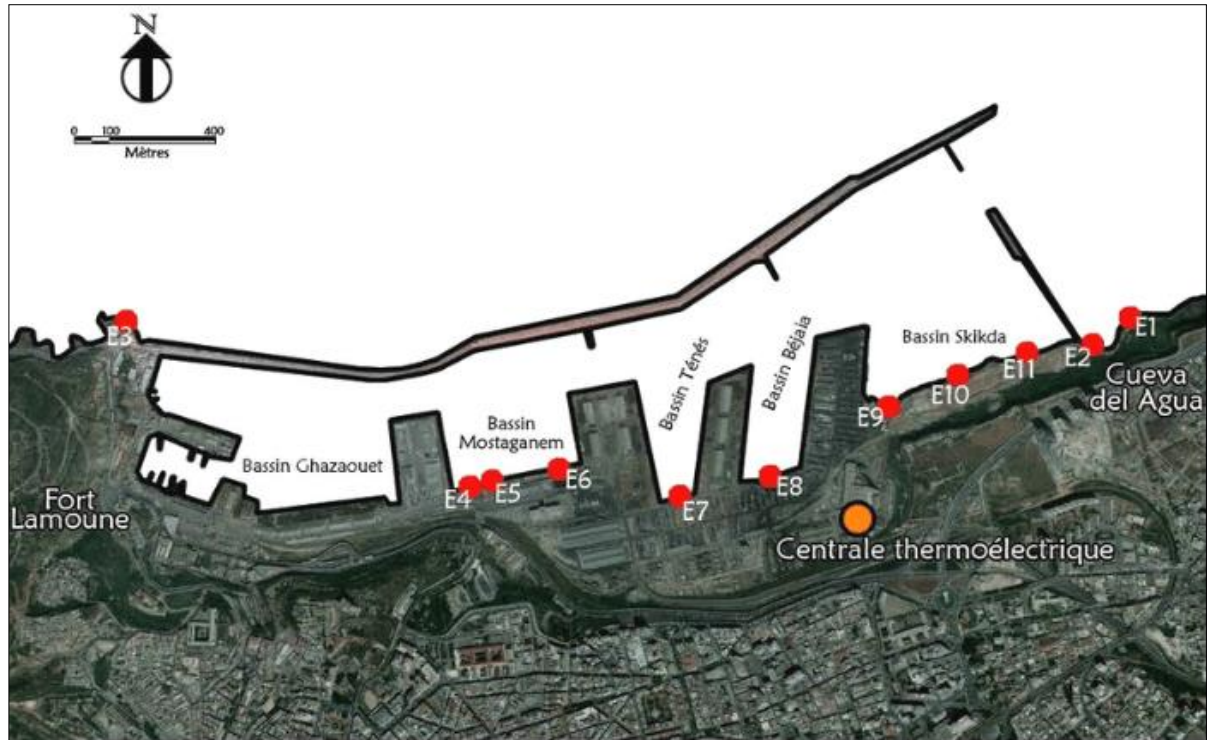


Figure 03 : Localisation des sites de rejets urbains au niveau du port d'Oran (Remili et Kerfouf, 2010).

Des études récentes ont montré la pollution du port d'Oran par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (Galgani et *al.*, 2010 ; Benali et *al.*, 2017). Mais aucune recherche n'a été effectuée préalablement sur la bioremédiation de la contamination en HAPs par des bactéries indigènes des sédiments du port d'Oran, d'où l'intérêt de la présente étude.

8. LES HYDROCARBURES

8.1. Définition des hydrocarbures

Les hydrocarbures sont des composés organiques dont la formule chimique comprend uniquement des atomes de carbone (**C**) et d'hydrogène (**H**), ils ont pour formule brute C_nH_m où n et m sont deux entiers naturels (Golovko et *al.*, 2012).

Les hydrocarbures sont groupés selon leur composition chimique en trois grandes classes à savoir : les hydrocarbures saturés et insaturés non aromatiques, les hydrocarbures aromatiques et les hydrocarbures lourds. Ces trois classes d'hydrocarbures sont présentes aussi bien pour les hydrocarbures d'origine biogène et pétrolière, à l'exception des alcènes qui sont absents dans les pétroles (Lin et Tjeerdema, 2008 ; Singh et *al.*, 2016).

8. 2. Sources des hydrocarbures en milieu marin

Les hydrocarbures représentent la plus importante source de pollution des eaux océaniques. Cette pollution peut être accidentelle ou volontaire. Ainsi les sources des hydrocarbures en milieu marin peuvent être naturelles et/ou anthropogéniques (McIntyre et He, 2018).

8. 2. 1. Les hydrocarbures naturels

Ils résultent principalement de processus biogéochimiques (diagenèse) qui induisent la formation de gaz naturel et de pétrole qui, par la suite, peut suinter au travers de failles dans les formations géologiques. La majorité du méthane qui est libérée par ces mécanismes dans le milieu marin est oxydée par les micro-organismes dans la colonne d'eau et seulement 1 à 10 % atteint l'atmosphère (Mau et *al.*, 2007).

Une autre partie des hydrocarbures naturels est produite par les plantes, animaux et micro-organismes qui synthétisent des composés dont la structure chimique varie en fonction des organismes considérés. Par exemple, le phytoplancton marin synthétise des alcanes linéaires (n-alcanes) avec une prédominance des n-C₁₅, n-C₁₇ et n-C₂₁ alors que des micro-organismes photosynthétiques, des bactéries hétérotrophes et certaines espèces de zooplancton et de macrophytes produisent du pristane et du phytane, des alcanes terpénoïdes saturés (Luong et *al.*, 2018 ; Lourenço et *al.*, 2019).

L'hydrocarbure formé par dégradation biologique le plus abondant sur Terre est sans aucun doute le méthane (CH₄), dont la formation (la méthanogénèse) est un processus exclusivement réalisé par un groupe d'archées anaérobies (Lyu et *al.*, 2018 ; Baek et *al.*, 2019 ; Zhu et *al.*, 2019).

De nombreux hydrocarbures aromatiques peuvent également provenir de la combustion incomplète de la matière organique pendant l'activité volcanique (Luo et *al.*, 2017).

Les hydrocarbures fossiles, proviennent de la décomposition d'une grande quantité de matière organique. Ces hydrocarbures se forment à partir de débris d'algues, de résidus de la faune marine et de plancton. Alors, le vieillissement, la température et la pression (qui s'exerce sur les fonds marins) transforment cette substance organique en hydrocarbures (Logan et *al.*, 2010 ; Garcia-Pineda et *al.*, 2016). Cela demande des caractéristiques géologiques spécifiques, ce qui explique la faible quantité de ressources disponibles.

8. 2. 2. Les hydrocarbures d'origine anthropique

La pollution anthropique par les hydrocarbures résulte de plusieurs activités liées à l'extraction du pétrole, à son transport et en aval à l'utilisation de produits finis (carburants, lubrifiants,...) (Sun *et al.*, 2018).

A. Rejets industriels et domestiques des hydrocarbures

Les rejets industriels et domestiques des stations d'épuration contiennent des quantités non négligeables en hydrocarbures suites à leurs utilisations en tant que sources d'énergie et de matière primaire pour divers produits tout au long de la chaîne industrielle (Qiao *et al.*, 2018 ; Berardi *et al.*, 2019).

B. Activités pétrolières

Les activités pétrolières engendrent une contamination continue et chronique des points de rejets souvent marins et aussi peuvent causer des déversements accidentels au cours des différentes étapes des activités pétrolières : les fuites des oléoducs, les opérations de vidange réalisées par les pétroliers en mer, les opérations offshore (rejet des eaux de gisement), rejet urbain (Raffineries et industries pétrochimiques installées dans des zones portuaires) (Eronat *et al.*, 2019).

Aussi et dans le cadre des activités pétrolières, il est important de noter la contribution des accidents pétroliers. Au cours de la dernière décennie, 47 % des accidents ayant conduit à des déversements importants (plus de 100 tonnes) ont eu lieu dans l'ouest de la Méditerranée. Un tiers (33 %) des accidents ont eu lieu dans l'est de la Méditerranée et un cinquième des accidents en Méditerranée centrale (PNUE/PAM, 2012).

C. Déversement accidentel des hydrocarbures

Il représente une des plus grosses sources d'hydrocarbures et de pollution pétrolière des océans. Depuis 1970, environ 700 incidents ont été recensés dans 99 pays, les plus médiatisés étant l'Exon Valdez (1989), l'Erika (1999), le Prestige (2002), Hebei Spirit (2007) (Lee *et al.*, 2019) et dernièrement l'Event Horizon (2010) et le Réna (2011) (sauret, 2011), et plus récemment le Chennai 2017 (Han *et al.*, 2018). Ce dernier s'est produit près de Chennai. En effet, cette ville côtière indienne de plus de 7 millions d'habitants a été touchée par un important déversement accidentellement d'environ 32,000 tons de pétrole lord le 28 janvier 2017. La marée noire s'est produite lorsque deux cargos sont entrés en collision à environ deux milles du littoral de la ville de Chennai (Fig. 04). L'accident a libéré environ 75 tonnes d'hydrocarbures lourds dans le

golfe du Bengale. Les données de caractérisation ont montré que la source de déversement contenait environ 17 586 mg / kg d'hydrocarbures aromatiques polycycliques totaux (HAPs), et les effets à long terme sur les écosystèmes côtiers sont en grande partie inconnus (Han et *al.*, 2018).



Figure 04 : Conséquences du déversement accidentel de Chennai 2017.

(a) : Les hydrocarbures restent piégés près d'une frontière entre l'aine et la digue près de la plage de Bharathiyar une semaine après le déversement ; la figure montre également une chaîne humaine de travailleurs retirant manuellement l'huile ; **(b) :** des travailleurs chargés du nettoyage de l'huile flottante ; **(c) :** les huiles récupérées temporairement stockées dans des seaux ; **(d) :** les travailleurs transportant l'huile et la transférant dans des récipients en plastique (Han et *al.*, 2018).

En Algérie, en 1980 l'accident du pétrolier Juan A. Lavelleja a déversé plus de 39 000 de tonnes de pétrole dans les eaux territoriales algériennes. Bien que les statistiques montrent clairement une tendance à la baisse du nombre de déversements de grande ampleur (> 700 Mt), le nombre d'accidents annuels reste constant (environ 20 à 25 par an). Par conséquent, la nécessité de mettre en œuvre des moyens de réponse à ces pollutions demeure d'actualité (PAM/PEC, 2011).

8.3. Les familles des hydrocarbures

8.3. 1. Les hydrocarbures aliphatiques

A. Les hydrocarbures aliphatiques saturés : paraffines normales dites N-paraffines (alcane linéaires) ou iso-paraffines (alcane ramifiés), de formule générale C_nH_{2n+2} . Leur nom vient du grec aleiphar qui signifie huile ou graisse. Cette nomenclature vient du fait que les graisses sont des composés à chaîne ouverte. Ils constituent 10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier (Speight, 2011 ; Devi, 2017).

Sous une atmosphère (1 atm), les alcanes sont sous l'état gazeux jusqu'au C_4 (butane), liquide (jusqu'à C_{17}) et solide au-delà. Ils se présentent alors comme une huile lourde et leur point de fusion n'excède pas les 100°C (Tableau 1). Il faut noter que les molécules ramifiées sont plus volatiles que les linéaires.

Tableau 01 : Propriétés physiques de quelques alcanes linéaires (Speight, 2011).

	Etat à 25°C sous 1atm	T ébu / °C sous 1 atm	T° fus / °C	Densité	Formule
Méthane	gazeux	-161,5	-182,5	-	CH₄
Ethane	gazeux	- 88,6	-183,3	-	C₂H₆
Propane	gazeux	- 42,1	- 188	-	C₃H₈
Butane	gazeux	- 0,5	- 135	-	C₄H₁₀
Pentane	liquide	36,1	-130	0,626	C₅H₁₂
Hexane	liquide	68,7	- 95	0,659	C₆H₁₄
Heptane	liquide	98,4	- 91	0,684	C₇H₁₆
C₂₀	solide	342	37	-	C₂₀H₄₂
C₃₀	solide	446	66	-	C₃₀H₆₂

ébu : ébullition; fus : Fusion ; atm : atmosphère.

B. Les hydrocarbures aliphatiques insaturés : Les oléfines (alcènes) de formule générale C_nH_{2n} , qui ne se rencontrent pas ou très peu dans le pétrole brut du fait de leur réactivité. Cependant, les oléfines peuvent être produites lors des procédés de raffinage (Speight, 2011).

C. Les hydrocarbures aliphatiques cycliques saturés

Les naphènes qui sont des composés carbonés de 5 ou 6 atomes pouvant comporter un ou plusieurs cycles et des chaînes ramifiées (Speight, 2011).

8.3.2. Les hydrocarbures aromatiques

Présentant un système particulier de liaison, qui confère à la molécule une grande stabilité, ainsi que certaines propriétés chimiques spécifiques très recherchées, dans les industries des parfums, des colorants et pharmaceutiques (Gachanja et Maritim, 2018).

- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont des molécules composées d'au moins deux noyaux aromatiques accolés, de formule générale C_nH_{2n-6} (Gachanja et Maritim, 2018). Ils diffèrent par le nombre de noyaux accolés ainsi que par leur agencement. Ces hydrocarbures peuvent être mono-aromatiques, di-aromatiques ou polyaromatiques et des ramifications aliphatiques peuvent être associées. La classe des hydrocarbures aromatiques la plus étudiée est celle des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). A ce jour, environ 130 HAPs sont identifiés mais seulement 16 sont généralement recherchés dans les études environnementales (Fig. 05). Ce sont les composés définis comme polluants prioritaires par l'agence environnementale américaine (US-EPA, 2016) et considérés comme les plus toxiques de cette famille (Ifegwu et Anyakora, 2015). On considère généralement les HAPs légers qui possèdent 3 cycles ou moins, et les lourds qui présentent plus de 3 cycles (Gachanja et Maritim, 2018).

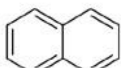
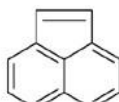
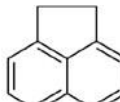
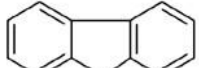
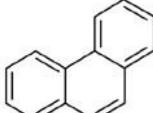
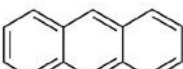
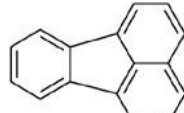
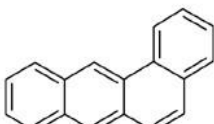
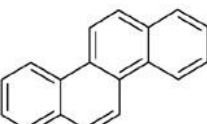
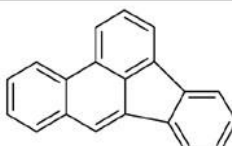
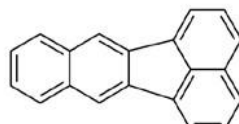
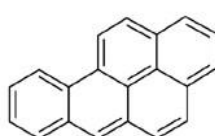
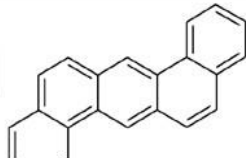
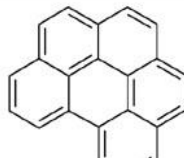
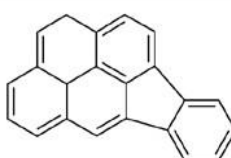
<u>2 cycles</u>	 Naphthalène	 Acénaphtylène	 Acénaphtène	 Fluorène
<u>3 cycles</u>	 Phénanthrène	 Anthracène	 Fluoranthène	 Pyrène
<u>4 cycles</u>	 Benzo[a]anthracène	 Chrysène	 Benzo[b]fluoranthène	 Benzo[k]fluoranthène
<u>5 cycles</u>	 Benzo[a]pyrène	 Dibenzo[a,h]anthracène	 Benzo[g,h,i]pérylène	 Indéno[1,2,3,cd]pyrène

Figure 05 : Liste des HAPs prioritaires selon les recommandations de l'US-EPA (Wilson et Jones, 1993).

Les HAPs sont très stables, peu volatils et hydrophobes, leur stabilité chimique et leur hydrophobicité augmente avec le nombre de cycles et la masse moléculaire (Kim *et al.*, 2013). Ces propriétés les rendent relativement résistants à la biodégradation. De ce fait, ils persistent dans l'environnement, faisant courir un risque sanitaire. En effet, des études ont montré que certains HAPs sont génotoxiques, mutagènes et cancérigènes (Ifegwu et Anyakora, 2015). En fonction de la présence de groupement alkyle, les HAPs peuvent avoir diverses origines. La présence de groupement alkyle sur les noyaux aromatiques indique un précurseur biologique ayant subi une réaction d'aromatisation lors de la diagenèse. Les HAPs non alkylés proviennent de la combustion de biomasse végétale (Reza Poursoltani *et al.*, 2018). Les HAPs peuvent avoir deux origines majeures. La plus importante est la source pyrolytique qui correspond à la combustion incomplète de la matière organique (forêt, charbon, pétrole, transports) à haute température aboutissant à leur émission dans l'atmosphère. La seconde est pétrogénique correspondant aux déversements de pétrole dans l'environnement (naturels ou d'origine anthropique). Les fossiles combustibles, comme le charbon et la houille, contiennent des HAPs (Jacquot *et al.*, 1999).

Tableau 02 : Propriétés physiques des HAPs (Ferreira, 2001).

Composés	Poids Moléculaire	Solubilité dans l'eau à 25°C (en mg/l)	Pf (°C)	Pe (°C)	Densité	Coefficient de partage octanol/eau (log Kow)
Naphtalène	128	31,7	80	218	1,02	3,37
Fluorène	166	1,68	114	298	1,2	4,16
Phénanthrène	178	1,0	101	338	1,16	4,46
Anthracène	178	0,045	215	340	1,15	4,5
Fluoranthène	202	0,206	107	384	1,20	4,9
Pyrène	202	0,132	151	396	1,27	4,88
Benzo[a]anthracène	228	0 ,0018	435	438	1,27	5,63
Chrysène	228	0 ,0015	258	441	1,27	5,63
Benzo[b]fluoranthène	252	0 ,0080	167	487	1,27	6,04
Benzo[k]fluoranthène	252	0 ,0015	217	481	-	6,21
Benzo[a]pyrène	252	0 ,0016	178	496	1,35	6,06
Dibenzo[a, h]anthracène	278	0 ,0050	263	498	1,28	6,86
Benzo[g, h, i]pérylène	276	0 ,0007	278	500	1,3	6,78
Indéno[1, 2, 3cd]pyrène	276	0 ,0002	164	505	1,07	6,58

Pf : point de fusion ; Pe : point d'ébullition ; j : jours ; m : mois ; a : années.

8.3.3. Les asphaltènes

Les asphaltènes représentent la fraction la plus lourde du pétrole. Bien que ces produits soient souvent en faible quantité, ils ont une influence considérable sur les propriétés physico-chimiques du pétrole brut. Leur capacité à flocculer, à s'adsorber sur des surfaces et à former des dépôts solides, est à l'origine de nombreux problèmes, aussi bien du point de vue exploitation des gisements, que du raffinage (Zuo et *al.*, 2019).

Les asphaltènes sont constitués de molécules polycycliques à haut poids moléculaire, contenant d'hétéroatomes tels que l'azote, le soufre et l'oxygène (Zuo et *al.*, 2019). Les métaux sont

également présents, mais à l'état de traces. Les plus abondants sont le vanadium et le nickel, mais du fer, du sodium, du cuivre et de l'uranium ont également été détectés (Golovko et *al.*, 2012).

8.3.4. Les composés polaires (résines)

Les résines contiennent des structures aromatiques (polycondensées ou non) dont le nombre de cycles est supérieur à 6, ainsi qu'une partie des hétéro-éléments et des métaux. Elles jouent un rôle essentiel dans la stabilité du pétrole en prévenant la démixtion des asphaltènes. La fraction résine est considérée comme moins aromatique que la fraction asphaltène. Cependant, la polarité globale des résines n'est qu'un peu plus faible que celle des asphaltènes (Islas-Flores et *al.*, 2006).

8.4. Le pétrole brut

Les pétroles sont des mélanges extrêmement complexes de composés hydrocarbonés (Fig. 06), qui peuvent être regroupés dans les familles suivantes des hydrocarbures : (i) insaturés, ils possèdent une à plusieurs double-liaison(s) (alcènes) ou triple-liaison(s) (alcynes) ; (ii) saturés, ils ne possèdent pas de double ou de triple liaison et peuvent être linéaires (n-alcanes exp. hexadécane), ramifiés (exp. pristane) ou alicycliques (exp. stèranes) ; et (iii) aromatiques, parmi lesquels on distingue les alkylbenzènes (BTEx) et les HAPs (hydrocarbures aromatiques polycycliques) dont la structure comprend au moins 2 cycles aromatiques fusionnés (Fig.05). Parmi ces composés, les hydrocarbures saturés et aromatiques sont les principaux constituants du pétrole (Nolan, 2019).

La genèse des pétroles explique pourquoi ils ne sont pas constitués uniquement d'hydrocarbures vrais au sens chimique du terme, mais aussi des molécules hydrocarbonées contenant d'autres éléments qu'on appelle hétéroatome principalement le soufre, l'azote et l'oxygène, en proportions variables. On trouve aussi des éléments métalliques, principalement le vanadium et le nickel mais aussi le fer, le cuivre et l'uranium sont présents à l'état de traces (Nolan, 2019). En revanche, on est amené à considérer deux autres familles : les résines regroupent essentiellement les composés contenant un ou plusieurs hétéroatomes, et les asphaltènes (Islas-Flores et *al.*, 2006). Si la composition élémentaire globale des pétroles est relativement fixe, la structure chimique de leurs constituants varie plus largement, ce qui entraîne une grande diversité des propriétés physiques (densité, viscosité), ainsi que des teneurs très variables dans les différents types de produits obtenus par raffinage (Nalon, 2019).

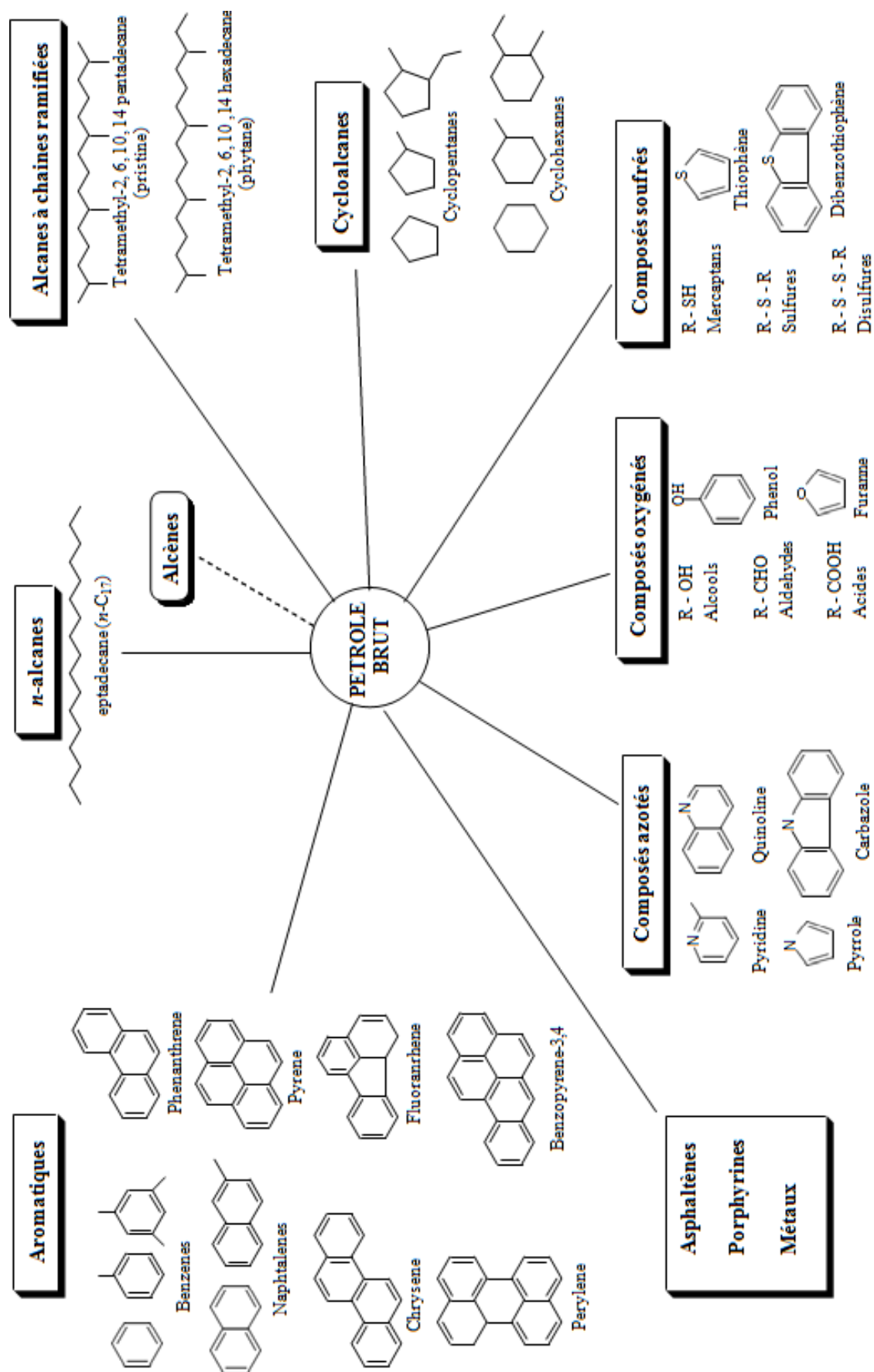


Figure 06 : Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans les pétroles bruts (Soltani, 2004).

9. DEVENIR DES HYDROCARBURES EN MILIEU MARIN

Une fois déversé en mer, le pétrole est soumis à différents processus qui vont entraîner des modifications de son aspect général et de ses caractéristiques physico-chimiques. Ces processus sont soumis au contrôle de facteurs abiotiques et biologiques (Logeshwaran et *al.*, 2019).

Dispersion et dégradation biotiques et abiotiques des hydrocarbures

9.1. Facteurs abiotiques

- **L'évaporation** : qui, selon le type de pétrole, peut affecter la quasi-totalité ou une partie insignifiante du pétrole déversé. Elle agit sur les fractions légères et elle s'intensifie lorsque l'étalement des hydrocarbures est important. L'agitation de la mer et des vents favorisent fortement l'évaporation (Hänichen et *al.*, 2019).
- **La photo-oxydation** : elle se produit en surface de l'eau suite à l'exposition des hydrocarbures à l'air libre et aux radiations solaires. Elle aboutit à des dérivés polaires généralement solubles dans l'eau (Stepanyan et Voskoboinikov, 2006). La photo-oxydation sera plus rapide lorsque les hydrocarbures sont étalés en film mince (OMI/PNUE, 2002).
- **L'émulsification** : c'est le mélange de deux fractions non miscibles : l'eau et le pétrole. Les émulsions directes « huile-l'eau » peuvent être facilement dispersées par les courants et les mouvements de turbulence (Fig. 07 et 08). Par contre, les émulsions de type inverse tendent vers une consistance semi-solide et sont à l'origine des boulettes de goudron, que l'on trouve échouées sur la côte (Fig. 07). L'émulsification est un facteur très important dans la disparition du pétrole de la surface de la mer (Bertrand et Mille, 1989 ; Toncu et *al.*, 2018, Qu, et *al.*, 2019).

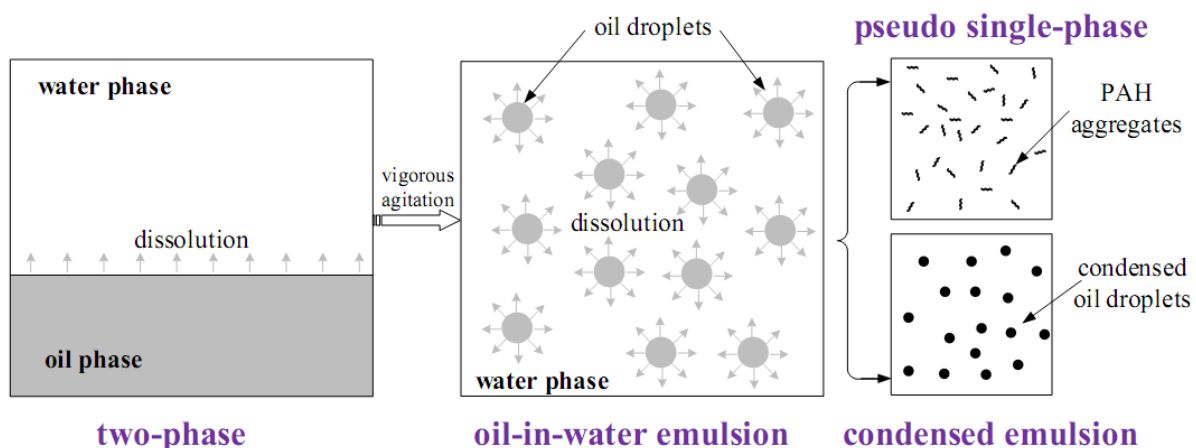


Figure 07 : Structures des hydrocarbures lourde dans l'eau (systèmes huile-eau) (Qu et *al.*, 2019).

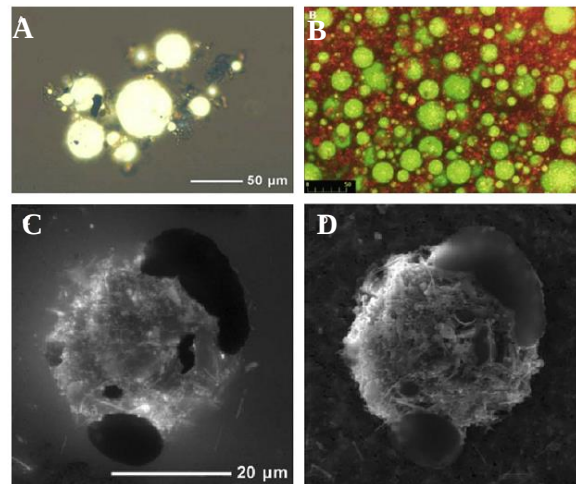


Figure 08 : Images microscopiques des agrégats de pétrole dans l'eau observées avec :

(A) : Epi-microscopie avec UV ; (B) : Microscopie confocale à balayage laser ;
(C) : microscopie à balayage environnemental à l'état humide, (D) : microscopie à balayage environnemental en stat sec (Gong et *al.*, 2014).

- **La dissolution** : la solubilité des hydrocarbures dans l'eau est très faible (Fig.08). Généralement, la dissolution des hydrocarbures est d'autant plus importante que sa masse moléculaire est faible et que sa polarité est élevée (Gong et *al.*, 2014). La présence de sels minéraux contribue à réduire l'espace limité disponible pour les molécules d'hydrocarbures. En fait, plus l'eau de mer est salée (c'est le cas de la Méditerranée) et plus la dissolution est faible (Babel et Schreiber 2014 ; Qu et *al.*, 2019).
- **La sédimentation** : Elle résulte de l'augmentation de la densité du pétrole par rapport à celle de l'eau de mer. Divers processus interviennent dans l'accroissement de cette densité, à savoir l'évaporation, la dissolution des composés légers, l'oxydation des paraffines, la formation d'agrégats et l'adsorption du pétrole dispersé sur les particules en suspension (Fig. 09). Les hydrocarbures aromatiques et aliphatiques à haut poids moléculaires, sont plus facilement adsorbés par les matières organiques particulaires et colloïdales (Fig. 10), et donc incorporés plus rapidement dans les sédiments (Gong et *al.*, 2014 ; Loh et *al.*, 2018).

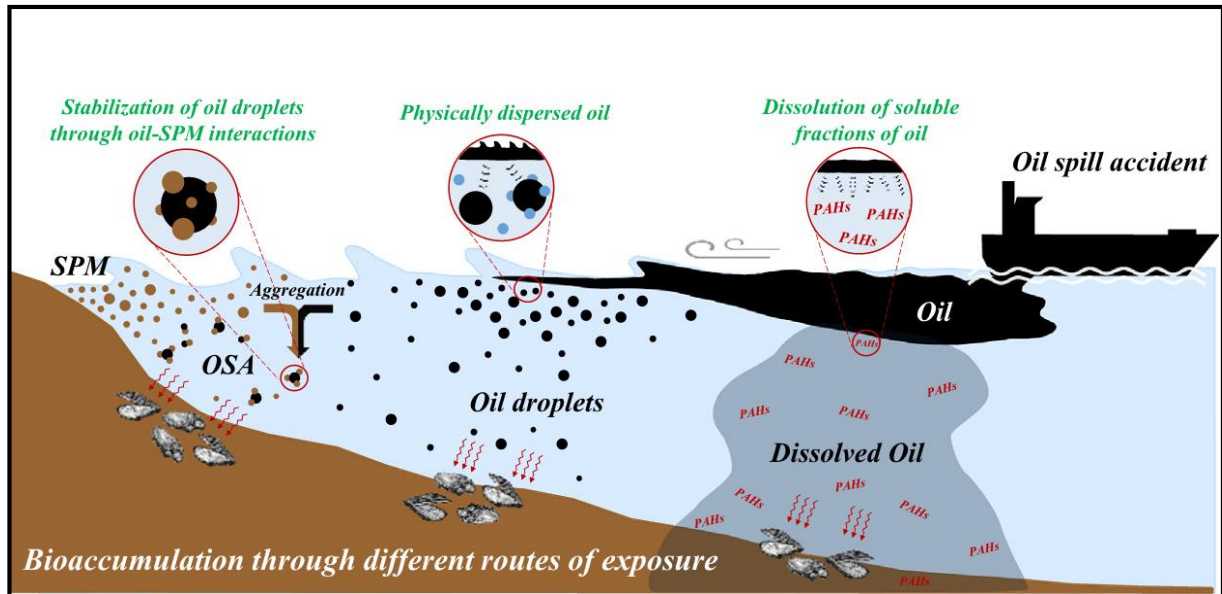


Figure 09 : Sédimentation et bioaccumulation des HAPs par différents voies d'expositions ; (SPM) : Particules en suspension ; (PAHs) : hydrocarbures aromatiques polycycliques (Loh et al., 2018).

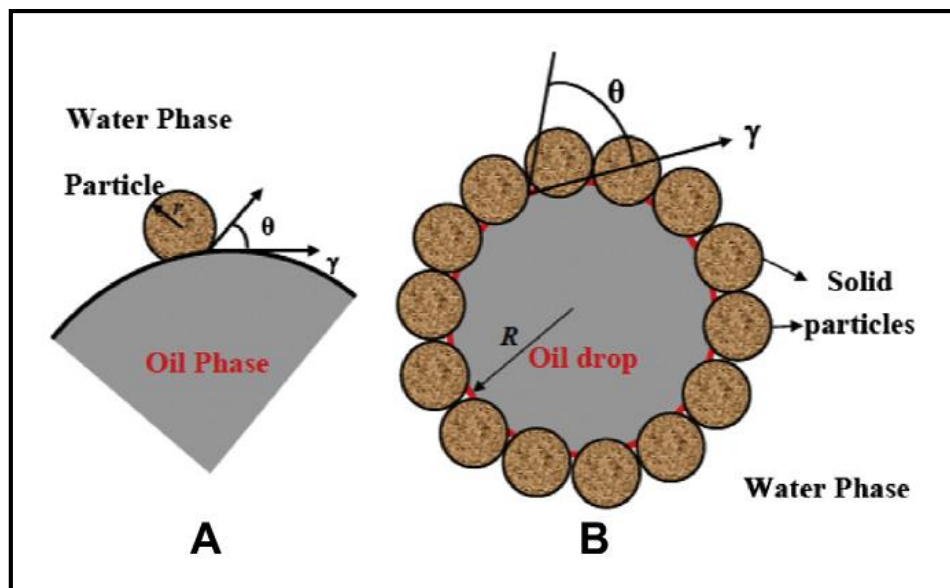


Figure 10 : (A) Position d'une particule sphérique (rayon r) à une interface huile-eau avec une tension superficielle γ et un angle de contact θ (mesuré à travers la phase aqueuse) inférieur à 90° ; et (B) Position de multiples particules adsorbées à une interface huile-eau, résultant en solide-stabilisé huile-eau émulsion (Gong et al., 2014).

9.2. Facteurs biotiques

- **La biodégradation**

Les micro-organismes jouent un rôle crucial dans le devenir des polluants, notamment dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers (Khudur et *al.*, 2018 ; Staninska-Pięta et *al.*, 2019). De nombreuses études ont montré que des microorganismes hydrocarbonoclastes étaient sélectionnés suite à la contamination (Atlas et Hazen, 2011 ; Gong et *al.*, 2014 ; Bovio et *al.*, 2017 ; Speight et El-Gendy, 2018 ; Vergeynst et *al.*, 2018 ; Ferrari et *al.*, 2019). L'effet des hydrocarbures sur les communautés microbiennes fait intervenir des mécanismes complexes dépendant de leurs capacités métaboliques, influencées par les paramètres environnementaux et la durée d'exposition aux polluants (Bordenave et *al.*, 2007 ; Cerro-Gálvez et *al.*, 2019). Ainsi, le devenir des hydrocarbures ne dépend pas uniquement des activités microbiennes, mais aussi des caractéristiques du milieu pollué, des facteurs physico-chimiques (accepteurs d'électron, température, salinité...), de la disponibilité des nutriments et des co-métabolites, et aussi de la bioturbation (Gong et *al.*, 2014 ; Crisafi et *al.*, 2016 ; Ganesh Kumar et *al.*, 2019).

La biodégradation des hydrocarbures par les bactéries et les champignons marins contribue de façon significative à la transformation des hydrocarbures en produits oxydés. La vitesse de dégradation dépend de la chaleur, des éléments nutritifs et de la teneur en oxygène dissous ainsi que du type d'hydrocarbure. Les composés les plus légers se dégradent plus vite que ceux qui ont un poids moléculaire élevé (Loh et *al.*, 2019).

En raison du métabolisme microbien des sédiments et de la nature des matériaux déposés, l'oxygène peut être épuisé en les premiers millimètres sous la surface des sédiments. La majeure partie du métabolisme microbien dans les sédiments plus profonds est anaérobie. Ainsi, lorsque l'oxydant est représenté par l'oxygène, on parle de condition d'aérobiose. Dans le cas d'anaérobiose, l'oxygène est remplacé par les nitrates, sulfates ou méthane (Aktas et *al.*, 2017 ; Boopathy, 2017 ; Nzila, 2018).

- **Pénétration dans la chaîne alimentaire**

Suite à leur exposition à des composés pétroliers variés, plusieurs organismes marins tels que les organismes planctoniques, les invertébrés (bivalves) et les poissons, peuvent accumuler les hydrocarbures sous forme de vésicules intracytoplasmique (Lourenço et *al.*, 2019 ; Yu et *al.*, 2019 ; Zhao et *al.*, 2019). Les organismes planctoniques qui sont solidaires des masses d'eau dans lesquelles ils sont en suspension, sont incapables d'éviter les zones contaminées par des déversements pétroliers et ils incorporent ainsi les hydrocarbures directement dans leurs

cellules ce qui constitue une voie de pénétration de ces composés dans la chaîne alimentaire. Par conséquent une altération affectant le plancton se répercute forcément sur les niveaux trophiques les plus élevés de la chaîne alimentaire (Behera et *al.*, 2018 ; Batten et *al.*, 2018 ; Walker et *al.*, 2019).

10. CONSEQUENCES DE LA POLLUTION MARINE PAR LES HYDROCARBURES SUR LA BIOCENOSE

La libération des hydrocarbures en milieu marin a des conséquences graves aussi bien sur le plan économique que sur le plan écologique. Les hydrocarbures déversés en mer, peuvent influencer l'équilibre écologique et parfois entraîner la destruction de l'écosystème. Ceci se traduit par des plages souillées, des oiseaux englués et des faunes et flores aquatiques en danger. La contamination par ces composés pourrait être immédiate ou à long terme (Ke et *al.*, 2017 ; Walker et *al.*, 2019 ; Yu et *al.*, 2019).

Les produits pétroliers rejetés dans le milieu marin ont des répercussions énormes sur la faune et la flore marines. Le colmatage de la surface par les nappes peut entraîner l'absence d'échanges gazeux à l'interface. Le pétrole peut également se «dissoudre » sous forme de gouttelettes dans la masse d'eau, voire sédimenter sous la forme de fractions vieilles et ainsi atteindre les organismes pélagiques et benthiques. La contamination est généralement mécanique (alourdissement du corps, trouble des mouvements, trouble de respiration) ce qui cause dans la majorité des cas une mortalité immédiate. Certaines espèces éprouvent des changements de comportements ou des problèmes de santé à court terme, d'autres espèces éprouvent des effets toxiques instantanés et aigus parfois mortels (OMI/PNUE, 2002 ; Abdel-Shafy et Mansour, 2016 ; Loh et *al.*, 2019).

En milieu marin tous les niveaux trophiques sont vulnérables à la contamination par les hydrocarbures, commençant des planctons aux mammifères marins. En effet toute altération affectant le plancton se répercute sur les niveaux trophiques plus élevés (les organismes auxquels il sert de nourriture) (Walker et *al.*, 2019). Les mollusques et les crustacés de mer (huître, moule, crevette, crabe) sont les plus susceptibles d'accumuler les hydrocarbures à cause de leur mode de vie. Ils ont une aptitude naturelle à bioaccumuler des contaminants même si la concentration est faible dans le milieu pollué ou si la source est éliminée. Les crustacés qui se nourrissent de détritus ou de particules en suspension seront affectés par perturbation de leur taux de reproduction (réduction du taux d'éclosion) ou leurs habitudes alimentaires. Par contre, les huîtres accumulent moins d'hydrocarbures que les moules, car elles sont capables de se

fermer pendant des périodes assez longues une fois soumises à l'agression d'un agent chimique toxique. Les moules, par contre, ne peuvent pas empêcher les polluants de pénétrer (Sun Y. et *al.*, 2019).

11. TOXICITE DES HAPS

La génotoxicité, la cancérogénicité, l'effet sur la reproduction et le développement (Li et *al.*, 2014 ; Muthusamy et *al.*, 2018 ; Meng et *al.*, 2019 ; McCarrick et *al.*, 2019) et l'immunotoxicité de certains hydrocarbures tels que les HAPs (Iwano et *al.*, 2010 ; Gwaltney-Brant, 2019) ont été principalement mis en évidence à des degrés divers selon les HAPs. Les mécanismes de toxicité des hydrocarbures sont en général liés à leur métabolisation. Une fois dans la cellule, ces composés sont pris en charge par des systèmes enzymatiques de métabolisation de phase I (oxydation) qui vont contribuer à diminuer leur hydrophobicité en vue d'une excrétion ultérieure. Certains métabolites sont cependant hautement réactifs et peuvent soit contribuer à la production d'espèces réactives d'oxygènes (ERO) et ainsi à un stress oxydant, ou bien directement interagir avec les composants cellulaires tels que l'ADN pour former des adduits ou générer des cassures (Chang et *al.*, 2019 ; Meng et *al.*, 2019).

12. BIOTECHNOLOGIES ACTUELLES POUR LA REMEDIATION DE LA CONTAMINATION PAR LES HAPS DANS L'EAU ET LES SEDIMENTS MARINS

Le sédiments contaminés par les HAPs posent des problèmes de nettoyage et de gestion, car les techniques classiques de dragage environnemental sont invasives, coûteuses et parfois inefficaces ou difficiles à appliquer à des sédiments vastes et variés (Maletić et *al.*, 2019).

Particulièrement intéressantes dans le cadre de dépollution des sédiments contaminés par hydrocarbures, la bioremédiation est considéré comme une façon écologique de diminuer la teneur de ces polluants récalcitrants notamment les HAPs. Elle consiste en une attaque des molécules organiques par les microorganismes naturellement présents dans les sédiments et l'eau. Les bactéries, champignons, algues et microalgues peuvent en effet cataboliser les hydrocarbures. Ainsi, les micro-organismes produisent des biosurfactants ou des enzymes qui vont réagir avec les molécules d'hydrocarbures pour les transformer en molécules généralement plus simples (Dell'Anno et *al.*, 2018 ; Gonzalez, et *al.*, 2019 ; Maletić et *al.*, 2019). Si la biodégradation est complète, les polluants sont entièrement décomposés en CO₂, c'est la minéralisation (Gonzalez, et *al.*, 2019).

En effet, certains microorganismes des sédiments, en particulier des bactéries, sont capables d'obtenir de l'énergie via le métabolisme des polluants tels que les HAPs (Khudur et *al.*, 2018 ;

Maletić et *al.*, 2019), en développant des stratégies pour utiliser ces molécules comme sources de carbone et d'énergie, assurant la détoxification de l'environnement, ou pour les transformer en substrats métabolisables par d'autres microorganismes. La réduction de la pollution qui en résulte, est exploitée dans des procédés de bioremédiation visant à décontaminer les sites pollués tout en conservant l'intégrité de l'écosystème (Vila et *al.*, 2015 ; Mapelli et *al.*, 2017 ; Maletić et *al.*, 2019). Ainsi, la décontamination par voie biologique a été reconnue comme la méthode la plus efficace et sans danger pour éliminer les HAPs des sédiments (Perlo, 2010 ; Behera et *al.*, 2018 ; Loh et *al.*, 2019).

En outre, la bioremédiation s'appuie sur le métabolisme et l'activité des communautés de bactéries, fungi, algues, afin d'évacuer, dégrader ou de stabiliser les polluants. De plus, l'efficacité des stratégies de biorestauration varie selon la nature du sédiment et le type de contaminant (Perelo, 2010 ; Belleset *al.*, 2016 ; Bovio et *al.*, 2017 ; Kadri et *al.*, 2017 ; Mondal et *al.*, 2019).

12.2. Biostimulation

La biostimulation consiste à stimuler l'activité des populations microbiennes indigènes par apport de nutriments pour en augmenter le rendement afin de détruire le polluant organique qui sera utilisé comme source de carbone. La décontamination se fait *in situ* en introduisant dans le site de traitement les éléments nécessaires au développement de la biomasse ou bien *ex situ* (Crisafi et *al.*, 2016).

La forme la plus courante de biostimulation est l'addition d'éléments nutritifs, principalement l'azote, le phosphore et le potassium nécessaires aux bactéries indigènes afin d'accélérer la dégradation des contaminants (Mapelli et *al.*, 2017). On peut aussi ajouter des sources de carbone comme le glucose, des oligo-éléments, des protéines, des enzymes et des hormones. En effet, les microorganismes ont besoin de nutriments et d'une source carbonée pour fournir l'énergie nécessaire à leur croissance et leur survie (Loh et *al.*, 2019 ; Maletić et *al.*, 2019).

La biostimulation des microorganismes dépollueurs peut donc être aussi obtenue par l'apport de divers donneurs d'électrons comme le NO_3^- , SO_4^{2-} , ou bien l'oxygène (Khudur et *al.*, 2018). L'oxygène peut être fourni par un système d'aération forcée, par l'injection d'oxydants chimiques à faible concentration (comme le peroxyde d'hydrogène) ou par l'utilisation de composés à relâchement progressif d'oxygène (Maletić et *al.*, 2019).

L'impact de l'ajout d'éléments nutritifs dans la biorestauration des HAPs a été étudié en grande partie dans le cadre de déversements de pétroles. Ainsi, l'addition d'éléments nutritifs augmente

généralement la biodégradation des HAPs et du pétrole. En fait, le taux de dégradation des HAPs dans les sédiments varie largement en fonction de la quantité de nutriments ajoutés. Ces derniers ont suggéré que les taux de biodégradation des HAPs doivent être optimisés par des concentrations et des rapports appropriés en nutriments qui peuvent varier en fonction des différents microorganismes hydrocarbonoclastes (Mapelli et *al.*, 2017 ; Loh et *al.*, 2019).

12.3. Bioaugmentation

La bioaugmentation consiste à augmenter la biodégradation ou la biotransformation des HAPs, en inoculant des microorganismes spécifiques isolés à partir des milieux contaminés. Les microorganismes peuvent être naturels ou génétiquement modifiés (Varjani et *al.*, 2017 ; Giovanella et *al.*, 2019). Généralement les microorganismes sont sélectionnés sur la base de leur aptitude à dégrader les composés organiques présents dans le site à dépolluer. Ainsi, les microorganismes sélectionnés doivent cibler les contaminants et ils ne doivent pas entrer en compétition avec les populations *in situ*. L'efficacité des stratégies de biorestauration varie cependant selon la nature du sédiment et le type de contaminant (Gonzalez et *al.*, 2019). Cette technologie est largement utilisée pour décontaminer les sites contenant des hydrocarbures (Mapelli et *al.*, 2017 ; Maletić et *al.*, 2019).

12.4. Combinaison Biostimulation et Bioaugmentation

Il est possible de combiner des actions de bioaugmentation avec des actions de biostimulation (comme l'ensemencement et l'ajout de fertilisants). Ces deux techniques de bioremédiation ont été appliquées en microcosmes (Nikolopoulou et *al.*, 2013 ; Crisafi et *al.*, 2016), pour dépolluer les sédiments contaminés par certains produits tels que les hydrocarbures et les métaux lourds (Giovanella et *al.*, 2019 ; Gonzalez et *al.*, 2019).

Plusieurs études ont montré que la biostimulation par ajout de nutriments et la bioaugmentation par inoculation de bactéries renforcent le taux de dégradation du pétrole brut et des HAPs dans les sites contaminés (Mapelli et *al.*, 2017, Maletić et *al.*, 2019 ; Loh et *al.*, 2019).

12.5. Phytoremédiation

En termes généraux, la phytoremédiation peut être définie comme l'utilisation de plantes pour extraire, séquestrer ou détoxifier des polluants. La bioremédiation assistée par les algues (Phytoremédiation) ou microalgues (phycoremédiation) implique l'interaction avec microorganismes du milieu (Mondal et *al.*, 2019 ; Gupta et *al.*, 2019). Les microalgues adsorbent, accumulent ou solubilisent ces composés, elles augmentent également l'activité

microbiologique au sein des sédiments et de l'eau. Les sédiments sont particulièrement impliqués dans la dégradation des HAPs (Kumar Yadav et *al.*, 2018 ; Odoh et *al.*, 2019).

Les microalgues sont des organismes photosynthétiques microscopiques omniprésents trouvés en milieu marin ou en eau douce. Leur mécanisme de photosynthèse est similaire à celui des plantes et des arbres sur terre, mais comme ils sont immergés dans l'environnement aqueux, ils ont un accès efficace à l'eau, au dioxyde de carbone et aux nutriments. Ils comprennent les cyanobactéries, les diatomées, les dinoflagellés et les flagellés verts (mondal et *al.*, 2019). Elles sont la plus grande source d'oxygène sur terre, constituent également le premier stade de la chaîne alimentaire dans les systèmes aquatiques.

Ainsi, la phycoremédiation consiste à utiliser des microalgues pour éliminer ou transformer les polluants contenus dans les eaux usées. On sait que les microalgues nettoient une vaste catégorie de polluants provenant des eaux usées provenant des secteurs domestique, agricole et industriel. Outre les polluants organiques et inorganiques courants, à savoir les nitrates, les phosphates et l'ammonium, les microalgues peuvent également assimiler et décomposer des molécules persistantes telles que les hydrocarbures, les métaux lourds, les antibiotiques et les composés chlorés. De nombreuses espèces de microalgues appartenant aux genres *Chlorella* et *Scenedesmus* sont connues pour accumuler des polysaccharides de manière extracellulaire (Ansari et *al.*, 2019 ; Gupta et *al.*, 2019), en entourant leurs cellules, appelées capsules, qui en font des candidats idéaux pour la phytodémodulation. Parallèlement à ces structures, ils possèdent également certains peptides capturant les métaux, appelés métallothionéines et phytochélatines, qui en font des outils efficaces de dépollution des métaux lourds (mondal et *al.*, 2019).

La phycoremédiation est choisie par rapport aux autres techniques de dépollution biologique (comme la phyto- ou la mycoremédiation) en raison de sa nature non pathogène, de simples exigences de croissance et surtout du fait que l'on observe que les microalgues agissent sur une large gamme de déchets toxiques. Les polluants inorganiques et organiques sont connus pour être détoxifiés ou transformés par les cellules de microalgues (Olguín et Sánchez-Galván, 2019). En effet, des espèces de microalgues sont étudiées comme des indicateurs environnementaux efficaces pour évaluer l'écotoxicité, la génotoxicité et le risque environnemental associé aux produits chimiques toxiques (Tigini et *al.*, 2011). Or, l'implication des microalgues dans la dépollution des hydrocarbures pétroliers n'est pas beaucoup rapportée (Mondal et *al.*, 2019). Mais des microalgues capables de dégrader les HAPs ont été trouvées. Lei et *al.* (2002) a trouvé que sept espèces de microalgues, à savoir *Chlorella vulgaris*,

Chlorella miniata, *Scenedesmus quadricola*, *Scenedesmus platydiscus*, *Chlamydomonas* sp., *Synechocystis* sp., and *Selenestrum capricornutum* dégradent efficacement le pyrène. Aussi, Salehi et al. (2019) a rapporté la dégradation hydrocarbures des hydrocarbures par les espèces *Chlorella vulgaris* et *Dunaliella tertiolecta*.

En terme de biodégradation, les algues possèdent également des enzymes capables de métaboliser certains HAPs (déhalogénases, nitroréductases et nitrilases) (Kotoky et al., 2019). Les procaryotes associés aux algues forment fréquemment des agrégats, des microcolonies et des biofilms sur les feuilles (Gupta et al., 2019). Les cellules présentes dans un biofilm sont physiologiquement différentes des cellules planctoniques, en ce sens qu'elles sont plus résistantes aux agents physiques et biologiques (García-Florentino et al., 2018).

Les herbiers sont des participants actifs à la biogéochimie des sédiments (Wakeham et Lee, 2019). Le recouvrement des particules de la colonne d'eau est facilité par le couvert végétal des algues et les prés des herbiers conservent et enterrent une partie de la matière organique produite dans la communauté, ce qui entraîne l'accumulation de matière organique dans les sédiments. La décomposition de la matière organique dans les sédiments marins consomme l'oxygène des sédiments, et la minéralisation anaérobie de la matière organique résulte de la réduction des sulfates. Les taux élevés de réduction des sulfates caractéristiques des sédiments d'herbes marines sont également alimentés par la libération de carbone organique dissous par les racines des herbiers. L'oxygène de la colonne d'eau peut se diffuser dans les sédiments à travers le système lacunaire d'herbiers, qui peut également libérer dans les sédiments une partie de l'oxygène produit par la photosynthèse (Gupta et al., 2019 ; Maletić et al., 2019 ; Wakeham et Lee, 2019).

Les processus biogéochimiques des sédiments (réduction des sulfates, fixation de l'azote, dénitrification) sont influencés par l'activité des herbiers marins, et présentent des taux plus élevés dans les herbiers recouverts d'herbiers que dans les sédiments sans végétation. En outre, les connaissances initiales sur certaines propriétés de dégradation des sédiments associés aux herbiers marins indiquent qu'il pourrait exister un potentiel important de biodégradation dans de tels environnements (Dunn, 2007 ; Maletić et al., 2019 ; Wakeham et Lee, 2019 ; Tripathi, et al., 2019).

12.6. Biorestauration des sédiments par l'amendement du charbon noir

L'amendement de carbone est effectué pour la détoxification et l'augmentation de la dégradation microbienne. En effet, les formes naturelles et anthropiques du charbon noir, telles que la suie, le kérogène et le charbon actif, sont des absorbants importants des produits chimiques hydrophobes dans les sols et les sédiments et ont un effet important sur la biodisponibilité des polluants hydrophobes tels que les HAPs (Oliveira et *al.*, 2017 ; Wang et Wang, 2019 ; Dai et *al.*, 2019). De nombreuses études ont montré que la sorption sur le charbon noir réduisait la bioaccumulation et la toxicité de ces produits chimiques. Le charbon actif, une forme fabriquée de charbon noir, est utilisé dans le traitement des eaux usées et des eaux potables pour éliminer les contaminants organiques. Il a également été ajouté aux sédiments pollués pour réduire les risques écologiques de polluants tels que les HAPs (Wang et Wang, 2019 ; Maletić et *al.*, 2019). Par adsorption sur le charbon noir, les concentrations de contaminants dans l'eau interstitielle sont réduites, et les plantes, animaux et même les microbes les plus élevés seront moins exposés et moins affectés (Oliveira et *al.*, 2017 ; Sizmur et *al.*, 2017 ; Zheng et *al.*, 2018).

Après une première phase d'absorption où les contaminants sont simplement absorbés par le charbon noir, des communautés microbiennes se développent par la présence de particules de carbone qui seront dégradées par exemple en méthane. De nombreuses bactéries dégradant les HAPs dans les sédiments marins ont tendance à s'adsorber sur des matériaux polymères hydrophobes (Oliveira et *al.*, 2017 ; Sizmur et *al.*, 2017 ; Wang et Wang, 2019), ce qui suggère qu'elles pourraient également se développer sur des particules de charbon noir et dégrader directement les HAPs adsorbés.

12.7. Méthodes bioélectrochimiques pour la surveillance de la biorestauration in situ des sédiments

Il s'agit de l'utilisation piles à combustible microbiennes pour la dégradation des polluants au moyen de populations microbiennes électrogènes (Maletić et *al.*, 2019). En effet, les piles à combustible microbiennes sédimentaires (SMFC) sont des dispositifs électrochimiques qui récupèrent l'énergie électrique à partir des différences potentielles entre les interfaces eau/sédiment de l'environnement. Enfouir une anode dans le sédiment et allouer une cathode dans l'eau sus-jacente, l'énergie électrique circulant dans le circuit externe. Différentes variations de dispositifs électrogènes environnementaux ont été décrites (Cappello et *al.*, 2019 ; Saini et *al.*, 2019). En outre, le combustible naturel des SMFC n'est pas simplement de la

matière organique, car une partie du courant est générée par l'oxydation du sulfure produit in situ par réduction microbienne du sulfate (Saini et *al.*, 2019 ; Yang, 2019).

Il est intéressant de noter qu'un autre groupe de microorganismes peut réoxyder le soufre en sulfate, entraînant un cycle qui, s'il est correctement équilibré, constituerait une source de combustible sans fin pour ces piles à combustible environnementales (Kronenberg et *al.*, 2017 ; Saini et *al.*, 2019). Cette technologie ne peut pas concurrencer le réseau électrique, mais elle répond aux exigences des périphériques de faible puissance qui fonctionnent dans des endroits éloignés où le réseau n'est pas disponible. Par exemple, il peut alimenter des capteurs électrochimiques et de petits systèmes de télémétrie pour transmettre les données acquises (Cappello et *al.*, 2019 ; Yang, 2019), ce qui constitue une application intéressante et raisonnable qui pourrait s'avérer extrêmement utile pour surveiller les paramètres caractérisant la qualité de l'eau, tels que la température, le pH et des concentrations de métaux lourds dans des environnements éloignés (Kronenberg et *al.*, 2017).

12.8. Restaurations des sédiments marins par combinaison de plusieurs méthodes

Des études récentes ont montré qu'une combinaison de plusieurs stratégies, y compris les approches in situ, est susceptible de fournir la solution la plus efficace à long terme pour faire face aux sédiments contaminés. Ces approches in situ incluent, sans toutefois s'y limiter : la bioaugmentation, la biostimulation, la phytoremédiation, la dépollution électrocinétique, l'addition de surfactant et l'application de l'amendement de différents sorbants (le charbon actif) pouvant réduire l'exposition et limiter la redistribution et apport de contaminants dans l'environnement (Maletić et *al.*, 2019).

En effet, la combinaison de plusieurs méthodes peut conduire à une amélioration de la stabilité phytosanitaire et à la promotion de la biorestauration des sédiments marins (Fig. 11). En outre, les macroalgues autochtones telles que *Caulerpa prolifera* sont fixées dans les fonds marins au moyen de structures analogues à des rhizomes, généralement réparties dans la Méditerranée (Ouahid et *al.*, 2019 ; Zhang C. et *al.*, 2017). Ces plantes influencent directement les caractéristiques des sédiments en excréant des matériaux pouvant contribuer à la qualité des substrats de croissance pour les communautés benthiques procaryotes. Ces macroalgues ont montré un certain degré de tolérance aux environnements contaminés, tels que les ports et, par conséquent, son interaction avec le biote benthique peut améliorer la biodégradation des contaminants (Maletić et *al.*, 2019).

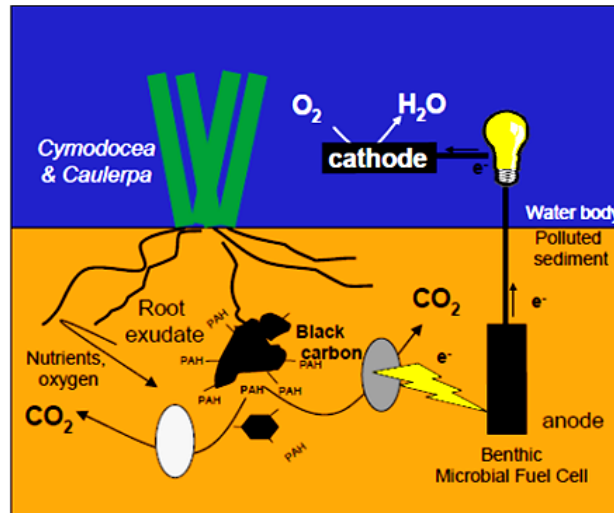


Figure 11 : Un modèle de biorestauration des sédiments marins par combinaison de plusieurs méthodes (bioaugmentation, phytoremédiation, amendement par le charbon noir et bioélectrochimie).

13. TECHNOLOGIES D'INTERVENTION ACTUELLES EN CAS DE DEVERSEMENT D'HYDROCARBURES EN MILIEU MARIN

Le premier grand déversement d'hydrocarbures en mer a eu lieu en 1907 avec le naufrage du Thomas W. Lawson, qui a déversé 7 400 t de pétrole paraffineux au large des côtes du Royaume-Uni. Depuis lors, des estimations indiquent que plus de 140 grands déversements ont déversé dans l'environnement plus de 7 millions de tonnes de pétrole (Li *al.*, 2016). Ainsi, la catastrophe de DeepWater Horizon (DWH), qui a eu lieu 20 avril 2010, a rejeté plus de 700 000 t de pétrole brut dans le golfe du Mexique. Bien que les accidents comme le DWH fassent l'objet d'une large publicité, plus de 90% de la pollution par les hydrocarbures provient de sources naturelles et anthropiques non accidentelles (Mapelli *et al.*, 2019), y compris d'écoulements de sources terrestres et d'opérations de routine des navires, telles que le déballastage et le lavage des citernes (Daffonchio *et al.*, 2013).

Les déversements d'hydrocarbures peuvent avoir un impact environnemental et économique considérable. Le pétrole brut rejeté dans l'environnement subit des modifications chimiques, physiques et biologiques, appelées altération. Le destin des hydrocarbures du pétrole brut altérés dépend des microorganismes qui ont développé des stratégies pour augmenter leurs voies de biodisponibilité et de dégradation qui leur permettent d'utiliser ces hydrocarbures comme sources de carbone et d'énergie. Hazen *et al.* (2010) ont observé que les demi-vies des n-alcanes ayant fui dans les profondeurs de la mer lors du déversement de DWH étaient plus

courtes que prévu (1 à 6 jours). Néanmoins, des nappes d'hydrocarbures fortement enrichies en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) ont atteint les côtes et ont été détectées pendant au moins un an, nécessitant des interventions de nettoyage (Mappelli et *al.*, 2017).

13.1. Stratégies physiques et chimiques actuelles (non microbiennes) pour les interventions d'urgence en cas de déversement d'hydrocarbures en milieu marin

Les interventions d'urgence actuelles incluent le confinement et la récupération mécaniques des hydrocarbures déversés, l'ajout de dispersants chimiques et le nettoyage physique des rives. Lorsqu'un déversement d'hydrocarbures se produit dans un environnement marin, l'ampleur du déversement est évaluée afin de déterminer l'action d'intervention la plus appropriée. La figure 12 met en évidence les différentes approches de nettoyage actuellement utilisées pour les eaux, les rivages et les sédiments. La stratégie de combat principale consiste à contenir et à récupérer le pétrole de manière mécanique en utilisant différents types de barrages, de barrières et de skimmers (des émulsifiants), ainsi qu'à l'application de matériaux absorbants naturels ou synthétiques. Les barrages de confinement sont généralement utilisés dans les eaux de surface en tant que barrières pour empêcher le pétrole de s'étendre et d'affecter les rivages ou d'autres ressources marines, telles que les installations d'aquaculture (Jafarinejad, 2017 ; Mapelli et *al.*, 2017).

À l'aide de différents types de barrages (clôtures, rideaux ou barrages gonflables), le pétrole est concentré en couches plus épaisses, ce qui facilite son élimination ultérieure avec des émulsifiants. Différents types d'émulsifiants (écumeurs de déversoir, oléophiles et à succion) ont été mis au point pour les types spécifiques d'hydrocarbures, et en présence de glace ou de débris. Les sorbants sont des matériaux polymères naturels ou synthétiques utilisés pour les très petits déversements afin d'absorber les hydrocarbures déversés à la surface ou à l'intérieur du corps par gonflement. Ils sont également utilisés pour éliminer les dernières traces d'huile après la collecte avec des émulsifiants (Fig. 12) (Jafarinejad, 2017 ; Mapeli et *al.*, 2017).

Les dispersants sont des mélanges de tensioactifs et de solvants, qui réduisent les hydrocarbures déversés en petites gouttelettes par l'action des vagues et des courants ; ils sont principalement utilisés en eaux libres et profondes (Fig. 12). La colonne d'eau, empêchant ainsi la marée noire d'atteindre le rivage. Le rapport surface/volume des gouttelettes d'huile est plus élevé que celui des nappes de pétrole, ce qui permet à une plus grande partie de la surface de l'huile d'être exposée à des microorganismes (Mapeli et *al.*, 2017 ; Chen et *al.*, 2019).

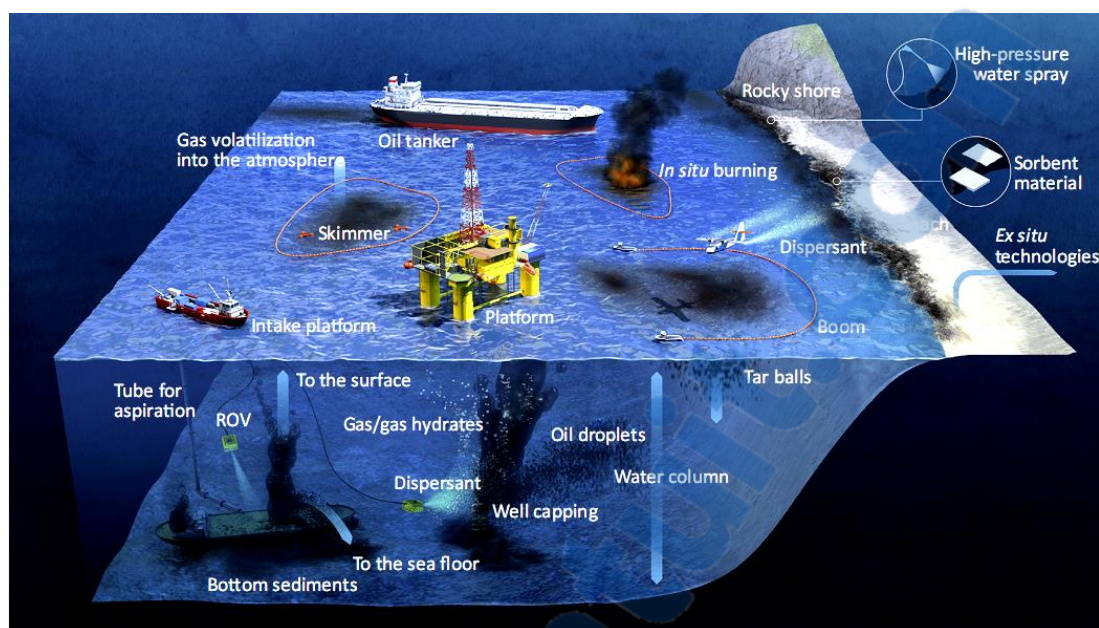


Figure 12 : Technologies actuelles (non microbiennes) pour les interventions d'urgence en cas de déversement d'hydrocarbures en milieu marin (Mapeli et *al.*, 2017).

Les dispersants sont efficaces lorsqu'ils sont appliqués immédiatement après un déversement (Fig. 12), avant que les composants des hydrocarbures les plus légers ne se volatilisent. Leur performance dépend de la salinité de l'eau, de la température et de l'action des vagues. Compte tenu de la toxicité des composants des dispersants, y compris pour les microorganismes, l'objectif technologique actuel de la remédiation des marées noires est de remplacer les tensioactifs chimiques (toxiques) par des biosurfactants non toxiques (Jafarinejad, 2017 ; Mapeli et *al.*, 2017).

Une série de méthodes physiques ont été mises au point pour différents types de contamination par le pétrole. Lorsque les marées noires atteignent les plages sablonneuses ou les côtes rocheuses, elles sont collectées manuellement ou pulvérisées avec de l'eau pour les remettre à l'eau, où elles sont adsorbées par des matériaux absorbants (Fig. 12). Une autre technique d'élimination du pétrole est la combustion in situ, la combustion contrôlée ou le pétrole sur le lieu du déversement afin de réduire la quantité de pétrole à la surface. Le brûlage in situ, qui devrait être associé à des évaluations de la toxicité des résidus brûlés (Schaum et *al.*, 2010), a été utilisé à plusieurs reprises, y compris lors de l'accident de DWH, où la quantité de pétrole brûlée était supérieure à la quantité de pétrole collecté mécaniquement malgré les incertitudes de l'estimation (Kerr, 2010). Les premières mesures à prendre en cas de déversement en eaux

profondes recouvrant la tête du puits de pétrole en fuite sont complétées par les autres approches (Fig. 12).

13.2. Stratégies biotechnologiques (microbiennes) pour les interventions en cas de déversement d'hydrocarbures en milieu marin

Les technologies de bioremédiation compatibles avec les cycles biogéochimiques naturels comprennent les amendements de biosurfactants, la biostimulation et la bioaugmentation. Les biosurfactants favorisent la solubilisation de l'huile et la formation de gouttelettes d'huile dans l'eau (Fig. 13), ce qui permet aux hydrocarbures d'être disponibles pour les microorganismes ne produisant pas de biosurfactants (Mapelli et *al.*, 2017).

Comparés aux dispersants chimiques, les biosurfactants ont une toxicité faible à nulle, une biodégradabilité élevée, des activités de surface et d'émulsification et une stabilité élevée dans des conditions extrêmes de température, de pH et de salinité. Ainsi, les biosurfactants ont un impact positif sur la biodégradation des hydrocarbures (Mapelli et *al.*, 2017 ; Chen et *al.*, 2019).

La biostimulation est l'une des approches les plus efficaces pour améliorer l'activité de dégradation des communautés bactériennes indigènes, car elle améliore le rapport C/N/P qui est déséquilibré après les marées noires. La micro-encapsulation des éléments nutritifs dans les particules à libération lente, éventuellement associées à des biosurfactants et à des microorganismes dégradant les huiles, peut améliorer l'efficacité de la biostimulation (Fig. 13). Les particules à libération lente sont produites avec des polymères à faible toxicité, par exemple des copolymères de polyuréthane et de polyurée, des alginates et des chitosanes. Une stratégie récente basée sur la micro-injection, la cryo-réticulation et le revêtement avec des films d'éthylcellulose a permis la synthèse de billes d'alginate à capacité de charge accrue et à libération lente d'engrais N/P. Ainsi, on a constaté une augmentation de l'élimination totale des hydrocarbures du pétrole en utilisant des bactéries dégradant le diesel, encapsulées dans un alginate, par rapport aux cellules libres (Kleindienst et *al.*, 2015 ; Mapelli et *al.*, 2017).

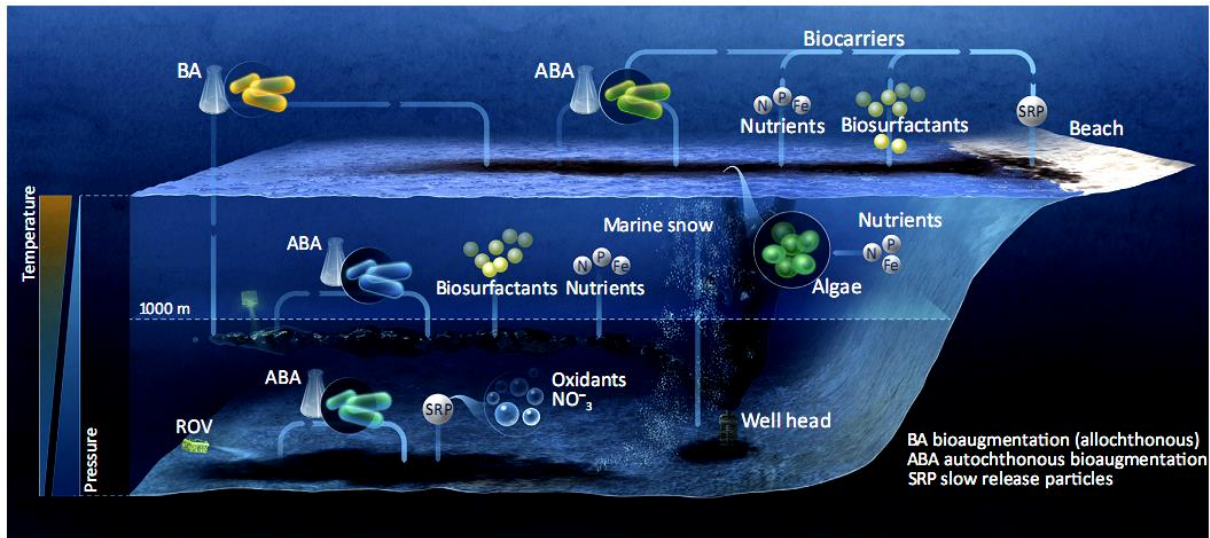


Figure 13 : Approches biotechnologiques pour l'assainissement des environnements marins pollués par les hydrocarbures (Mapelli et *al.*, 2017).

(BA) : Bioaugmentation allochtone (par des microorganismes allochtones) ;

(ABA) : Bioaugmentation autochtone (par des microorganismes autochtones) ;

(SRP) : particules à libération lente.

En revanche, les populations microbiennes indigènes (autochtones) peuvent ne pas avoir la capacité métabolique totale de traiter le mélange complexe d'hydrocarbures déversés, ou des agents de dégradation d'hydrocarbures spécialisés peuvent être sous-représentés dans la communauté existante. La bioaugmentation avec des microorganismes allogènes (allochtones) au site pourrait augmenter la dégradation des hydrocarbures, bien que la présence à long terme de ces microorganismes non indigènes a été interrogée. Ainsi, l'expérience a prouvé que la plupart des microorganismes exogènes ne sont pas plus efficaces que les organismes hydrocarbonoclastes indigènes, dont la prolifération est stimulée par la marée noire (Mapelli, et *al.*, 2017).

La bioaugmentation autochtone utilise des microorganismes indigènes enrichis, d'habitats spécifiques du site contaminé (par exemple, les eaux de surface ou les eaux de grande profondeur (Fig. 13). Cette approche a été appliquée avec succès dans une étude visant à simuler un déversement d'hydrocarbures, montrant que l'utilisation de bactéries préadaptées dégradant les hydrocarbures, en combinaison avec la biostimulation, donnait les meilleurs résultats en termes d'élimination des hydrocarbures. Une autre alternative est la bioaugmentation avec des éléments génétiques mobiles, qui vise le transfert horizontal de gènes de remédiation d'un

inoculant exogène à des microorganismes indigènes en utilisant des plasmides ou transposons cataboliques (Kleindienst et *al.*, 2015 ; Mapelli et *al.*, 2019).

14. PROCESSUS GENERAUX DE BIODEGRADATION DES HAPS

Dans les conditions naturelles, la biodégradation des hydrocarbures est un processus lent et complexe. Elle se déroule selon une réaction d'oxydation en chaîne, les hydrocarbures sont transformés par cassures successives en molécules de moins en moins complexe jusqu'à l'obtention de sous-produits simples qui sont représentés par l'H₂O et le CO₂ avec renouvellement de la biomasse (Babu et *al.*, 2019), comme suit :

- l'utilisation du xénobiotique comme source d'énergie pour la croissance bactérienne (oxydation, réduction, fermentation) ;
- le co-métabolisme, au cours duquel le composé chimique n'est pas utilisé pour la croissance bactérienne mais est dégradé du fait de l'activité métabolique.

14.1. La dégradation primaire (Minéralisation)

La dégradation primaire correspond à la biodégradation complète de la molécule organique, par les micro-organismes, appelée aussi la minéralisation. Elle est couplée à une production d'énergie et de carbone au travers d'une série de réactions complexes d'oxydoréduction. Dans ce cas, les substances impliquées sont considérées comme des sources de croissances primaires, puisqu'elles sont directement impliquées dans la croissance bactérienne. Au cours de ce procédé biologique, les électrons subissent des transferts par addition ou retrait au niveau d'intermédiaires tout au long de la chaîne de réactions (Babu et *al.*, 2019).

14.2. Le co-métabolisme des substrats

Le co-métabolisme correspond à la dégradation biologique d'un composé, par une enzyme produite de manière fortuite. Cette enzyme catalyse normalement un autre substrat, mais elle peut présenter une certaine non-spécificité de substrat (Babu et *al.*, 2019).

Le polluant ne sert pas de source principale de carbone ou d'énergie. Le microorganisme a besoin d'une source primaire de substrat, et le polluant est considéré comme un substrat secondaire. Ainsi, les produits de dégradation liés au co-métabolisme ne stimulent pas la croissance bactérienne des populations concernées. En culture bactérienne pure, le produit du co-métabolisme est généralement stocké et n'est pas entièrement minéralisé. Tant que le métabolite n'est pas toxique, la transformation du substrat peut continuer. Dans le cas d'un consortium microbien, il peut exister une forme de commensalisme, où une première espèce

dégrade un substrat. Le métabolite produit n'étant pas utilisé par la bactérie, cette source d'énergie peut servir à une seconde espèce (Alegbeleye, et *al.*, 2017 ; Obafemi et *al.* 2018).

Plusieurs microorganismes sont capables de minéraliser les hydrocarbures. Par contre la présence d'un consortium bactérien peut être requise pour la dégradation complète de HAPs, particulièrement les HAPs à haut poids moléculaire, tel que le benzo(a)pyrène (Babu et *al.*, 2019). Vu la nature complexe et la diversité de ces composés, la dégradation effectuée par un consortium est souvent plus efficace (Kumai et *al.*, 2018 ; Babu et *al.*, 2019).

Le cométabolisme demeure toutefois un phénomène complexe. En effet, lorsqu'il ya plusieurs bactéries, chaque microorganisme peut fournir les enzymes impliquées dans une certaine étape de la dégradation. Les métabolites intermédiaires de la dégradation des composés peuvent alors être utilisés comme source de carbone par les autres bactéries (Jamal et Pugazhendi, 2018 ; Babu et *al.*, 2019). De plus, certains métabolites intermédiaires peuvent être toxiques pour quelques bactéries tandis que d'autres peuvent les utiliser comme source de carbone. Plusieurs études ont d'ailleurs montré la dégradation des HAPs par différents consortium bactériens (Crisafi et *al.*, 2016 ; Obafemi et *al.* 2018 ; Jamal et Pugazhendi, 2018 ; Kumai et *al.*, 2018).

15. LES MECANISMES D'ACTION DES MICROORGANISMES

La bioremédiation est l'outil pour transformer les composés en formes moins dangereuses ou non dangereuses, avec moins d'apport de produits chimiques, d'énergie et de temps. C'est une approche pour dégrader ou éliminer les polluants dans un moyen écologique. Les sites contaminés par les HAPs peuvent être dépollués par des microorganismes tels que des bactéries, champignons et algues, individuellement ou en combinaison. La bioremédiation d'un polluant et la vitesse à laquelle elle est atteinte dépend de l'environnement conditions générales, nombre et type de microorganismes, la nature et la structure chimique du composé chimique à dégrader (Loh et *al.*, 2019 ; Yu et *al.*, 2019).

15.1. Les enzymes

Il existe ainsi une grande diversité de voies métaboliques aérobies et anaérobies des hydrocarbures. Cependant, l'attaque initiale est un indicateur précis de la voie métabolique mise en jeu (Vandecasteele, 2005). Les trois principaux types d'attaque enzymatiques impliquent soit des oxygénases (dioxygénases ou mono-oxygénases), des ligninases ou des hydrolases (Sharma et *al.*, 2018 ; Babu et *al.*, 2019) (Fig. 14).

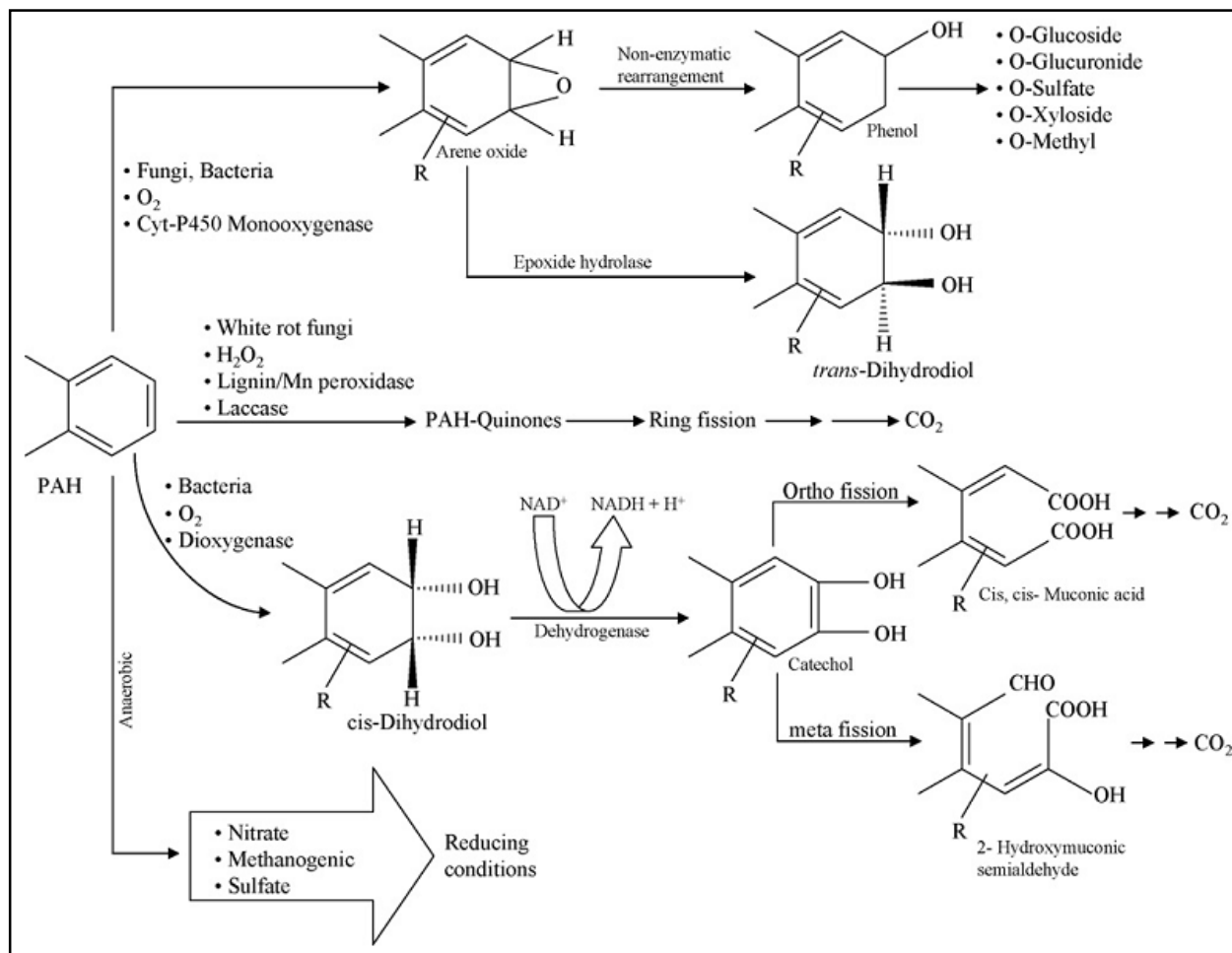


Figure 14 : Catabolisme microbien général des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (Haritash et *al.*, 2009).

15.1.1. Les oxygénases

Les oxygénases sont des enzymes qui catalysent l'incorporation de l'oxygène sous forme d' O_2 dans les composés organiques. Il existe deux classes d'oxygénases : les dioxygénases qui catalysent l'incorporation de deux atomes d' O_2 dans une molécule de composé organique, et les mono-oxygénases qui catalysent le transfert d'un des deux atomes d'oxygène d' O_2 dans un composé organique, le deuxième atome d' O_2 est réduit en H_2O . Le donneur d'électrons de la plupart des mono-oxygénases est le NADH ou le NADPH, bien que l' O_2 soit couplé directement à une flavine qui est ensuite réduite par NADH ou NADPH (Fig. 15) (Madigan et Martinko, 2007).

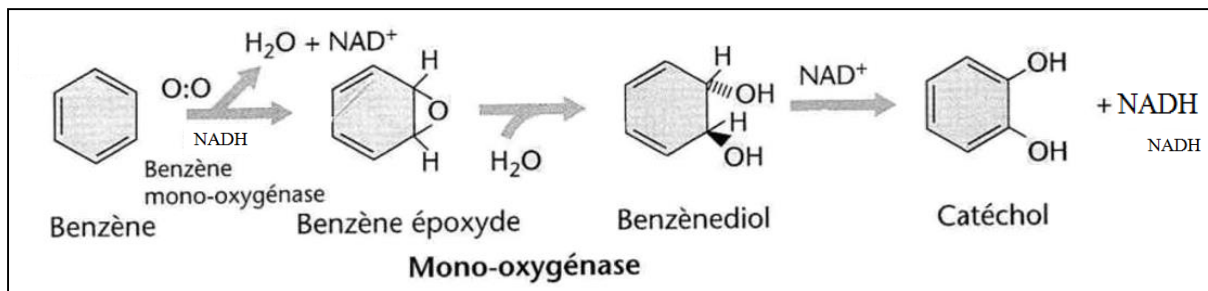


Figure 15 : Mécanisme d'action de la mono-oxygénase (Madigan et Martinko, 2007).

Les dioxygénases

Plusieurs travaux ont porté sur la biodégradation des HAPs par des souches bactériennes hydrocarbonoclastes (Kasuga et *al.*, 2007 ; Chang et *al.*, 2011 ; Wojcieszynska et *al.*, 2012 ; Xie et *al.*, 2013 ; Hassan et Aly, 2018, Liu, Z. et *al.*, 2019). L'habilité de ces bactéries à dégrader les hydrocarbures est liée au fait que leur génome porte le gène codant pour l'enzyme de dégradation, à savoir, la dioxygénase. Cette enzyme contient du fer comme seul cofacteur qui joue un rôle clé dans la biodégradation oxydative d'un grand nombre de composés aromatiques (Kita et *al.*, 1999 ; Sharma et *al.*, 2018).

Les dioxygénases catalysent le clivage du cycle aromatique du catéchol et ses dérivés soit de manière intradiol ou extradiol (Fig. 16) (Reddig et *al.*, 2004).

L'enzyme catéchol 1,2-dioxygénase, est une dioxygénase de type intradiol qui catalyse la conversion du catéchol en cis,cis-acide muconique. Cette enzyme est présente chez de nombreux microorganismes qui métabolisent les composés aromatiques par clivage ortho (Fig. 16) (Kasai, et Harayama, 2004 ; Parales et Ju, 2011 ; Nogales et *al.*, 2017).

L'enzyme catéchol 2,3-dioxygénase est une dioxygénase de type extradiol, catalyse la conversion du catéchol en 2-hydroxymuconique semi-aldéhyde avec l'insertion de deux atomes de d'oxygène, et responsable du clivage méta (Fig. 16) (Parales et Ju, 2011 ; Sharma et *al.*, 2018).

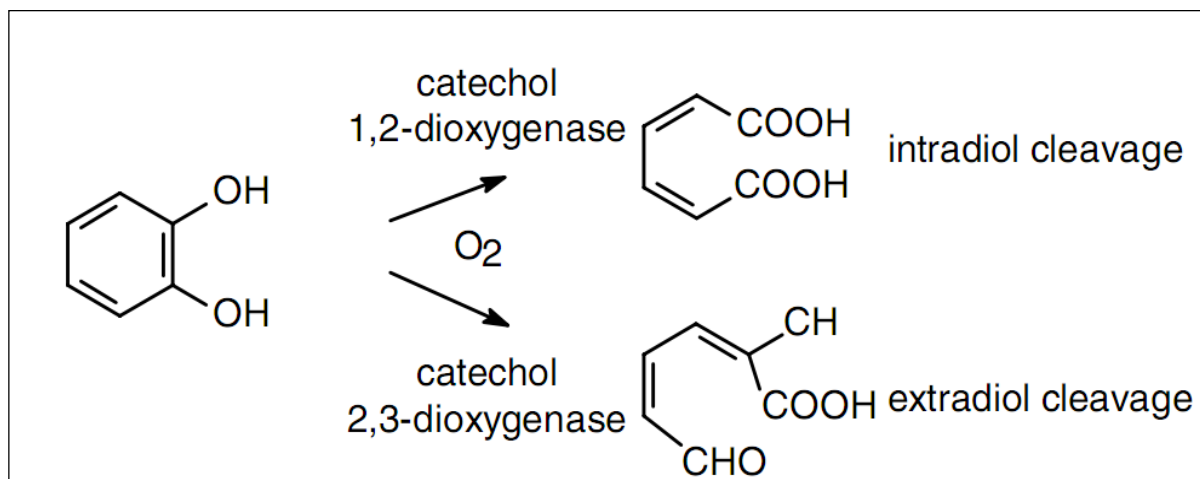


Figure 16 : Modes de clivage catalysés par la catéchol 1,2-dioxygénase (clivage intradiol) et la catéchol 2,3-dioxygénase (clivage extradiol) (Reddig et *al.*, 2004).

La catéchol 2,3-dioxygénase

La catéchol 2,3-dioxygénase (métopyrocathécasse MPC) de *Pseudomonas putida* mt-2 a été la première enzyme à être purifiée et étudiée parmi les dioxygénases, et qui a permis la compréhension du mécanisme des dioxygénases en général (Kita et *al.*, 1999).

L'enzyme est un homotétramère et chacune de ses sous-unités possède un ion de fer (Fe^{2+}) non hémique au niveau du site actif (Winkler et *al.*, 1995 ; Costa et *al.*, 2004). Les sous-unités comprennent des domaines N- et C- terminaux de structures similaires (Fig. 17).

Le site actif se trouve dans un espace en forme d'un entonnoir du domaine C- terminal. Dans cet espace, l'atome de fer est directement ligaturé par trois résidus de protéines (His153, His 214, et Glu 265), et une molécule d'acétone liée à l'atome de fer (Fig. 17). La géométrie du site Fe est un tétraédrique déformé (Costa et *al.*, 2004). Ce gène, catéchol 2,3-dioxygénase (C23O), appartient à une famille de gènes codants, responsables de la dégradation de plusieurs hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (Hassan et Aly, 2018, Liu, Z. et *al.*, 2019).

Pour la dégradation du naphthalène, l'enzyme catéchol 2,3-dioxygénase est codée par le gène *nahH* présent dans le plasmide IncP-9 NAH7; par contre, différents gènes (*xylE*) codants pour cette même enzyme pour dégrader le toluène sont présents dans les plasmides IncP-9 TOL ou pWW0 (Bartilson et Shingler, 1989).

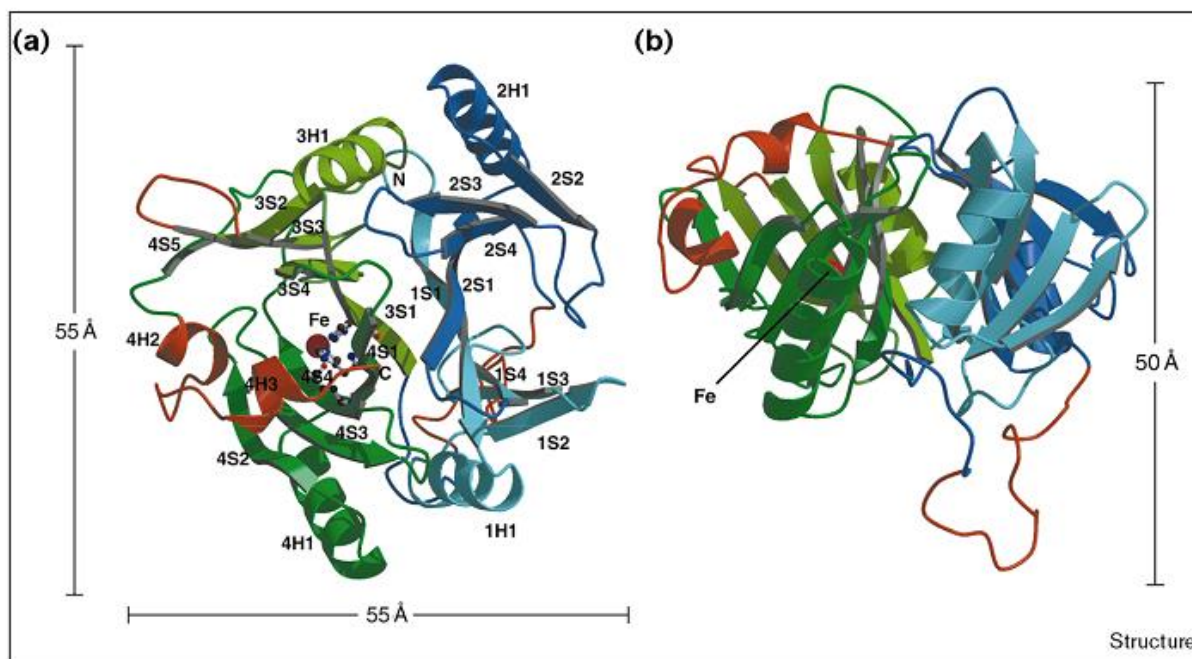


Figure 17 : Structure du monomère de l'enzyme catechol 2,3-dioxygénase (MPC). L'atome de Fe (II) est montré comme une sphère rouge. (a) Une vue de dessus du monomère MPC. Les éléments de structure secondaires, feuillet β et les hélices α dans le nième motif $\beta\alpha\beta\beta\beta$ sont représentés par nS1, nH1, nS2, nS3 et nS4 respectivement. (b) Une vue de côté du monomère MPC tourné à 90° de (a) le long de l'axe horizontal (Kita et al. 1999).

Le gène catéchol 2,3-dioxygénase (gène *nahH*) responsable de la dégradation des HAPs a été détecté dans le chromosome de *Staphylococcus* sp. KW-07 et *Ochrobactrum* sp. CH-19, et dans l'ADN plasmidique de *Pseudomonas* sp. CH-1 (Chang et al., 2011 ; Ghosh et al., 2017). Selon Chang et al. (2011), la souche de *Staphylococcus* sp. était la plus dégradante du phénanthrène par rapport aux deux autres souches isolées.

15.1.2. Les enzymes lignolytiques

Bien que moins étudiés que les bactéries dans le domaine de la biodégradation, les champignons apparaissent très intéressants pour la dégradation des HAPs, en particulier de hautes masses molaires (Kadri, et al., 2017). Cette propriété est liée aux métabolismes du règne fongique qui leur permettent de dégrader des molécules naturelles complexes, en particulier, de dégrader la lignine, qui est un polymère de structure complexe et aléatoire contenant des noyaux aromatiques.

Cependant, Il existe deux types de champignons dégradants les HAPs, à savoir les champignons lignolytiques et des champignons non lignolytiques (Kadri, et al., 2017 ; Babu et al., 2019).

En effet, deux voies d'attaques ont été décrites pour les champignons, l'une s'effectue par des mono-oxygénases qui forment des époxydes (souvent des cytochromes P450), l'autre par des enzymes lignolytiques, généralement extracellulaires : les lignines-peroxydases (ou ligninases), les peroxydases manganèse-dépendantes (manganèse-peroxydase), et la laccase (Fig. 11). Elles sont extracellulaires et catalysent la formation de radicaux par oxydation (Kadri, et *al.*, 2017).

Selon Haritash et *al.* (2009), le groupe majeur d'espèces fongiques, responsables de la dégradation des HAPs, est celui qui comprend des espèces dotées d'une batterie de la lignine-peroxydase et la peroxydase de manganèse, qui transforment les HAPs en formes moins nocives et plus simples, tels que *Aspergillus* sp., *Trichocladium canadense*, et *Fusarium oxysporum*.

Chez les champignons non lignolytiques (*Cunninghamella elegans*, *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp.), l'attaque initiale des HAPs, catalysée par une monooxygénase, se traduit par l'incorporation d'un atome d'oxygène dans un cycle aromatique de l'hydrocarbure, qui forme alors une arène oxyde. Cette action peut se faire en différentes positions, et à partir d'un même HAP, de très nombreux isomères peuvent ainsi être formés. Ce mécanisme est le même que celui utilisé par les organismes supérieurs pour la détoxification des molécules aromatiques. La monooxygénase responsable de cette dégradation est le cytochrome P450 (enzyme membranaire inductible) (Vandecasteele, 2005 ; Kadri, et *al.*, 2017).

Ainsi, les champignons peuvent transformer les hydrocarbures de façon cométabolique en métabolites moins toxique, par l'action de peroxydase et de monooxygénase (Kadri, et *al.*, 2017).

La figure 18 montre le métabolisme du phénanthrène par différentes espèces de champignons. Le phénanthrène est métabolisé via la production de trans-1,2-, trans-3,4-, et trans-9,10-dihydrodiols et d'un conjugué glucoside (Sutherland et *al.*, 1995).

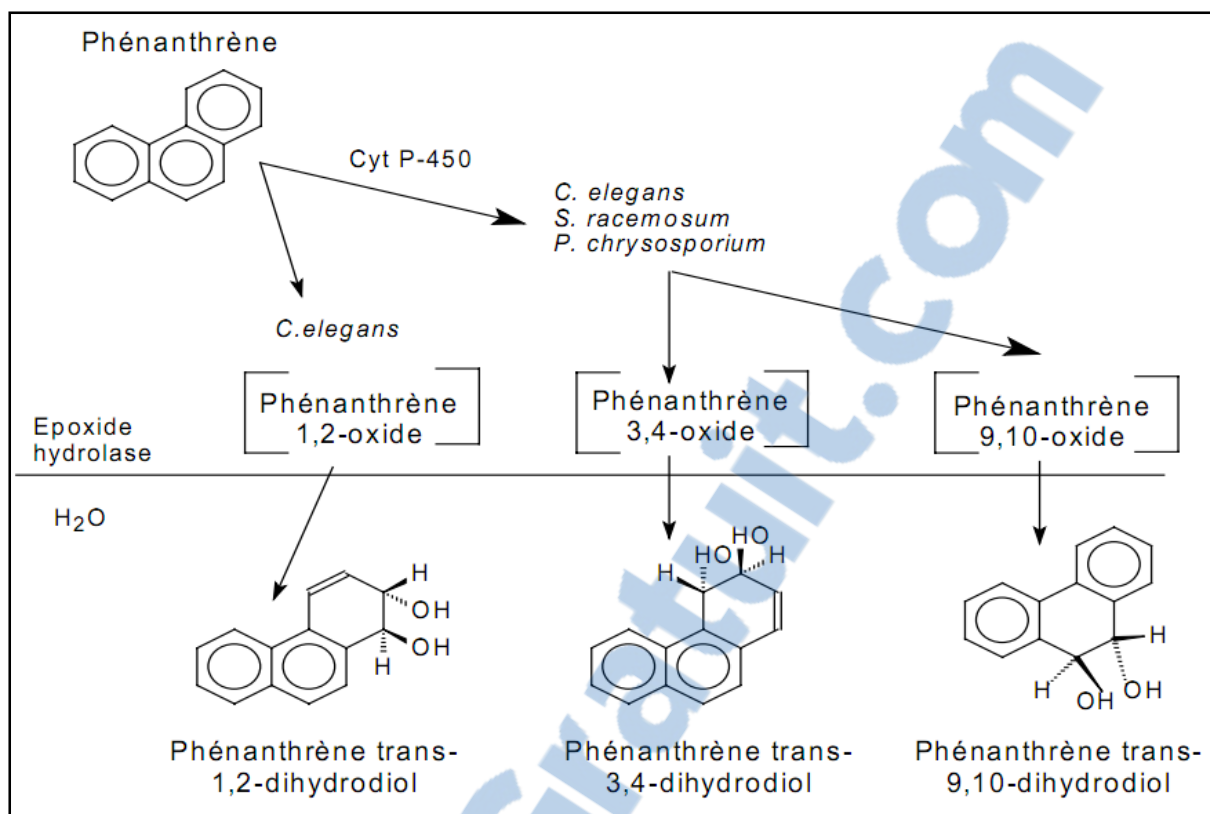


Figure 18 : Métabolisme du phénanthrène par différentes espèces de champignons (Sutherland et *al.*, 1995).

15.1.3. Les enzymes hydroxylases

Les enzymes hydrolytiques comprennent les lipases (participe à la dégradation des HAPs selon Mehta et *al.*, 2017), les cellulases, les carboxylestérases, phosphotriestérases, et les haloalkane-dehalogénases. Les hydrolases extracellulaires catalysent la bioremédiation de polymères organiques, et des composés toxiques de poids moléculaires inférieurs à 600 Da pouvant traverser les pores des cellules. La bioremédiation des déversement d'hydrocarbures à l'aide d'enzyme hydrolytique est très efficace (Sharma et *al.*, 2018).

Les enzymes hydrolytiques sont le plus souvent utilisées pour la bioremédiation des pesticides et des insecticides et la réduction de leur toxicité. Les principales liaisons chimiques telles que les esters, les liaisons peptidiques, les liaisons carbone-halogénures, etc. sont perturbées par différentes enzymes hydrolytiques (Sharma et *al.*, 2018).

15.2. Les biosurfactants

Les surfactants (Surface Active Agents) sont des agents à activité de surface (tensioactifs), synthétisés chimiquement ou par voie biologique (biosurfactants). Ces molécules de haute énergie se répartissent à l'interface entre deux liquides non miscibles, réduisant ainsi l'énergie

libre du système, et formant des microémulsions des solutions aqueuses ou des mélanges d'hydrocarbures (Liu et *al.*, 2019). Il s'agit de molécules amphiphiles, constituées de deux pôles : un pôle hydrophile, qui peut être un ester, un hydroxyle, un phosphate, un carboxyle, ou encore un groupe d'hydrates de carbone, et peut avoir une charge neutre ou négative, et un pôle hydrophobe qui est un acide gras hydroxylé, saturé ou insaturé, et peut être aussi un peptide selon plusieurs auteurs (Twigg et *al.*, 2018). Les classes majeures de biosurfactants sont différenciées essentiellement par leur composition chimique et leur origine microbienne (Karlapudi et *al.*, 2019).

La production de biosurfactants est un phénomène communément observé lors de la croissance d'un microorganisme sur des substrats insolubles dans l'eau, et la réduction de la tension superficielle du milieu, ainsi que la formation d'une émulsion stable indiquent une production efficiente (Karlapudi et *al.*, 2019). Elle est nécessaire pour obtenir une émulsion stable entre deux liquides purs non miscibles (Liu et *al.*, 2019). C'est l'un des comportements des microorganismes pour augmenter la biodisponibilité de plusieurs substrats hydrophobes, qui sont peu utilisés à cause de leur insolubilité dans l'eau. En effet, certaines bactéries synthétisent des biosurfactants qui sont soit intracellulaires, extracellulaires ou à la surface de la cellule (Karlapudi et *al.*, 2019). Ainsi, ces molécules sont synthétisés pour faciliter la diffusion des hydrocarbures ou leurs dérivés à l'intérieur de la cellule bactérienne à fin de les dégrader (Vasudevan et *al.*, 2018). De même, les produits intermédiaires d'oxydation des hydrocarbures ne persistent pas, mais seront potentiellement réabsorbés et métabolisés par le métabolisme enzymatique des mêmes microorganismes (Jimoh et Lin, 2019).

En outre, les biosurfactants peuvent avoir d'autres rôles aussi importants que l'émulsification, qui diffèrent selon les espèces, tels que l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms, la régulation du niveau énergétique cellulaire, l'activité bactéricide (gramicidine, polymexine, surfactine), la pathogénicité de certaines bactéries (rhamnolipides de *Pseudomonas*), ainsi que le piégeage des métaux lourds (Liu et *al.*, 2017 ; Lal et *al.*, 2018).

Le rôle des biosurfactants dans la biodégradation des hydrocarbures

Le rôle des biosurfactants est très important dans la biodégradation des hydrocarbures. Ils assurent la dispersion des complexes d'hydrocarbures, et permettent leur biodisponibilité pour une éventuelle dégradation par des microorganismes hydrocarbonoclastes. Cependant, il existe une relation claire entre l'activité d'émulsification, l'adhérence des cellules à l'hydrocarbure, et le taux de croissance des isolats sur le pétrole brut (Lui, et *al.*, 2019). Ainsi, le biosurfactant

disperse les hydrocarbures en petites gouttelettes, et forme une couche autour de chacune, augmentant ainsi sa disponibilité aux organismes dégradants (Karlupudi et *al.*, 2019).

En outre, certaines bactéries sécrètent des substances qui forment un réseau de projections extracellulaires reliant les cellules les unes aux autres. Ce réseau est supposé être un complexe de biosurfactants et d'alcane qui forme un site d'ancrage des cellules et un moyen de transport d'hydrocarbures à leur surface cellulaire (Karlupudi et *al.*, 2019 ; Jimoh et Lin, 2019).

Au cours de ces dernières années, la recherche sur les biosurfactants a fortement augmenté sous l'effet des progrès de la biotechnologie. Aussi efficaces que leurs homologues chimiques, les biosurfactants présentent l'avantage d'être biodégradables et non toxiques. De plus certains qui sont sécrétés par des organismes extrêmophiles (et sont donc très efficaces), restent fonctionnel malgré les conditions sévères de température, de salinité et de pH. De nombreux microorganismes producteurs de biosurfactants ont été déjà isolés et il est devenu maintenant possible de produire par voie biologique une grande variété de biosurfactants dont la nature chimique et les propriétés dépendent des paramètres physiques de l'environnement (pH, température, salinité) et de la composition du milieu nutritif (N, P, K, Fe et Mn). Les conditions qui existent dans le futur milieu d'utilisation du biosurfactant déterminent d'ailleurs en grande partie le choix d'une souche pour une application donnée. Étant donné leur diversité chimique et fonctionnelle, les biosurfactants trouveront probablement des applications aussi variées que leurs homologues de synthèse (Akbari et *al.*, 2018 ; Vasudevan et *al.*, 2018).

16. MODE D'ACCESSION AUX HYDROCARBURES

Les hydrocarbures sont des composés hydrophobes dont la solubilité diminue d'autant que la masse moléculaire des composés est importante. Pour les hydrocarbures dont la solubilité est insignifiante, les microorganismes ont dû développer des mécanismes permettant un contact intime entre les cellules et le substrat. Quatre modes d'accession ont été avancés pour expliquer l'assimilation des hydrocarbures par les microorganismes (Bouchez et *al.*, 1996).

16.1. La solubilisation

La solubilisation dans la phase aqueuse a surtout été rapportée pour les hydrocarbures aromatiques suffisamment solubles et les alcanes légers. C'est sous forme solubilisée que le substrat pénètre dans la cellule (Loh et *al.*, 2018 ; Vergeynst et *al.*, 2018).

16.2. L'accèsion interfaciale

Les microorganismes utilisant les alcanes peu solubles possèdent fréquemment une membrane externe hydrophobe. L'hydrophobicité élevée de la membrane cellulaire externe permet l'adhésion du microorganisme aux gouttelettes de substrat présentes dans le milieu aqueux, souvent de taille très supérieure à celle des bactéries. Le substrat pénètre directement dans la cellule par diffusion ou transport actif sans se dissoudre dans la phase. L'hydrophobicité des microorganismes concernés entraîne souvent une forte tendance à l'agrégation (Vandecasteele., 2005 ; Varjani et Upasani, 2017).

16.3. L'accèsion interfaciale facilitée (émulsification)

Dans ce mécanisme, le transfert entre les hydrocarbures et le microorganisme s'effectue par contact direct, mais l'intervention de biosurfactants produit par le microorganisme accélère le transfert en augmentant l'aire interfaciale entre les phases hydrophobes et hydrophiles. On parle de transfert interfacial assisté (Vandecasteele, 2005).

16.4. Le transfert micellaire

Ce mécanisme de pseudo-solubilisation fait intervenir des biosurfactants, produits par certains microorganismes, qui solubiliseraient le substrat en formant de micelles qui à leur tour seraient directement assimilés par les cellules. Ainsi, le transfert micellaire apparaît privilégié chez les microorganismes dont l'hydrophobicité de l'enveloppe cellulaire est faible (Vandecasteele, 2005).

17. LES ESPECES HYDROCARBONOCLATES

17.1. Les espèces Bactériennes

Plusieurs espèces bactériennes sont connus pour leur pouvoir de dégradation des hydrocarbures appartiennent aux genres suivant : *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Achromobacter*, *Staphylococcus*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Actinomycètes*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Serratia*, *Mycobacterium*, *Alcanivorax*, *Comamonas*, *Chryseomicrobium*, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Sphingomonas*, *Cyanobacterium*, *Aeromonas* et *Nesterenkonia* (Vila et al., 2015 ; Mohanram et al., 2016 ; Behera et al., 2018; Appolinario et al., 2019 ; Lee et al., 2019 ; Zhang, S. et al., 2019).

Les principales espèces bactériennes biodégradant les HAPs, isolées de l'eau et des sédiments marins, sont citées dans le tableau 03.

Tableau 03 : Espèces bactériennes aérobies cultivables dégradantes des HAPs isolées du milieu marin.

Composé (HAP)	Microorganismes	Références
Pyrène	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Jiang et al. (2018)
	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp.	Zhang S. et al. (2019)
Acénaphthène	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Barman et al. (2017)
Naphtalène	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Jiang et al. (2018)
	<i>Hewanella</i> sp., <i>Salegentibacter</i> sp. , <i>Halomonas</i> sp., <i>Marinobacter</i> sp., <i>Oceanicola</i> sp., <i>Idiomarina</i> sp. <i>Thalassospira</i> sp.	Hassanshahian, et Boroujeni, (2016)
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Barman et al. (2017)
Anthracène	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Jiang et al. (2018)
	<i>Bacillus subtilis</i>	Salamat et al. (2018)
Phénanthrène	<i>Bacillus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Acinetobacter</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp.	Tiralerdpanich et al. (2018)
	<i>Azoarcus</i> sp., <i>Chelativorans</i> sp.	Patel et al. (2019)
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Ma et al. (2018)
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Tarafdar et al. (2018)
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Mangwani et al. (2014)
	<i>Staphylococcus</i> sp.	Chang et al. (2011)
Fluoranthène	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Jiang et al. (2018)
	<i>Azoarcus</i> sp., <i>Chelativorans</i> sp.	Patel et al. (2019)
Benzo[a]pyrène	<i>Acinetobacter</i> sp.	Kotoky et al. (2017)
	<i>Microbacterium maritypicum</i>	Mansouri et al. (2017)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Meng L. et al. (2019)
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Shuona et al. (2017) ; Kumari et al. (2018)

17.2. Les espèces fongiques

Les champignons dégradant les HAPs qui sont les plus fréquemment retrouvés dans la littérature appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Cunninghamella*, *Penicillium*, *Trametes*, *Fusarium*, *Sacharomyces* et *Bjerkandera* (Kadri et al., 2017). Ainsi, *Aspergillus* sp., *Trichocladium canadense* et *Fusarium oxysporum* se sont avérés les plus dégradantes des HAPs de haut poids moléculaire (4 à 7 cycles) (Hiritash et al., 2009 ; Kadri et al., 2017).

17.3. Les espèces d'algues et de microalgues

Quelques recherches ont aussi démontré la dégradation de certains HAPs par des algues. En effet, *Selenastrum capricoruntum*, une algue verte, peut dégrader le fluoranthène, le pyrène et le Benzo[a]Pyène. D'autres espèces de microalgues comme *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus platydiscus* et *Scenedesmus quadricauda* ont aussi montré une certaine capacité de dégradation des HAPs (Alegbeleye et al., 2017).

18. VOIES METABOLIQUES DE LA DEGRADATION DES HYDROCARBURES

18.1. Voies métaboliques de la dégradation aérobie des hydrocarbures aliphatiques

18.1.1. Dégradation des n-alcanes

Les n-alcanes à courtes chaînes, tel le n-nonane ne sont pas toujours assimilés, mais peuvent être oxydés. Seulement quelques bactéries ont la capacité de croître sur les alcanes plus courts que le n-octane, alors que les n-alcanes dont le nombre de carbone est supérieure à 9, sont les hydrocarbures les plus facilement dégradables par une très grande variété de microorganismes (Viggor et al., 2015 ; Alegbeleye et al., 2017).

Trois voies de dégradation des n-alcanes qui font intervenir l'oxygène moléculaire ont été clairement élucidées : il s'agit de l'oxydation monoterminal, subterminal et diterminal (Bertrand et Mille, 1989). Ces réactions sont réalisées par des cytochromes P450, des méthanes monooxygénases et des systèmes d'hydroxylases à Fer non hémique dits alcane hydroxylase (Viggor et al., 2015 ; De Sousa et al., 2017).

a. L'oxydation monoterminal

L'oxydation monoterminal est le principal processus utilisé par la plupart des bactéries, conduisant à la formation de l'alcool primaire, puis de l'aldéhyde et de l'acide gras correspondant. Les acides gras formés peuvent être oxydés par α , β ou ω -oxydation ; les composés formés pourront par la suite être incorporés aux lipides cellulaires. Une élévation

de la chaîne carbonée est alors possible. Les voies métaboliques d'oxydation monoterminal de n-alcanes sont indiquées sur la figure 19 (Soltani, 2004).

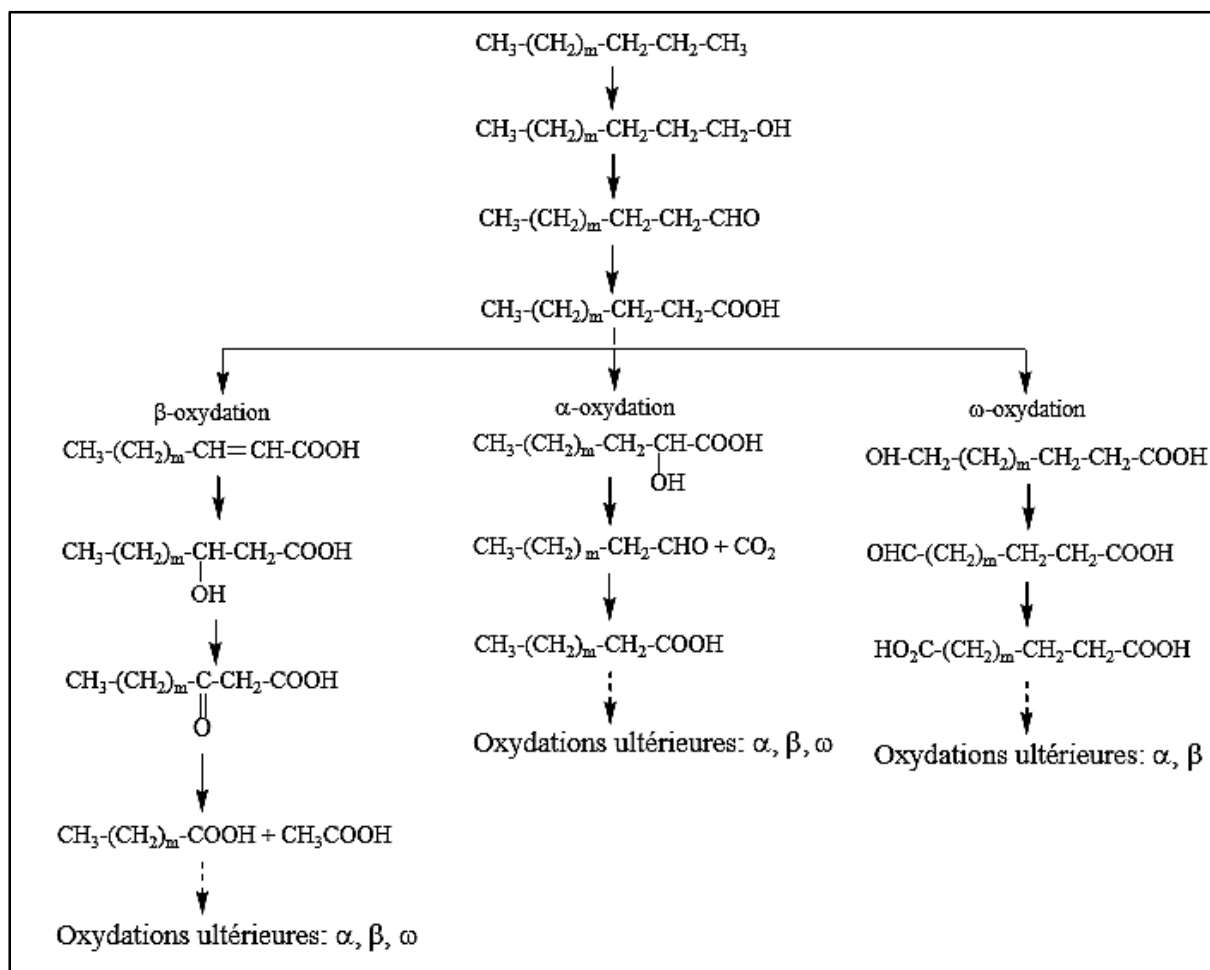


Figure 19 : Voie métabolique de l'oxydation monoterminal de n-alcanes (Soltani, 2004).

b. Oxydation des n-alcanes par le système de dioxygénase

Les n-alcanes sont oxydés par une dioxygénase conduisant à la formation d'un n-alkyl-hydroperoxyde, qui sera à son tour oxydé en aldéhyde puis en acide (Fig. 20). Chez d'autres souches, une étape supplémentaire dans la voie métabolique d'oxydation des n-alcanes a été démontrée : il s'agit de la formation d'un alcool à partir du n-alkyl-hydroperoxyde, qui est ensuite oxydé en aldéhyde (Soussan et al., 2016). La figure 20 montre ces deux voies métaboliques

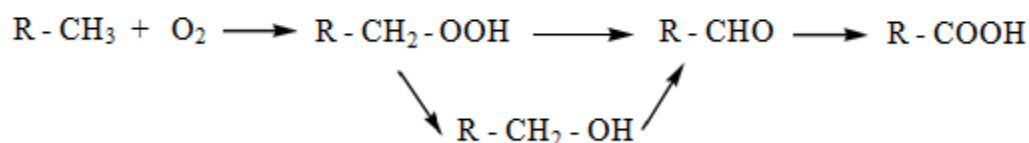


Figure 20 : Les deux voies métaboliques de la dégradation des n-alcanes (Soltani, 2004).

C. Oxydation des alcanes en alcènes

Les alcènes sont des métabolites intermédiaires de la dégradation des alcanes. Les alcènes formés subissent une époxidation suivie d'une réduction en alcool primaire, qui à son tour sera oxydé en acide (Parales et Ju, 2011).

D. Oxydation subterminale

Dans certains cas, l'oxydation peut être subterminale, ce qui conduit à la formation d'un alcool secondaire puis à une cétone. La dégradation ultérieure de la cétone par incorporation d'un atome d'oxygène conduit à la formation d'un ester (réaction de type Bayer-Villiger) qui est hydrolysé en alcool et en acide (Soltani, 2004), comme le montre la figure 21.

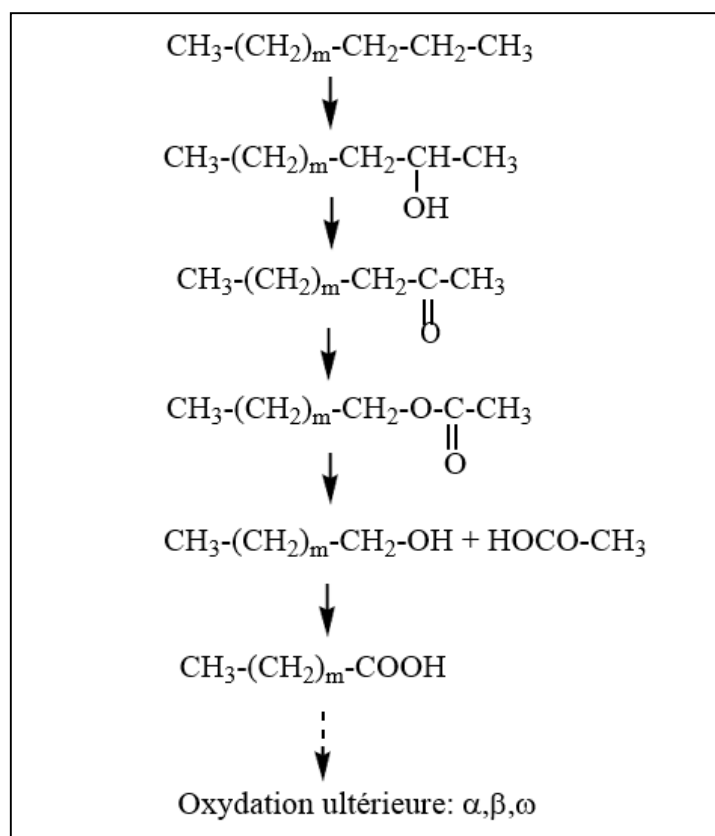


Figure 21 : Voie métabolique de l'oxydation subterminale (Soltani, 2004).

E. Oxydation diterminale

Après formation de l'acide gras, une deuxième oxydation peut se produire au niveau du groupement méthyl- ω pour donner un di-acide. La formation de 1- ω -alcane-diol et de dialdéhyde n'a pas été observée. L'oxydation subterminale de l'acide gras peut également se produire pour donner le (ω -1)-hydroxy acide de même longueur de chaîne que le n -alcane (Reddig et al., 2004).

18.1.2. Biodégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques et des polyaromatiques (HAPs)

La dégradation des hydrocarbures aromatiques par les microorganismes est très importante pour l'élimination de ces composés des systèmes aquatiques et terrestres. Les microorganismes procaryotes et les eucaryotes ont des capacités enzymatiques qui leur permettent d'oxyder les composés aromatiques et polyaromatiques dont la taille peut varier du benzène au benzo[a]pyrène (Gupta *et al.*, 2019).

Les bactéries oxydent initialement les hydrocarbures aromatiques par l'incorporation de deux atomes d'oxygènes moléculaires dans le substrat pour former des dihydrodiols de configuration *cis*. Cette réaction est catalysée par une enzyme, la dioxygénase. L'oxydation des *cis*-dihydrodiols conduit à la formation de catéchols (Parales et Ju, 2011). Généralement, l'oxydation se poursuit par une rupture *ortho* (rupture de la liaison entre les deux groupements hydroxyle) ou *méta* (rupture d'une liaison entre un carbone portant un groupement hydroxyle et le carbone immédiatement voisin ne portant pas de groupement hydroxyle) du cycle qui est assuré par une autre dioxygénase (Reddig *et al.*, 2004 ; Parales et Ju, 2011), comme le montre la figure 21 correspondant à la dégradation du benzène.

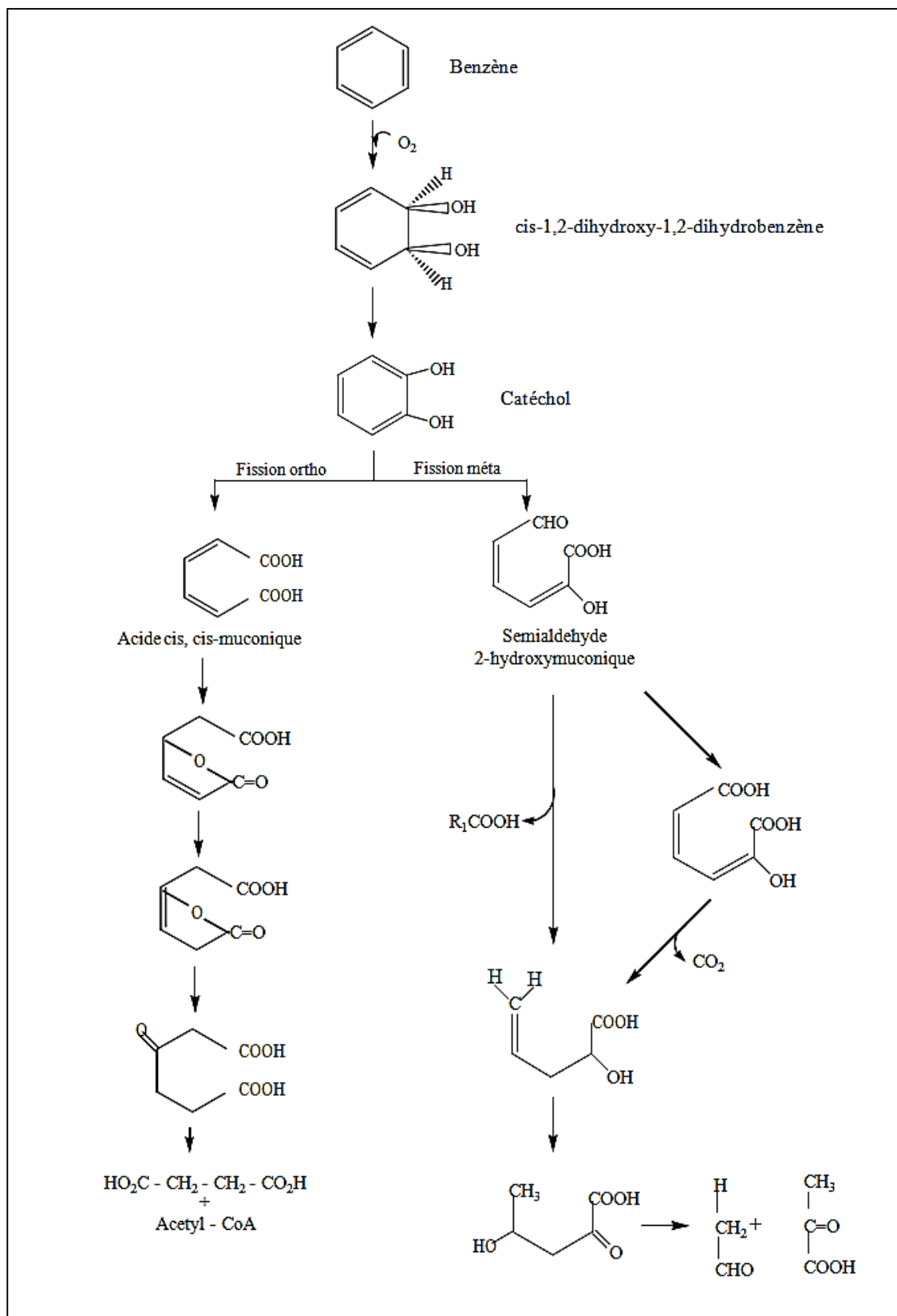


Figure 21 : Voies métaboliques de la dégradation du cycle aromatique : cas du benzène clivage ortho par la catéchol 1,2-dioxygénase et clivage méta par la catéchol 2,3-dioxygénase (Reddig *et al.*, 2004).

Pour les dérivés méthylés du benzène, tel que le toluène ou le xylène, l'oxydation dépend du microorganisme. L'attaque enzymatique initiale peut se faire au niveau du groupement méthyle pour donner l'acide benzoïque, ou sur le cycle aromatique pour former des méthyl-3catéchols, ou sur les deux à la fois (Parales et Ju, 2011).

En ce qui concerne les alkyl-benzènes, qui sont des produits caractéristiques du pétrole et dont la présence est utilisée comme indicateur de contamination pétrolière des sédiments et des organismes marins, généralement, il se produit une oxydation du groupement méthyle terminal qui donne l'acide phényl-alcanoïque correspondant, qui par une série de β -oxydations peut conduire à l'acide benzoïque ou à l'acide phényl-acétique en fonction du nombre d'atomes de la chaîne alkyle. La dégradation peut s'arrêter à ce stade ou se poursuivre au niveau du cycle aromatique. Dans certains cas, la co-oxydation par des populations microbiennes mixtes peut jouer un rôle très important dans la dégradation complète de ces composés (Alegbeleye et *al.*, 2017). Par ailleurs, la photo-oxydation des alkyl-benzènes permettait d'accélérer leur dégradation par les bactéries (Lofthus et *al.*, 2018 ; Loh et *al.*, 2019).

A. Biodégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques à deux cycles aromatiques

Les voies métaboliques de dégradation par des souches de *Pseudomonas* sp. ont été les premières voies étudiées et sont très connues (Sutherland et *al.*, 1995). La figure 22 montre la voie métabolique de dégradation du naphthalène (un HAP à deux cycles aromatiques) par *Pseudomonas* sp. et *Acinetobacter calcoaceticus*.

La première étape de la dégradation aérobie fait intervenir une dioxygénase, qui oxyde l'un des cycles benzéniques pour former un cis-dihydrodiol. Les dihydrodiols sont ensuite transformés en biphenols, lesquels sont attaqués par d'autres dioxygénases. De la même manière, tous les cycles sont alors dissociés et dégradés les uns après les autres pour conduire à des intermédiaires à simple cycle, comme l'acide benzoïque, l'acide salicylique, l'acide phthalique ou le catéchol (Seo et *al.*, 2009).

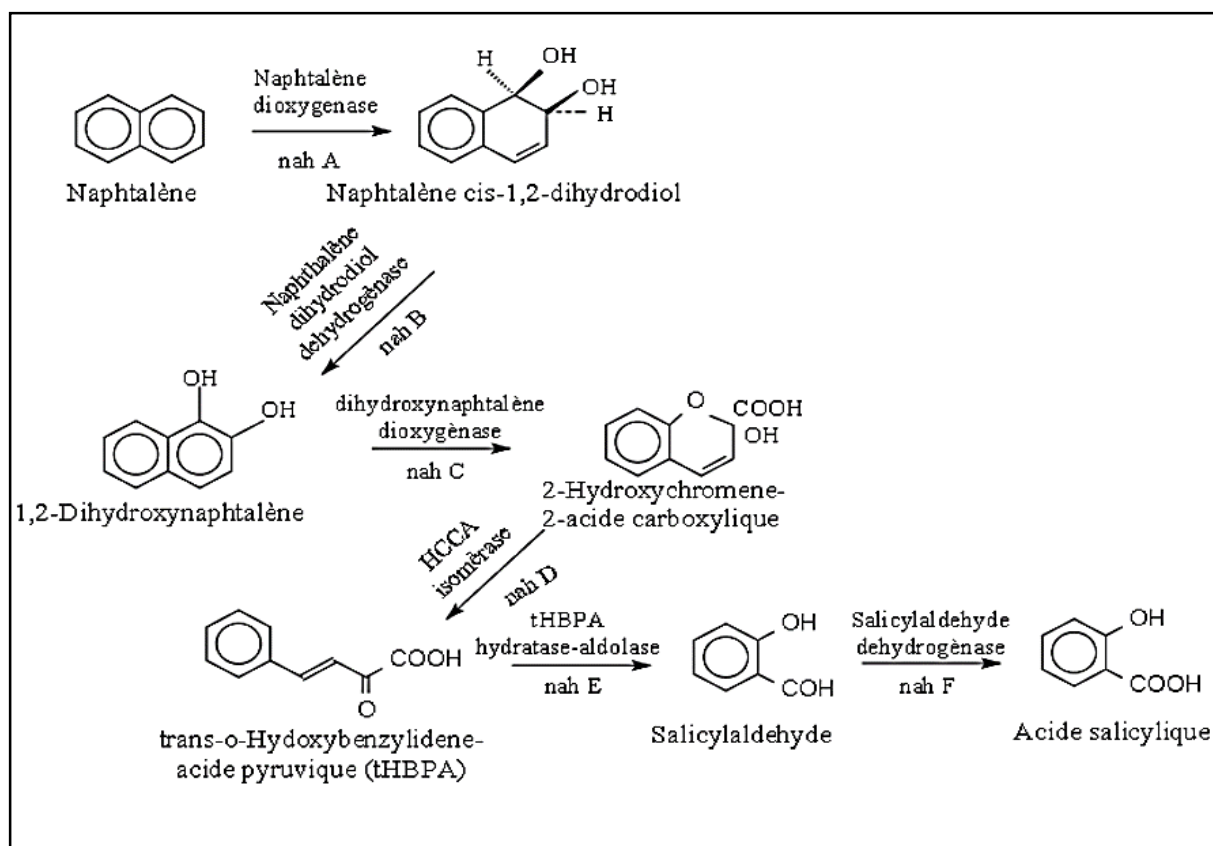


Figure 22 : La voie métabolique de dégradation du naphthalène par *Pseudomonas* sp. et *Acinetobacter calcoaceticus* (Sutherland et al., 1995).

B. Biodégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques à trois cycles aromatiques

Les voies de dégradation pour les hydrocarbures polyaromatiques avec trois cycles, comme l'acénaphthylène, le fluorène, l'anthracène et le phénanthrène, suivent le même modèle avec l'action des dioxygénases pour former des dihydrodiols. L'anthracène est métabolisé par *Pseudomonas aeruginosa* selon le schéma illustré dans la figure 23 (Sutherland et al., 1995).

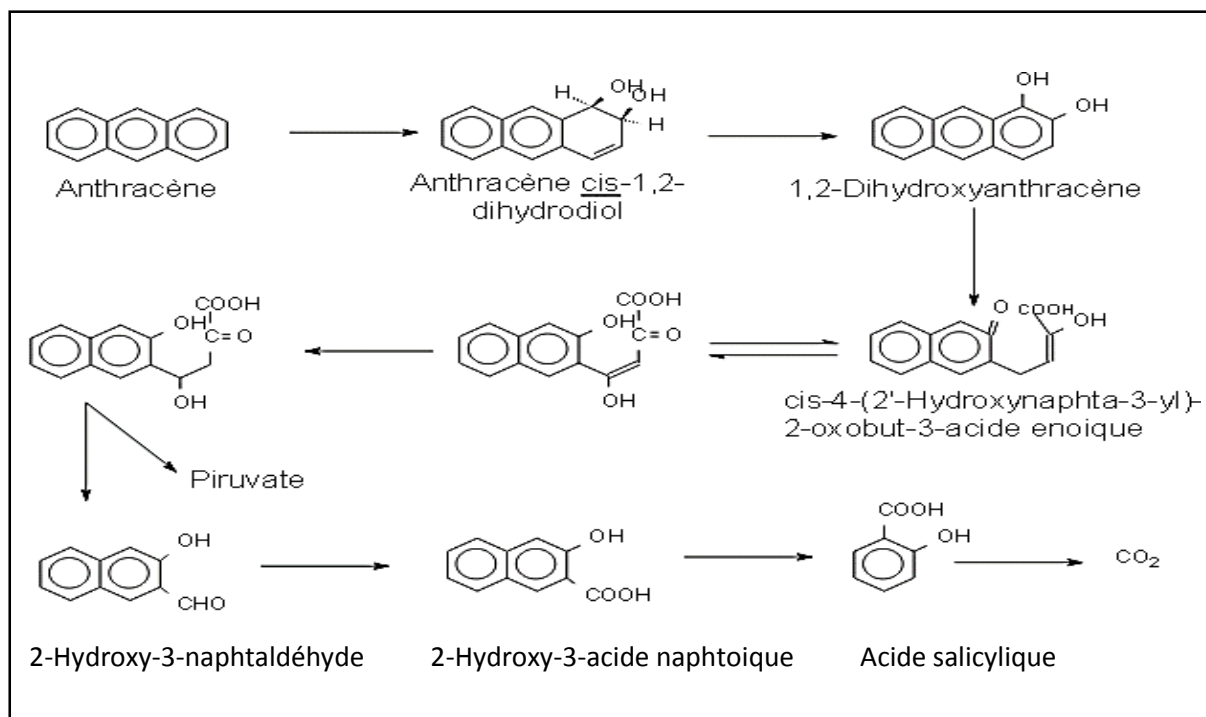


Figure 23 : La voie aérobie de dégradation de l'anthracène par *Pseudomonas aeruginosa* (Sutherland et *al.*, 1995).

Il arrive fréquemment qu'un produit de dégradation d'un HAP à grand nombre de cycles passe par la voie de dégradation d'un HAP à petit nombre de cycles. Ainsi certains produits de dégradation du phénanthrène vont pouvoir être dégradés via les enzymes de dégradation du naphthalène, et donc suivent la la voie de dégradation du naphthalène. De plus, pour une grande majorité de bactéries, la dégradation du phénanthrène nécessite les mêmes étapes biochimiques, et souvent les mêmes enzymes que la dégradation du naphthalène (Seo et *al.*, 2009).

Aussi, selon Gao et *al.* (2013), le phénanthrène peut être complètement dégradé par la souche *Stenotrophomonas maltophilia* (C6) par 1,2-, 3,4-, et 9,10-dioxygénations. Les phénanthrènes diols sont transformés en *o*-hydroxynaphtoates ou en acide naphtalène-1,2-dicarboxylique par clivage ortho et méta (Fig. 24). Le métabolisme ultérieur de ces acides a produit du naphtalène-1,2-diol ou 2-carboxybenzalpyruvate, qui est ensuite dégradé en acide protocatéchique et acide salicylique, par l'implication de nombreuses enzymes dans le métabolisme. Des voies métaboliques complexes indiquent que *Stenotrophomonas maltophilia* a été bien adapté pour utiliser le phénanthrène (un HAP à trois cycles aromatiques) comme substrat (Fig. 24) (Gao et *al.*, 2013).

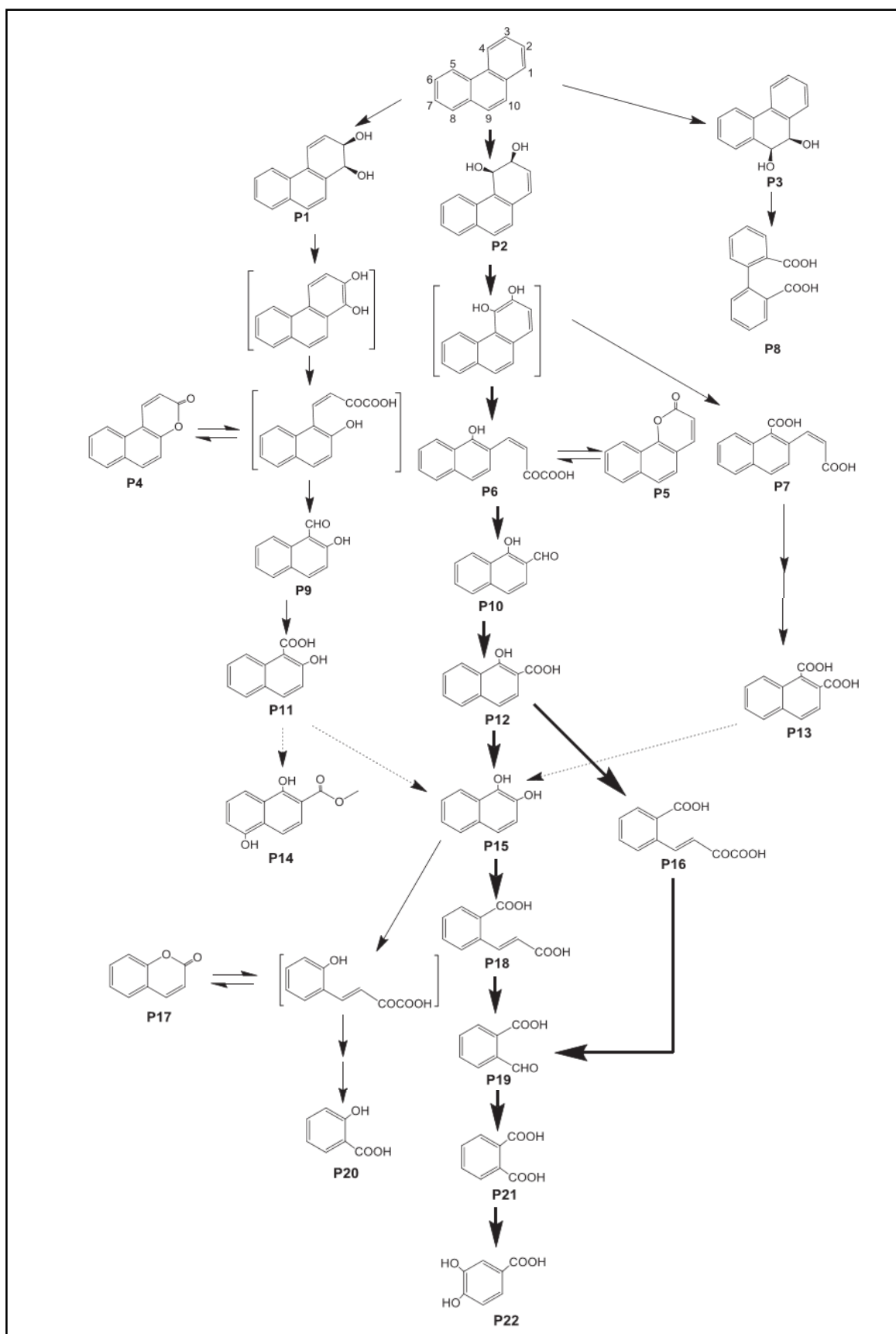


Figure 24: Voies métaboliques de la dégradation du phénanthrène par la souche *Stenotrophomonas maltophilia* (C6), P1, P4, P9 et P11 sont des produits de dégradation par la 1,2-dioxygénation, alors que P2, P5, P6, P7, P12 et P13 sont des métabolites de la 3,4-dioxygénation (Gao et *al.*, 2013).

C. Biodégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques à quatre cycles aromatiques

Sur la base de l'identification de protéines par analyse LC-MS/MS, une voie catabolique pour la dégradation du pyrène (un HAP à quatre cycles aromatiques) par la souche *P. aeruginosa* ASP-53 a été proposée par Mukherjee et al. (2017), selon le schéma illustré dans la figure 25.

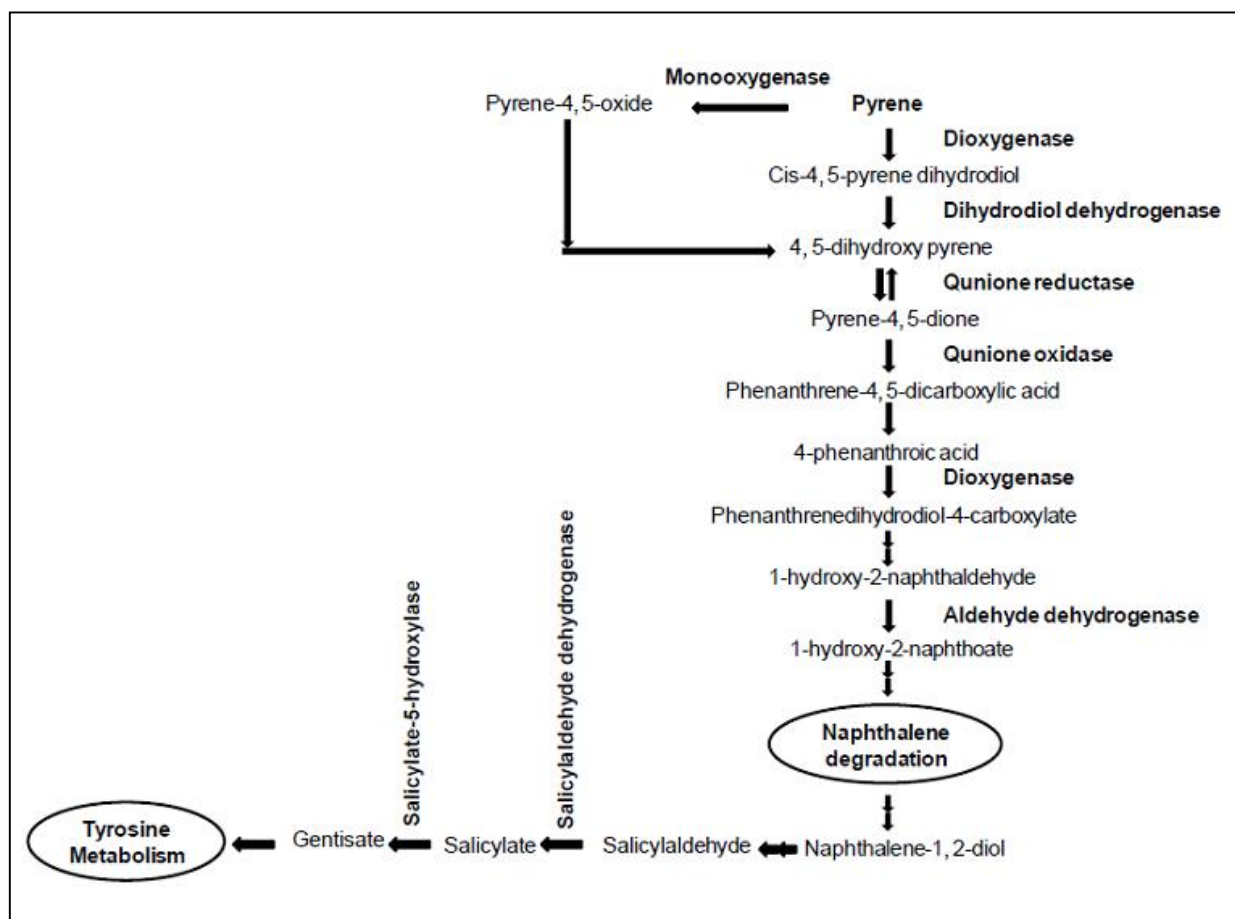


Figure 25: Voie de dégradation proposée du le pyrène par la souche *P. aeruginosa* ASP 53 (Mukherjee et al., 2017).

D. Biodégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques à cinq cycles aromatiques

Le benzo[a]pyrène, un HAP à cinq cycles aromatiques, est l'un des HAPs cancérigènes les plus puissants. Il a une faible solubilité dans l'eau, et un coefficient de partage octanol / eau élevé (LogK_{ow} , 6,06), ce qui est associé à une forte récalcitrance à la dégradation microbienne. Il a également une abondance relativement faible dans les échantillons environnementaux, ce qui limite son catabolisme par les assemblages bactériens (Seo et al., 2009). En revanche, il existe plusieurs espèces bactériennes capables de dégrader le benzo[a]pyrène, telles que *Mycobacterium* sp., *Sphingomonas paucimobilis*, et *Stenotrophomonas maltophilia*, (Seo et al., 2009). Le catabolisme proposé du benzo[a]pyrène est illustré dans la figure 26.

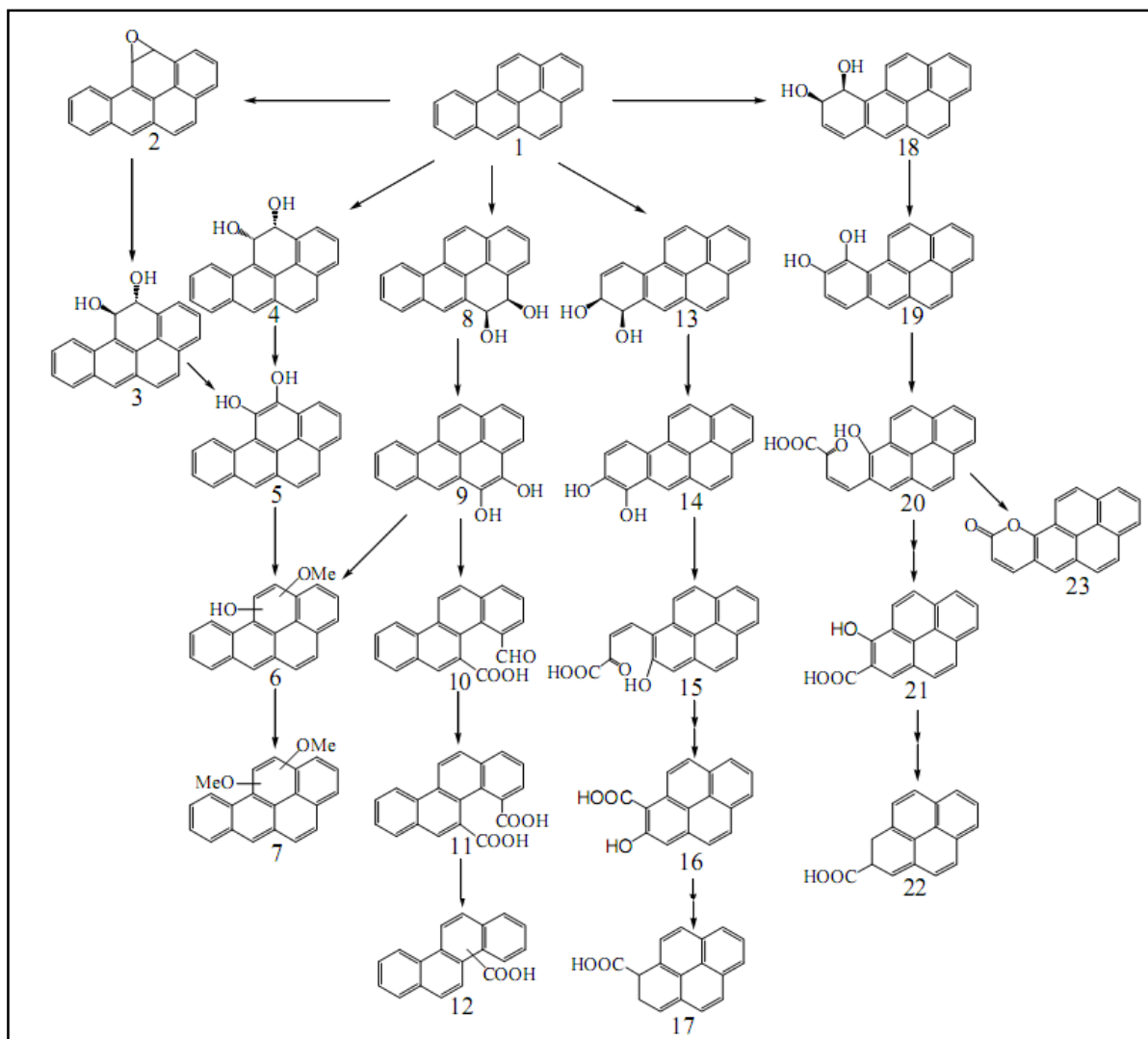


Figure 26 : Voies cataboliques proposées du benzo[a]pyrène par des bactéries (1) ; (2-23) : métabolites intermédiaires (Seo et *al.*, 2009).

E. Mécanisme métabolique des HAPs en coopération bactérienne en consortium (co-métabolisme)

La coordination entre différentes espèces bactériennes par divers gènes fonctionnels pourrait révéler la co-acclimatation de communautés bactériennes au stress par un HAP tel que le pyrène (Fig. 27) (Zhang S. et *al.*, 2019). Ces derniers ont découvert que les gènes fonctionnels liés à la dégradation des hydrocarbures aromatiques consistaient en plusieurs voies métaboliques telles que la dégradation de l'acylglycérol, la fixation de l'azote, le système de transport des sulfates, le cycle d'Arnon-Buchanan et le cycle de Calvin, et ont suggéré que la dégradation des hydrocarbures aromatiques exige la participation du métabolisme énergétique (Fig. 27). L'analyse des gènes fonctionnels a également suggéré que la dégradation des HAPs était étroitement liée à divers métabolismes, tels que le métabolisme du soufre et la fixation du carbone (Zhang S. et *al.*, 2019). Conformément à une étude précédente, diverses réactions

métaboliques pourraient être nécessaires au métabolisme de l'autotrophie sous le stress de polluants externes (Bertin et *al.*, 2011).

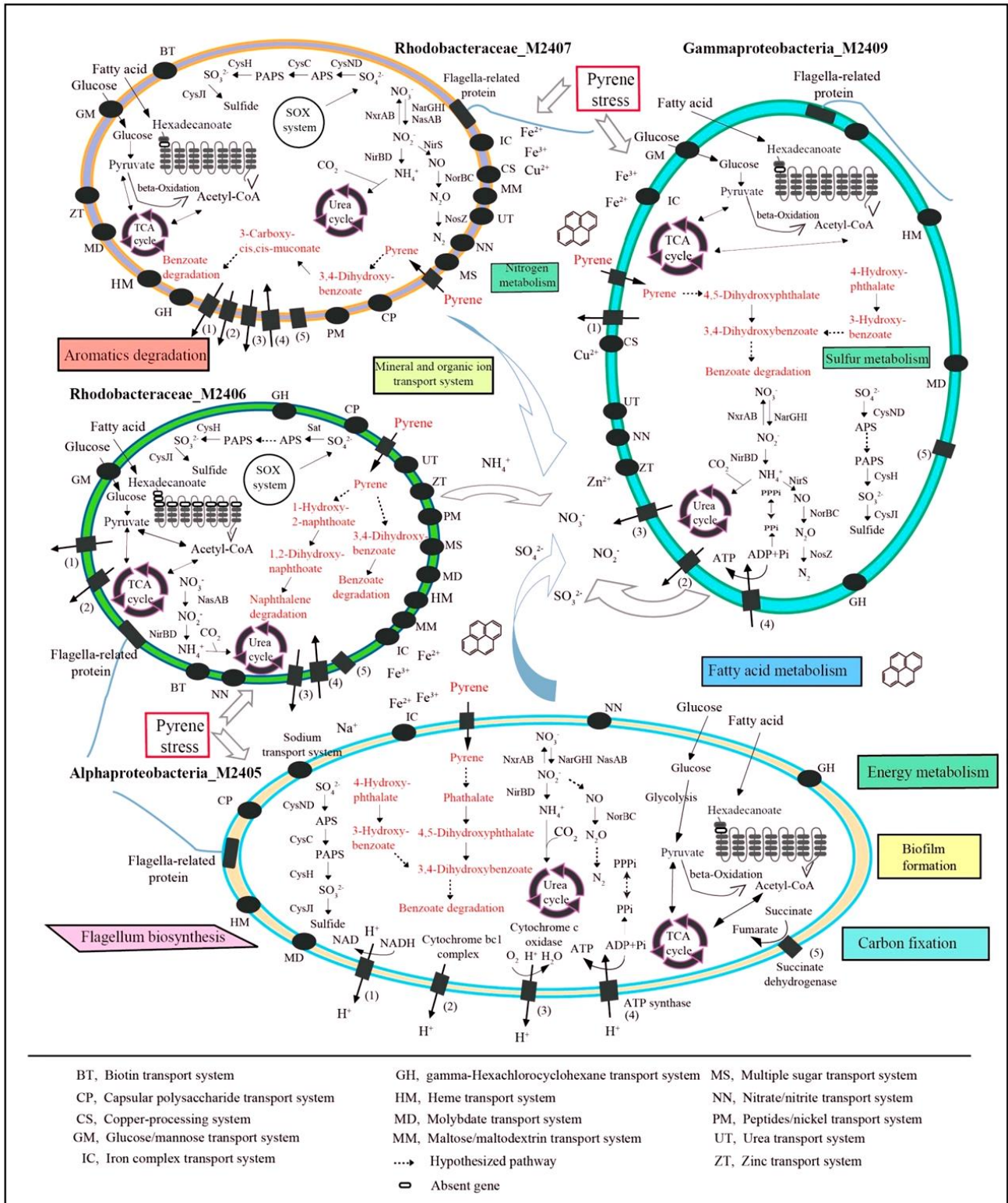


Figure 27 : Modèle de co-métabolisme d'une communauté bactérienne dégradant le pyrène, basé sur des cellules génomiques générées à partir des données métagénomiques. Les activités métaboliques simulées comprenaient le transport et la dégradation du pyrène, le métabolisme énergétique (C, N, S), la biosynthèse des flagelles, l'utilisation des acides gras, le métabolisme du cuivre et du fer, etc. La distribution des principales voies de dégradation du pyrène dans a été mise en évidence en rouge (Zhang S. et *al.*, 2019).

18.2. Voies biologiques anaérobies

Les environnements anoxiques sont répandus dans la nature. En effet, de tels environnements ont fréquents dans les sédiments et les eaux, et même dans les sols où des micro-niches anaérobies sont présentes. En anaérobiose, les mécanismes d'activation doivent faire intervenir d'autres réactifs que le dioxygène afin d'introduire un groupement polaire. En, effet, l'oxygène est remplacé par les nitrates, sulfates, fer ou méthane (Fig. 28) (Nzila, 2018).

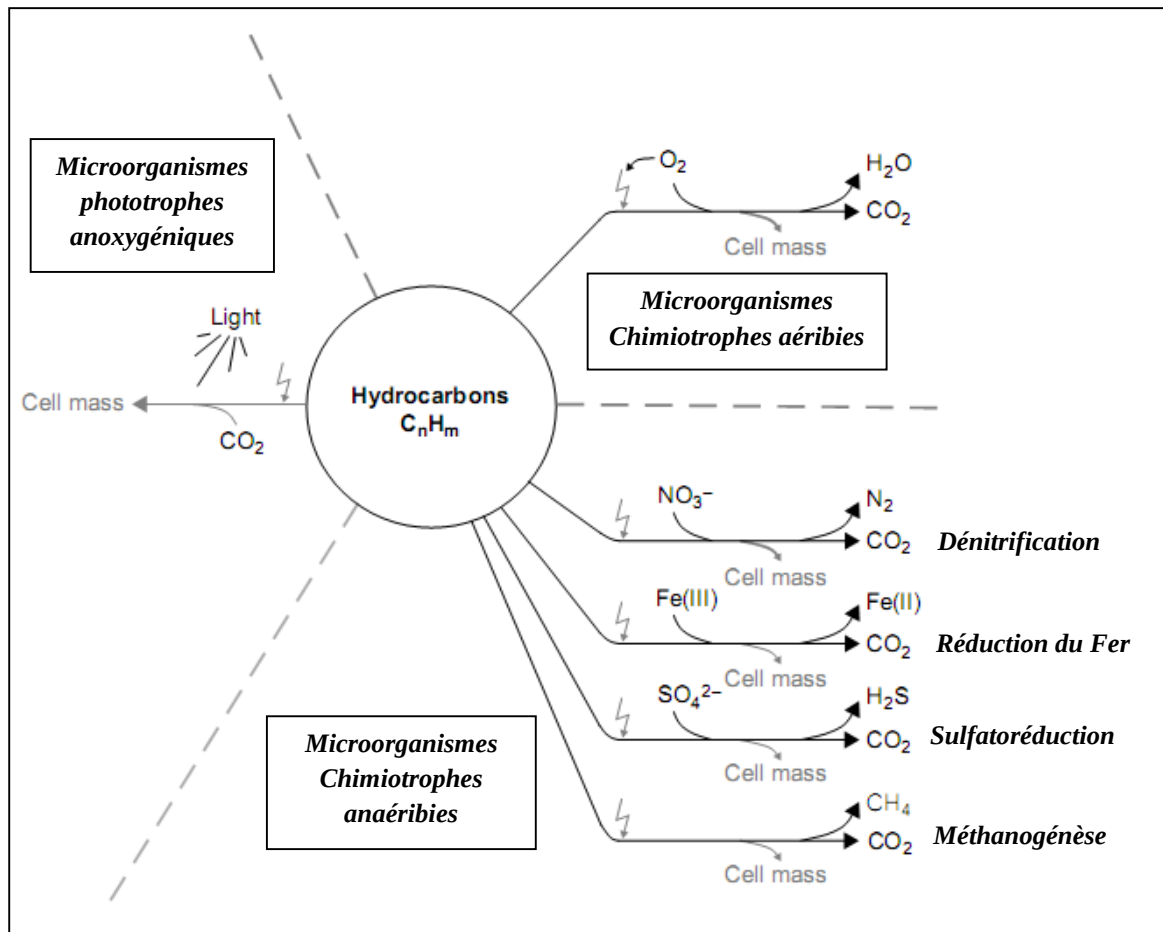


Figure 28: Métabolismes impliqués dans l'utilisation des hydrocarbures par les micro-organismes (D'après Widdel et Rabus, 2001).

La biodégradation anaérobie des hydrocarbures a été très largement étudiée dans le cas du toluène (Boopathy, 2017 ; Kong et al., 2019), puis des homologues ont été observées pour les autres types d'hydrocarbures. La biodégradation anaérobie des hydrocarbures est un domaine récent et en pleine expansion. Les capacités de microorganismes à dégrader des hydrocarbures dans des conditions strictement anaérobies sont très limitées. Elles sont pratiquement absentes pour des composés aliphatiques, mais cela n'empêche pas qu'il existe des exceptions

extrêmement rares. C'est le cas des bactéries sulfato-réductrices, des bactéries dénitrifiantes, des méthanogènes et des ferri-réductrices (Boopathy, 2017).

Dans les environnements anoxiques, l'absence d'oxygène implique une stratégie d'activation enzymatique spécifique. Ainsi, les bactéries anaérobies possèdent différentes voies biochimiques pour convertir les hydrocarbures, substrats apolaires, en composés contenant un groupement polaire (Meckenstock et Mouttaki, 2011 ; Nzila, 2018). Les mécanismes d'activation de la biodégradation des hydrocarbures en anaérobie peuvent varier. NO_3^- , Fe(III) et SO_4^{2-} sont ainsi différents accepteurs d'électrons utilisés pour la dégradation d'un hydrocarbure en anaérobie (Widdel et Rabbus, 2001 ; Boopathy, 2017) (Fig. 29).

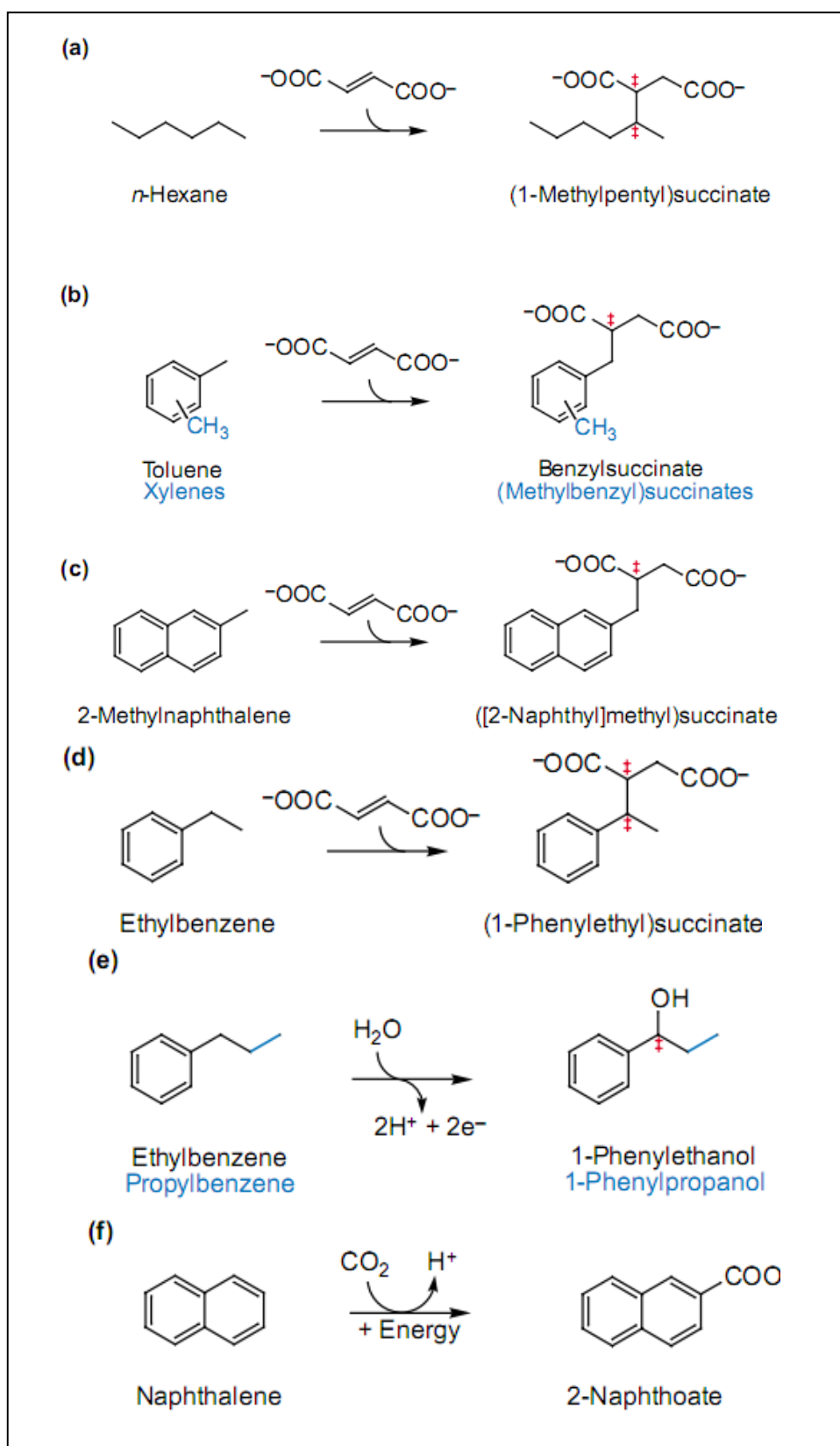


Figure 29 : Les réactions initiales de la dégradation anaérobie des hydrocarbures saturés et aromatiques. **(a – d) :** Le mécanisme d'activation le plus commun qui a été détecté dans plusieurs types physiologiques d'anaérobies est une réaction radicale des hydrocarbures avec le fumarate, donnant des succinates substitués ; **(e) :** L'éthylbenzène (ou le n-propylbenzène) dans les dénitrifiants est déshydrogéné pour donner un alcool secondaire ; **(f) :** La dégradation anaérobie du naphthalène, par carboxylation comme l'étape initiale (Widdel et Rabbus, 2001).

19. FACTEURS PHYSIQUES ET CHIMIQUES AFFECTANT LA BIODEGRADATION 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 (Vagge et *al.*, 2018). 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 (Khudur et *al.*, 2018 ; Al-Hawash et *al.*, 2019). En outre, certains paramètres environnementaux comme la température et le pH vont affecter les propriétés des hydrocarbures (viscosité, volatilité et solubilité) et l'activité des communautés microbiennes (Acosta-González et Marqués, 2016 ; Jiao et *al.*, 2017 ; Vagge et *al.*, Yu et *al.*, 2019).

Partie 02

Matériel et méthodes

1. ECHANTILLONNAGE

Les échantillons des sédiments et l'eau de mer sont récoltés de trois points (A, B, et C) du port commercial d'Oran (Algérie), situés à une latitude : $35^{\circ} 42' 44''$ Nord, et longitude : $0^{\circ} 30' 28''$ Ouest (Fig. 30). Les échantillons sont prélevés de quelques millimètres de la surface des sédiments marins (de - 40 m de profondeur), dans des conditions stériles (dans des flacons stériles en verre pour l'analyse microbiologique, et en polyéthylène haute densité (PEHD) avec des bouchons en téflon pour l'analyse physico-chimique), en Octobre 2013, et acheminés immédiatement au laboratoire dans des glacières.



Figure 30 : Carte d'Algérie, zone d'échantillonnage -Le port d'Oran-

2. CARACTERISATION DU MILIEU ECOLOGIQUE

2.1. Analyses physico-chimiques

Différents paramètres physico-chimiques sont étudiés pour l'eau de surface des sédiments (de -40 m de profondeur), effectués au niveau du laboratoire de SEOR-Oran (Laboratoire accrédité), des trois points d'échantillonnage (A, B et C). Ces paramètres étudiées consistent en : pH, salinité, dureté totale (TH), conductivité, turbidité, matières en suspension (MES), chlorures, calcium, nitrite, nitrate, sulfate, magnésium, alcalinité totale (TAC), taux hydrocarbures totaux, oxydabilité par permanganate de potassium (matières organiques), la demande chimique en Oxygène (DCO), la demande biochimique en Oxygène (DBO₅), et le taux de biodégradation (B%).

2.1.1. Température

La température de l'eau est mesurée *In-situ* à l'aide d'un ordinateur de plongée sous-marine (Mares Matrix).

2.1.2. Détermination du Potentiel d'Hydrogène (pH)

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre (WTW ProfiLine pH 3110), avec une sensibilité de ± 0.02 , contenant un filtre à pores ($> 1\mu\text{m}$) permettant d'empêcher les substances huileuses, les solides en suspension, les précipités ou autres matières de couvrir l'électrode.

2.1.3. Détermination de la conductivité

La conductivité mesure la capacité de l'eau à conduire le courant entre deux électrodes. L'unité de conductivité est le siemens par mètre (S/m). La plupart des matières dissoutes dans l'eau se trouvent sous forme d'ions chargés électriquement. La mesure de la conductivité permet donc d'apprécier la quantité de sels dissous dans l'eau (chlorures, sulfates, calcium, sodium, magnésium...). Nous avons déterminé la conductivité par un conductimètre (WTW ProfiLine Cond 3110), en introduisant l'électrode dans notre échantillon, après stabilisation, la valeur est notée.

2.1.4. Mesure de la de la turbidité (Norme ISO 7027)

La turbidité désigne la teneur d'une eau en matières qui la troublent. Dans les cours d'eau elle est généralement causée par des matières en suspension et des particules colloïdales insolubles, d'origine minérale ou organique, qui absorbent, diffusent ou réfléchissent la lumière. Son principe de mesure est basé sur la comparaison de l'intensité de la lumière diffractée par l'échantillon à celle de référence dans les mêmes conditions (longueur d'onde, angle entre le rayon incident et le rayon diffracté). Elle est exprimée en NTU (Nephelometric Turbidity Unit). Nous avons mesuré la turbidité à l'aide d'un turbidimètre (HACH 2100N Turbidimeter).

2.1.5. Détermination des matières en suspension (Norme ISO 9001)

La séparation des matières en suspension a été réalisé par filtration sur disque filtrant en fibre de verre de cellulose de 47 mm de diamètre et de porosité de $0,45\mu\text{m}$, selon le mode opératoire est le suivant :

Laver le disque filtrant avec de l'eau distillée. Ensuite, le sécher à $105 \pm 2^\circ\text{C}$ jusqu'à obtention d'une masse constante. Laisser refroidir en dessiccateur, et peser (M_0). Une fois refroidi, le disque filtrant est placé le sur l'équipement de filtration, puis le dispositif

d'aspiration est mis en marche. Verser progressivement 100 ml d'échantillon sur le filtre jusqu'à ce que le récipient soit vide. Ensuite, le filtre est récupéré puis séché à 105°C. Après refroidissement en dessiccateur, le disque filtrant est de nouveau pesé (M_1). Le taux de matières en suspension, exprimé en milligrammes par litre, est défini comme suit :

$$MES = (M_1 - M_0) \times 1000 / V$$

V : volume de l'échantillon.

M_0 : la masse en mg de la membrane avant filtration.

M_1 : la masse en mg de la membrane après filtration.

2.1.6. Mesure le TDS (Total des solides dissous) (Norme ISO 9001)

L'eau de mer contient de nombreux sels minéraux (étant essentiellement sous forme ionique), présents en concentration différentes. Le TDS désigne la masse globale en sels dissous dans 1 kg d'eau de mer. Il est exprimé en grammes de sels par kilogramme d'eau (g/kg), en ppt (Part Per Thousand ou ‰), ou en UPS (Unité Pratique de Salinité). Selon la présente norme, il est égal à la conductivité sur deux à température 20°C.

2.1.7. Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO) (Norme ISO 9001)

La demande chimique en oxygène (DCO) est définie comme la quantité d'oxygène égale à la teneur en matières organiques, d'un échantillon susceptible d'être oxydé à reflux en système fermé, par un oxydant chimique fort (dichromate de potassium), en milieu d'acide fort (acide sulfurique), et en présence d'un catalyseur (sulfate d'argent), sous l'action de la chaleur ($150 \pm 2^\circ\text{C}$).

Dans les conditions définies de la présente norme, en milieu acide en présence d'une quantité connue de dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), de sulfate d'argent (Ag_2SO_4) jouant le rôle d'un catalyseur d'oxydation, et de sulfate de mercure (HgSO_4), qui permet de complexer les ions chlorures. Les matières oxydables dans l'échantillon, qui réagissent avec le bichromate de potassium, provoquent un changement de couleur dont l'absorbance est proportionnelle à la quantité de bichromate de potassium réduit, et se mesure en équivalent d'oxygène. Après refroidissement du mélange à température ambiante, la mesure peut être effectuée au moyen d'un spectrophotomètre UV-visible.

A 2,5 ml d'échantillon sont additionnés lentement 1,5 ml de la solution de digestion, et 3,5 ml de réactif acide. Le mélange est homogénéisé soigneusement, puis 0,3 mg de sulfate de mercure sont ajoutés. Le blanc est également préparé en remplaçant le volume d'échantillon requis par de l'eau distillée. Les solutions sont portées à reflux dans un thermoréacteur (WTW Thermoréacteur CR 3200), à une température de 150°C pendant 2 heures. Après les avoir retirés du thermoréacteur et laissés refroidir à la température ambiante, la lecture des résultats est effectuée au spectrophotomètre (HUCH DR6000 Spectrophotomètre), à longueur d'onde 420 nm.

Réactif acide : dissoudre 1 g de sulfate d'argent (Ag_2SO_4) dans 40 ml d'eau distillée, ensuite verser avec précaution 960 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) et laisser reposer pendant 24 heures.

Solution de digestion : dissoudre 80 g de sulfate de mercure (HgSO_4) dans 800 ml d'eau, ajouter avec précaution 200 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4), laisser refroidir et ajouter 11.767g de dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) préalablement séché à 105°C pendant 2 heures, puis transférer la solution dans une fiole jaugée et compléter le volume jusqu'à 1000 ml.

2.1.8. Détermination de la demande biochimique en oxygène (DBO_5) (Norme ISO 9001)

La Demande Biochimique en Oxygène (DBO), exprimée en mg/l de dioxygène O_2 , est la quantité d'oxygène nécessaire à la dégradation de la matière organique biodégradable d'une eau, par le développement des microorganismes (oxydation par voie biologique), équivalente à la quantité de dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) consommée par les matières dissoutes et en suspension, lorsqu'on traite un échantillon d'eau avec cet oxydant, après une période d'incubation de 5 jours à 20°C, on parle alors de la DBO_5 .

Nous avons mesuré la DBO_5 par la méthode manométrique au moyen d'un indicateur digital dite Oxitop (WTW OxiTop®IS). Le système de mesure est basé sur une différence de pression en oxygène dissous.

La valeur de la DBO_5 est approximativement estimée à 80 % de la DCO mesurée. On choisit le volume de la prise d'essai selon les intervalles de mesure de la DBO_5 selon le tableau 04. À la fin on multiplie le résultat obtenu par le facteur correspondant.

Tableau 04 : Intervalles et facteurs de conversion de la DBO₅ en fonction du volume de la prise d'essai.

Intervalle de mesure (mg/l)	Volume de la prise d'essai	Facteur
0 - 40	432	1
0 - 80	365	2
0 - 200	250	5
0 - 400	164	10
0 - 800	97	20
0 - 2000	43,5	50
0 - 4000	22,7	100

La réalisation de l'essai est faite dans des bouteilles ambrées, et l'incubation est effectuée à 20 ± 1°C pendant 5 jours. On note la valeur de chaque jour, et la valeur du cinquième jour est celle de la DBO₅.

La demande biochimique en oxygène après 5 jours, exprimée en mg d'oxygène par litre correspond à :

$$DBO_5 = C_0 - C_5$$

C₀ = concentration en oxygène dissous dans l'échantillon au temps 0.

C₅ = concentration en oxygène dissous dans l'échantillon après incubation de 5 jours.

2.1.9. Calcul du taux de biodégradation (Norme ISO 9 408)

Le taux de dégradation est calculé selon la formule suivante :

$$B\% = DBO_5 / DCO$$

2.1.10. Oxydabilité par le permanganate de potassium (matières organiques) (Norme ISO 8467)

L'oxydabilité par le permanganate de potassium (KMnO_4) est une grandeur qui permet d'estimer la concentration en matières organiques présentes dans l'eau. Le résultat est exprimé en mg/l d'O_2 .

Les matières oxydables contenues dans l'eau à analyser sont oxydées par un excès de permanganate de potassium (0.01 N), en milieu acide à chaud pendant 10 min, ensuite le KMnO_4 est réduit par l'oxalate de sodium en excès (0.01 N), puis on effectue un dosage en retour de cet excès par le KMnO_4 , selon le mode opératoire suivant :

25 ml d'échantillon sont additionnées de 4 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) à 1 N, et portés à température $97 \pm 3^\circ\text{C}$ sur une plaque chauffante, puis 5 ml KMnO_4 à 0.01 N sont ajoutés, et l'ébullition est maintenue pendant 10 min. Après 10 min de réaction à $97 \pm 3^\circ\text{C}$, on refroidit rapidement et on fait la réduction des ions MnO_4^- en Mn^{2+} par une solution d'oxalate de sodium à 0.01 N, ensuite on procède à un titrage de l'excès de l'acide par le permanganate de potassium (2 mmol/l), par une burette digital (BRAND® Titrette® digital bottle-top burette, 25 ml), jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle persistant environ 30 s. Noter le volume de solution de permanganate consommé, soit V_1 .

Le même traitement est effectué pour le blanc (les mêmes conditions), où l'échantillon est remplacé par l'eau distillée, soit V_0 le volume de permanganate de potassium utilisé, V_0 doit être inférieur à 0,3 ml.

L'oxydabilité par permanganate (OP), exprimé en milligrammes d'oxygène par litre d'échantillon, peut alors se calculer comme suit :

$$\text{OP (mg/l O}_2\text{)} = [(V_E \times V_0) / V_1] \times 16.$$

V_0 : volume en ml de la solution de permanganate de potassium consommé pour l'essai à blanc.

V_1 : volume en ml de la solution de permanganate de potassium utilisé pour le titrage de l'échantillon.

V_E : volume de l'échantillon.

2.1.11. Dosage des hydrocarbures totaux par chromatographie (GC-FID) (Norme ISO 9377-2)

Les hydrocarbures totaux ($\text{C}_{10}\text{-C}_{50}$), comprenant les hydrocarbures aromatiques polycycliques

(HAPs), sont dosés par la chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) de type BRUKER 450 GC-FID. Cette méthode s'applique au dosage des hydrocarbures pétroliers dans les matières liquides aqueuses, les matières solides et les matières liquides organiques. Le domaine d'étalonnage se situe entre 20 et 100 X 10³ µg/ml d'hydrocarbures (100 mg/ml).

Tous les solvants utilisés sont de qualité HPLC, et tout le matériel utilisé (verrerie, pinces, laine de verre...etc.) doit préalablement être décontaminé avec les solvants appropriés.

Le débit du gaz vecteur (Hélium) est régulé par la pression d'entrée dans la colonne (Tableau 5). Ce gaz est préalablement épuré de toute trace d'O₂ et d'H₂O. L'air et l'hydrogène sont filtrés pour éliminer toute trace d'hydrocarbures. La méthode est définie dans l'appareil comme l'indique le tableau 05.

Tableau 05 : Conditions chromatographiques pour l'analyse des hydrocarbures résiduels par CPG/FID.

Paramètres du chromatographe		Valeur
Colonne	Type	VF 1301ms
	marque	Varian
	Longueur	30m
	Diamètre intérieur	0,25µm
Méthode colonne	Isotherme initiale	40°C
	Durée de l'isotherme	5min
	Température finale	255°C
Détecteur	Température	320°C
Injecteur	Température initiale	220°C
Méthode d'injection	Volume	1µl
	Gaz vecteur	Hélium
	Pression d'entrée	3 Bar

Au préalable, une extraction liquide-liquide des hydrocarbures totaux est effectuée comme suit : 500 ml d'échantillon sont additionnées à 25 ml de solution d'hexane S₂ (Solution S₁ diluée x 10 additionnée de 40 mg MgSO₄), dans une bouteille d'extraction en verre à goulot étroit muni d'un bouchon de téflon, puis l'échantillon est acidifié à pH 2 par le HCl (2 N). Le mélange est mis sous agitation à vitesse moyenne pendant 1 h, ensuite transféré dans une ampoule à décantation, après avoir lavé cette ampoule avec 10 ml de solution S₁ d'hexane. Après séparation des phases, l'hexane est récupéré de l'ampoule. À savoir : S₁ (solution mère d'hexane) = (500 ml hexane + 100 µl de n Décane + 20 µg de Tetracantane).

Une fois le solvant récupéré, on procède à étape de purification de l'extrait des hydrocarbures par chromatographie sur colonne en utilisant du gel de silice. L'extrait purifié est concentré par séchage sous un jet d'azote à 37°- 40°C dans un évaporateur rotatif (rotavapor), jusqu'à l'obtention d'un volume inférieur à environ 300 µl, puis transvaser dans un vial d'injection. 1 µl d'extrait purifié est injecté dans l'appareil GC-FID.

2.1.12. Détermination du titre d'alcalinité complet (TAC) (Norme ISO 9001)

L'alcalinité de l'eau se définit comme étant sa capacité à neutraliser un acide. Elle correspond à la présence des anions ou des espèces basiques principalement les ions hydroxyde (HO⁻), les ions carbonate (CO₃²⁻) et les ions hydrogénocarbonate (aussi nommés ions bicarbonates) (HCO₃⁻).

L'alcalinité se mesure par la neutralisation d'un certain volume d'eau par une solution diluée d'un acide minéral. Les variations du pH de l'échantillon d'eau au cours du titrage sont détectées et indiquées par l'appareil titreur automatique.

100 ml d'échantillon sont titrées avec une solution de HCl (0,02 N), le pH est diminué jusqu'à 4,23. Le titrage est effectué avec un titreur potentiométrique automatique (848 Titrino plus, Metrohm), et on note le volume du titrage V_T. Les résultats d'alcalinité sont calculés par l'équation suivante :

$$\text{TCA (mg/l)} = (V_T \times N \times C) / V_E$$

V_T : volume du titrant en ml (HCl) ;

N : normalité réelle du titrant (0,02 N) ;

C : 50045 (constante de transformation en mg/l CaCO₃) ;

V_E : volume d'échantillon titré (ml).

2.1.13. Titre hydrométrique (TH) (Norme ISO 9001)

On désigne par le titre hydrotimétrique (TH) la totalité des sels de calcium (Ca^{2+}) et magnésium (Mg^{2+}), libres ou associés, et autres cations bivalents et trivalents dans cette eau.

Le titre hydrotimétrique total ou la dureté de l'eau est déterminé par un dosage complexométrique par l'EDTA (acide éthylène diamine tétra acétique), en présence du Noire d'Eriochrome T (NET), et une solution tampon ammoniacale (pH 10). Le point d'équivalence de ce dosage est marqué par une couleur pourpre en présence des ions Ca^{2+} , et une couleur bleu lorsque ces dernières sont complexés.

10 ml d'échantillon d'eau de mer sont ajoutés à 1 ml de solution tampon de carbonate (10 mM, pH 10), plus une pincée d'indicateur coloré (le NET), puis on titre avec la solution EDTA (10 mol/l) jusqu'à coloration bleue à l'aide d'un titreur potentiométrique automatique (848 Titrino plus, Metrohm), et on note le volume équivalent V_1 . Le titre hydrométrique est donné par l'expression :

$$\text{TH (mg/l)} = (V_1 \times C \times 1000) / V_E$$

C : Concentration la solution d'EDTA (0,02 N) ;

V_E : Volume d'échantillon (10 ml) ;

V_1 : le volume d'EDTA utilisé pour le titrage.

2. 1.14. Dosage du nitrate (NO_3^-) (Norme ISO 9001)

Les nitrates représentent la forme azotée souvent la plus présente dans les eaux naturelles, et constituent la composante principale de l'azote inorganique ou minéral (Rodier, 2009).

Le dosage des nitrates se fait par la méthode spectrométrique. Le principe est basé sur la mesure spectrométrique à 220 et 280 nm. Les résultats sont calculés directement à partir du logiciel.

2.1.15. Dosage de nitrite (NO_2^-) (Norme ISO 6777)

Les nitrites sont les sels de l'acide nitreux, ce dernier est un acide instable de formule HNO_2 . La procédure de dosage consiste à déterminer la concentration des nitrites dans l'eau par la méthode spectrophotométrique. En milieu acide (pH 1,9), les nitrites NO_2^- forment avec la sulfanilamide, un composé diazoïque, lequel couplé avec le NED (N-(1-naphtyl)-

ethylenediamine-dihydrochloride), donne une coloration rose caractéristique, dont l'intensité est mesurée au spectrophotomètre à 540 nm.

Ainsi, 40 ml d'échantillon d'eau de mer sont introduits dans une fiole jaugée de 40 ml, puis 1ml du Réactif coloré (RCNO₂) sont ajoutés. On homogénéise immédiatement et on complète au volume 50 ml avec de l'eau distillée, puis on laisse 20 min le temps de réaction. Pour le banc l'échantillon est remplacé par l'eau distillée (témoin). La mesure de l'absorbance est effectuée à 540 nm (HUCH DR6000 Spectrophotomètre).

RCNO₂ : Dissoudre 0.5 g de sulfanilamide dans 45 ml d'eau distillé et ajouter 5 ml de H₃PO₄ à 85%. Après dissolution complète, additionner 0.05 g de N-(1-naphtyl)-ethylenediamine dihydrochloride (NED). Conserver le réactif dans une bouteille sombre.

2.1.16. Détermination de la dureté calcique (Norme ISO 9001)

Les ions Ca²⁺ présent dans l'eau sont complexés par l'addition de l'EDTA. Le point final est détecté par le murexide, qui donne une couleur pourpre en présence des ions Ca²⁺, et une couleur violette lorsque ces derniers sont complexés. Le magnésium est précipité sous forme d'hydroxyde et n'interfère pas lors du dosage.

50 ml d'échantillon (dilué 10 X dans l'ED) sont ajoutés à 2 ml de solution NaOH (0,2 N), plus une pincée d'indicateur murexide (1%), et on titre avec la solution de l'EDTA (0,01M) jusqu'à la coloration violette, à aide titreur potentiométrique automatique (848 Titrino plus, Metrohm), puis on note le volume d'EDTA. La concentration en ions Ca⁺² est donnée par la formule suivante :

$$[Ca^{+2}] = V_{EDTA} \times 8,016 \times F.$$

V_{EDTA} : le volume d'EDTA utilisé pour le titrage ;

F : Facteur de dilution (10).

2.1.17. Détermination du taux de Magnésium (Mg^{2+}) (Norme ISO 9001)

Le magnésium est calculé à partir de la différence entre la dureté totale et la dureté calcique, selon la formule suivante :

$$[Mg] \text{ (mg/l)} = [(TH - ([Ca] \text{ (mg/l)} \times 2,5))] \times 0,243.$$

[Mg] : Concentration en magnésium.

[Ca] : Concentration en Calcium.

TH : Titre hydrométrique.

2.1.18. Dosage des ions sulfate (SO_4^{2-}) (Norme ISO 9001)

Le dosage des ions sulfates dans les eaux peut se mettre en évidence par précipitation des ions sulfates en présence de Chlorure de Baryum en milieu Chlorhydrique à l'état de Sulfate de Baryum, et mesure de leur turbidité. Pour cela, à 25 ml d'échantillon sont ajoutés 1,25 ml de solution de précipitation, puis le Chlorure de Baryum. L'absorbance de la suspension de sulfates de baryum est mesurée à 425 nm par un spectrophotomètre (HUCH DR6000 Spectrophotomètre).

2.1.19. Dosage des ions chlorure (Cl^-) (Norme ISO 9001)

Les ions Cl^- sont dosés par une solution titrée de nitrate d'argent ($AgNO_3$) en présence du chromate de potassium ($K_2Cr_2O_4$) qui sont précipités en formant un précipité blanc d' $AgCl$, la fin du dosage est indiquée par une coloration rouge brique de $Ag_2Cr_2O_4$.

10 ml de l'échantillon d'eau de mer sont ajoutés à 1 ml de l'indicateur chromate de potassium ($K_2Cr_2O_4$). Le titrage se fait par du nitrate d'argent ($AgNO_3$, 0,02 N), jusqu'à l'obtention d'un précipité rouge brique, et on note le volume équivalent V_{AgNO_3} . La teneur de l'eau en ions chlorure est donnée en milli-équivalents d'ions Cl^- au litre par l'expression :

$$\text{Concentration en chlorure } [Cl^-] \text{ (mg/l)} = 35,45 \times V_E \times V_{AgNO_3}$$

V_{AgNO_3} : Volume d' $AgNO_3$ utilisé pour le titrage.

V_E : Volume de l'échantillon.



2.2. Analyses microbiologiques

2.2.1. Dénombrement de la microflore totale

Afin de déterminer la microflore existant dans les échantillons du mixte (sédiments marins-eau de mer), une culture sur gélose nutritive (GN) est effectuée. Pour se faire, une série de dilutions variant de 10^{-1} à 10^{-9} a été préparée, selon des étapes décrites par Marchal et Bourdon (1982).

2.2.2. Production de la biomasse hydrocarbonoclaste et dénombrement

A partir des échantillons du mixte sédiments marins-eau de mer destinés à l'analyse microbiologique, 1 ml est prélevé puis mélangé à 9 ml de milieu minéral d'enrichissement Bushnell Haas Salt Medium (BHSM), composé de : 1 gl^{-1} de KH_2PO_4 ; 0.2 gl^{-1} de K_2HPO_4 ; 0.2 gl^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0.02 gl^{-1} de CaCl_2 ; 1 gl^{-1} de NH_4NO_3 ; et 50 μl of FeCl_3 60%, selon Mehdi et Giti (2008), additionné de pétrole brut à raison de 2% (v/v) comme seule source de carbone et d'énergie. Le mélange est agité énergiquement pendant 2 min, et incubé à 25°C sous agitation à 140 t/min pendant 24 h. Après incubation le mélange représente la solution mère 10^{-1} , à partir de cette solution, des dilutions décimales sont réalisées jusqu'à 10^{-9} .

Le dénombrement de la microflore hydrocarbonoclaste (ainsi que le dénombrement de la microflore totale) est réalisé après étalement de 0,1 ml de chaque dilution sur milieu gélose nutritive, en répartissant uniformément la goutte sur toute la surface de la boîte. Après 24 à 48 h d'incubation à 25°C , les colonies développées sont dénombrées à l'aide d'un compteur de colonies (Colony star, FUNK GERBER) (Boboye et *al.*, 2010), chaque échantillon est analysé en duplicata.

La concentration « N » (UFC/ml) en microorganismes cultivables de l'échantillon est déterminée en calculant la moyenne arithmétique des résultats obtenus, en tenant compte des facteurs de dilutions, à l'aide de la formule suivante :

$$N = \Sigma C / v (n_1 + 0,1 n_2) d$$

Avec :

C : nombre d'UFC (unités formant colonies) observées sur l'ensemble des boîtes sélectionnées et exploitables (boîtes provenant de deux dilutions successives et dont au moins une contient 15 colonies ; seules les boîtes correspondant à un nombre d'UFC inférieur ou égal à 300 sont considérées dans le calcul) ;

v : volume de la suspension étalée à la surface des milieux en ml (0,1 ml) ;

n₁ : nombre de boîtes retenues à la première dilution (la plus faible) ;

n₂ : nombre de boîtes retenues à la seconde dilution (la plus forte) ;

d : taux de dilution correspondant à la dilution la plus faible retenue.

Les résultats sont arrondis à deux chiffres significatifs après la virgule et sont exprimés en UFC par ml dans la suspension cellulaire d'origine.

3. ETUDE DES BACTERIES HYDROCARBONOCLASTES

Dans L'analyse bactériologique, on s'est intéressé aux bactéries hydrocarbonoclastes présentes dans les sédiments marins et l'eau de mer du port d'Oran. De ce fait, nous avons utilisé un milieu d'enrichissement pour augmenter la biomasse hydrocarbonoclaste, en vue de l'étude de caractérisation microbiologique, biochimique et moléculaire de ces bactéries.

Enrichissement, présélection, isolement et purification des bactéries hydrocarbonoclastes

A partir des échantillons du mixte (eau de mer-sédiments marins), destinés à l'analyse microbiologique, l'isolement de bactéries dégradant les hydrocarbures est effectué, on utilisant un milieu un minéral synthétique de Bushnell et Hass (BHSM) selon Mehdi et Giti (2008), composé de : 1 gl⁻¹ de KH₂PO₄; 0.2 gl⁻¹ de K₂HPO₄; 0.2 gl⁻¹ de MgSO₄.7 H₂O; 0.02 gl⁻¹ de CaCl₂; 1 gl⁻¹ de NH₄NO₃; et 50 µl of FeCl₃ 60%. La stérilisation du milieu BHSM est effectuée par autoclavage à 121°C pendant 20 min, après ajustement du pH à 7,2. Une fois le milieu BHSM refroidi, le pétrole brut stérile (De la raffinerie de Hassi-Messaoud, Algérie) est ajouté, comme seule source de carbone et d'énergie. La stérilisation du pétrole brut est réalisée en utilisant une membrane filtrante à 0,22 µm.

Pour la procédure d'enrichissement, 2 ml des sédiments marins mélangés à l'eau de mer (de – 40 m de profondeur) sont prélevés après décantation, et ajouté à 100 ml du milieu BHSM, contenant 2 % de pétrole brut (v/v), dans un Erlenmeyer de 500 ml, puis incubés à 25°C (Jin et *al.*, 2013), sous agitation continu à 140 tours par minute (tr/min) dans un incubateur à agitateur (Heidolph Inkubator 1000 couplé à Heidolph Unimax 1010, Allemagne) pendant 7 jours. Afin d'obtenir des sous-cultures, 1 ml de produit de la culture d'enrichissement estensemencé dans un nouveau milieu BHSM stérile (La première sous-culture), puis du produit de cette première sous-culture, 1 ml est transféré dans une série de quatre sous-cultures supplémentaires successivement à 4 %, 6 %, 8 % puis 10 % de pétrole brut (v/v) comme seule

source de carbone et d'énergie, sur milieu BHSM. Chaque sous-culture est incubée pendant 72 h à 25 °C et à 140 tr/min.

À partir du produit de la dernière sous-culture, contenant 10 % (v/v) de pétrole brut, des inoculums sontensemencés sur milieu BHSM solide, additionné de 10 % (v/v) de pétrole brut, puis incubés pendant 7 jours, à 25°C. La purification des différentes colonies obtenu sur ce dernier milieu BHSM solide est réalisée par repiquage successif sur milieu gélose nutritive (GN), par la méthode de stries d'épuisement, jusqu'à l'obtention de cultures pures. La pureté des cultures est analysée sur le plan morphologique, macroscopique et microscopique (Coloration de Gram).

3.1. Examen macroscopique des colonies

L'étude macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats pour l'identification. Les éléments d'identification macroscopique sont : la forme des colonies (ronde, irrégulière...etc.), la taille des colonies (par la mesure du diamètre), la chromogénèse (couleur de la colonie), l'élévation (convexe, concave, plate), l'opacité (opaque, translucide, transparente), et la surface (lisse, rugueuse). Examen macroscopique est effectué à l'œil nu, et à l'observation sous loupe binoculaire (Stemi 2000, ZEISS).

3.2. Examen microscopique des colonies

Il se base essentiellement sur l'observation, au microscope optique (Axiolab, ZEISS), avec huile à immersion, de la morphologie bactérienne, le mode d'association ainsi que l'aspect après coloration de Gram.

Coloration de Gram

La coloration de Gram (Annexe 01) permet de différencier, sur la base de la composition de la paroi cellulaire, les bactéries Gram négatives, des bactéries Gram positives. L'observation microscopique au grossissement X100 avec huile à immersion permet de voir si les cellules sont colorées en violet (Gram-positif) ou bien en rose (Gram-négatif).

3.3. Conservation des bactéries hydrocarbonoclastes

En vue de leur conservation, les souches sont repiquées sur milieu gélose nutritif (GN) incliné, par la méthode des stries, et incubées à 25°C pendant 24 h, puis conservées à 4°C pour une conservation de courte durée (Quelques semaines). Les souches sont également conservées dans le bouillon nutritif (BN) additionné de 50 % de glycérol (v/v), à - 20°C

pour une conservation de longue durée (jusqu'à 2 ans). Les cultures sont renouvelées périodiquement afin de disposer du matériel biologique frais.

4. CRIBLAGE DES SOUCHES POTENTIELLEMENT HYDROCARBONOCLASTES

La sélection des souches est effectuée en deux parties. La première consiste à choisir les meilleures souches hydrocarbonoclastes biodégradant le pétrole brut, ayant un taux de croissance nettement élevé et apparent dans le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie (la consommation des hydrocarbures est indiquée par la variation de la turbidité), et tolérant jusqu'à 10 % (v/v) de pétrole brut, et une émulsification distincte du pétrole, ayant une relation symbiotique, et possédant toujours leur activité hydrocarbonoclaste après isolement. La deuxième partie consiste en une sélection moléculaire par analyse via PCR-RFLP, afin de différencier les souches bactériennes et d'éviter leur redondance, avant d'effectuer l'identification moléculaire par le séquençage de l'ADNr 16S et les caractérisations biochimiques, physiologiques et physico-chimiques.

Criblage moléculaire : Etude du polymorphisme des fragments de restriction (PCR-RFLP) du gène de l'ADNr 16S

L'approche PCR-RFLP conduit à comparer la longueur des fragments de restriction d'une région choisie du génome et préalablement amplifiée par PCR, afin de déterminer le polymorphisme. Cette région est utilisée comme substrat pour les enzymes de restriction. Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui reconnaissent spécifiquement une séquence courte (4 à 8 bases), et coupent la chaîne d'ADN chaque fois qu'elles reconnaissent cette séquence élémentaire. L'ADN se retrouve ainsi fragmenté en morceaux de différentes longueurs, séparés en fonction de leur taille par électrophorèse sur un support physique. Un fragment va migrer d'autant plus loin qu'il est court. Un polymorphisme de la longueur des fragments de restriction est ainsi mis en évidence. Les profils observés permettent l'analyse de la diversité des souches par la caractérisation de chaque isolat, et par l'estimation des divergences de séquences entre isolats et l'établissement de leur proximité phylogénétique (Suharjo et al., 2014 ; Sourri et al., 2019). Ainsi nous avons analysé onze souches hydrocarbonoclastes symbiotiques, qualifiées « d'intéressantes », purifiées difficilement, à partir des bactéries isolées dans la présente étude, ayant le taux de croissance le plus important, apparent par turbidité sur milieu BHSM en présence du pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie. La sélection est effectuée par la mise en évidence d'un polymorphisme de la longueur des fragments de restriction de l'ADNr 16S amplifié par PCR (PCR-RFLP), afin de cribler des bactéries représentatives de groupes et d'éviter la redondance

des souches bactériennes, en analysant les profils génétiques générés, pour pouvoir produire un mixte bactérien efficace, contenant différentes espèces bactériennes hydrocarbonoclastes, et donc différents métabolismes hydrocarbonoclastes (différents potentiels de dégradation).

4.1. Extraction de l'ADN génomique

A partir des cultures jeunes de 18 h, l'ADN génomique des isolats a été extrait en utilisant un Kit EasyPure® Bacteria Genomic DNA (TransBionovo Co., Ltd., Chine). Le protocole a été effectué comme préconisé par le fournisseur (Annexe 02). L'ADN extrait a été conservé à -20°C jusqu'à l'analyse.

4.2. Vérification de la qualité et de la quantité d'ADN

Le dosage d'ADN par spectrophotométrie constitue une méthode de choix non dénaturante et assez précise de quantification et de control de pureté de l'ADN extrait (Loncle *et al.*, 1993).

Deux lecture de densité optique sont effectués après une dilution de l'ADN extrait, une à 260 nm qui correspond à la longueur d'onde d'absorption maximal des bases puriques et pyrimidiques des acides nucléiques, et une autre à 280 nm qui correspond à la longueur d'onde d'absorption maximal des protéines.

Dans le but d'estimer la pureté de l'ADN extrait, le rapport $R = DO_{260}/280$ effectué. Ce dernier doit être compris entre 1,8 et 2. Si R est inférieur à 1,8, des protéines contaminent probablement la solution. Une valeur supérieure à 2 indique une probable contamination par des ARN. Une DO de 1 correspond à une concentration d'ADN bicaténaire de 50 µg/ml (Loncle *et al.*, 1993).

L'estimation de la concentration d'ADN extrait est donnée en µg/ml par la formule suivante :

$$[ADN] = DO_{260nm} \times 50 \times F$$

- 50 unités de densité optique à 260 nm de l'ADN double brin.
- F : le facteur de dilution.

4.3. Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose et visualisation

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique de biologie moléculaire utilisée soit à des fins analytiques, pour séparer et identifier des fragments d'ADN pour déterminer leur taille et estimer leur quantité, soit à des fins préparatives, pour purifier un fragment d'ADN de

taille connu (Loncle *et al.*, 1993).

Un gel d'agarose à 0,8 % est préparé par le mélange de 100 ml de tampon TBE 1X (Tris 40 mM, borate de sodium 5 mM pH 8, EDTA 1mM), et l'agarose à raison de 1 g. Le mélange est porté à ébullition jusqu'à dissolution complète de l'agarose, et l'obtention d'un liquide transparent. Après refroidissement (à environ 45°C), 2,5 µl de bromure d'ethidium (BET) 10 mg/ml sont ajoutés au mélange d'agarose et TBE. Le tampon de migration utilisé est le TBE 1X, ce même tampon est utilisé comme tampon de migration. Le BET est le colorant le plus pratique pour détecter l'ADN dans les gels d'agarose, car il s'intercale entre les bases de l'ADN et le complexe émet des radiations fluorescentes sous illumination par les UV. Après migration, Les gels sont visualisés sous lumière ultraviolette (Achtung ; UV-Strahlen).

4.4. Amplification du gène de l'ARNr 16S par PCR

L'amplification par PCR du gène de l'ARNr 16S a été réalisée dans un Thermocycleur (Mastercycler Personal, Eppendorf) en utilisant un l'extrait d'ADN, par les amorces universelles : l'amorce forward ben27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') et l'amorce reverse ben1492R (5'-GGTTACCTTGTACGCTT-3'), synthétisées par Sigma (Allemagne). Le mélange de réaction PCR, avec un volume total de 50 µl, contenait les éléments suivants : 2 µL d'extrait d'ADN (20 ng), 1 µL de ben27F (25 µM), 1 µL de ben1492R (25 µM), 1,0 µL de dNTP (5 mM), 4,0 µL de MgCL₂ (25 mM), 5 µL de solution tampon 10X (20 mM), 0,5 µL d'ADN polymérase Taq (5 U/µl) et qsp H₂O jusqu'à 50 µL. Le programme de PCR utilisé: une dénaturation à 95 °C pendant 5 min; suivie de 35 cycles, 94 °C pendant 1 minute de dénaturation, 55 °C pendant 1 minute d'hybridation, et 72 °C pendant 2 minutes d'extension. L'extension finale est effectuée à 72 °C pendant 10 min.

4.5. Double digestion enzymatique de l'ADNr 16S (RFLP)

La digestion enzymatique ou RFLP de l'ADN 16S amplifié par PCR est effectuée avec deux différentes enzymes de restriction (double digestion), RsaI et NcoI (Sigma-Aldrich), afin de générer des profils moléculaires spécifiques des souches bactériennes.

Chaque enzyme de restriction reconnaît des sites de clivage qui lui sont spécifiques. L'enzyme de restriction endonucléase RsaI (Sigma-Aldrich), reconnait la séquence tétra-nucléotidique «5'-GT/AC-3'», et clive entre le T et le A, et la deuxième enzyme de restriction endonucléase NcoI (Sigma-Aldrich), reconnait la séquence penta-nucléotidique «5'-C/CATGG-3'» et clive entre le C et le C.

Les réactions de digestion enzymatique sont effectuées en utilisant les deux enzymes

simultanément, car la température optimale de l'activité enzymatique des deux enzymes est de 37°C, leurs sites de reconnaissances sont différents, et sont deux endonucléase compatibles.

La digestion enzymatique est effectuée dans un mélange réactionnel de 50 µl contenant : 0,5 µl de Rsa I (5U/ µl) (Sigma- Aldrich), 0,5 µl de NcoI (5U/ µl) (Sigma- Aldrich), 5 µl de tampon de digestion (50 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM Dithioerythritoll (DTE), pH 7,5 à 37°C ; Sigma- Aldrich), 8 µl d'ADNr 16S (produit d'amplification par PCR), et qsp 50 µl d'eau distillée stérile. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 1 h, pour les réactions de digestions enzymatiques, puis à 65°C pendant 15 min pour l'inhibition des enzymes.

4.6. Électrophorèse des produits de PCR-RFLP

La vérification des produits de la digestion de l'ADNr 16S par les deux enzymes (RsaI et NcoI, Sigma- Aldrich), est réalisée par électrophorèse horizontale (VWR European, Kuro GEL Mini Plus 10 Electrophoresis Horizontal). Chaque échantillon de produit de digestion (8 µl) est additionné de 3 µl de tampon de charge pourpre 6X (BioLabs), puis soumis à électrophorèse en gel d'agarose à 2 % présence du BET (10 mg/ml), dans du tampon TBE 1X (Tris 40 mM, borate de sodium 5 mM pH 8, EDTA 1mM), à 80V, 100 mA pendant 40 min de migration. Le front de migration est identifié par bleu de charge. Le marqueur taille (Trans5K® DNA Marker, 5000-300 pb) est utilisé comme marqueur de poids moléculaire, l'ADN est visualisé sous un Transilluminateur à UV (Achtung ; UV-Strahlen), et la taille des bandes d'ADN est estimée en utilisant une courbe étalon (Annexe 03).

5. IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE, PHYSICOCHIMIQUE ET MOLECULAIRE DES SOUCHES HYDROCARBONOCLASTES SELECTIONNEES

Après l'analyse en PCR-RFLP de l'ADNr 16S de souches hydrocarbonoclastes les plus potentiellement intéressantes isolées dans cette étude, nous avons sélectionné 4 différentes souches bactériennes hydrocarbonoclastes symbiotiques, afin de les étudier et les caractériser.

5.1. Identification biochimique et physiologique des souches bactériennes sélectionnées

Cette approche nous renseigne sur le métabolisme et les enzymes que les microorganismes sélectionnés, ce qui permet de différencier les espèces bactériennes.

Afin d'identifier les souches bactériennes hydrocarbonoclastes sélectionnées, nous avons eu recours, en un premier temps, après coloration de Gram, aux tests biochimiques d'orientation, à savoir, l'activité de la catalase, l'activité de l'oxydase, type respiratoire (gélose viande-foie), mobilité (milieu mannitol-mobilité), test d'utilisation de citrate (gélose citrate de Simmons),

test du triple sucre-fer (test TSI), ainsi que la capacité de croissance dans différents milieux de culture tels que le milieu Chapman, le milieu SS, le milieu BHIB, et le milieu BCPL, milieu King A, et milieu King B. La composition des différents milieux de culture est indiquée en annexe 04. Les résultats de la caractérisation biochimique ont été systématiquement analysés selon le manuel de détermination de la bactériologie de Bergery (Holt et *al.* 1998 ; Wolfgang et Karl-Heinz 2009). Tous les tests biochimiques ci-dessus sont effectués en triple.

5.1.1. Études des enzymes respiratoires

a. Recherche de l'oxydase

Ce test permet la détection de la phénylène-diamine-oxydase ou le cytochrome oxydase ; enzyme entrant dans divers couples d'oxydoréduction. Agissant sur un substrat incolore, cet enzyme entraîne la formation d'une semi-quinone rouge. Cette dernière, très instable, s'oxyde rapidement pour donner un composé noirâtre (Marchal et Bourdon, 1982). Pour la mise en évidence de cette enzyme, un disque oxydase (Kit, Fluka) contenant de l'oxalate N- diméthyl-paranitrophénylène-diamine, préalablement imbibé d'une goutte d'eau distillée stérile est mis en contact avec une colonie bactérienne fraîchement cultivée. L'apparition d'une coloration violette immédiatement, indique que la souche est oxydase positive (Marchal et Bourdon, 1982).

b. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante (Marchal et Bourdon, 1982) :



La recherche de la catalase est réalisée par émulsion d'une colonie bactérienne dans une goutte d'eau oxygénée (à 10 volumes). La révélation d'une effervescence indique la présence de la catalase.

5.1.2. Type respiratoire sur milieu viande-foie (VF) (Fluka)

C'est un milieu semi solide, utilisé pour la recherche du mode respiratoire des bactéries. Après incubation nécessaire au développement bactérien, il permet la mise en évidence des 4 principaux modes respiratoires (Marchal et Bourdon, 1982), avec ou sans production de gaz, à savoir :

- a- aérobies-anaérobies facultatives : croissance sur toute la hauteur du milieu ;
- b- aérobies stricts : croissance en surface du milieu (en contact de l'air) ;
- c- microaérophiles : croissance dans la partie supérieure (ne croissant pas en surface).
- d- anaérobies stricts : croissance uniquement dans le fond du tube (Tableau 06).

5.1.3. Test de mobilité (croissance sur milieu mannitol-mobilité)

Ce test est réalisé sur le milieu mannitol. Il permet de mettre en évidence deux caractères, à savoir, l'utilisation du mannitol et la mobilité. On a ensemencé les isolats étudiées par piqure centrale sur 1 à 2 cm, puis l'incubation est effectuée à 25°C pendant 24 heures. Si le milieu devient jaune : la bactérie est Mannitol+, et s'il reste rouge elle est Mannitol-. Pour la mobilité, elle se traduit par l'envahissement de la culture sur la gélose (Marchal et *al.*, 1991).

5.1.4. Test de fermentation du lactose, Glucose, saccharose et production de gaz sur milieu TSI (Triple Sugar Iron) (Fluka)

Le test TSI permet une mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose, du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène H₂S, ainsi que la production de gaz.

L'ensemencement se fait abondamment à la surface par des stries serrées ou par inondation, et au milieu jusqu'au culot par simple piqure, à l'aide de la même pipette boutonnée. On dévisser partiellement le bouchon afin de permettre les échanges gazeux (Marchal et *al.*, 1991).

La dégradation des sucres est accompagnée d'une production d'acide. Celle-ci est détectée par l'indicateur de pH, le rouge de phénol, qui en milieu basique est rouge et en milieu acide est jaune orange. Le thiosulfate est réduit en sulfures d'hydrogènes par certaines bactéries. Le H₂S réagit avec un sel de fer pour donner un précipité noir (Sulkin, 1940).

Au terme d'une incubation de 24 h à 25°C, une lecture est réalisée comme suit (Tableau 06) :

- **Fermentation de glucose**

Culot rouge : glucose non fermenté

Culot jaune : glucose fermenté

- **Fermentation du lactose**

Pente inclinée rouge : lactose non fermenté.

Pente inclinée jaune : lactose fermenté.

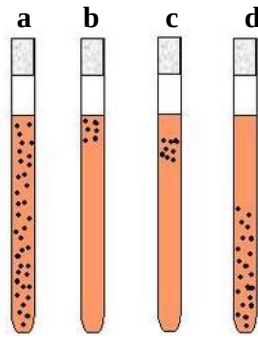
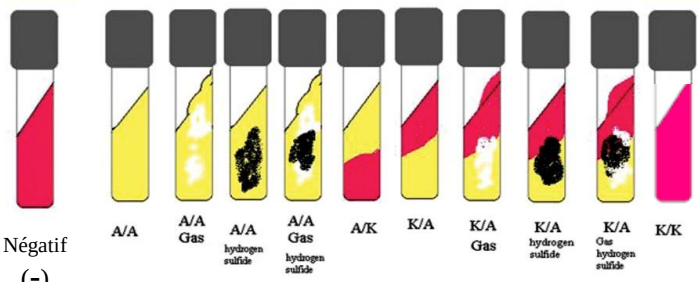
- **Fermentation du saccharose**

Milieu du tube rouge : saccharose non fermenté.

Milieu du tube jaune : saccharose fermenté.

- **Production de gaz** : apparition de bulles ou d'une poche gazeuse qui décale la gélose du tube.
- **Formation d'H₂S** : Formation d'une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre (Sulkin et Willet, 1940).
- **Dégradation des peptones** : Croissance bactérienne avec légère alcalinisation du milieu induisant l'apparition d'une couleur rose-violette.

Tableau 06 : Différents résultats des types respiratoires sur milieu VF (viande-foie) et du test TSI (Test Triple Sugar Iron).

Tests	Résultats
Type respiratoire (croissance sur milieu VF)	
Test TSI (Test Triple Sugar Iron)	 Négatif (-) A/A A/A Gas A/A hydrogen sulfide A/A Gas hydrogen sulfide A/K K/A K/A Gas K/A hydrogen sulfide K/A Gas hydrogen sulfide K/K
(a) : aérobies-anaérobies facultatives ; (b) : aérobies stricts ; (c) : microaérophiles ; (d) : anaérobies stricts ; K = alcalin ; A = acide (jaune).	



5.1.5. Test d'utilisation de citrate (milieu citrate se Simmons) (Fluka)

Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. En effet, ce milieu ne contient qu'une seule source de carbone : le citrate. Seules les bactéries possédant une citrate-perméase seront capables de se développer sur ce milieu. Le milieu est ensemencé par des stries à la surface de la pente puis incubé à 25°C pendant 24 h. On dévisser partiellement le bouchon afin de permettre les échanges gazeux.

La bactérie sera dite citrate de Simmons positive (+) si elle alcalinise le milieu en utilisant le citrate. Cette réaction est indiquée par le changement de couleur de l'indicateur de pH, le bleu de bromothymol qui devient bleu si l'alcalinisation est suffisante. Lorsque la bactérie est citrate de Simmons négative (-), il n'y a pas de culture et le milieu reste vert (Obréa et Buttaux, 1982).

5.1.6. Croissance sur milieu King (King A et King B)

Les milieux King A et King B permettent la différenciation entre les espèces de *Pseudomonas* par la mise en évidence de leurs pigments spécifiques (King *et al.*, 1954). La production des pigments est favorisée par la composition du milieu (Marchal et Bourdon, 1982).

Milieu King A permet la mise en évidence de la pyocyanine de *P. aeruginosa*. La pyocyanine bleuit le milieu. Alors que le milieu King B permet la mise en évidence de la pyoverdine des *Pseudomonas* du groupe fluorescent. La pyoverdine jaunit le milieu.

Pour ce faire, une boîte de milieu King A (Biochim) et une autre de milieu King B (Biochim) sont ensemencées en réalisant des stries médianes. L'incubation est effectuée à 25°C pendant 24 à 48 h.

5.1.7. Croissance sur milieu Chapman (Fluka)

Le milieu de Chapman est un milieu, concentré en NaCl (75 g.l⁻¹) permettant la croissance sélective des germes halophiles tels que *Staphylococcus*. La présence du mannitol dans ce milieu permet de différencier les staphylocoques des autres halophyles. Les staphylocoques étant mannitol positif, le milieu Chapman rouge à l'origine vire au jaune de par la dégradation du mannitol qui se manifeste par une acidification du milieu induisant ce virage. La croissance bactérienne avec légère alcalinisation du milieu se traduisant par un virage de la couleur du milieu du rouge vers le violet signifie la dégradation des peptones (Marchal et Bourdon, 1982). L'ensemencement doit être massif, en stries serrées ou par inondation. Ne pas sécher le milieu à l'étuve avant l'ensemencement : la dessiccation du milieu pourrait entraîner une augmentation de la concentration en NaCl et rendre le milieu trop inhibiteur.

- Pas de virage (le milieu reste rouge) : les colonies mannitol - car elles ne fermentent pas le mannitol, avec une légère alcalinisation du milieu par l'utilisation de peptones dans leur métabolisme énergétique.
- Virage au jaune du milieu : les colonies sont mannitol + car elles fermentent le mannitol dans leur métabolisme énergétique avec acidification du milieu (Marchal et Bourdon, 1982).

5.1.8. Croissance sur le milieu Bouillon lactosé au BCP (BCPL/ coche de Durham)

Le milieu BCPL ou bouillon lactosé au BCP est un milieu de culture non sélectif et non enrichi utilisé en microbiologie pour l'identification de bactéries. C'est un milieu différentiel, comportant un indicateur de pH, le pourpre de bromocrésol. Ce dernier donne une couleur pourpre au milieu. La fermentation du lactose est mise en évidence par l'acidification du milieu qui provoque le virage au jaune de la couleur du milieu, ainsi que par la production de gaz dans les cloches de Durham.

Le pourpre de bromocrésol est pourpre en milieu basique ou neutre, et devient jaune lorsque le milieu devient acide.

- Les bactéries "lactose +" utilisent le lactose présent dans le milieu comme source d'énergie. En dégradant le lactose, les bactéries produisent de l'acide ce qui entrainera une acidification du milieu et donc le virage de l'indicateur coloré de pH (le pourpre de bromocrésol), qui en milieu acide est jaune.
- les bactéries "lactose -" n'utilisent pas le lactose mais les peptones. En dégradant les peptones les bactéries alcalinisent le milieu, qui restera donc violet (Luquet et Corrieu, 2005).

5.1.9. Croissance sur milieu bouillon indole-mannitol (Schubert/cloche de Durham)

Afin de mettre en évidence la production d'indole par les bactéries étudiées, nous avons analysé leur croissance sur milieu Schubert. Ainsi, on ensemence 2 à 3 gouttes de culture jeune dans un tube de milieu indole-mannitol (milieu Schubert) (Conda, Espagne), muni d'une cloche de Durham. L'incubation est effectuée pendant 24 à 48 h à 25°C. Sont considérés comme positifs (Indole +), les tubes présentant à la fois une production des gaz et un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs (Sigma-Aldrich, Allemagne). Le réactif de Kovacs est utilisé pour la mise en évidence de la production d'indole par les bactéries possédant une

tryptophanase. Le tryptophane est dégradé en indole qui réagit avec le p-diméthylamino-benzaldéhyde du réactif, donnant une coloration rouge (Marchal et Bourdon, 1982 ; Guiraud, 2003).

5.1.10. Croissance sur milieu bouillon infusion cœur cerveau (BHIB) (Fluka)

Milieu bouillon infusion cœur cerveau, ou Brain-Heart Infusion Broth en anglais (BHIB), est un milieu polyvalent, riche, utilisé pour la recherche de la coagulase libre (enzyme thermostable permettant la formation de caillots de fibrine, coagulation) et la DNase thermostable (Joffin et Leyral, 2001). Sa richesse en éléments nutritifs permet aux bactéries exigeantes d'atteindre rapidement la phase stationnaire de croissance.

On ensemence le bouillon cœur-cerveau avec quelques gouttes de bouillon bactérien de culture jeune, puis on incube à 25°C pendant 24 heures. La croissance est mise en évidence par l'apparition d'une turbidité dans le milieu.

5.1.11. Croissance sur le milieu SS (Gélose *Salmonella-Shigella*)

C'est un milieu sélectif utilisé généralement pour la recherche des *Salmonella* et des *Shigella*. Ce milieu contient trois inhibiteurs : sels biliaires, vert brillant et forte concentration en citrate de sodium. Ceux-ci empêchent la pousse de toutes bactéries Gram⁺, et rendent difficile la croissance des bactéries Gram⁻. Ce milieu est utilisé pour voir l'aptitude nos souches bactériennes hydrocarbonoclastes sélectionnées de s'y développer.

Le milieu contient du lactose dont la fermentation est révélée par le virage de l'indicateur coloré, le rouge neutre, à sa teinte en pH acide. Ainsi, si la bactérie ensemencée fermente le lactose, le milieu devient rouge, par virage du rouge neutre, du fait de l'acidification du milieu. Ce milieu contient aussi du thiosulfate à partir duquel les bactéries qui en sont capables de pousser peuvent produire H₂S, qui sera révélé par le citrate ferrique. Ainsi, si la bactérie ensemencée produit le H₂S, en présence du fer III, un précipité noir se forme au centre de la colonie (Marchal et Bourdon, 1982).

5.2. Identification moléculaire et analyse phylogénétique des souches bactériennes hydrocarbonoclastes sélectionnées

L'identification des bactéries par la biologie moléculaire est une approche plus approfondie qui permet d'authentifier les souches bactériennes. L'identification des souches hydrocarbonoclastes sélectionnées a été également effectuée sur le plan moléculaire par le séquençage du gène d'ARNr 16S.

5.2.1. Choix du gène de l'ADNr 16S

Les gènes ribosomiques sont utilisés comme marqueurs moléculaires dans l'étude phylogénétique de différents organismes en raison de leur universalité, leur abondance, leur taille convenable aux analyses comparatives. Les ADNr contiennent par ailleurs des régions de séquences hautement conservées, très utiles pour la désignation des amorces et d'autres régions de séquences suffisamment variables pour servir comme un excellent moyen taxonomique, notamment l'ADNr 16S codant pour la petite sous unité ribosomique d'environ 1500 pb (opéron *rrs*: ribosomal RNA small subunit). Toutefois, depuis que Woese (1987) a montré que le gène de l'ADNr 16S est présent chez toutes les bactéries, qu'il a la même fonction et que sa structure est conservée, plusieurs chercheurs l'ont préférentiellement utilisé comme une approche rapide pour évaluer la variabilité génétique entre les souches bactériennes (Kacaniova et *al.*, 2019, Sting et *al.*, 2019).

5.2.2. Extraction d'ADN génomique

Les bactéries ont ainsi été sujet d'une extraction d'ADN. L'ADN génomique est extrait à partir d'une culture de 18 h des quatre souches sélectionnées en utilisant le Kit EasyPure® Bacteria Genomic DNA (TransBionovo Co., Ltd., Chine), en respectant les recommandations du fournisseur (protocole : voir annexe 04).

5.2.3. Amplification de l'ADNr 16S, séquençage et analyse phylogénétique

L'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S est réalisée dans un thermocycleur (Mastercycler Personal, Eppendorf), en utilisant les amorces universelles : benF27 : (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), benR1492 (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), synthétisée par Sigma (Allemagne). Le mélange de la réaction PCR, avec un volume total de 50 µl, contenait les éléments suivants: 2 µl d'extrait d'ADN (20 ng), 1 µl de ben27F (25 µM), 1 µl de ben1492R (25 µM), 1,0 µl de dNTP (5 mM), 4,0 µl de MgCl₂ (25 mM), 5 µl de solution tampon 10 X (20 mM), 0,5 µl d'ADN polymérase Taq (5 U/µl) et qsp d'eau distillée stérile (H₂O) jusqu'à 50 µl. L'amplification est effectuée en utilisant le programme suivant : dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, suivie de 35 cycles de 1 min à 94°C pour la dénaturation, 1 min à 55°C pour l'hybridation et 1,5 min à 72°C pour l'élongation et 10 min à 72°C pour l'extension finale.

Les produits d'amplification sont analysés par électrophorèse horizontal (VWR European, Kuro GEL Mini Plus 10 Electrophoresis Horizontal), sur gel d'agarose 1, 5 %, en présence de BET (10 µg/ml), à 120 V, 100 mA pendant 30 min, puis visualisé sous lumière ultraviolette

(Achtung ; UV-Strahlen). Le marqueur taille (Trans5K® DNA Marker, 5000-300 pb) est utilisé comme marqueur de poids moléculaire (Annexe 03).

Le séquençage partiel de l'ADNr 16S amplifié est effectué par les laboratoires Sanger sequencing services (GENEWIZ, Inc., South Plainfield, NJ, USA). L'analyse des séquences, par l'alignement et le pourcentage de similitude, sont effectuées en ligne par l'outil d'alignement BLASTn, sur le site web du National Biotechnology Information Center (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), en utilisant les séquences d'ADNr 16S publiées, et sur la base de données d'ARNr 16S EzBioCloud (Yoon et *al.*, 2017), en utilisant des séquences de référence. L'analyse des données des séquences partielles du gène de l'ADNr 16S des souches étudiées est réalisée à l'aide le programme Clustal W, pour l'alignement des séquences obtenue avec les séquences répertoriées des souches apparentées, ensuite le programme MEGA (version 7.0) est utilisé pour générer les arbres phylogénétiques, en utilisant la méthode de Neighbor Joining (NJ) (Kumar et *al.*, 2016), par l'analyse de bootstrap avec 1000 interactions. Les séquences obtenues dans cette étude sont déposées sur NCBI-GeneBank.

6. ANALYSE BIOINFORMATIQUE ET THERMODYNAMIQUE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES FRAGMENTS D'ARNr 16S

La structure secondaire des fragments d'ARNr 16S et les matrices thermodynamiques des différences des énergies libres sont prédites et calculées par le logiciel RNAFold (RNAFold web server ; The ViennaRNA) (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>), web services d'analyses bioinformatiques (Lorenz et *al.*, 2011).

7. ANALYSE FONCTIONNELLE DES ISOLATS SELECTIONNEES

7.1. Etude du gène codant pour l'enzyme catechol 2,3-dioxygénase (C23O)

En vue de la mise en évidence d'un fragment de 238 pb du gène C23O codant pour l'enzyme catéchol 2,3-dioxygénase (Mesarch et *al.*, 2000 ; Jyothi et *al.*, 2012), l'enzyme clef de la dégradations des hydrocarbures, chez les souches bactériennes hydrocarbonoclastes sélectionnées, nous avons utilisé un couple d'amorces spécifiques à ce gène de dégradation (Fig. 31), constitué sur la base de régions nucléotidiques conservées de 17 gènes C23O connues et répertoriées sur NCBI-GenBank.

DEG-Forward: (5'-CGACCTGATCATCGCATGACCGA -3');

DEG-Reverse: (5' -TCTAGGTCAGTACACGGTCA-3').

Les conditions de PCR sont réalisées selon Mesarch et *al.* (2000). La mixture de PCR (50 µl) contient : 5 µl tampon de PCR (10 X), 6 µl MgCl₂ à 25 Mm, 1 µl de chaque amorce (5 µM), 1µl dNTP (10 µM), 0,5 µl de Taq DNA polymérase (5 U/µl), et 1 µl d'extrait d'ADN total (chromosomique et plasmidique, extrait par le protocole de Ruiz-Barba et *al.* (2005) ; voir annexe 05). L'amplification est effectuée en utilisant le programme suivant : 5 min de dénaturation initiale à 95°C, suivie de 30 cycles de dénaturation à 94°C pendant 1 min, 56°C pendant 1 min d'hybridation, et 72 °C durant 2 min d'élongation avec une extension finale à 72 °C de 10 min (Mesarch et *al.*, 2000).

Les produits de PCR sont séparés par électrophorèse horizontal (VWR European, Kuro GEL Mini Plus 10 Electrophoresis Horizontal), à 80V 100 mA pendant 35 min ; sur gel d'agarose à 1,5 % en présence de BET (10 µg/ml), puis visualiser sous UV (Achtung ; UV-Strahlen). Le marqueur taille (Trans5K® DNA Marker, 5000-300 pb) est utilisé comme marqueur de poids moléculaire (Annexe 03).

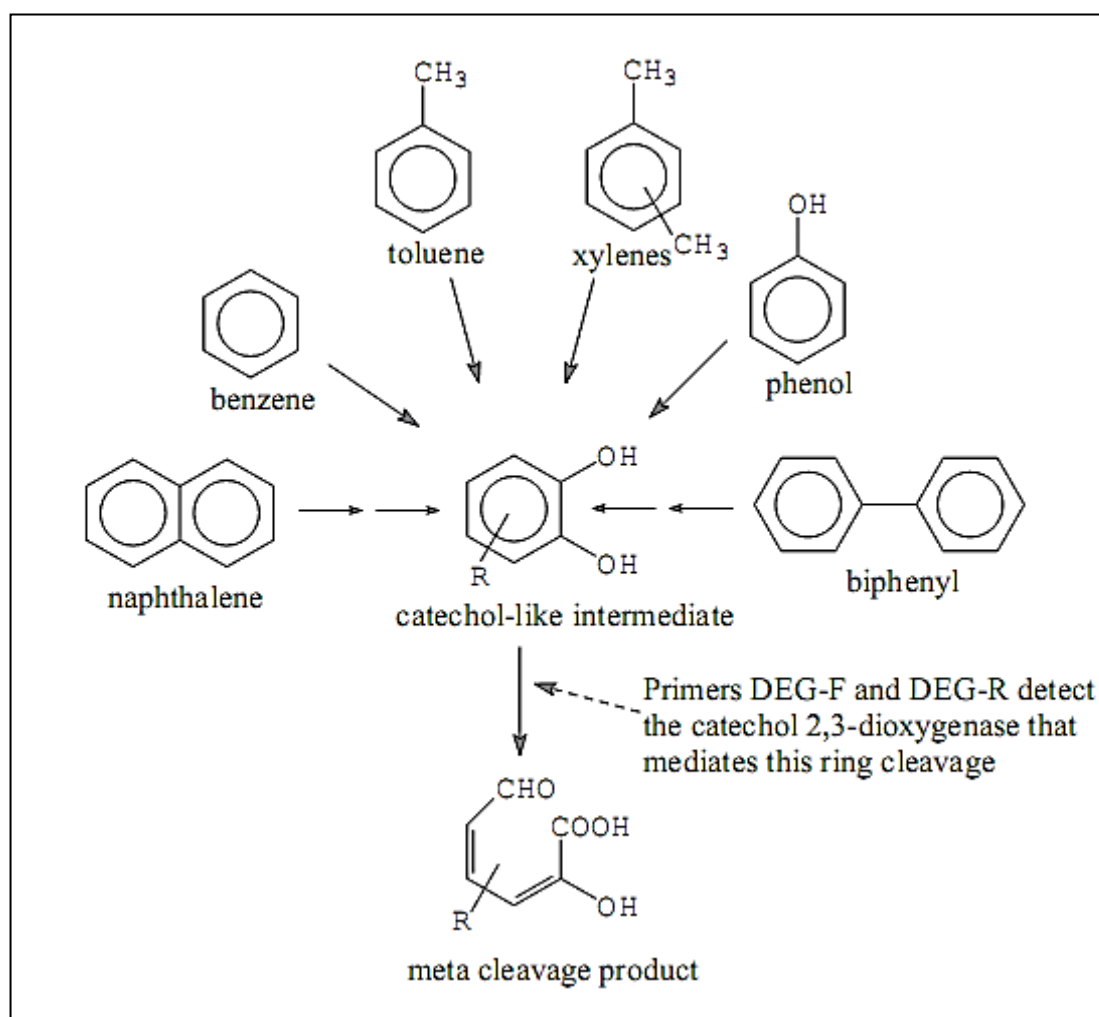


Figure 31 : Composés aromatiques dégradés via le méta-clivage (Mesarch et *al.* 2004).

7.2. Analyses bioinformatiques et modélisation 3D de la structure de l'enzyme catechol 2,3-dioxygenase (C23O)

Il est important d'avoir une vision fonctionnelle élargie de nos isolats, et des enzymes de biodégradation des HAPs. Pour cela nous avons utilisé l'outil bioinformatique, en se basant sur les résultats de l'identification moléculaire et l'analyse phylogénétique. Ainsi, afin d'établir l'analyse moléculaire bioinformatique des gènes codants pour l'enzyme catechol 2,3-dioxygénase (l'enzyme clé dans la biodégradation des HAPs), nous avons utilisé les souches bactériennes des mêmes espèces que celles de la présente étude, dont le gène codant pour l'enzyme catechol 2,3-dioxygénase est séquencé entièrement (déposées sur GenBank en NCBI database), ou les souches bactériennes les plus proches de point de vue moléculaire (obtenus par l'analyse phylogénétique), dont le génome est séquencé entièrement (déposées sur GenBank en NCBI database) (en ciblant notre gène d'intérêt codant pour l'enzyme catechol 2,3-dioxygénase), comme souches représentatives de nos espèces bactériennes hydrocarbonoclastes sélectionnées dans cette étude.

L'analyse des gènes est effectuée en ligne sur le site web NCBI en utilisant l'outil d'alignement BLASTn. Les séquences génomiques et protéiques de l'enzyme catechol 2,3-dioxygenase sont alignées par le programme Clustal W. la structure tridimensionnelle de l'enzyme catechol 2,3-dioxygenase des différents espèces est modélisée en utilisant les séquences en acides aminés par SIB-MODEL (Protein comparative modeling server) (<https://swissmodel.expasy.org/>). Les structure tridimensionnelles prédites sont comparées à celles déposées sur RCSB-PDB (3D) sur wwPDB protein data Bank.

8. OPTIMISATION DES SOUCHES HYDROCARBONOCLASTES SELECTIONNEES

Vu que l'activité métabolique des bactéries hydrocarbonoclastes est affectée par plusieurs facteurs physiques et chimiques, il est important d'étudier l'effet des conditions environnementales de culture sur la croissance bactérienne, afin de connaître les conditions optimales de croissance.

Ainsi, la croissance des souches bactérienne hydrocarbonoclastes sélectionnées est étudiée dans du pétrole brut comme source de carbone et d'énergie, avec la variation du facteur pH, température, et la concentration en NaCl, dans le milieu BHSM liquide supplémenté de 2 % de pétrole (au total : 48 test). Pour cela, dans des flacons de 250 ml, contenant 50 ml de ce milieu, sont inoculés avec des souches de culture jeune (24 h), à raison de 0,2 % (v/v)

de suspension bactérienne de turbidité équivalente au tube Mc Farland 0.5, à une concentration approximative de 1.5×10^8 UFC/ml (Annexe 06). L'incubation est effectuée sous agitation rotative à 140 tour/min dans un agitateur incubateur (Heidolph Inkubator 1000 coupled with Heidolph Unimax 1010, Germany), pendant 48 h. La croissance est estimée par la mesure de la densité optique à 600 nm, par un spectrophotomètre (Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis Spectrometer, USA). Les différents tests sont effectués en triplicata.

8.1. Effet du pH

L'effet du pH sur la croissance des souches bactérienne sélectionnées dans le pétrole brut, comme seule source de carbone e d'énergie, est étudié. Le pH du milieu est ajusté aux valeurs suivantes : 6, 7, 8 et 9. L'incubation est effectuée à température 25°C.

8.2. Effet de la température

Pour l'étude de l'effet de la température sur la croissance des bactéries hydrocarbonoclastes sélectionnées dans le pétrole brut, les souches sont incubées à différentes température (20°C, 25°C, 30°C, 37°C et 40°C), à pH 7 (Rodrigo, 2005).

8.3. Effet de la concentration en NaCl

Cette étude est réalisée à différentes concentrations de NaCl (0%, 3%, 6%, 9%, 12% et 15%). L'incubation est effectuée à pH7, et température 25°C.

9. CINETIQUE DE CROISSANCE DES SOUCHES SELECTIONNEES EN CULTURE SIMPLE ET EN CONSORTIUM DANS LE PETROLE BRUT

Nous avons réalisé un suivi de la croissance des souches en culture simple et en culture mixte (en triplicata), sur milieu BHSM liquide contenant du pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie, en mesurant la concentration microbienne toutes les 48 h. Ainsi, des cultures jeunes, âgées de 24 h, à raison de 0,2 % (v/v) de suspension bactérienne à une concentration approximative de 1.5×10^8 UFC/ml de turbidité équivalente au tube Mc Farland 0.5 (Annexe 06), sont inoculées dans flacons de 250 ml contenant 50 ml de milieu BSMH additionné 2% (v/v) de pétrole brut (Kumari et al., 2018). Pour le consortium, 0,2 % (v/v) de la culture mixte obtenue en mélangeant à des proportions égales les cultures des quatre souches (d'une concentration approximative de 1.5×10^8 UFC/ml chaque une). Ce pourcentage de culture est considéré (0,2 % ; v/v) de façon à avoir au départ une DO égale à 0 pour tous les échantillons. L'incubation est effectuée à 25°C, pH 7 et 3 % de NaCl, sous agitation rotative continu à 140 tours/min, dans un agitateur incubateur (Heidolph Inkubator

1000 coupled with Heidolph Unimax 1010, Germany), pendant 20 jours, en triplicata. Un prélèvement d'échantillon est effectué tous les 48 h pour la mesure de la concentration microbienne par turbidité à 600 nm par un spectrophotomètre (Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis Spectrometer, USA). Cette mesure est considérée comme indicateur biologique direct de la biodégradation.

10. ANALYSE ET TRAITEMENT DES RESULTATS

10.1. Traitements statistiques

Les moyennes des essais en triplicata $\pm$ écart-type (ET) sont déterminées à l'aide du programme Microsoft, Excel (Version 2013). L'analyse de la variance (ANOVA) est menée pour analyser les données avec des niveaux de signification inférieurs à 0,05 en utilisant l'outil d'analyse statistique STATISTICA (Version 10).

10.2. Analyse des patterns moléculaires

Afin de comparer les différents patterns moléculaires obtenus par PCR-RFLP, d'établir la relation phylogénique entre les souches bactériennes étudiées, par un dendrogramme, le test classification hiérarchique est utilisé (Logiciel STATISTICA, version 5,7), ainsi qu'une analyse densitométrique par le programme Image J (1,43 U).

Partie 03

Résultats et discussion

Les hydrocarbures pénètrent dans l'environnement au moment du transport, l'utilisation et les déversements. La contamination par les hydrocarbures est l'une des préoccupations majeures dans le monde entier, en raison des dommages qu'ils causent à l'environnement. La décontamination des sites contaminés par les hydrocarbures est très coûteuse et nécessite beaucoup de temps. Cependant, la bioremédiation représente une approche de décontamination efficace, rentable et respectueuse de l'environnement.

Réalisée pour la première fois sur les sédiments marins du port d'Oran, ce travail a pour but d'initier une approche de bioremédiation de ce milieu fortement contaminé par les hydrocarbures polycycliques aromatiques, par l'analyse du milieu, et par l'isolement de bactéries indigènes potentiellement dégradantes des hydrocarbures, et particulièrement les HAPs, et la sélection des meilleures souches, pouvant dégrader les hydrocarbures en monoculture ou en consortium, et par une caractérisation fonctionnelle des bactéries sélectionnées.

Ainsi, nous avons isolé et purifié au total 140 souches bactériennes hydrocarbonoclastes indigènes du port d'Oran (Algérie), après plusieurs étapes de purification successives, dont 24 sont qualifiées comme potentiellement intéressantes, et ont fait l'objet d'une présélection, parmi lesquelles nous avons sélectionné quatre souches bactériennes hydrocarbonoclastes symbiotiques les plus intéressantes, ayant un potentiel intéressant de dégradation des hydrocarbures et un taux de croissance net et important dans le pétrole brut comme seule source d'énergie.

Nous avons procédé en parallèle à la caractérisation du milieu écologique d'échantillonnage, situé en le port commercial d'Oran, dont les bactéries isolées sont indigènes, on effectuant des analyses physico-chimiques et microbiologiques.

1. CARACTERISATION DU MILIEU ECOLOGIQUE

1.1. Analyses physico-chimiques

La qualité des eaux est extrêmement variable dans le temps et elle est fonction de différents facteurs. Afin d'avoir une bonne connaissance de l'état globale, l'analyse physico-chimique de l'eau superficielle des sédiments marins du port d'Oran (- 40 m de profondeur) est effectuée en trois points d'échantillonnage. Permettant d'obtenir une image globale de la qualité des eaux des sédiments, et de définir les aptitudes à satisfaire les équilibres biologiques.

La température de l'eau de surface des sédiments de - 40 m de profondeur, mesurée *In-situ* au moment du prélèvement à l'aide d'un ordinateur de plongée, est de $13,87 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ (entre les trois ponts d'échantillonnage A, B et C). Cette température favorise le développement de différents microorganismes, comme elle semble activer les réactions d'oxydation, d'hydrolyse et de minéralisation de la matière organique biodégradable par les bactéries (Vergeynst et *al.*, 2018). Elle est conforme à la norme algérienne (JORA, 2006).

La température de l'eau, est un facteur écologique qui entraîne d'importantes répercussions écologiques. En effet, La température joue un rôle très important dans l'augmentation de l'activité chimique et bactérienne et de l'évaporation des eaux. Elle est un élément essentiel dans le fonctionnement des systèmes aquifères, surtout dans la solubilité des sels, des gaz et le conditionnement des équilibres de dissociation. Ainsi, elle agit sur la densité, la viscosité, la dissociation des sels dissous, de même que sur les réactions chimiques et biochimiques, le développement et la croissance des organismes vivants dans l'eau et particulièrement les microorganismes (Ulrich et *al.*, 2018 ; Fang et *al.*, 2019).

Aussi, la température de l'eau reste liée d'une part aux conditions locales telles que le climat régional et la topographie (Neely et *al.*, 1980). Ainsi, elle varie en fonction de la température extérieure, des saisons et de la profondeur du niveau de l'eau par rapport à la surface des sédiments (Kumar et *al.*, 2019 ; Soliman et *al.*, 2019 ; Mengual et *al.*, 2019).

Le potentiel Hydrogène (pH) des échantillons d'eau de mer de la surface des sédiments marins du port d'Oran est alcalin, de $8,2 \pm 0,1$. Ce pH correspond à celui de l'eau de mer, adéquat pour la vie marine. Il est lié à un système tampon (Aminot et Kérouel, 2004). Ces résultats concordent avec Kumar et *al.* (2019). Les valeurs du pH obtenus pour nos échantillons sont conformes à la norme algérienne (JORA, 2006).

Le pH conditionne un grand nombre d'équilibres physicochimiques. Il intervient avec d'autres paramètres comme la dureté, l'alcalinité et la température (Rodier, 1984). Il mesure la concentration des protons H^+ contenus dans l'eau, et résume la stabilité de l'équilibre établi entre les différentes formes de l'acide carbonique. Ainsi, le pH est lié au système tampon développé par les carbonates et les bicarbonates (Rodier, 2009).

La conductivité électrique permet d'évaluer la minéralisation globale et d'estimer la totalité des sels solubles dans l'eau (Rodier, 1984). La conductivité de nos échantillons d'eau de mer représente des valeurs de conductivité très importantes de $70,267 \pm 3,027$ mS/cm. Il s'agit d'un caractère de l'eau de mer (Rodier, 2009). Ces résultats indiquant une forte minéralisation

des sédiments marins du port d'Oran. Cette minéralisation est principalement attribuable aux ions chlorures, calciums, sulfates et magnésiums.

L'évolution des concentrations en chlorures semble influencer celle de la conductivité électrique qui est déterminée principalement par ces ions (Rodier, 2009). En effet, concernant le taux de sulfate et de chlorure, nous avons enregistré des valeurs de $2,165 \pm 0,410$ g/l et $20,730 \pm 0,634$ g/l respectivement. Alors que, le taux de Magnésium (Mg), le taux de sulfate, et taux de chlorure (Cl^-) sont détectés dans les plages de $1,200 \pm 0,075$ g/l ; $2,432 \pm 0,320$ g/l et $20,730 \pm 0,634$ g/l respectivement entre les trois points d'échantillonnage. Quant au total des solides dissous (TDS) nous avons enregistré des valeurs de $35,134 \pm 1,514$ U, alors que l'oxydabilité par le permanganate de potassium révèle des valeurs de $13,247 \pm 1,895$ mg/l entre les trois points d'échantillonnage. D'après ces résultats on remarque que le taux de sels est élevé (Elements Present in Seawater (<http://www.mbari.org/science/upper-ocean-systems/chemical-sensor-group/periodic-table-of-elements-in-the-ocean>) dans Kress (2019).

D'autre part, le dosage du titre d'alcalinité complet (TAC), la dureté calcique, et titre hydrométrique (TH), nous a révélé des valeurs de $197,245 \pm 25,545$; 504 mg/l ; $605 \pm 39,843$ mg/l ; $6,196 \pm 0,265$ g/l respectivement entre les trois points d'échantillonnage.

En ce qui concerne les taux de nitrite (NO_2^-) et de nitrate (NO_3^-), nous avons enregistré $0,018 \pm 0,006$ mg/l et $2,473 \pm 0,513$ mg/l respectivement entre les trois points d'échantillonnage. Les taux de nitrites enregistrés sont faibles et ne dépasse pas les normes algériennes (JORA, 2006). Ces résultats sont en accord avec Laredj (2018). On considère que la situation est très critique à partir d'une concentration de plus de $3 \text{ mg NO}_2^-/\text{l}$ (WHO, 2003).

Les nitrites constituent une étape importante dans la métabolisation des composés azotés ; ils s'insèrent dans le cycle de l'azote entre l'ammoniac et les nitrates. Leur présence est due, soit à l'oxydation bactérienne de l'ammoniac, soit à la réduction des nitrates. Ils ne représentent qu'un stade intermédiaire, et sont facilement oxydés en nitrates (par voie chimique et bactérienne). Des concentrations élevées en nitrites, témoignent souvent de la présence de matières toxiques (De Villers et *al.*, 2005).

Quant à la turbidité et les matières en suspension (MES), nous avons enregistré des valeurs de $17,387 \pm 0,661$ NTU et $1398,333 \pm 136,226$ mg/l respectivement, entre les trois points d'échantillonnage. Les valeurs de turbidité dépassent les normes standards internationales qui sont de 5 NTU (O.I.E, 2009), et les valeurs des MES dépassent largement les normes algériennes (JORA, 2006). Les valeurs élevées en turbidité et en matières en suspension

(MES) peuvent être considérées comme une forme de pollution (WHO, 2003).

Concernant les teneurs de la DCO et de la DBO₅, elles sont respectivement de $1024,470 \pm 138,506$ mg d'O₂/l et $245,433 \pm 16,607$ d'O₂/l dans l'eau de mer des profondeurs de – 40 m (surface des sédiments) des trois points d'échantillonnage. Ces résultats sont en accord avec Laredj (2018). La concentration réelle de la DBO₅ est limitée car le milieu des profondeurs marin est un milieu extrêmement inhibiteur du développement des bactéries sauf celles qui sont adaptées et sont résistantes (Drira et *al.*, 2016). La valeur de la DCO est plus importante que celle de la DBO₅ ce qui indique que l'abattement de la matière organique dépend davantage des processus physicochimiques que microbiologiques (Alamgir et *al.*, 2018). Du point de vue qualité, selon les valeurs de DBO₅ et DCO, l'eau de surface des sédiments marins du port d'Oran connaît une pollution très importante d'après IFREMER (2002) (Tableau 07). Ainsi, les valeurs de DBO₅ et DCO des trois points d'échantillonnage dépassent largement les normes nationales (JORA, 2006), ce qui indique une forte pollution.

Tableau 07 : Evaluation de la qualité de l'eau de mer selon IFREMER, (2002).

Etat de pollution	DBO ₅ (mg/ml)	DCO (mg/ml)
Absente	< 3	< 20
Pollution modérée	3-5	20-30
Pollution nette	5-10	25-40
Pollution importante	10-25	40-80
Pollution très importante	> 25	> 80

Le rapport DCO/DBO₅ permet d'apprécier la biodégradabilité de la matière organique et sa nature. Ainsi, les valeurs du rapport de biodégradabilité DCO/DBO₅ des trois points d'échantillonnage de la zone étudiée sont de $4,164 \pm 0,280$. C'est valeurs indiquent qu'il y'a une forte biodégradabilité, et que la matière organique est biodégradable.

De plus Laredj (2018) a observé, lors de l'étude des variations saisonnières de la qualité de l'eau de mer du port d'Oran, des concentrations en aluminium (NH₄) ne dépassant pas $3,5 \pm 1,12$ mg/l, et en phosphore total <13 mg/l, ce qui indique que les valeurs du phosphore total dépasse la norme algérienne qui est de 10 mg/l (JORA, 2006).

Tous les paramètres physico-chimiques effectués dans de la présente étude caractérisant le

milieu d'échantillonnage sont représentés dans le tableau 08.

Tableau 08 : Résultats des paramètres physico-chimiques caractérisant le milieu d'échantillonnage.

Paramètre	Moyenne de mesures des trois points d'échantillonnage (A, B et C)	Ecartype
Température	13,87°C	± 0,40
Potentiel d'Hydrogène (pH)	8,20	± 0,10
Turbidité	17,387 NTU	± 0,661
Conductivité	70,267 mS/cm	± 3,027
Matières en suspension (MES)	1398,333 mg/l	± 136,226
Total des solides dissouts (TDS)	35,134 U	± 1,514
Demande chimique en oxygène (DCO)	1024,470 mg/l	± 138,506
Demande biochimique en oxygène (DBO ₅)	245,433 mg/l	± 16,607
Taux de biodégradation	4,164	± 0,280
Oxydabilité par le permanganate de potassium	13,247 mg/l	± 1,895
Hydrocarbures totaux (C ₁₀ -C ₅₀) (GC-FID)	<100,000 µg/l	/
Titre d'alcalinité complet (TAC)	197,245 mg/l	± 25,545
Dureté calcique	504,605 mg/l	± 39,843
Titre hydrométrique (TH)	6,196 g/l	± 0,265
Dosage du nitrate (NO ₃ ⁻)	2,473 mg/l	± 0,513
Dosage de nitrite (NO ₂ ⁻)	0,018 mg/l	± 0,006
Taux de Magnésium (Mg ²⁺)	1,200 g/l	± 0,075
Taux de sulfate (SO ₄ ²⁻)	2,432 g/l	± 0,320
Taux de chlorure (Cl ⁻)	20,730 g/l	± 0,634

Le contenu en hydrocarbures totaux (de C₁₀ à C₅₀) est analysé, comprenant les hydrocarbures aromatiques polycycliques, représenté par les 16 congénères HAPs les plus courants (naphthalène, acénaphthylène, acenaphthène, fluorène, phenanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo[a]anthracène, chrysène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, benzo[a]pyrène, dibenzo[a,h]anthracène, benzo[g,h,i]perylène, indeno[1,2,3-c,d]pyrène). L'analyse est effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID), après une extraction une liquide-liquide selon la norme (Norme ISO 9377-2).

L'analyse du chromatogramme (Fig. 32) nous a permis de quantifier les hydrocarbures totaux (C₁₀-C₅₀) contenus dans l'eau surface des sédiments marins du port d'Oran. Les pics sont intégrés par rapport à la ligne de base du chromatogramme. C'est la différence des aires de pics du chromatogramme en début et en fin de test qui nous permet de quantifier les hydrocarbures totaux (Tableau 09). Interface du logiciel CompassCDC associé au détecteur de l'appareil CG-FID figure en annexe 07.

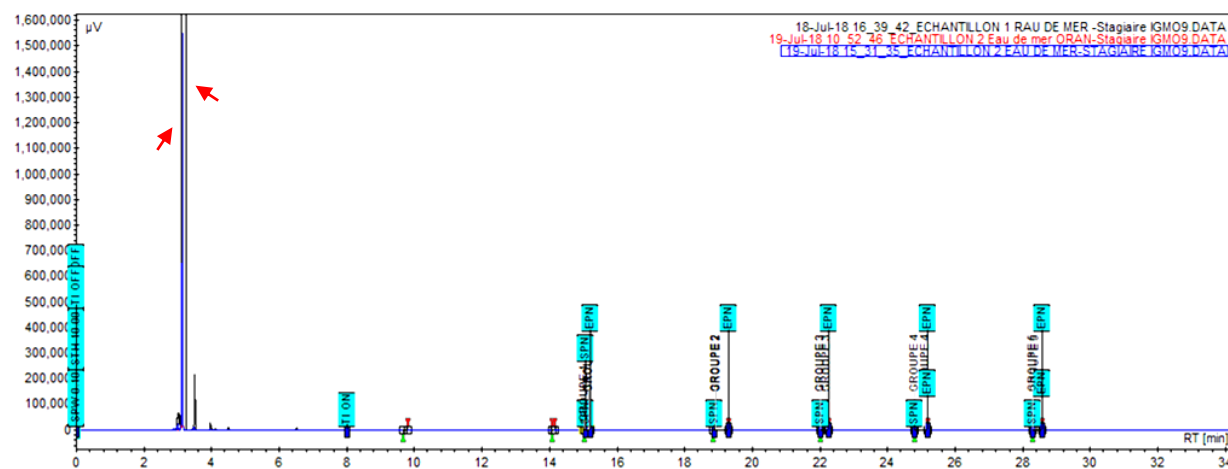


Figure 32 : Chromatogramme obtenu par l'analyse des hydrocarbures totaux (C₁₀-C₅₀) de l'échantillon de l'eau de mer de la surface des sédiments marins du port d'Oran, obtenu par chromatographie (GC/FID).

Tableau 09 : Résultats de l'analyse en chromatographie (GC/FID).

	Nom	Temps (Min)	Height (μV)	Area ($\mu V \cdot \text{min}^{-1}$)	Area (%)	Quantity (μg)
1	Groupe 1	15,03	10,2	0,1	2,587	2,5868
2	Groupe 2	18,92	16,9	1,5	68,813	68,8133
3	Groupe 3	22,01	5,6	0,2	7,738	7,7377
5	Groupe 5	28,28	5,9	0,3	14,438	14,4375
Totale			39,6	2,2	100,000	100,000

Selon le chromatogramme (Fig. 32 et Tableau 09), les pics sont de différentes amplitudes et à différents temps de rétention, ce qui signifie différents composant hydrocarbures, ainsi que de T (2,2 min) à T (2,3 min), en remarque l'agencement et la superposition de plusieurs pics d'amplitude différente et très importante pour certains pics (dépassant le seuil de quantification).

Les résultats de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des hydrocarbures totaux montrent une présence notable en hydrocarbures (de C_{10} à C_{50}), avec des valeurs élevées supérieure à $100 \mu g/l$, qui représente la limite de quantification de l'appareil, ce qui signifie que ce taux peut être largement dépassé. Cette valeur assez importante excède largement les normes algériennes. En effet, cette valeur est dix fois plus supérieure à la norme algérienne qui préconise une valeur limite des hydrocarbures de $10 \mu g/l$ (JORA, 2006), indiquant un taux de pollution par les hydrocarbures assez important de l'eau de surface des sédiments marin du port d'Oran, d'où la nécessité d'une dépollution efficace et biologique respectueuse de l'environnement. Ces résultats sont en accord avec Feknous et *al.* (2017) qui ont travaillé sur le port d'Annaba (Algérie).

Outre que la contamination par les hydrocarbures, les sédiments marins sont fortement contaminés par les métaux lourds. En effet, une étude récente a été menée par Haddou (2017) sur la contamination des sédiments superficiels du port d'Oran par les métaux lourds. A savoir, le Plomb (Pb), le Cadmium (Cd), le Cuivre (Cu), le Zinc (Zn) a révélé des concentrations en (μg de poids sec) de 290,64 - 400,86 ; 1,78 - 2,65 ; 30 - 42,22 ; 692,11 - 856,86 respectivement, dépassants les normes algériennes (JORA, 2006) (sachant que l'échantillonnage a été effectué annuellement en (2011-2013), leur permettant de déterminer l'indice de géo-accumulation (Igeo). Ainsi, les résultats obtenus par Haddou (2017), indiquent

que le port d'Oran est très impacté par la pollution métallique, qui se traduit par des indices de géo-accumulation. Cet impacte varie entre une contamination modérée en (Cd) à forte pour le Zinc (Zn) avec un indice compris entre ($2 > I_{geo} > 3$), une contamination forte en plomb (Pb) ($3 < I_{geo} < 4$), et une absence de contamination au cuivre avec un indice de géo-accumulation ($I_{geo} < 0$). Concluant qu'à l'exception du Cuivre (Cu), la contamination des sédiments marins du port d'Oran par les métaux lourds est certaine et élevée selon Haddou (2017).

L'Algérie dispose un littoral qui est soumis à des pressions anthropiques, conduisant à la dégradation des écosystèmes littoraux. La pollution des eaux dans son sens le plus large est définie comme «Tout changement défavorable des caractéristiques naturelles (biologiques ou physicochimiques) dont les causes sont directement ou indirectement en relation avec les activités humaines». Ainsi, plusieurs auteurs (Grimes et Bakalem, 1993 ; Grimes et Boudjakdji, 1996 ; Boutiba et *al.*, 2003; Grimes et *al.*, 2010) ont montré une pollution croissante dans l'ensemble du littoral algérien, en particulier dans les zones côtières des grandes villes à l'instar du littoral oranais, et particulièrement le port d'Oran. En effet, de nombreuses études ont montré la pollution du port d'Oran, en utilisant différents analyses physico-chimiques de l'eau de mer et des sédiments marins, notamment le dosage des métaux lourds et des HAPs, et en utilisant des organismes aquatiques indigènes comme bioindicateur et biomarqueurs tels que les moules (*Mytilus galloprovincialis*) pour évaluer les indices et le degré de la pollution du milieu (Remili et Kerfouf, 2010 ; Benali et *al.*, 2015 ; Benali et *al.*, 2017).

1.2. Analyse bactériologique

Dénombrement de la microflore totale et de la microflore hydrocarbonoclaste

Le dénombrement de la microflore totale et de la microflore biodégradable d'hydrocarbures renseigne de la grande diversité microbienne. D'après les résultats du dénombrement de la microflore totale qui varient de $20,64.10^5$ UFC/ml et $23,82.10^5$ UFC/ml, et de la microflore hydrocarbonoclaste qui varient de $18,73.10^4$ UFC/ml et $22,68.10^4$ UFC/ml (Fig. 33). Il en ressort la présence d'une microflore hydrocarbonoclaste dans les trois échantillons d'eaux de mer des sédiments marins (- 40 m de profondeur). Ces résultats révèlent qu'il y a une corrélation positive entre teneur en hydrocarbures (< 100 mg/l) et présence d'une microflore. Ces observations concordent avec Atlas et Hazen (2011), et Nogales et Bosch (2019) qui ont noté qu'un apport d'hydrocarbures dans un milieu est suivi d'une augmentation de la population microbienne hydrocarbonoclaste.

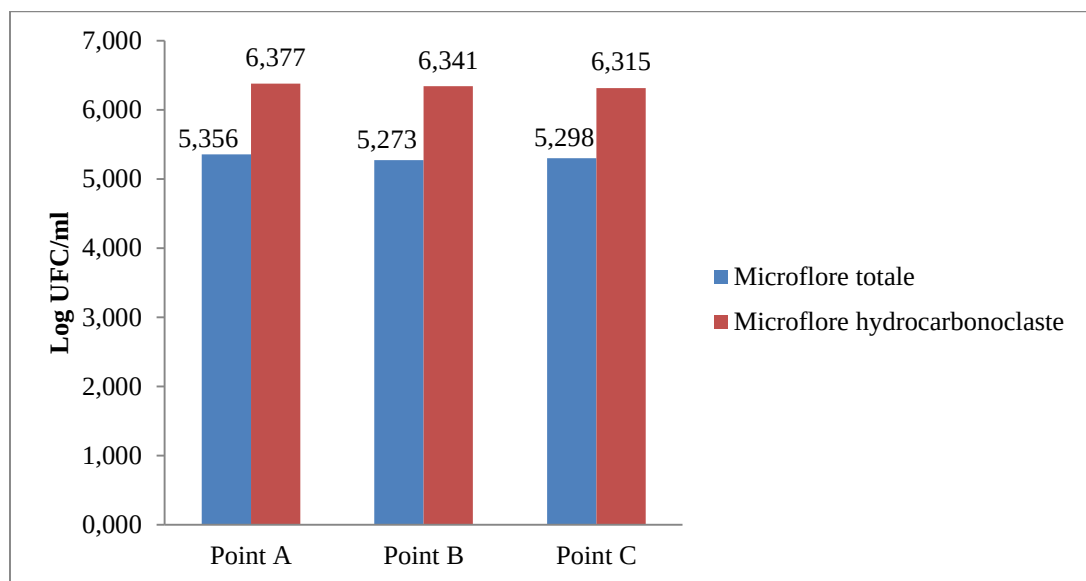


Figure 33 : Enumération de la microflore totale et de la microflore hydrocarbonoclaste des échantillons du mixte sédiments marins-eau de mer de la surface des sédiments des trois points d'échantillonnage du port d'Oran.

Plusieurs bactéries ont le pouvoir de biodégradation des HAPs (Babu et *al.* 2019). Ces microorganismes sont disponibles dans les sites pollués par les hydrocarbures. Le nombre et la diversité de ces bactéries hydrocarbonoclastes sont influencés par différents facteurs environnementaux, physiques et chimiques, les facteurs environnementaux tels que la température, le pH, l'oxygène dissout et la nature de la source de carbone dont les hydrocarbures font partie qui représentent les majeurs polluants xénobiotiques (Khudur et *al.*, 2018). Aussi, le changement saisonnier et climatique joue aussi un rôle sur le nombre et la diversité des bactéries en général et des bactéries hydrocarbonoclastes en particulier.

Nos résultats de dénombrement de la microflore hydrocarbonoclaste, nous permettent d'avancer que les sédiments marins du port d'Oran peuvent être dépollués par des procédés biologiques en utilisant les microorganismes indigènes du milieu.

2. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES SOUCHES BIODEGRADANTES DES HYDROCARBURES

Après enrichissement avec le milieu BHSM additionné de 2 % à 10 % de pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie, successivement par une série de sous cultures, nous avons isolé et purifié environ 140 souches bactériennes susceptibles de dégrader les hydrocarbures. Quelques souches sont représentées dans les figures 34 et 35.

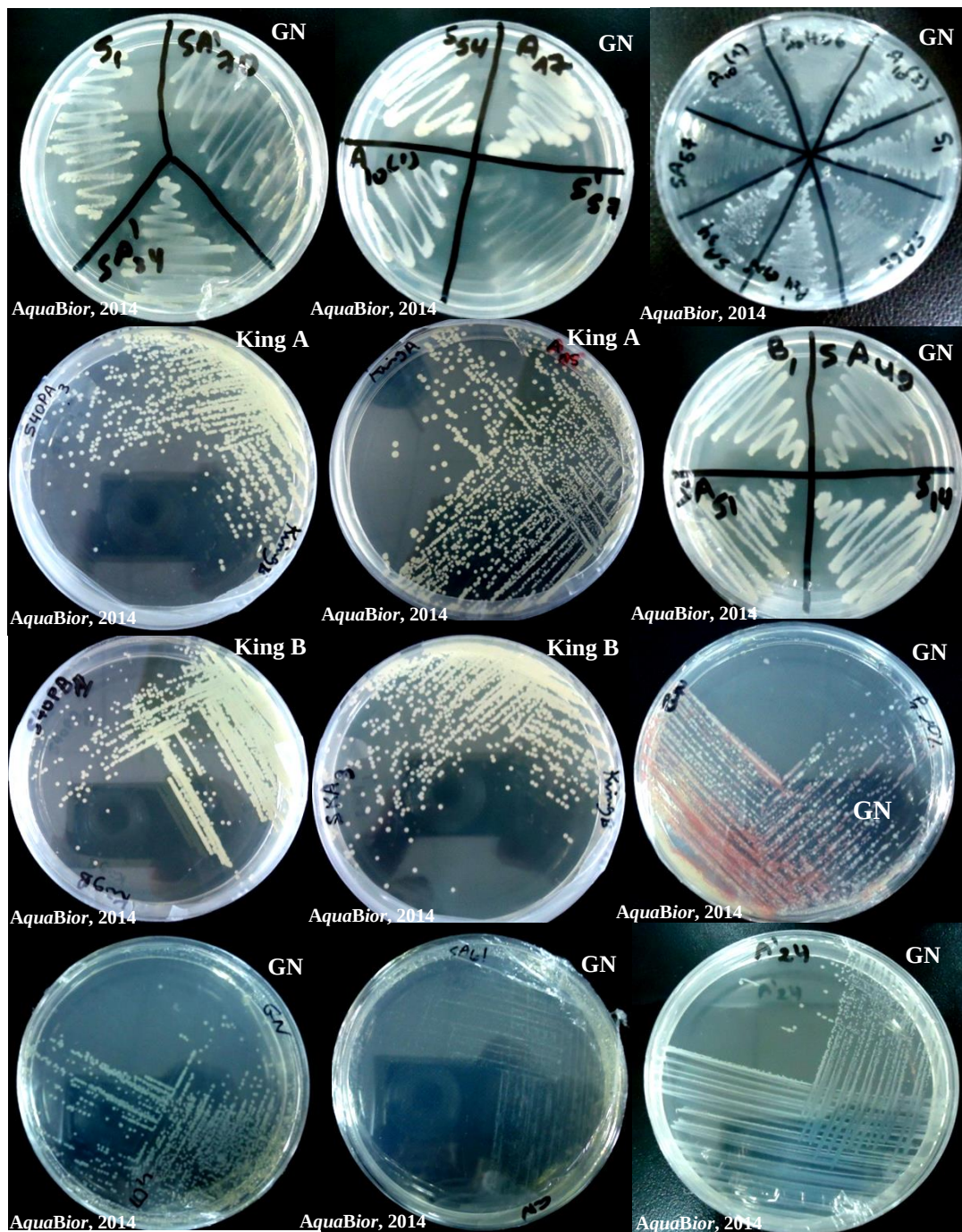


Figure 34 : Différentes souches hydrocarbonoclastes isolées des sédiments marins du port d'Oran ; sur milieu gélose nutritive (GN); et sur milieux King A et King B.

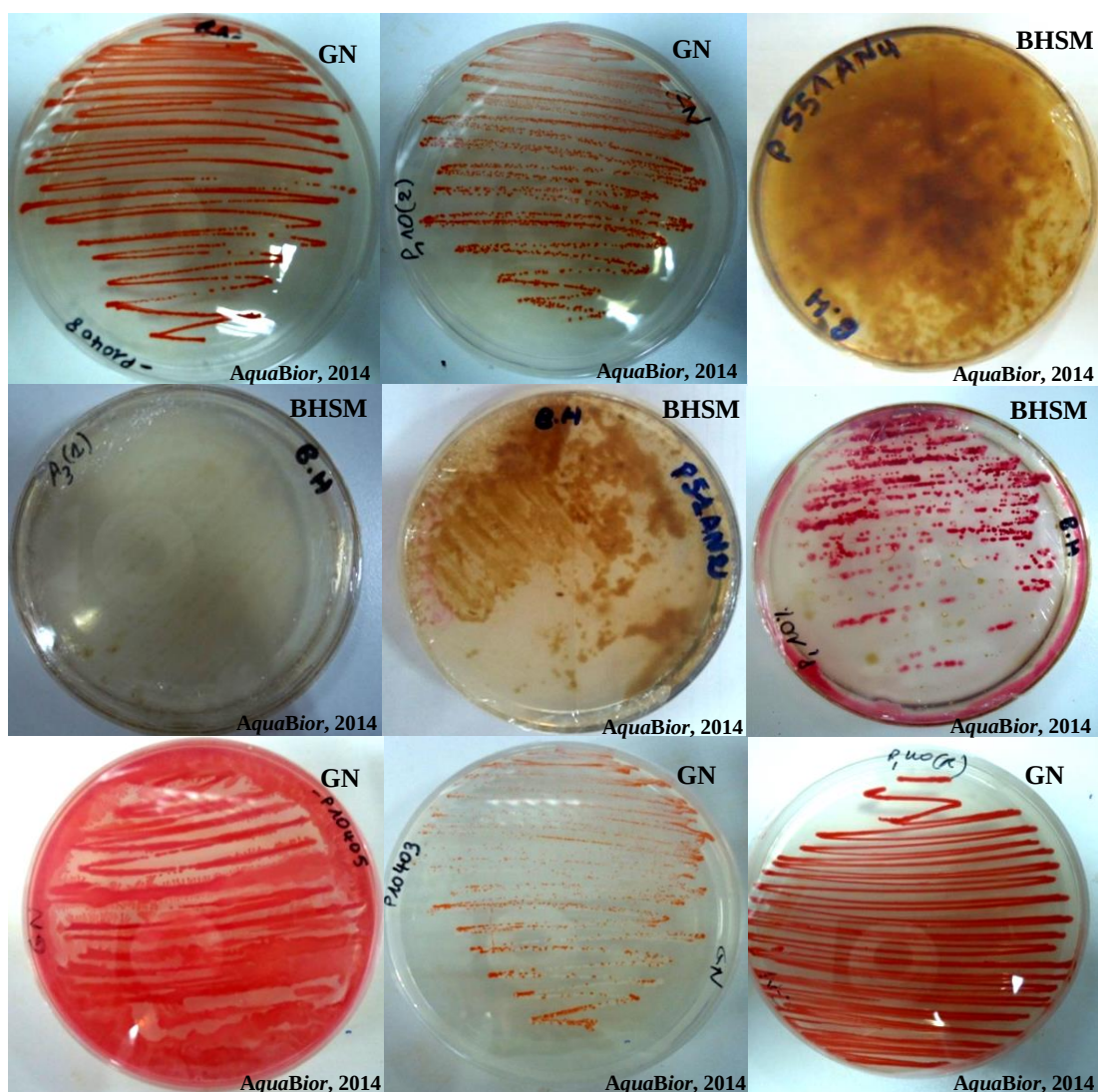


Figure 35 : Différentes souches hydrocarbonoclastes isolées des sédiments marins du port d'Oran ; sur milieu BHSM additionné de pétrole brut comme seule source d'énergie ; et sur milieu gélose nutritive (GN).

3. CRIBLAGE ET PRESELECTION DE SOUCHES BACTERIENNES HYDROCARBONOCLEASES

Les microorganismes isolés capables de dégrader les hydrocarbures appartiennent à différents groupes de bactéries à Gram positifs (36 %) et à Gram négatifs (64 %). Parmi ces souches bactériennes hydrocarbonoclastes isolées des sédiments marins du port d'Oran, nous avons présélectionné vingt quatre souches bactériennes qualifiées "d'intéressantes". Cette sélection est basée sur le meilleur taux de croissance dans le milieu BHSM additionné de 2 % et de 10 % de pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie, ce qui reflète le potentiel de

dégradation du pétrole brut (Fig. 36), et la capacité de croissance en présence d'un taux élevé de pétrole brut (allant jusqu'à 10 %).

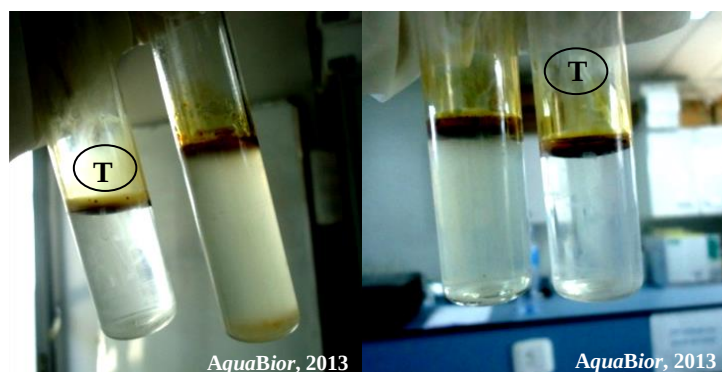


Figure 36 : Exemples d'aspect des troubles apparents de différentes souches hydrocarbonates isolées du port d'Oran ; **(T)** : témoin (milieu BHSM sans culture).

Parmi ces vingt-quatre souches hydrocarbonoclastes, nous avons présélectionné onze souches symbiotiques (pouvant croître simultanément dans le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie), et dont la séparation et la purification été difficiles préalablement. Ces derniers sont sujet d'une dernière sélection basée sur l'outil moléculaire, en utilisant la méthode de PCR-RFLP de l'ADNr 16S.

La croissance des souches bactériennes hydrocarbonoclastes présélectionnées sur le milieu BHSM liquide, en présence du pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie, est montrée dans la figure 37.

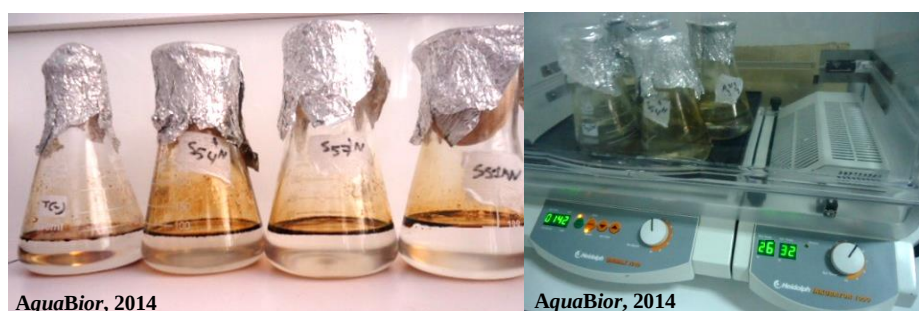


Figure 37 : Croissance des souches présélectionnées sur milieu BHSM liquide en présence du pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie.

4. SELECTION MOLECULAIRE DES SOUCHES HYDROCARBONOCLASTES ISOLEES PAR PCR-RFLP

4.1. Extraction de l'ADN génomique et amplification de l'ADNr 16S

L'ADN génomique a directement été extrait des souches hydrocarbonoclastes présélectionnées.

L'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN génomique des quatre souches hydrocarbonoclastes présélectionnées est réalisée dans l'objectif de visualiser l'ADN extrait, et de vérifier sa la qualité. Cette électrophorèse révèle des bandes uniques, intactes de bonne qualité sans la présence de smear, ce qui nous a permis de constater que l'ADN extrait n'était ni dégradé ni contaminé, et peut donc être utilisé pour l'analyse en PCR-RFLP. L'ADN 16S est ensuite amplifié par PCR, grâce aux amorces universelles du domaine Bacteria ; benF27: (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ; et benR1492: (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), synthétisée par Sigma (Allemagne).

L'amplification de l'ADNr 16S est une étape préliminaire à l'analyse du polymorphisme de la longueur des fragments de restriction de ce gène. Cette méthode, qui est l'une des plus utilisées pour l'identification des bactéries permet de regrouper les souches bactériennes à un niveau de résolution taxonomique qui s'étend du genre à l'espèce (Chmagh et *al.*, 2019).

La PCR réalisée sur l'ADNr 16S a permis d'amplifier tous les ADN 16S des souches hydrocarbonoclastes présélectionnées, soit un taux d'amplification de 100 %.

Ces résultats montrent la présence d'une seule bande d'ADN au niveau de chaque échantillon (Fig. 38). Evaluée visuellement par comparaison au marqueur utilisé, et à l'aide d'une courbe étalon (Annexe 03), la taille de la bande amplifiée correspond au poids moléculaire d'environ 1500 pb (Fig. 38).

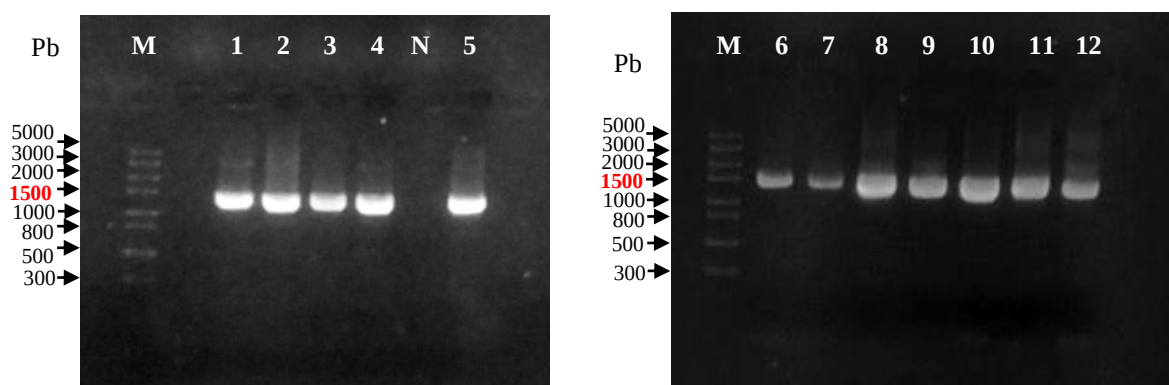


Figure 38 : Electrophorèses des produits de PCR du gène ADNr 16S de souches hydrocarbonoclastes présélectionnées, isolées des sédiments marins du port d'Oran, à 1,5 % d'agarose. **(1)** : SA50F ; **(2)** : SA24N ; **(3)** : A34P ; **(4)** : SP57N ; **(5)** : SP49F2 ; **(6,7)** : SA9N ; **(8)** : SP63N ; **(9)** : A3NI3 ; **(10)** : SP54N ; **(11)** : S51AN ; **(12)** : A3NI4 ; **(M)** : Trans5K DNA Marker. **(N)** : Contrôle négatif (sans ADN).

4.2. Double digestion enzymatique et mise en évidence du polymorphisme de restriction de l'ADN 16S amplifié

L'ADNr 16S amplifiées, des souches hydrocarbonoclastes présélectionnées, est soumis à une double digestion enzymatique par deux enzymes de restriction endonucléase simultanément ; RsaI et NcoI (Sigma-Aldrich). Les polymorphismes de restriction, obtenus après la double digestion enzymatique des ADNr 16S, sont mis en évidence par l'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% (Fig. 39).

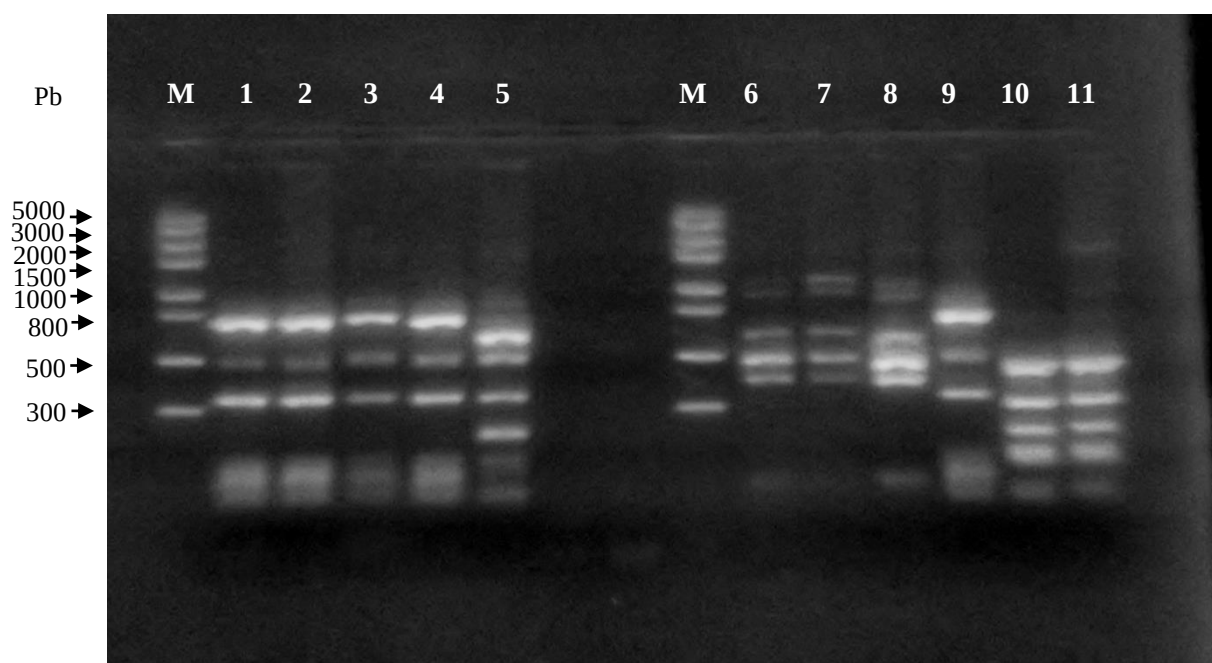


Figure 39 : Electrophorèse des produits de PCR-RFLP du gène ADNr 16S des souches hydrocarbonoclastes présélectionnées, isolées des sédiments marins du port d’Oran, à 2% d’agarose après digestion par les deux enzymes de restriction endonucléase *RsaI* et *NcoI* (Sigma-Aldrich). **(1)** : SA50F ; **(2)** : SA24N ; **(3)** : A34P ; **(4)** : SP57N ; **(5)** : SP49F2 ; **(6)** : SA9N ; **(7)** : SP63N ; **(8)** : A3NI3 ; **(9)** : A3NI4 ; **(10)** : SA5AN ; **(11)** : SP54N ; **(M)** : Marqueur de taille Trans5K DNA Marker.

Les profils électrophorétiques des ADNr 16S, digérés par les deux enzymes de restriction endonucléase *RsaI* et *NcoI* (Sigma-Aldrich) (Fig. 39), montrent des différences individuelles dans la taille des fragments de restriction (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism), et chaque profil de restriction caractérise une espèce donnée. Visiblement, il y a la présence de profils qui se ressemblent, ce qui peut s’agir du même genre, ou de la même espèce. Ainsi, pour mieux visualiser les ressemblances et les différences entre les profils moléculaires obtenus, et afin de regrouper les espèces selon leurs ressemblances, pour pouvoir choisir de chaque groupe d’espèces une souche bactérienne représentative du groupe, nous avons utilisé un logiciel de traitements des profils des restriction (Image J), et l’analyse hiérarchique du traitement statistique du le logiciel STATISTICA (Version 5,7), dont les résultats obtenus sont représentées par les figures 40 et 41 respectivement.

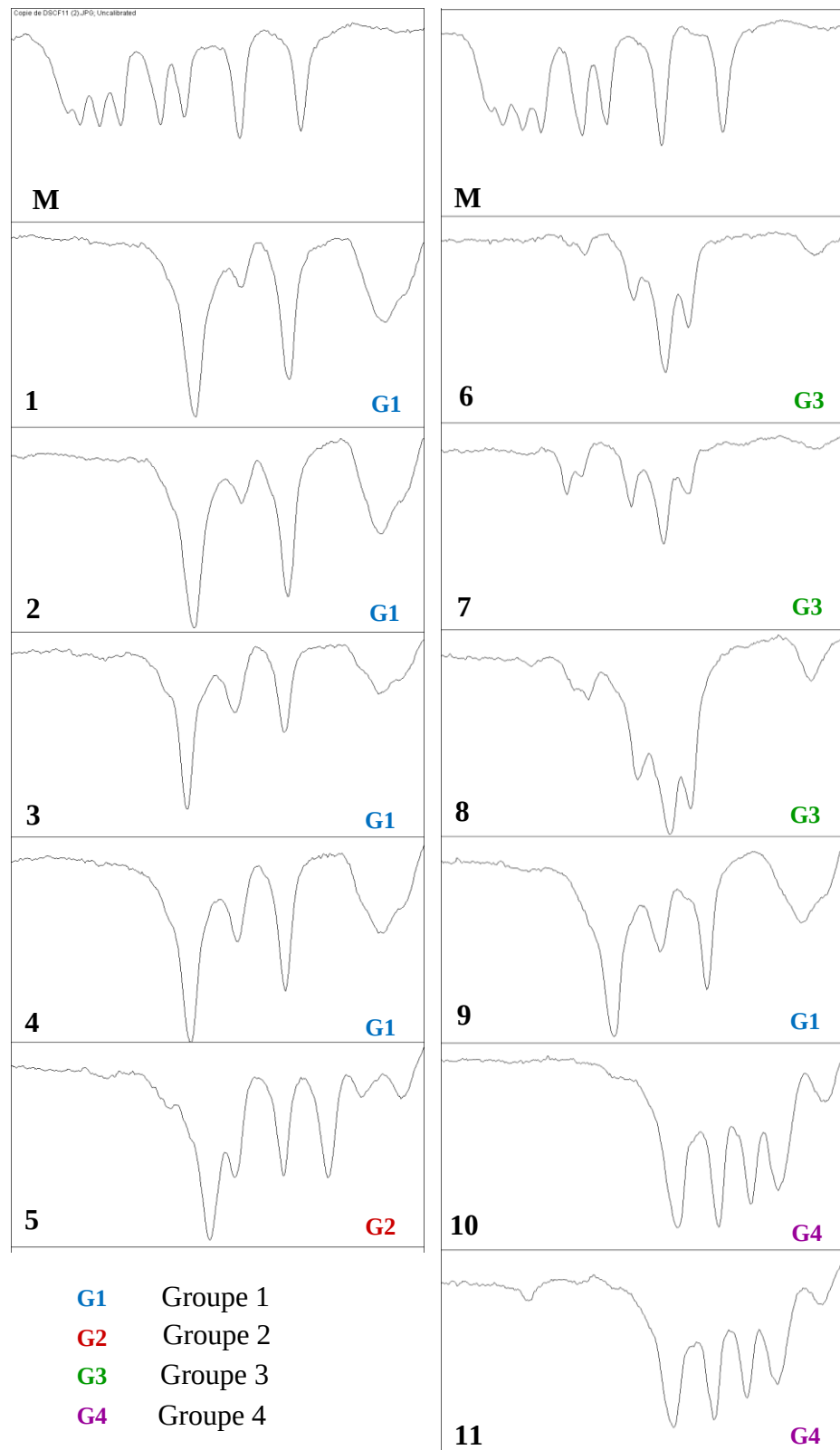


Figure 40 : Electrophorégrammes de l'analyse des profils de restriction obtenu par PCR-RFLP du gène 16S des bactéries présélectionnées analysées par le logiciel image J.
(1) : SA50F ; **(2) :** SA24N ; **(3) :** A34P ; **(4) :** SP57N ; **(5) :** SP49F2 ; **(6) :** SA9N ; **(7) :** SP63N ; **(8) :** A3NI3 ; **(9) :** A3NI4 ; **(10) :** S51AN ; **(11) :** SP54N ; **(M) :** Trans5K DNA Marker.

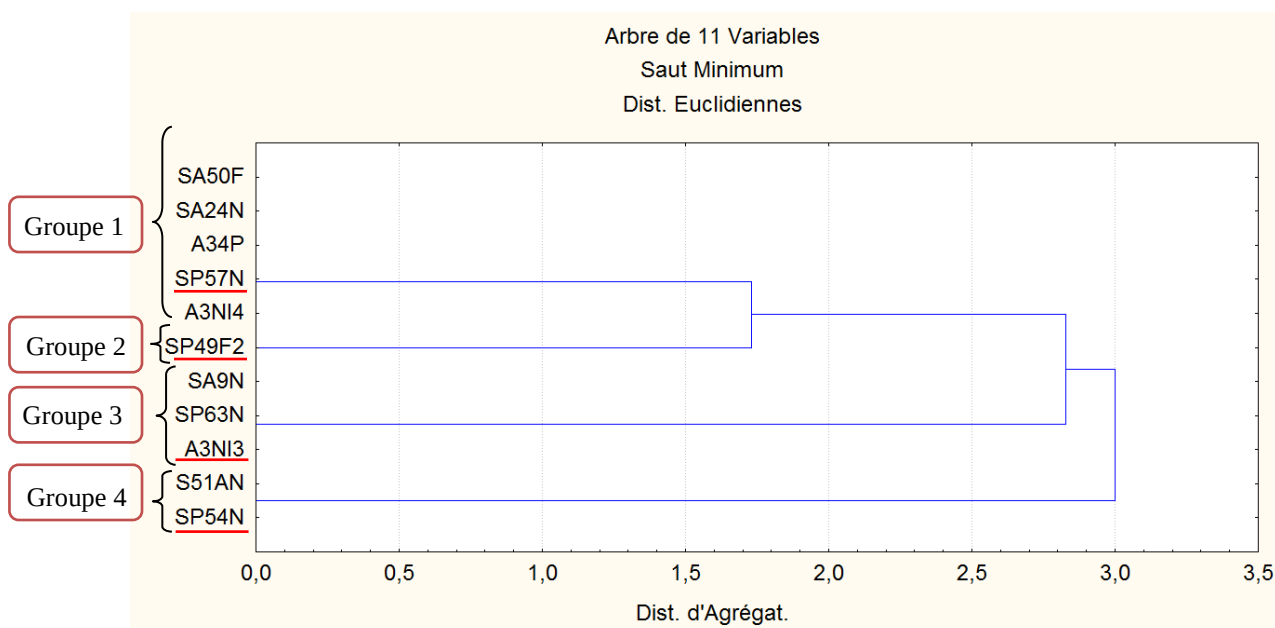


Figure 41 : Dendrogramme obtenu par le logiciel STATISTICA de l'analyse des profils génétiques générés par PCR-RFLP en double digestion enzymatique, de l'ADNr 16S des bactéries hydrocarbonoclastes présélectionnées, isolées des sédiments marins du port d'Oran.

Chaque enzyme endonucléase catalyse un site de restriction qui lui est spécifique, générant ainsi des profils spécifiques des ADNr 16S, reflétant la diversité génotypique des souches bactériennes à analyser. L'analyse des profils de restriction obtenus, est traduite en piques générés en fonction de la présence et de l'intensité des bandes génomiques par le logiciel image J (Fig.40), et par un dendrogramme, basé sur les ressemblances, en analysant la présence (1) ou l'absence (0) des bandes d'ADN des profils (Fig. 39 et Fig. 41). Ainsi, nous observons quatre groupes bactériens distincts, regroupés en fonction des ressemblances des profils génétiques obtenus. Ces groupes, représentés par un dendrogramme dans figure 41, sont : le groupe 1 contenant les souches SA50F, SA24N, A34P, SP57N et A3NI4 (Fig. 40 (1, 2, 3, 4 et 9) respectivement), le groupe 2 représenté par la souche SP49F2 (Fig. 40 (5)), le groupe 3 regroupant les souches SA9N, SP63N et A3NI3 (Fig. 40 (6, 7 et 8) respectivement) et le groupe 4 constitué par les souches S51AN et SP54N (Fig. 40 (10 et 11) respectivement). De nombreuses études ont utilisées la méthode PCR-RFLP pour l'analyse et la différenciation entre des groupes, et des espèces bactériennes (Noaman et *al.*, 2009; Jinsheng et *al.*, 2010 ; Suharjo et *al.*, 2014 ; Beghalem et *al.*, 2017 ; Rilling et *al.*, 2018 ; Chmagh et *al.*, 2019 ; Schmidt et *al.*, 2019).

La dimension et le degré de conservation du gène d'ADNr 16S font de lui un marqueur phylogénétique idéal (Sumathi et *al.*, 2015). Cette technique est performante, d'une grande précision, rapide, informative et reproductible (Clark, 1997, Minoru et *al.*, 2009 ; Onni et *al.*, 2010 ; Suharjo et *al.*, 2014 ; Sourri et *al.*, 2019). Sa résolution taxonomique permet la distinction entre différents genres et différents espèces bactériennes, permettant de l'utiliser comme une méthode fiable pour la caractérisation moléculaire des souches (Suharjo et *al.*, 2014). Lui et *al.* (2010) ont utilisé La PCR-RFLP du gène 16S pour la différenciation d'espèces bactériennes hydrocarbonoclastes contenus dans un mélange complexe. De même, Gomes et *al.* (2018) ont utilisé cette méthode pour la différenciation entre 132 souches bactériennes cultivables dégradantes des hydrocarbures au niveau infra-spécifique, révélant ainsi 79 profils génétiques différents. Aussi, Tanti et *al.* (2011) ont utilisé la méthode de PCR-RFLP de la région d'espacement intergénique entre les gènes d'ADNr 16S-23S, pour la différenciation entres quatre espèces proches de *Pseudomonas* spp. Biodégradant les hydrocarbures pétroliers. Par ailleurs, Sourri et *al.* (2019) ont utilisé cette méthode en ciblant la région V1-V3 du gène d'ADNr 16S, permettant l'identification directe de l'espèce d'*Alicyclobacillus acidoterrestris* parmi d'autres espèces d'*Alicyclobacillus*.

A partir de ces résultats moléculaires nous avons sélectionné quatre souches hydrocarbonoclastes représentatives de chaque groupe.

Les souches sélectionnées sont : la souche SP57N (groupe 1), la souche SP49F2 (groupe 2), la souche A3NI3 (groupe 3) et la souche SP54N (groupe 4). Ces bactéries dégradent et utilisent le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie, en culture simple et en consortium (culture mixte).

5. IDENTIFICATION DES QUATRE SOUCHES SELECTIONNEES

5.1. Etude morphologique

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies permet d'effectuer une première caractérisation. L'inoculation sur milieu BHSM additionné de pétrole brut, des souches hydrocarbonoclastes sélectionnées nous a permis de confirmer une autre fois le pouvoir de biodégradation et d'utilisation du pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie, et d'avoir quatre types de colonies distinctes par leur aspect, leur taille et leur couleur (Fig. 42).

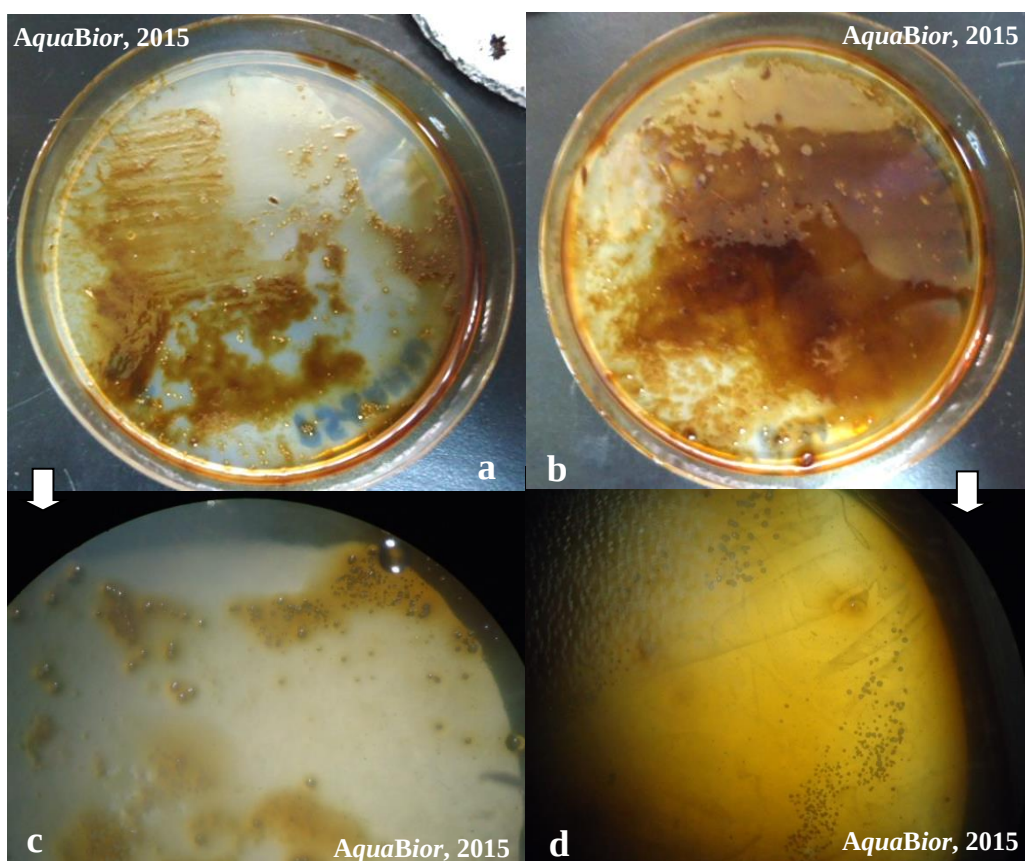


Figure 42 : Colonies des souches sectionnées SP54N et A3NI3 dans le milieu BISM solide additionné du pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie. **(a)** : La souche SP54N dans 2% de pétrole brut ; **(b)** : La souche SP54N dans 10 % de pétrole brut ; **(c)** : souches SP54N et **(d)** : A3NI3 observées sous loupe binoculaire (G X10).

L'observation macroscopique, des souches hydrocarbonoclastes sélectionnées (SP54N, SP57N, SP49F2 et A3NI3)ensemencées sur milieu GN, a révélé la présence de colonies bien distinctes et caractéristiques, indiquant la pureté des cultures (Fig. 43 et 44). Les résultats de l'aspect de croissance des quatre souches hydrocarbonoclastes sélectionnées (SP57N, SP54N, A3NI3 et SP49F2), après 24 h et 48 h d'incubation, sont illustrés dans les figures 43 et 44.

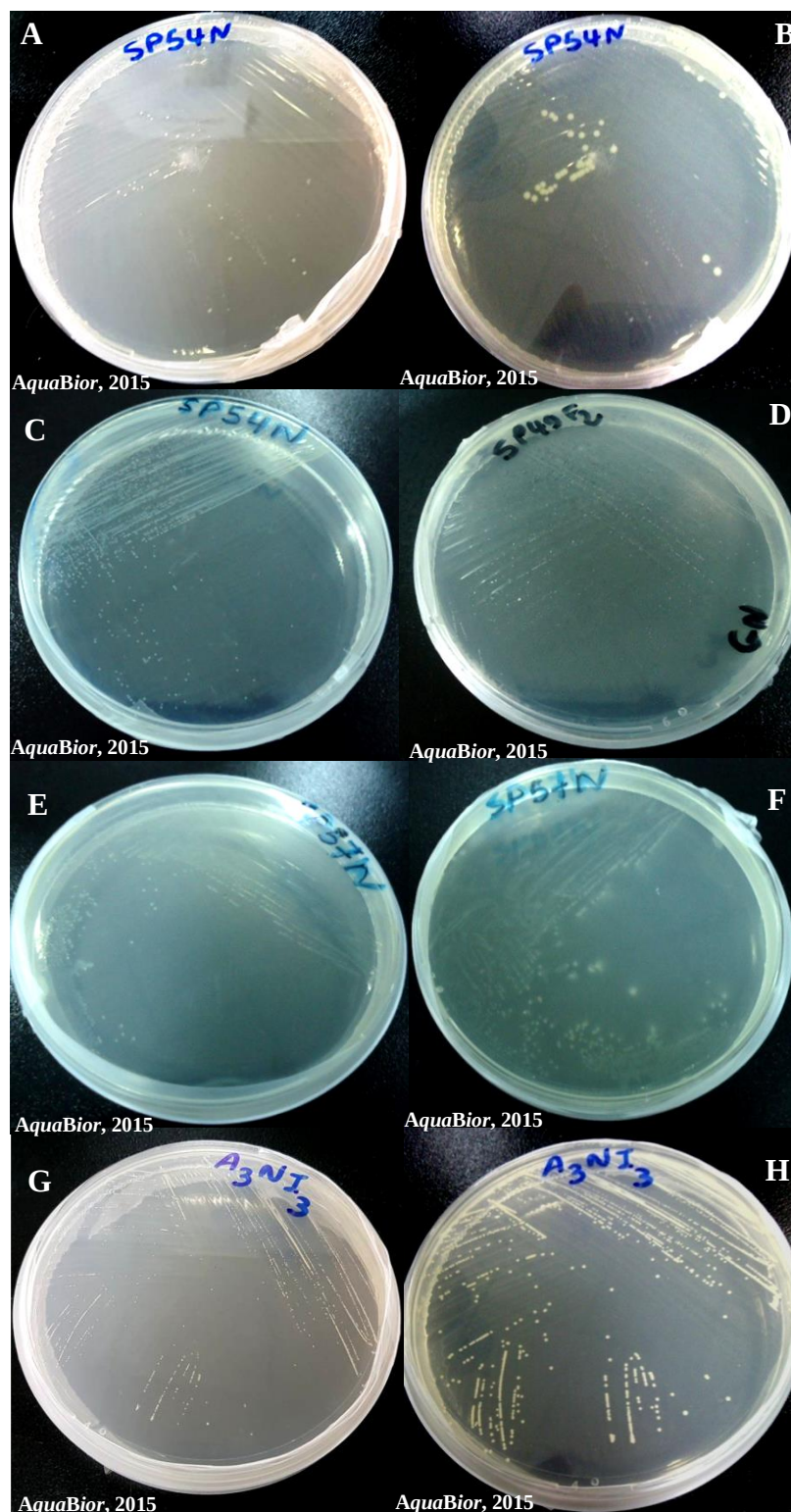


Figure 43 : Aspects de croissance des quatre souches hydrocarbonoclastes sélectionnées sur milieu GN. **(A, C)** : Aspect de croissance de la souche SP54N après 24 h d'incubation ; **(B)** : Aspect de croissance de la souche SP54N après 48 h d'incubation ; **(D)** : Aspect de croissance de la souche SP49F2 après 24 h d'incubation ; **(E)** : Aspect de croissance de la souche SP57N après 24 h d'incubation ; **(F)** : Aspect de croissance de la souche SP57N après 48 h d'incubation ; **(G)** : Aspect de croissance de la souche A3NI3 après 24 h d'incubation ; **(H)** : Aspect de croissance de la souche A3NI3 après 48 h d'incubation.

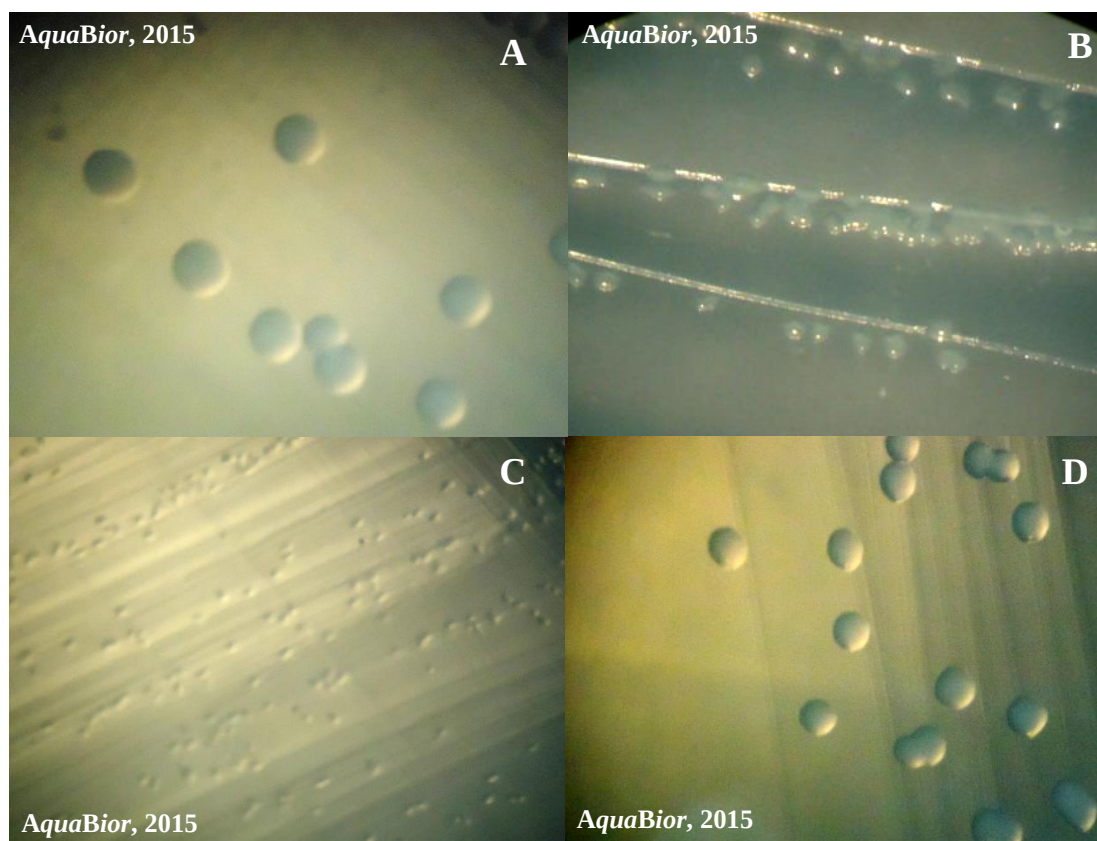


Figure 44 : Observation macroscopique des colonies quatre souches bactériennes hydrocarbonoclastes sélectionnées sous loupe binoculaire (Grossissement X 20) après 24 h d'incubation on milieu GN. **(A)** : La souche SP54N ; **(B)** : La souche SP57N ; **(C)** : La souche SP49F2 ; **(D)** : La souche A3NI3.

D'autre part, La coloration de Gram des différentes souches hydrocarbonoclastes sélectionnées nous a permis d'observer deux types de Gram différents, ainsi que la forme des cellules bactériennes, et leurs type d'association (Fig. 45). La présence d'une forme unique pour chaque souche confirme de plus la pureté des cultures (Fig. 45).

Les souches SP54N, SP57N et SP49F2 sont à Gram-, tandis que la souche A3NI3 est à Gram+. Pour toutes les souches, les cellules sont isolées, associées en paires, ou en amas.

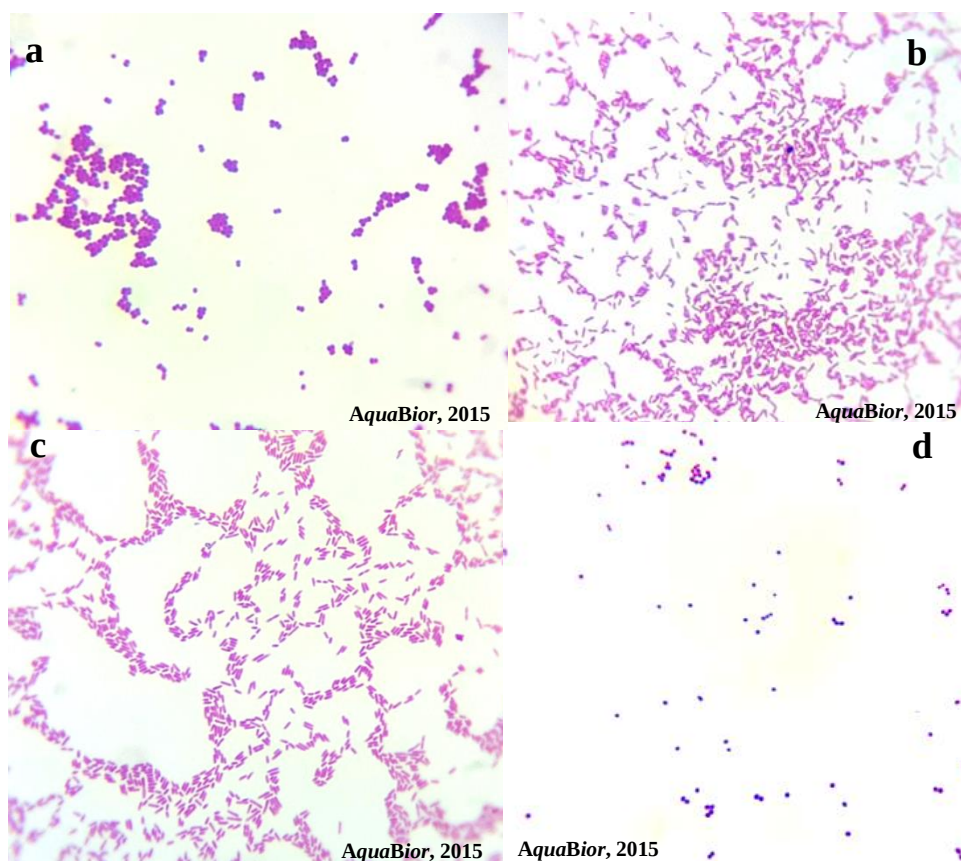


Figure 45 : Coloration de Gram des quatre souches hydrocarbonoclastes sélectionnées observées au microscope optique (G 10 x 100) ; **(a)** : La souche SP49F2 ; **(b)** : La souche SP54N ; **(c)** : La souche SP57N ; **(d)** : La souche A3NI3.

5.2. Caractérisation biochimique des isolats

L'identification a pu être réalisée à l'échelle du genre par l'analyse phénotypique et, morphologique, de par la forme et la couleur des colonies (Fig. 43 et 44), et celle des cellules, après coloration de Gram (Fig. 45). Cela a été mieux confirmé par les tests biochimiques catalase, oxydase, dégradation de sucres (glucose, saccharose et lactose), et la production de gaz et d' H_2S par la croissances sur milieu TSI, ainsi que la croissance de ces bactéries sur milieux Chapman, SS, BHIB, mannitol, vf (types respiratoire), citrate de Simmons, Shuber, BCPL, King A et King B, en plus de leur caractère hydrocarbonoclaste. Les résultats de ces tests sont regroupés dans le tableau 10. En effet, les quatre bactéries hydrocarbonoclastes sélectionnés appartiennent aux Gammaprotéobactéries (SP57N, SP54N et SP49F2), et aux Firmicutes (A3NI3). Ainsi, les souches SP57N, SP54N, SP49F2 et A3NI3 sont affiliées selon Bergey (1984) aux genres *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* et *Staphylococcus* respectivement.

Tableau 10 : Résultats des caractères phénotypiques et biochimiques des quatre souches hydrocarbonoclastes sélectionnées.

Souches		SP57N	SP54N	A3NI3	SP49F2
Tests					
Forme des colonies		Circulaire Contour irrégulier convexe	Circulaire Contour régulier convexe	Circulaire Contour régulier Plate	Circulaire Contour irrégulier convexe
Taille des colonies (après 24 h sur GN)		1,5-2,5 mm	1-2 mm	<1 mm	<0,5 mm
Couleur des colonies		Beige-verdâtre Translucide	Translucide	Blanchâtre Opaque	Blanchâtre Translucide
Surface des colonies		Lisse-Brillante	Lisse-Brillante	Sèche	Lisse-Brillante
Forme cellulaire		Bacilles (Fig. 45)	Bacilles (Fig. 45)	Cocci (Fig. 45)	Coccobacilles (Fig. 45)
Gram		-	-	+	-
Oxydase		-	-	-	-
Catalase		-	+	+	+
Type respiratoire		Aérobie stricte	Aérobie stricte	Microaérophyle	Aérobie stricte
Mobilité		Mobile	Mobile	Immobile	mobile
Saccharose		-	-	+	-
Lactose		-	-	-	-
Glucose		-	-	+	-
H₂S		-	-	-	-
Mannitol		-	-	+ (Fig. 46)	- (Fig. 46)
Gaz en TSI		-	-	-	-
Citrate		+ (Fig. 48)	-	-	-
Indole		-	-	-	-
Croissance sur milieu	TSI	K/K	K/K	A/K	K/K
	King A	+ (Fig. 48)	+ (Fig. 46)	ND	ND
	King B	+ (Fig. 48)	+ (Fig. 48)	ND	ND
	Chapman	-	-	+ (Fig. 46)	+ (Fig. 47)
	BCPL	-	-	-	-
	Schubert	-	-	-	-
	BHIB	+	+	+	+
	SS	+ (Fig. 48)	+ (Fig. 46)	-	-

(+) : Présence du caractère étudié ; (-) : Absence du caractère étudié ; ND : Non déterminé.

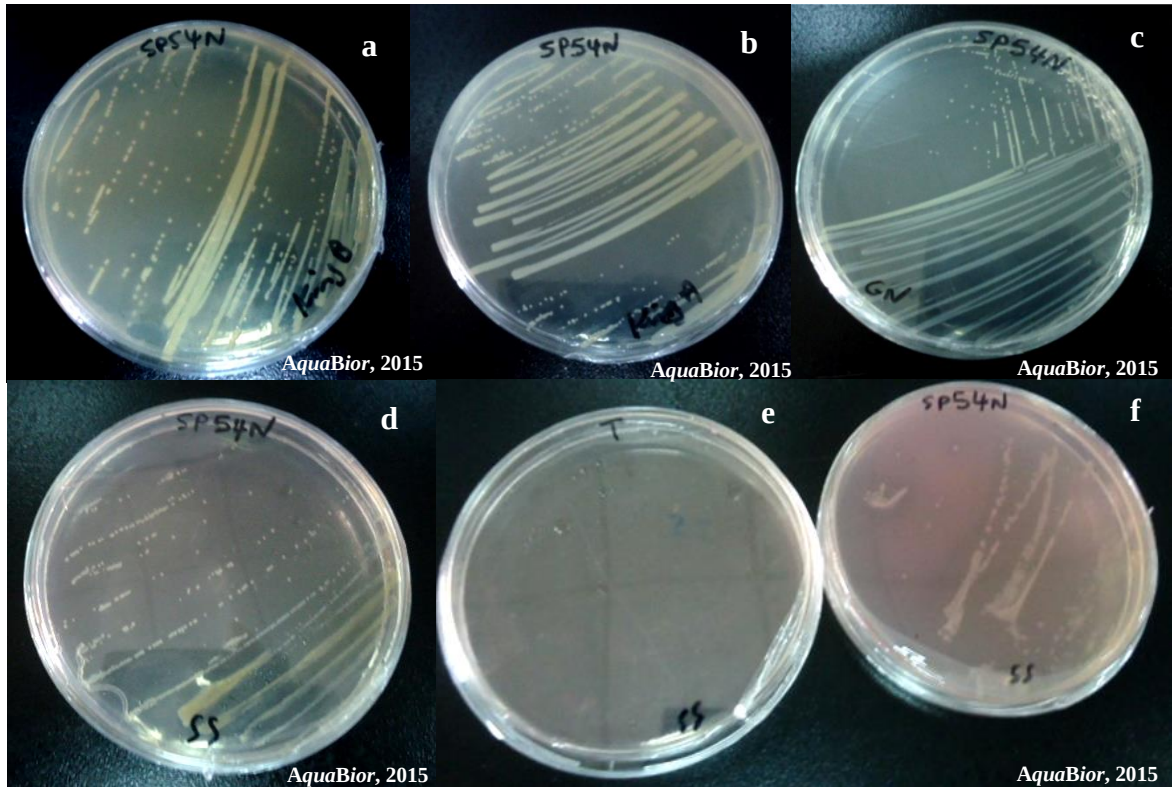


Figure 46 : Résultats de croissance de la souche SP54N sur différents milieux de culture après 24h d'incubation à 25°C ; **(a) :** Aspect de croissance sur milieu King A ; **(b) :** Aspect de croissance sur milieu King B ; **(c) :** Aspect de croissance sur milieu gélose nutritive (GN) ; **(d) et (f) :** Croissance sur milieu SS sous forme de colonies de couleur uniforme beige ; **(e) :** milieu SS sans culture.



Figure 47 : Aspect de croissance des souches SP49F2, A3NI3 sur milieu Chapman après 24 h d'incubation à 25°C ; **(a, b) :** La souche SP49F2 ; **(d) :** Croissance de la souche A3NI3 sous forme de colonies jaunâtres de couleur uniforme (avec virage au jaune du milieu) ; **(c) :** Milieu Chapman sans culture témoin (T).

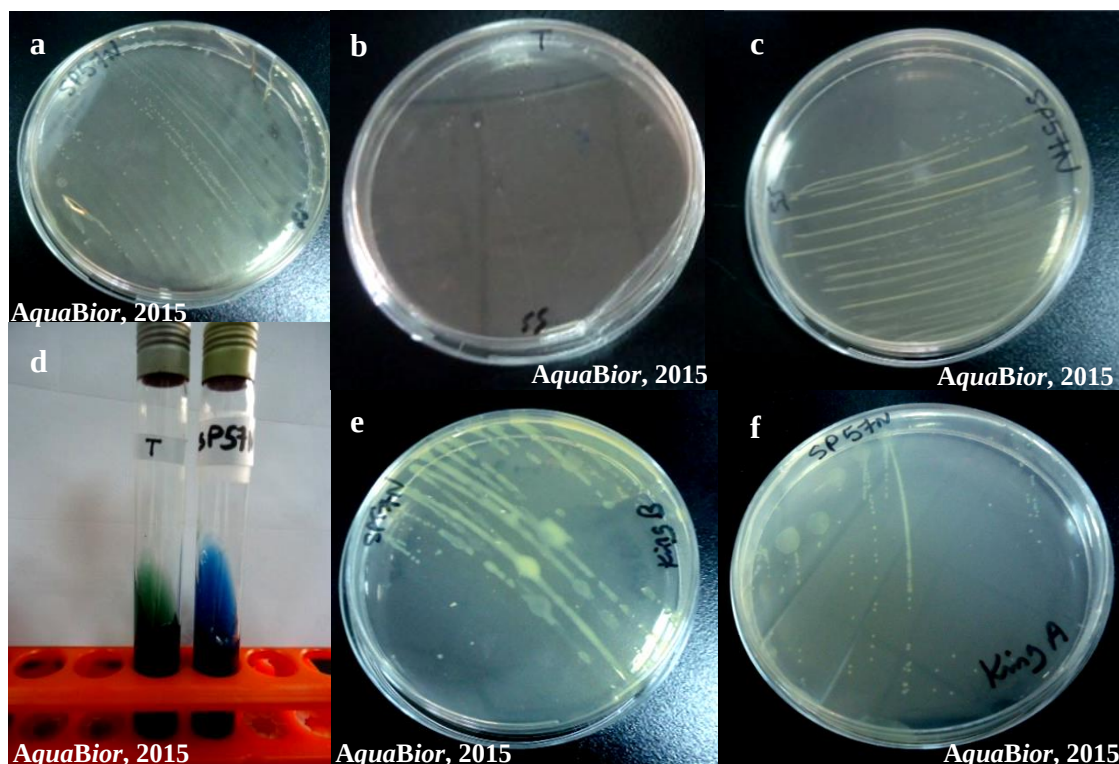


Figure 48 : Résultats de croissance de la souche SP57N sur différents milieux de culture. **(a)** et **(c)** : Croissance sur le milieu SS sous forme de colonies de couleur beige uniforme ; **(b)** : Milieu SS sans culture ; **(d)** : Utilisation du citrate par la souche SP57N (Virage de la couleur du vert vers le bleu) en milieu citrate de Simmons ; **(e)** : Croissance sur le milieu King B sous forme de colonies jaunâtres ; **(f)** : Croissance sur le milieu King A sous forme de colonies beiges ; **(T)** : Témoin (milieu sans culture).

Ensuite, ces souches hydrocarbonoclastes criblées sont identifiées par la biologie moléculaire, par le séquençage de l'ADNr 16S, et l'analyse phylogénétique, ce qui a permis de différencier les espèces.

5.3. Identification moléculaire des souches hydrocarbonoclastes sélectionnées par amplification et séquençage d'ADNr 16S

L'ADN génomique est extrait directement des souches hydrocarbonoclastes sélectionnées, en utilisant le Kit EasyPure® Bacteria Genomic DNA (TransBionovo Co., Ltd., Chine). L'ADN 16S a ensuite été amplifié par PCR grâce aux amorces universelles du domaine Bacteria benF27 : (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), benR1492 : (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), synthétisée par Sigma (Allemagne) (Fig. 49) puis séquencé.

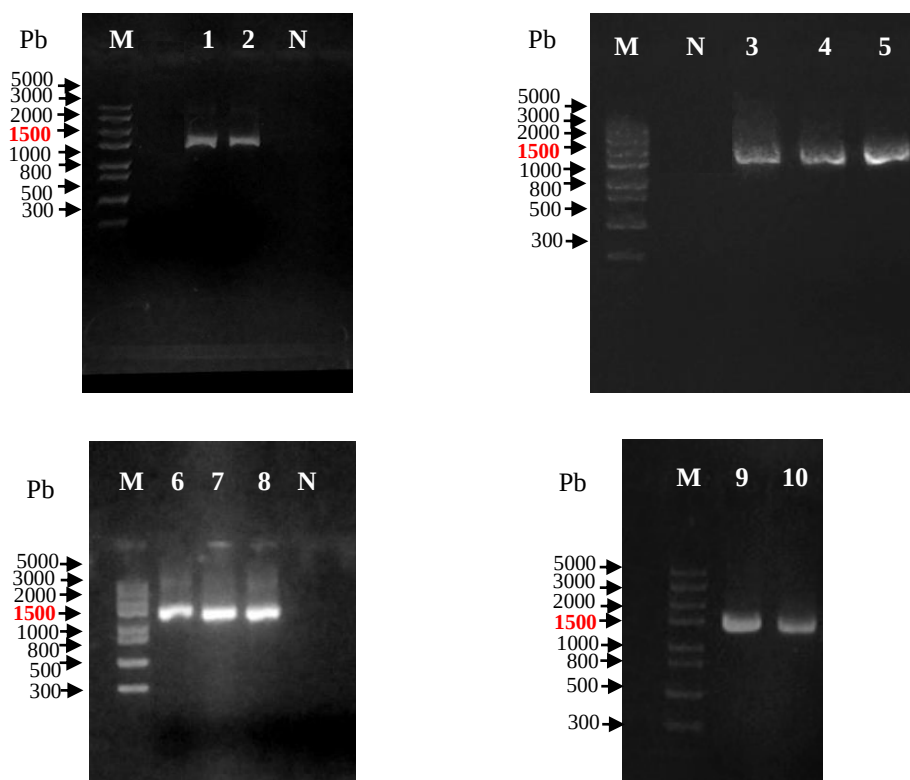


Figure 49 : Electrophorèses des produits de PCR du gène ribosomal 16S des quatre souches bactériennes hydrocarbonoclastes sélectionnées sur 1,5 % d’agarose ; **(M)** : Marqueur de taille Trans5K DNA Marker, **(1, 2)** : La souche SP54N ; **(3, 4, 5)** : La souche SP57N ; **(6, 7, 8)** : La souche S49F2 ; **(9, 10)** : La souche A3NI3 ; **(N)** : contrôle négatif (sans ADN).

L’ADNr 16S des quatre souches hydrocarbonoclastes sélectionnées sont ensuite séquencés partiellement par les laboratoires Sanger sequencing services (GENEWIZ, Inc., South Plainfield, NJ, USA). Les séquences obtenue sont soumises à une analyse de type BLASTn via la base de données National Biotechnology Information Centre (NCBI) (www.ncbi.nih.gov/blast) en utilisant les séquences publiées, et sur EzBiocloud dans EzTaxon en utilisant des séquences de souches de références (Yoon et *al.* 2017). Les séquences obtenues sont alignées par le programme Clustal W (Russell, 2014), et les arbres phylogénétiques sont construits en utilisant le programme MEGA (version 7.0) (Kumar et *al.*, 2016). Les arbres phylogénétiques sont réalisés par la méthode de Neighbor-Joining (NJ), générés avec 1000 répétition (bootstrap = 1000) (Felsenstein, 1985).

Les arbres phylogénétiques des séquences obtenues des souches bactériennes hydrocarbonoclastes sélectionnées sont représentés par les figures 50 ; 51 ; 52 (a, b) ; 53 (a,

b) ; 54 et 55. Ces figures illustrent l'appartenance et la phylogénie des souches sélectionnées. Le pourcentage (%) au niveau des noeuds représente les valeurs de probabilités de la robustesse de la similitude. Ainsi, selon cette analyse, ces souches sont affiliées aux espèces suivantes : *Pseudomonas mendocina* (SP57N) ; *Stenotrophomonas maltophilia* (SP54N) ; *Acinetobacter johnsonii* (SP49F2) ; et *Staphylococcus cohnii* (A3NI3).

Les séquences partielles déterminées de l'ADNr 16S des quatre souches hydrocarbonoclastes sélectionnées dans cette étude sont déposées sur GenBank database du National Center for Biotechnology Information (NCBI), et désignées sous les numéros d'Accession de **MG738221**, **MG738224**, **MH392720** et **MK825733** pour les souches **SP57N**, **A3NI3**, **SP49F2** et **SP54N** respectivement.

Concernant la souche SP54N, environ 1500 pb du gène d'ADNr 16S sont amplifiés par PCR (Fig. 49), puis séquencé partiellement. La séquence déterminée est de 932 pb (ID GenBank: MG738221). Le calcul du taux de similitude de cette séquence avec les séquences apparentées en utilisant le programme BLASTn sur NCBI data base révèle un taux élevé de 99,57 % de similarité, sur la séquence entière avec les deux souches *Stenotrophomonas maltophilia* ISMMS2 (CP011305.1) et la souche *Stenotrophomonas maltophilia* ISMMS2R (CP011306.1) respectivement, dont le génome est séquencé entièrement. Ce même pourcentage de ressemblance (99,57 %) est enregistré avec les deux souches *Stenotrophomonas maltophilia* PSM-5 (GQ267816.1) et *Stenotrophomonas maltophilia* PSM-2 (FJ906801.1), alors qu'un pourcentage de similitude de 99,36 % est obtenu avec la souche *Stenotrophomonas maltophilia* CanL-56 (KT580582.1). En outre, le calcul du taux de similitude de cette séquence avec les séquences apparentées par le programme BLASTn sur base de données EzBioCloud révèlent des taux de similarité de 98,90 % avec la souche *Stenotrophomonas maltophilia* MTCC 434 (JALV01000036). Subséquemment, deux arbres phylogénétiques sont construits en utilisant des séquences d'ADNr 16S similaires des deux bases données (Fig. 50 et 51). Les résultats de l'analyse phylogénétique du gène d'ADNr 16S de la souche bactérienne SP54N montrent que cette souche est apparentée aux espèces de *Stenotrophomonas maltophilia* (Fig. 50 et 51). Ainsi, la souche SP54N est identifiée comme étant *Stenotrophomonas maltophilia*.

D'autre part, l'analyse de la séquence partielle de l'ADNr 16S de la souche SP49F2, représentée par une séquence continue de 978 pb, a confirmé l'identification de l'espèce comme étant *Acinetobacter johnsonii*, avec une similarité de 100 % avec la souche *Acinetobacter johnsonii* XBB1 (CP010350.1), dont le génome est séquencé entièrement, ce

même pourcentage est observé avec la souche *Acinetobacter johnsonii* ATCC_17909 (NR_117624.1), en utilisant l'alignement BLASTn sur la base de données NCBI. Aussi, un taux de similitude de 99,90 % avec la souche *Acinetobacter johnsonii* CIP 64,6 (APON01000005) est obtenu, en utilisant l'alignement BLASTn sur la base de données EzBioCloud. Les résultats de l'analyse phylogénétique de la SP49F2 et des espèces apparentées sont illustrés par les deux arbres représentés dans la figure 52. Les arbres phylogénétiques montrent que la souche bactérienne SP49F2 est apparentée aux espèces d'*Acinetobacter johnsonii* (Fig. 52). Pour cela, la souche SP49F2 est identifiée comme étant *Acinetobacter johnsonii*.

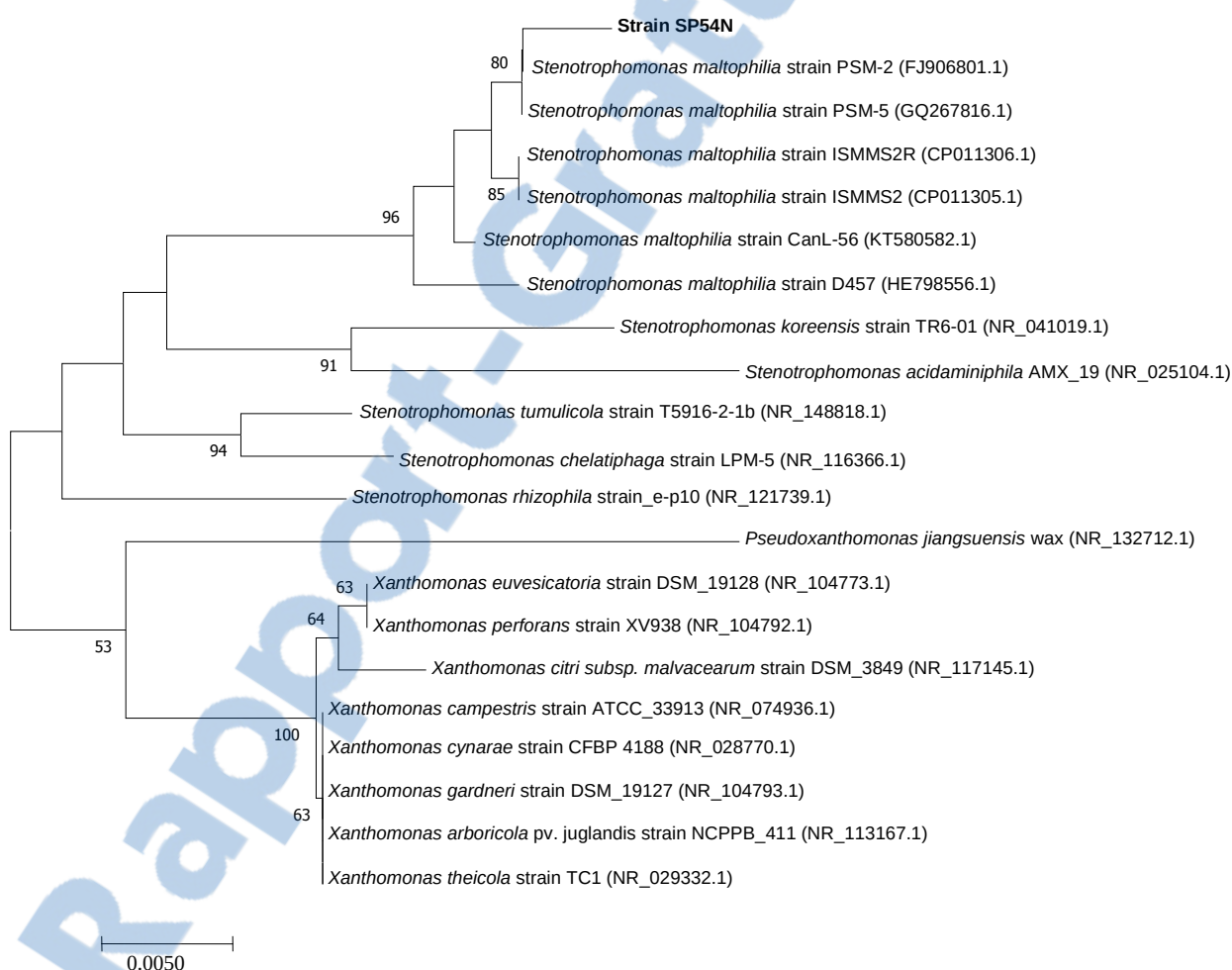


Figure 50 : Arbre phylogénétique de la séquence d'ADNr 16S de la souche SP54N et des espèces apparentées les plus proches obtenue à partir de la base de données NCBI-GenBank.

Les calculs ont été effectués selon la méthode Neighbor-Joining (bootstrap = 1000). Les numéros d'accès sur NCBI-GenBank sont indiqués entre parenthèses. La barre d'échelle représente 0,0050 de divergence des séquences.

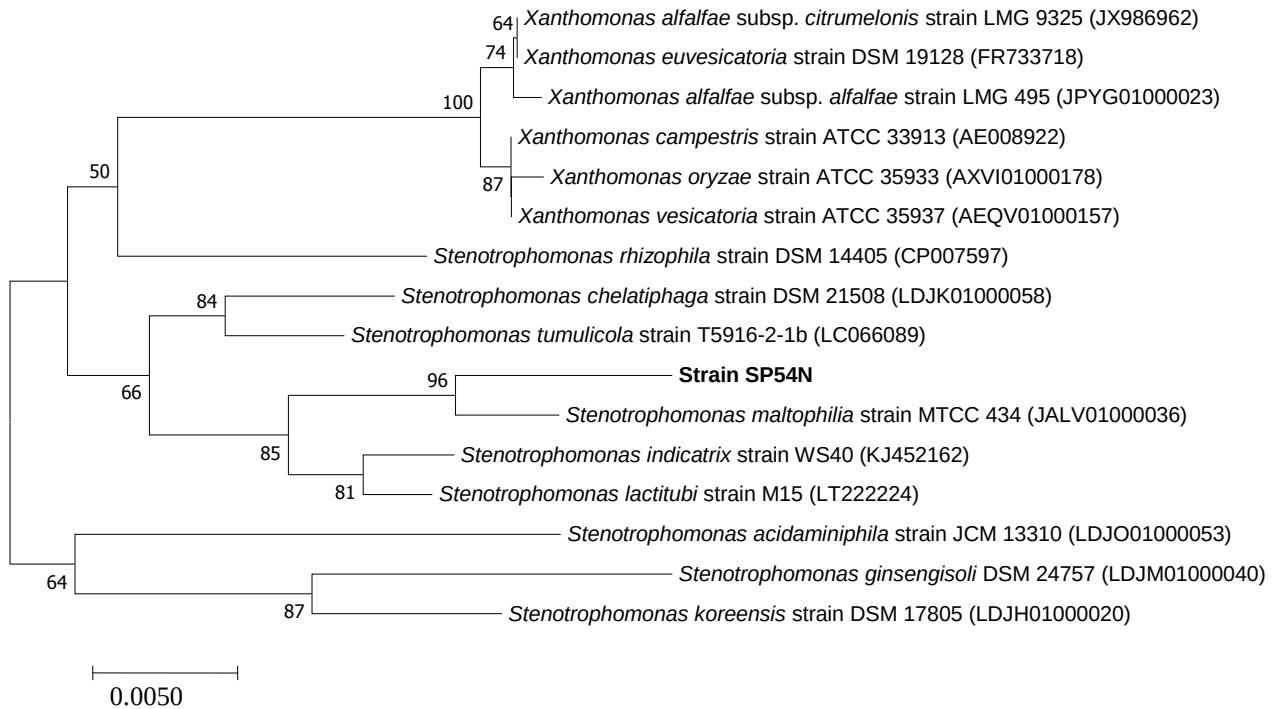


Figure 51 : Arbre phylogénétique de la séquence d'ADNr 16S de la souche SP49F2 et des espèces apparentées les plus proches obtenue à partir de la base de données EzBiocloud. Les calculs ont été effectués selon la méthode Neighbor-Joining (bootstrap = 1000). Les numéros d'accèsion sur NCBI-GenBank sont indiqués entre parenthèses. La barre d'échelle représente 0.0050 de divergence des séquences.

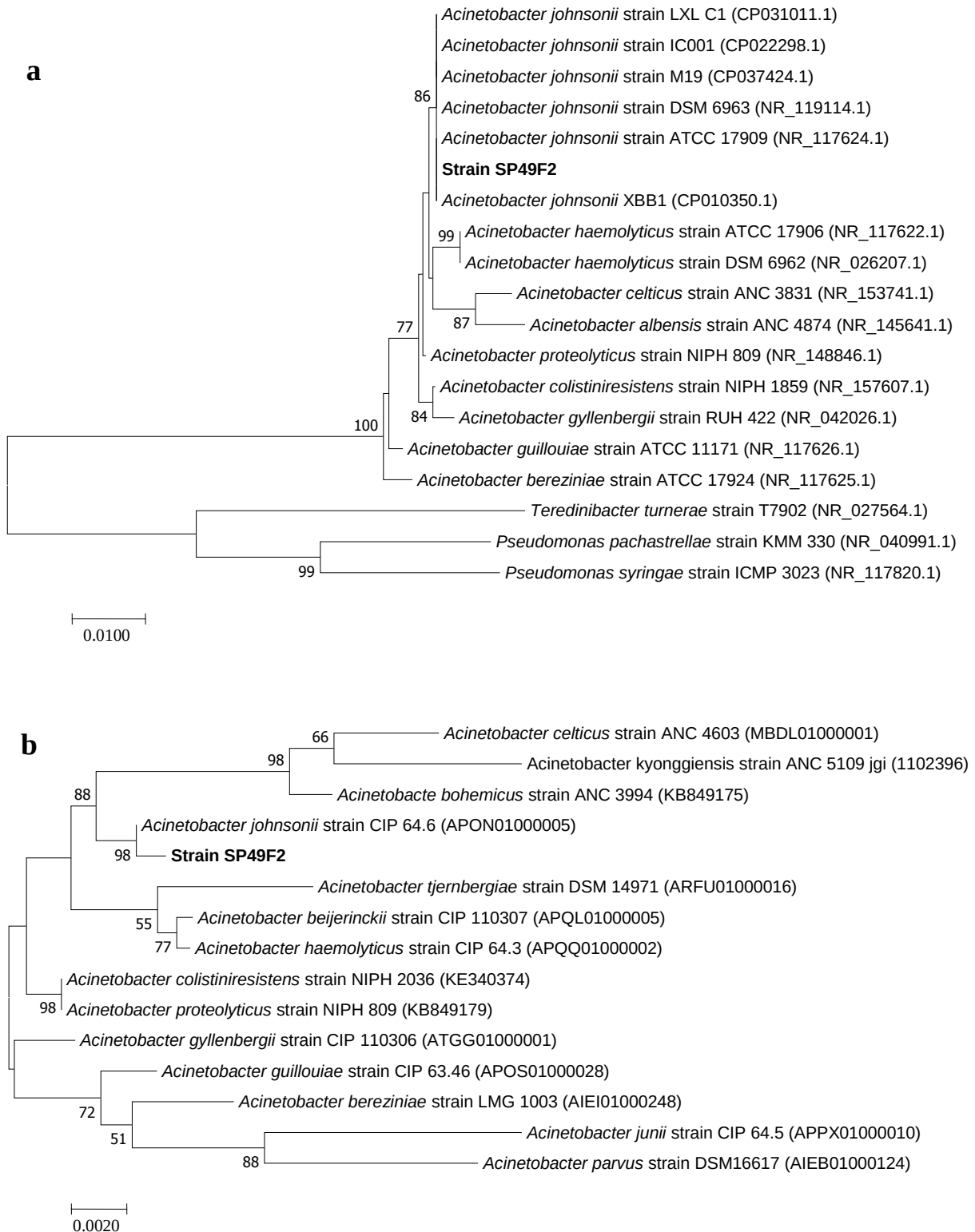


Figure 52 : Arbres phylogénétiques de la séquence d'ADNr 16S de la souche SP49F2 et des espèces apparentées les plus proches obtenue à partir ; **(a)** : de la base de données GenBank (NCBI) ; **(b)** : de la base de données EzBiocloud. Les calculs ont été effectués selon la méthode Neighbor-Joining (bootstrap = 1000). Les numéros d'accès sur NCBI-GenBank sont indiqués entre parenthèses. La barre d'échelle représente le taux de divergence des séquences.

Concernant la souche SP57N, après amplification d'environ 1 500 fragments de pb de l'ADNr 16S (Fig. 49), cet ADNr amplifié est séquencé partiellement. L'analyse de la séquence continue ainsi déterminée de 928 pb (ID GenBank : MK825733) par le programme d'alignement BLASTn, sur NCBI database, et sur EzBiocloud database, révèle l'appartenance de la souche SP57N à l'espèce *Pseudomonas mendocina*. En effet, le calcul de la similarité des séquences, sur par le programme BLASTn sur la base de données NCBI, a montré que la séquence partielle du gène de l'ADNr 16S de la souche SP57N avait un score de similarité de 98.92 % avec la souche *Pseudomonas mendocina* NK-01 (CP002620.1), dont le génome est séquencé complètement, et de 98.60% avec la souche *Pseudomonas mendocina* strain IITR46 (MF321766), et la souche *Pseudomonas mendocina* *Pseudomonas mendocina* NCIB 10541 (NR_043421.1). Alors que par l'analyse sur la base de données EzBiocloud, nous avons enregistré un taux de similarité de 97,90 % avec la souche *Pseudomonas mendocina* NBRC 14162 (BBQC01000018). Subséquemment, deux arbres phylogénétiques sont construits en utilisant des séquences d'ADNr 16S similaires des deux bases données (Fig. 53). Les résultats de l'analyse phylogénétique montrent que la souche bactérienne SP57N est apparentée aux espèces d' *Pseudomonas mendocina* (Fig. 53). Ainsi, la souche SP57N est identifiée comme étant *Pseudomonas mendocina*.

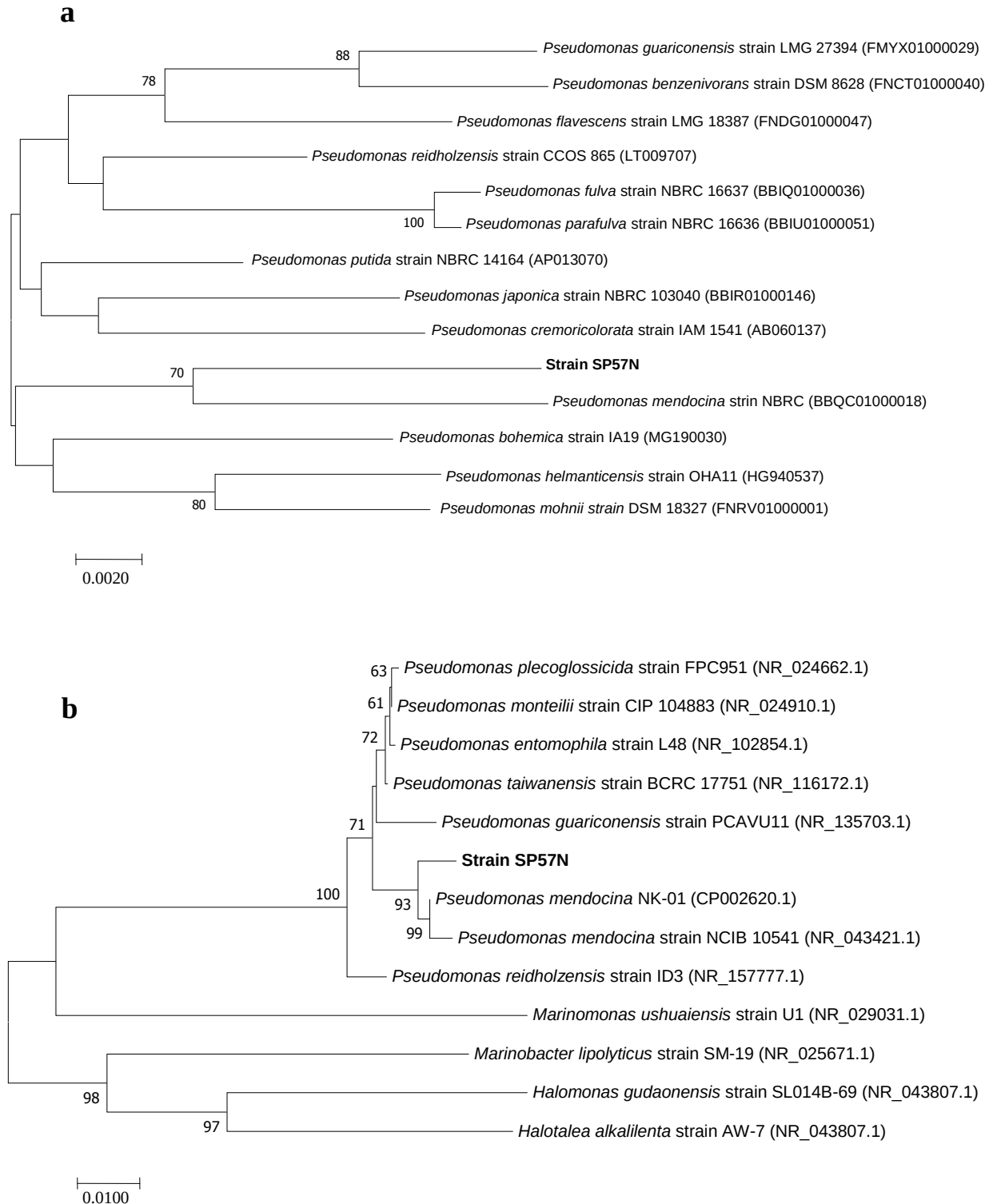


Figure 53 : Arbres phylogénétiques de la séquence d'ADNr 16S de la souche SP57N et des espèces apparentées les plus proches obtenue à partir ; **(a)** : de la base de données EzBiocloud ; **(b)** : de la base de données NCBI. Les calculs ont été effectués selon la méthode Neighbor-Joining (bootstrap = 1000). Les numéros d'accèsion sur NCBI-GenBank sont indiqués entre parenthèses.

La barre d'échelle représente la divergence des séquences.

Aussi, la souche A3NI3, l'ADNr est séquencé partiellement (484 pb). Cette séquence continue est déposée sur GenBank sous le numéro d'identification MH392720. Le calcul de similarité de la séquence en utilisant l'alignement de BLASTn par la base de données NCBI a révélé que la souche sélectionnée A3NI3 appartient au genre *Staphylococcus*, avec une similarité de séquence élevée, de 99,38 % avec *Staphylococcus cohnii* FDAARGOS 334 (CP027422.1), et *Staphylococcus cohnii* SNUDS-2 (CP019597.1) respectivement (dont le génome est séquencé entièrement), et en comparant avec des séquences référence sur EzBioCloud, elle présente 99,35% de similarité avec *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus* ATCC_49330 (AB009936) et 99,14 % de similarité avec *Staphylococcus cohnii* subsp. *cohnii* ATCC_29974 (D83361). Deux arbres phylogénétiques ont ensuite été générés en utilisant des séquences d'ADNr 16S similaires (Fig. 54 et 55), sur la base des deux programmes d'alignement (NCBI et EzBioCloud). Les résultats de cette analyse phylogénétique montrent que la souche A3NI3 apparentées aux espèces de *Staphylococcus cohnii*, et pour cela elle est identifiée comme *Staphylococcus cohnii*.

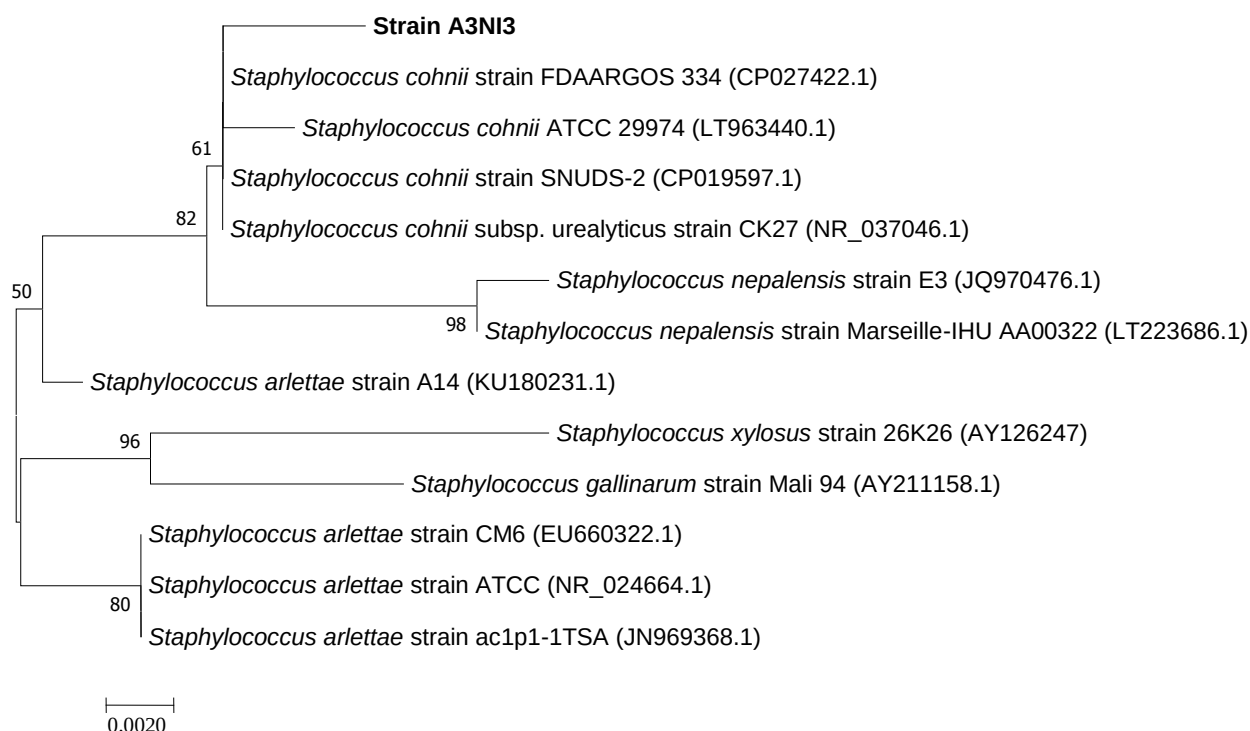


Figure 54 : Arbre phylogénétique de la séquence d'ADNr 16S de la souche A3NI3 et des espèces apparentées les plus proches obtenue à partir de la base de données GenBank (NCBI).

Les calculs ont été effectués selon la méthode Neighbor-Joining (bootstrap = 1000).

Les numéros d'accès sur NCBI-GenBank sont indiqués entre parenthèses. La barre d'échelle représente 0,0020 divergence des séquences.

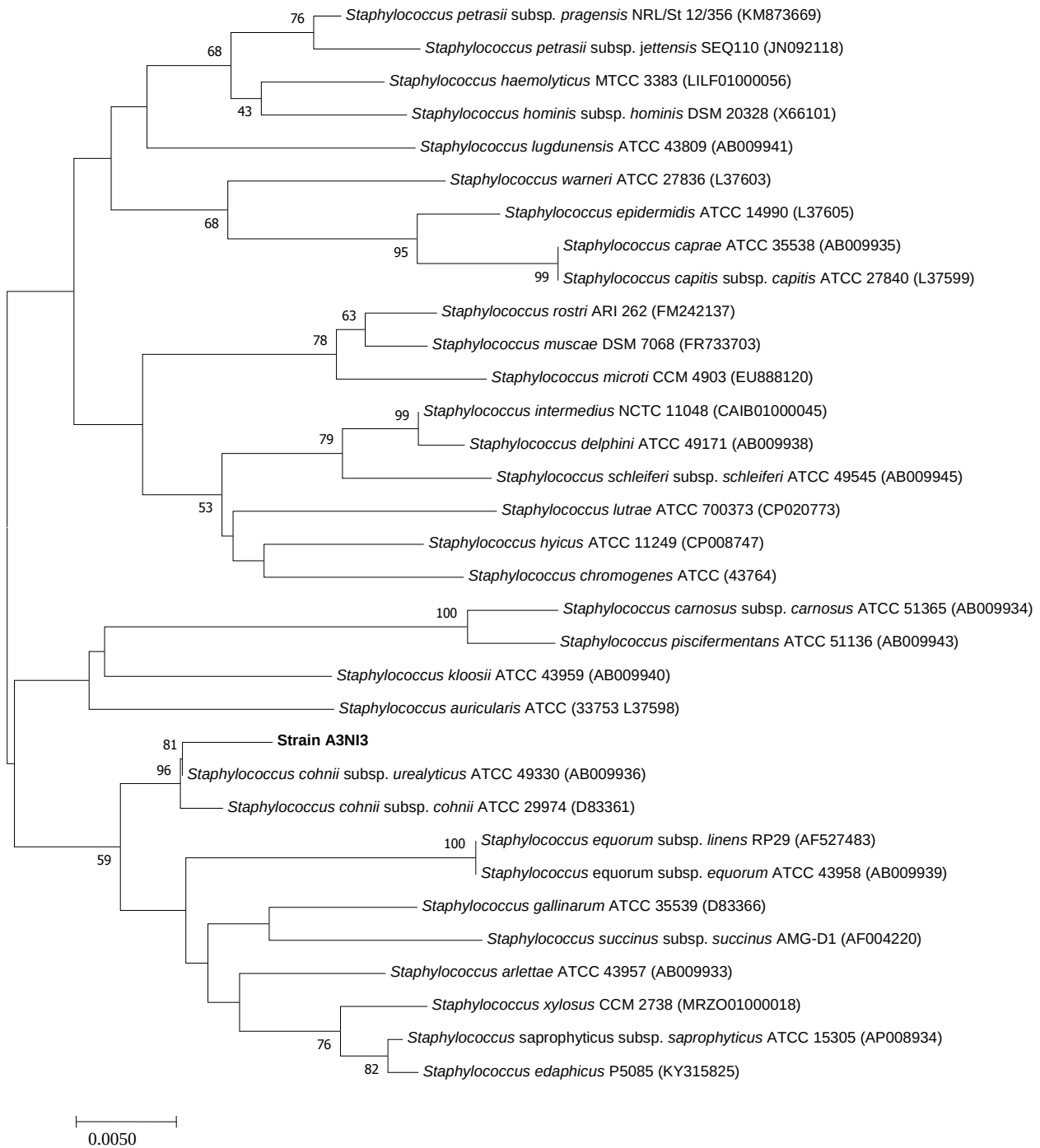


Figure 55 : Arbre phylogénétique de la séquence d'ADNr 16S de la souche A3NI3 et des séquences apparentées les plus proches obtenue à partir de la base de données EzBiocloud espèces. Les calculs ont été effectués selon la méthode Neighbor-Joining (bootstrap = 1000). Les numéros d'accès sur NCBI-GenBank sont indiqués entre parenthèses. La barre d'échelle représente 0,0050 divergence des séquences.

La phylogénie moléculaire a pour objectif de retrouver les liens de parenté entre des séquences de nucléotides. Ces relations de parenté sont généralement représentés sous forme d'arbre, composés de branches et de nœuds, les branches connectant les nœuds eux-mêmes définis comme des points au niveau desquels deux branches ou plus divergent. Les nœuds terminaux (également dénommés « Operational Taxonomic Units » ou OTU) correspondent aux séquences à partir desquelles l'arbre a été construit. Un nœud interne et l'ensemble des OTU qui en dérivent forment un groupe monophylétique ou clade (Calvayrac 2011).

En se basant sur les résultats de l'analyse morphologique (macroscopique et microscopique), biochimique, et moléculaire effectué par le séquençage de l'ADNr 16S et l'analyse phylogénétique, les souches bactériennes hydrocarbonoclastes sélectionnées dans la présente étude, indigènes du port d'Oran sont identifiées comme indiqué dans le tableau 11.

Tableau 11 : Classification des bactéries hydrocarbonoclastes sélectionnées.

Domaine	Bacteria			
Phylum	Proteobacteria			Firmicutes
Classe	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteria	Bacilli
Ordre	Pseudomonadales	Xanthomonadales	Pseudomonadales	Bacillales
Famille	Pseudomonadaceae	Xanthomonadaceae	Moraxellaceae	Staphylococcaceae
Genre	Pseudomonas	Stenotrophomona	Acinetobacter	Staphylococcus
Espèce	<i>P. mendocina</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>A. johnsonii</i>	<i>S. cohnii</i>
Souche	SP57N	SP54N	SP49F2	A3NI3

Les souches SP54N, SP57N, SP49F2 et A3NI3 sont des bactéries dégradantes des hydrocarbures, appartenant aux espèces *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas mendocina*, *Acinetobacter johnsonii* et *Staphylococcus cohnii* respectivement, isolées pour la première fois de l'eau de mer et des sédiments marins du port d'Oran-Algérie. Elles présentent un potentiel important comme souches bioremédiatrices de milieux marins pollués aux HAPs.

Plusieurs études ont reporté que des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* avaient la capacité de dégradation les hydrocarbures (Lee et al., 2002 ; Tiwari et al., 2016 ; Mukherjee et Roy, 2016 ; Venkidusamy et Megharaj, 2016 ; Tripathi et al., 2019).

D'autres études ont montré que des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* avaient la capacité de dégrader des polluants organiques, tels que les pesticides (Kumar et al., 2018), les

insecticides (Wang et al., 2019), la chitine (Kobayashi et al., 2002), les hormones stéroïdiennes (Li et al., 2012) et la Kératine (Fang et al., 2013). Des souches de *Stenotrophomonas maltophilia* étaient capables d'utiliser le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie (Kumari et al., 2019). D'autres souches de *Stenotrophomonas maltophilia* pouvaient également dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), tels que le naphthalène, le fluorène et l'anthracène (Arulazhagan et al., 2010), le phénanthrène (Arulazhagan et al., 2010 ; Gao et al., 2013 ; Alfonso-Gordillo et al., 2016 ; Jamal et Pugazhendy, 2018), le benzo[a]pyrène (Shuona et al., 2017). De plus, Urszula et al. (2009) ont montré que la souche *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 était capable de dégrader de fortes concentrations de composés aromatiques, et pouvait utiliser le phénol comme seule source de carbone, ainsi que différents types de composés aromatiques, tels que l'acide protocatéchique (3,4-DBH), l'acide 4-hydroxybenzoïque (4-HB), l'acide benzoïque, l'acide vanillique et le catéchol (Wojcieszynska et al., 2012).

Mahjoubi et al. (2013) ont montré que *Stenotrophomonas maltophilia*, isolée des sédiments et de l'eau de mer contaminés par le pétrole, dans le port de la raffinerie de la côte de Bizerte (au nord de la Tunisie), était la souche hydrocarbonoclaste la plus active isolée, avec une production importante de biosurfactants et une forte émulsification du pétrole brut (allant jusqu'à 46%). Ces auteurs suggèrent par leurs résultats que *Stenotrophomonas maltophilia* pourrait être un candidat potentiel pour la bioremédiation et pourrait être utile pour les applications biotechnologiques.

La production de biosurfactants par l'espèce *Stenotrophomonas maltophilia* est rapportée également par Tripathi et al. (2019). En outre, d'autres chercheurs ont démontré que cette espèce a la capacité d'utiliser une large gamme de substrats aromatiques comme unique source de carbone et d'énergie (Kumari et al., 2018), et peut dégrader en 48 heures 80 % de phénanthrène, alors que *Pseudomonas* dégrade 70% le phénanthrène en 40 jours (Wojcieszynska et al., 2011 ; Kahlon, 2016). De plus, *Stenotrophomonas maltophilia* est un moyen très puissant et utile pour le traitement biologique de la décontamination des sols et des eaux usées (Mahjoubi et al., 2013).

Par ailleurs, de nombreuses souches d'*Acinetobacter* sp. ont été démontrées possédant la capacité de dégrader les hydrocarbures (Lee et al., 2012 ; Fang et al., 2017 ; Tiralerdpnich et al., 2018). Aussi, cette espèce possède la capacité de dépolluer des environnements contaminés par des hydrocarbures (Obafemi et al., 2018). Des études récentes ont démontré la

production de biosurfactant par *Acinetobacter* sp. avec une application potentielle dans la bioremédiation d'environnements contaminés par les hydrocarbures (Mahjoubi et al., 2013; Jadeja et al., 2018). D'autres études ont montré l'aptitude des souches d'*Acinetobacter* sp. à biore médier des environnements pollués par divers composés, tels que des composés pharmaceutiques, présentant des polluants ubiquitaires, affectant les organismes aquatiques et la santé humaine, notamment le sulfaméthoxazole (SMX), la sulfadiazine (SD) et la sulfaméthazine (SMT), le triméthoprim (THM), le triclosan (TCS), le diclofénac (DFC) et la carbamazépine (CBZ) (Wang et al., 2018). En outre, *Acinetobacter* sp. était capable de dégrader l'herbicide utilisé en agriculture, notamment le Fénoxaprop-P-éthyle (FE) (Dong et al., 2015) ; et le di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP), l'un des esters de l'acide phtalique (PAEs), représentant un groupe de composés réfractaires et dangereux mélangés aux plastiques (Wang et al., 2017). Aussi, Panda et Sarkar (2011) ; et Bhattacharya et Gupta (2013) ont démontré le potentiel et l'application d'*Acinetobacter* sp. dans la biorestauration et la détoxification des eaux usées industrielles riches en métaux lourds et dans les effluents de tannerie tels que le Cr (VI).

De plus, les souches d'*Acinetobacter* sp. étaient capables d'utiliser le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie (Hanson et al., 1997; Huang et al., 2004; Obafemi et al., 2018), et ont été décrites comme le genre le plus dominant dans les sédiments marins (Mahjoubi et al., 2013).

Des souches d'*Acinetobacter johnsonii* étaient capables de biodégradation des pesticide-organophosphates, tel que le malathion (O, O-diméthyl-S- [1,2-di (éthoxyl-carbonyl) éthyle] phosphoro-dithioate), utilisé dans l'agriculture (Xie et al., 2009). D'autres souches d'*Acinetobacter johnsonii* avaient la capacité d'élimination des impuretés inorganiques des huiles usées et des eaux de lavage (Jian et al., 2012), ainsi que la biodégradation de fongicides, tel que le Cyprodinil (4-cyclopropyl-6-méthyl-N-phénylpyrimidin-2-amine), utilisé dans le monde entier en agriculture en tant qu'anilinopyrimidine à large spectre, affectant l'écosystème et provoquant une toxicité chronique ainsi que la contamination des eaux souterraines (Chen et al., 2018; Wang et al., 2018).

En outre, *Acinetobacter johnsonii* pouvait biodégrader le diesel (Lee et al., 2012), et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), tels que le pyrène, le naphthalène, le phénanthrène et l'anthracène, et possédait l'enzyme catéchol-2,3-dioxygénase présentant une plus grande capacité de dégradation les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Jiang et al.

2018; Wang et al., 2019). Selon Xue et al. (2018), des bactéries hydrocarbonoclastes isolées des sédiments marins sont identifiées comme *Acinetobacter johnsonii*.

Par ailleurs, plusieurs études ont montré la capacité des espèces de *Pseudomonas* sp. de dégrader des hydrocarbures (Nwinyi et al., 2016 ; Chebbi et al., 2017; Nogales et al., 2017; Ramadass et al., 2018). Aussi, le genre *Pseudomonas* est parmi les espèces qui montrent une grande efficacité à dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Lamichhane et al., 2017 ; Sun et al., 2019). Ces microorganismes ont la propriété de coloniser les environnements contaminés par des hydrocarbures (Liu Q. et al., 2019).

Aussi, des nombreuses souches de *Pseudomonas mendocina* ont le pouvoir de dégrader différents polluants environnementaux (Zhang et al., 2017; Mudhoo et al., 2018). En effet *Pseudomonas mendocina* NSYSU a pu minéraliser une concentration élevée de pentachlorophenol (PCP) (150 mg/l) selon Kao et al. (2005), et la souche de *Pseudomonas mendocina* ZAM1 a dégradé plus de 64,5% d'endosulfan après douze jours d'incubation d'après Mir et al. (2017).

L'espèce *Pseudomonas mendocina* peut croître dans le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie (Kumari et al., 2018). Ainsi, cette espèce bactérienne a la capacité de dégrader efficacement les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (Nogales et al., 2017). En effet, selon Barman et al. (2017), près de 98,8 % et 98,6 % de la dégradation de l'acénaphthène et du naphthalène respectivement ont été enregistrés par *Pseudomonas mendocina* dans les conditions optimales de croissance. La dégradation du naphthalène par l'espèce *Pseudomonas mendocina* isolée de l'eau de mer a été rapportée également par Mangwani et al. (2014). Cette espèce a été rapportée ayant la capacité de dégrader le phénanthrène (Tian et al., 2002). L'espèce *Pseudomonas mendocina* est rapportée possédant le gène codant pour l'enzyme catéchol dioxygénase, l'enzyme clé de la dégradation des HAPs (Heinaru et al., 2000 ; Kahlon, 2016 ; Nogales et al., 2017).

Aussi, d'autres études ont démontré la production de biosurfactant par la souche *Pseudomonas mendocina* ayant potentiel d'application pour la bioremédiation des hydrocarbures (Kumari et al., 2018 ; Tripathi et al., 2019).

Par conséquent, l'espèce *Pseudomonas mendocina* est un moyen puissant et intéressant pour la bioremédiation de l'environnement contaminé par les HAPs, et pour des applications biotechnologiques.

D'autre part, de nombreuses souches de *Staphylococcus* sp. ont été confirmées possédant l'aptitude de la dégradation des hydrocarbures (Moussavi et Ghorbanian 2015 ; Mnif et al., 2017; Tiralerdpanich et al., 2018). Ainsi, cette espèce a la capacité de décontaminer des environnements contaminés par des hydrocarbures (Chaerun et al., 2004). Eddouaouda et al. (2011) ont démontré la production de biosurfactant par la souche *Staphylococcus* sp. 1E, ayant le potentiel d'application pour la bioremédiation des hydrocarbures.

D'autres études ont montré la capacité des souches de *Staphylococcus* sp. de décontaminer des environnements pollués par divers contaminants, tels que les colorants triphénylméthane présent dans l'eau usée de l'industrie des textiles (Ayed et al., 2010), et la dégradation des herbicides tel que le 2,4-dichlorophénoxyacétique (Karami et al., 2016).

Des souches de *Staphylococcus* sp. pouvaient utiliser le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie (Dashti et al., 2017; Vilcáez et al., 2018), et pouvaient biodégrader efficacement les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), tels que le phénanthrène (Mallick et Dutta, 2008; Moscoso et al., 2012; Tiralerdpanich et al., 2018), le Pyrène et le Benzo[a]anthracène (Mallick et Dutta, 2008). En outre, la souche *Staphylococcus* sp. est l'une des bactéries les plus dégradantes des hydrocarbures, qui présente le gène *nahH* codant pour la catéchol 2,3-dioxygénase, responsable de la dégradation des HAPs (Chang et al., 2010).

Vandecandelaere et al. (2010) ont montré que *Staphylococcus cohnii* était l'une des souches bactériennes isolées de la fraction cultivable d'un biofilm marin électroactif. De plus, la souche de *Staphylococcus cohnii* est capable de dégrader des insecticides de l'environnement, tel que le lindane (Abhilash et al., 2011), de produire des biofloculants à partir des effluents des usines de traitement de l'huile de palme (Wong et al., 2012 ; Shahadat et al., 2017), de dégrader des colorants azoïques à partir des eaux usées issues de l'industrie des textiles (Yan et al., 2012). D'autres souches de *Staphylococcus cohnii* avaient la capacité de bioaccumulation et d'élimination de 75 à 90 % du chrome (Cr) des effluents de tannerie contaminés (Saxena et al., 2000), et fait partie de la communauté bactérienne d'un sol contaminé par le chrome (Cr) (Liu B. et al., 2019). L'espèce *Staphylococcus cohnii* possède également le potentiel de biodégradation des polymères de plastique (Pathak et Navneet, 2017).

Pour mettre en évidence la similarité et les différences entre la séquence de l'ADNr 16S des quatre souches et les séquences des souches les plus proches par l'analyse phylogénétique, un

alignement par le programme Multiple Sequence Alignment Clustal W (Russell, 2014) est effectué, et les résultats des alignements sont montrés ont annexe 08.

Les résultats montrent que les souches sélectionnées présentent quelques différences avec les souches apparentées les plus proches au niveau des séquences de l'ADNr 16S, vue qu'elles sont des souches indigènes du port d'Oran, et peuvent être légèrement différentes des autres souches de la même espèce, du fait qu'elles prolifèrent dans un environnement dont elles se sont adaptées, différents de celui des autres souches des mêmes espèces qui sont dans des milieux et des conditions différents.

En outre, les souches hydrocarbonclates sélectionnées : *Acinetobacter johnsonii* SP49F2, *Pseudomonas mendocina* SP57N ; *Stenotrophomonas maltophilia* S54N ; *Acinetobacter johnsonii* SP49F2 et *Staphylococcus cohnii* A3NI3, isolées de l'interface eau de mer-sédiments marins contaminés par les hydrocarbures, dans la présente étude, tolèrent des concentrations importantes de pétrole brut, allant jusqu'à 10 % (v/v), en raison de la zone polluée et l'induction de développement des enzymes d'intérêt. Cette tolérance peut refléter l'adaptation évolutive qui résulte en une grande stabilité, permettant aux bactéries vivant dans de tels circonstances de réagir plus rapidement que les autres bactéries à de nouvelles sources d'hydrocarbures (Girvan et al., 2005; Joy et al. 2017 ; Khudur et al., 2018).

En tant que microorganismes autochtones, les quatre souches sélectionnées, *Acinetobacter johnsonii* SP49F2, *Stenotrophomonas maltophilia* SP54N, *Pseudomonas mendocina* SP57N, et *Staphylococcus cohnii* A3NI3, ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures, et en particulier les HAPs, sont un moyen très important et utile pour la bioremédiation et la décontamination du milieu et des sédiments marins tel que le port d'Oran, et seraient utiles pour des applications biotechnologiques.

6. ANALYSE BIOINFORMATIQUE ET THERMODYNAMIQUE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES FRAGMENTS D'ARNr 16S

Les séquences d'ARNr 16S des souches hydrocarbonoclastes sélectionnées ont fait l'objet d'une prédiction de structure 2D par la méthode du minimum d'énergie libre (ΔG°). L'outil de prédiction structurale utilisé est le RNA Fold du package Vienna RNA Web Server (Lorenz et al., 2011).

Les résultats des structures 2D des fragments partiels des ARNr 16S des souches hydrocarbonoclastes sélectionnées dans la présente étude sont représentés par la figure 56 (Au forma plus détaillée en annexe 09), et ceux des calculs des énergies thermodynamiques libres (ΔG°) sont représentées sur le tableau 12 et la figure 57.

Il en ressort l'architecture 2D des séquences partielles d'ARNr 16S, présentant des différences chez les quatre souches hydrocarbonoclastes sélectionnées. Ainsi, les souches *Pseudomonas mendocina* SP57N, *Stenotrophomonas maltophilia* SP54N et *Acinetobacter johnsonii* SP49F2 montrent certaines topologies similaires, du fait de leur appartenance aux *Gammaproteobacteria*. En revanche, La souche *Staphylococcus cohnii* A3NI3 exprime une différence nette dans l'architecture 2D par rapport à l'ensemble des autres souches. La souche *Pseudomonas mendocina* SP57N présente un profil 2D plus proche de celui de la souche *Stenotrophomonas maltophilia* SP54N, du fait de leur appartenance toutes les deux aux *Pseudomonadales*.

Ces résultats sont confirmés par les diagrammes des énergies libres standards (ΔG : Kcal/mol) représentés sur la figure 57. En effet, les mesures des énergies thermodynamiques libres ΔG° (Tableau 12 ; Fig. 57) révèlent des valeurs plus proches pour les ARNr 16S des souches SP57N et SP54N (-348.64 kcal/mol et -349.64 kcal/mol respectivement) (928 pb et 932 pb respectivement). Par contre, l'ARNr 16S de la souche SP49F2 exprime une énergie libre significativement différente (- 305.80 kcal/mol) (978 pb). Ainsi, les différences des énergies libres entre les séquences partielles des ARNr 16S des souches SP54N et SP49F2 (Fig. 57 ; Tableau 12) montrent des écarts d'énergie significatifs, et l'énergie de repliement de la structure 2D de l'ARNr 16S de la souche SP54N est plus négative, ce qui signifie que la structure de l'ARNr 16S de la souche SP54N est plus stable que celle de la souche SP49F2.

La souche A3NI3 présente une énergie plus grande par rapport aux autres souches ($\Delta G^\circ = - 174.91$ kcal/mol), du fait que la taille de la séquence analysée est réduite par rapport

aux autres séquences (484 pb), ce qui signifie qu'on ne peut pas comparer son énergie libre à celles des autres souches.

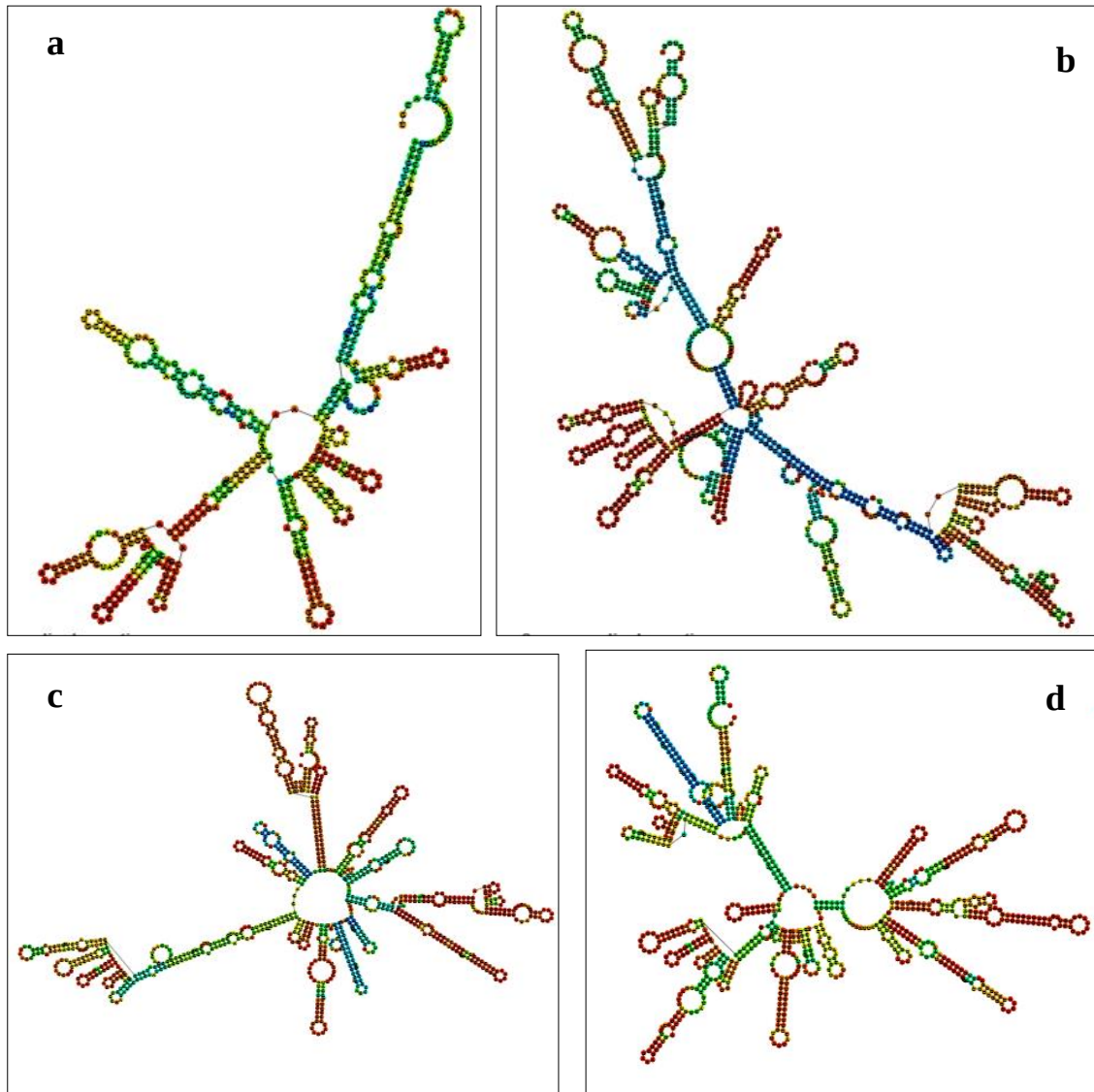


Figure 56 : Structures secondaires des fragments l'ARNr 16S des souches sélectionnées prédites par le logiciel RNAFold ; **(a)** : *Staphylococcus cohnii* A3NI3 ; **(b)** : *Acinetobacter johnsonii* SP49F2 ; **(c)** : *Stenotrophomonas maltophilia* SP54N ; **(d)** : *Pseudomonas mendocina* SP57N.

Les différences des énergies libres entre les espèces sont expliquées par la divergence de leurs structures. En effet, les profils énergétiques des quatre isolats ont fait ressortir des niveaux d'énergie libre avec des pics différents (Fig. 57) ; expliqué par la différence dans la structure secondaire des ARN 16S entre les différentes espèces.

Les résultats de la prédiction des structures secondaires 2D des ARNr 16S d'une part, et le calcul de l'énergie montrent que SP57N et SP54N sont des espèces proches. Cela est confirmé par l'appartenance de ces souches aux *Pseudomonadales*.

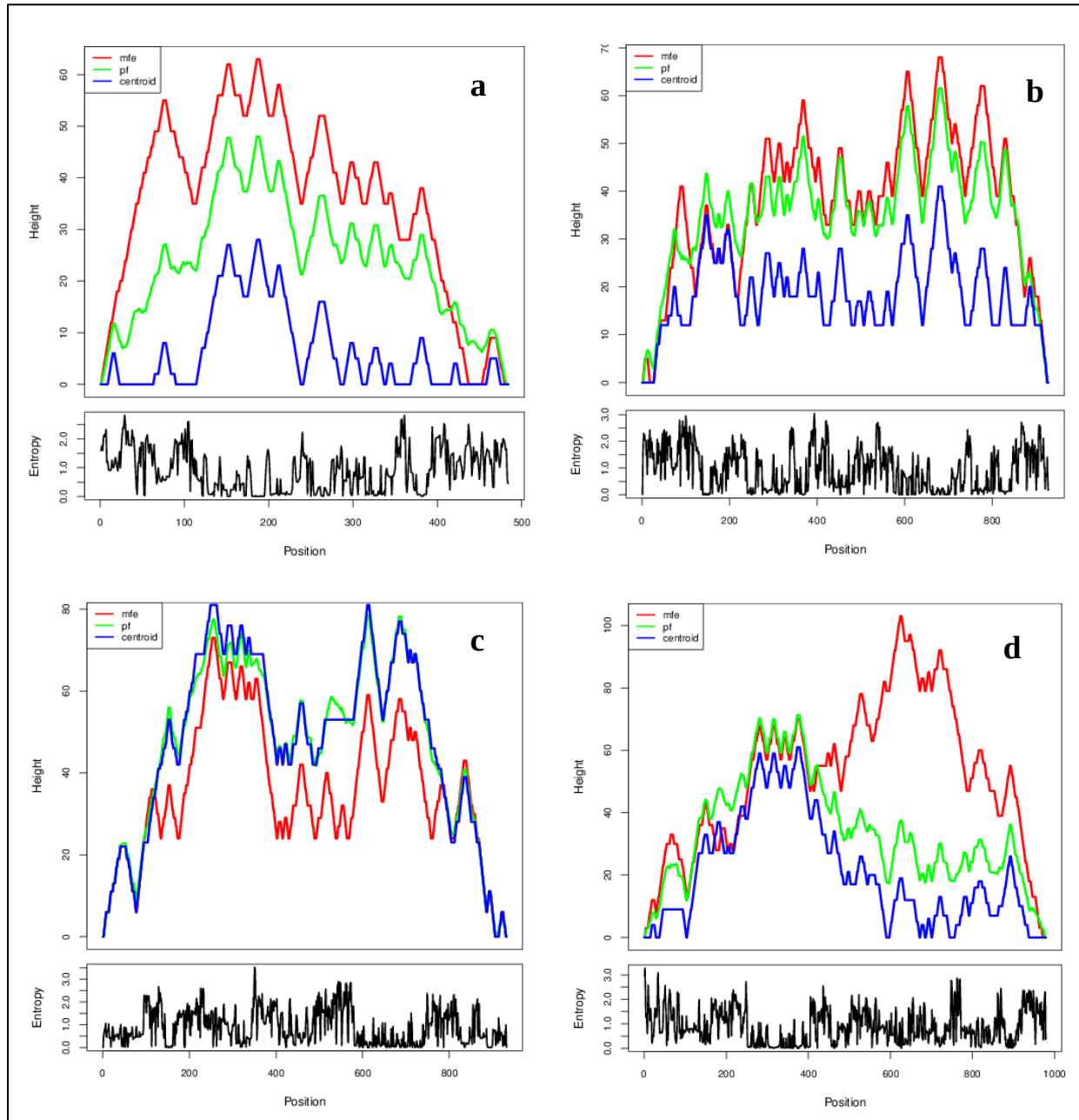


Figure 57 : Diagrammes des différences des énergies thermodynamiques libres standards (ΔG° : Kcal/mol) des ARNr 16S des souches bactériennes sélectionnées calculées et établit par le logiciel RNAFoldr. **(a)** : *Staphylococcus cohnii* A3NI3 ; **(b)** : *Pseudomonas mendocina* SP57N ; **(c)** : *Stenotrophomonas maltophilia* SP54N ; **(d)** : *Acinetobacter johnsonii* SP49F2.

Tableau 12 : Prédiction des énergies libres thermodynamiques (ΔG°) de l'ensemble des fragments de l'ARNr 16S des souches hydrocarbonoclastes sélectionnées.

Souches	Energie libre thermodynamique de l'ensemble du fragment de l'ARN 16S (ΔG°)
<i>Staphylococcus cohnii</i> A3NI3	-174.91 kcal/mol
<i>Pseudomonas mendocina</i> SP57N	- 348.64 kcal/mol
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> SP54N	-349.64 kcal/mol.
<i>Acinetobacter johnsonii</i> SP49F2	-305.80 kcal/mol

La prédiction des structures 2D révèle également que les structures ont toutes des énergies libres favorables à des structures secondaires stables, du fait que toutes les énergies estimées sont considérablement négatives (Tableau 12), synonyme d'une structure secondaire très stable.

En se repliant, la molécule d'ARN forme une structure stabilisée par la force des ponts hydrogènes entre certaines paires de bases (les paires de bases Watson-Crick : G-C et A-U ; et les paire de bases Wobble : G-U) et l'empilement de paires de bases voisines, produisant la structure secondaire de la molécule. La paire G-C est celle qui donne le plus de stabilité, que les paires A-U et G-U (Bon 2009).

La prédiction de La structure secondaire des ARN 16S forme un niveau intermédiaire important de description des acides nucléiques, qui encapsule la partie dominante de l'énergie de repliement, est souvent bien conservée dans son évolution, et est couramment utilisée comme base pour expliquer les résultats expérimentaux. Sur la base de paramètres thermodynamiques soigneusement mesurés, des algorithmes de programmation dynamique exacts peuvent être utilisés pour calculer les états fondamentaux, les probabilités d'appariement des bases, ainsi que les propriétés thermodynamiques (Lorenz et *al.*, 2011 ; Hofacker, 2014 ; Dans et *al.*, 2018 ; Jarmoskaite et *al.*, 2019). La connaissance de la structure de l'ARN est donc cruciale pour comprendre divers processus biologiques (Lorenz et *al.*, 2011 ; Jarmoskaite et *al.*, 2019 ; Lind et *al.*, 2019).

RNA Fold du package Vienna RNA Web Server est l'un des programmes de prédiction de structure d'ARN 2D les plus utilisés, et les plus cités (Hofacker et Lorenz, 2013 ; Iwakiri et

Asai, 2018 ; Andrews et Moss 2019 ; Ebrahimi et *al.*, 2019 ; Jarmoskaite et *al.*, 2019), vue qu'il permet une prédiction sur la totalité de la séquence alors que d'autres programmes font des calculs predictionnels sur une portion plus courte de nucléotides (ne dépassant pas 400 à 800 pb) (Andrews et Moss, 2019).

La connaissance de la structure de l'ARNr est fondamentale, car elle peut déterminer la fonction de celui-ci. Il y a un intérêt majeur pour l'étude des structures pour trois raisons principales : la première raison est qu'il est plus aisé de déterminer la structure secondaire que de déterminer la structure tertiaire. La deuxième raison est que la structure secondaire explique en majeure partie la structure tertiaire. Et enfin, la troisième raison qui permet l'identification des espèces, est que la majorité des familles d'ARN ont des structures secondaires très conservées (Glouzon, 2017).

Les séquences d'ADN ribosomiaux (ADNr) sont des marqueurs évolutifs relativement robustes, très utiles pour déchiffrer la phylogénie et l'évolution des populations microbiennes au cours du temps (Woese, 1987). Les ARN ribosomiques (petite sous unité = ARNr 16S, grande sous-unité = ARNr 23S) se sont imposés comme référence de taxonomie moléculaire car ils réunissent l'ensemble des qualités requises. En premier lieu, ils sont un élément clé de la synthèse protéique, fonction très conservée car indispensable à la vie de la cellule. Ensuite, ils ont une structure particulière faite d'une succession de domaines dont les vitesses d'évolution sont très variables, et chacun de ces domaines a son importance pour l'identification moléculaire des microorganismes. La comparaison des domaines conservés permet de retracer les liens de parenté qui unissent des bactéries éloignées, tandis que les domaines à vitesse d'évolution plus rapide permettent l'étude des relations phylogénétiques d'espèces plus proches. D'autres parties de séquences sont propres à un groupe et permettent ainsi l'identification de séquences dites signatures caractéristiques d'ordres taxonomiques différents (espèce, genre, famille ou royaume) (Calvayrac 2011). Heuer et *al.* (1999) ont indiqué que 14 régions différentes de l'ADNr 16S (A, B, C, D, E, F, V1–V3 et V5–V9) ont pu être utilisées pour générer des empreintes des communautés bactériennes.

7. CARACTERISATION FONCTIONNELLE DES SOUCHES BACTERIENNES HYDROCARBONOCLES SELECTIONNEES

7.1. Étude du gène codant pour l'enzyme catechol 2,3-dioxygénase (C23O)

Le gène C23O codant pour l'enzyme catechol 2,3-dioxygénase est potentiellement une excellente cible moléculaire pour caractériser et typer la microflore des sédiments marins impliquée dans la dégradation des composés xénobiotiques aromatiques. Il est généralement porté par un plasmide catabolique conjugatif, comme il est chromosomique chez d'autres espèces (Calvyrac 2011). Nous avons recherché, chez nos souches sélectionnées, la présence du gène codant pour l'enzyme catéchol 2,3-dioxygénase (C23O), vu qu'il est important d'avoir une vision fonctionnelle élargie de nos isolats sélectionnés vis-à-vis de cette enzyme clef du métabolisme bactérien des HAPs.

Pour mettre en évidence la présence du gène codant pour la catechol 2,3-dioxygénase (C23O), chez les quatre souches bactériennes hydrocarbonoclastes sélectionnées, une extraction d'ADN total (génomique et plasmidique) est effectuée selon le protocole de Ruiz-Barba et *al.* (2005), puis une amplification par PCR d'un fragment de ce gène de 238 pb est réalisée en utilisant des amorces spécifiques à ce dernier. L'électrophorèse des produits d'amplification par PCR du gène C23O a donné les résultats représentés dans la figure 58.

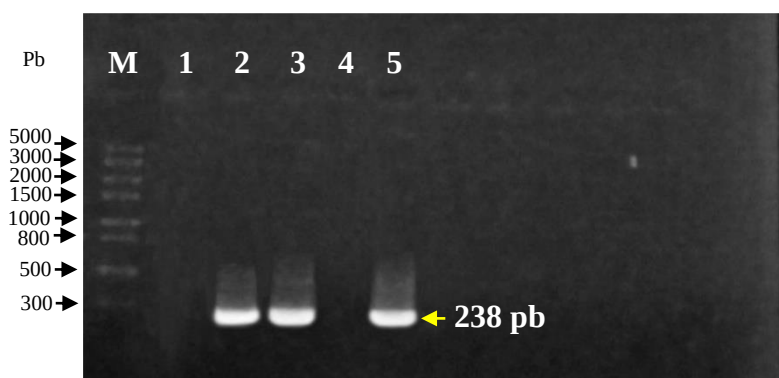


Figure 58 : Electrophorèse des produits de PCR du gène C23O des quatre souches étudiées, réalisée sur gel d'agarose à 1,5 %. **(M)** : Marqueur de taille Trans5K DNA Marker ; **(1)** : contrôle négatif (sans ADN) ; **(2)** : *Stenotrophomonas maltophilia* S54N ; **(3)** : *Acinetobacter johnsonii* SP49F2 ; **(4)** : *Staphylococcus cohnii* A3NI3 ; **(5)** : *Pseudomonas mendocina* SP57N.

L'électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5 % des produits d'amplification du fragment du gène C23O (Fig. 58) montre la présence d'une seule bande intense d'ADN au niveau des souches SP54N, SP49F2 et SP57N. Évaluée visuellement par comparaison au marqueur de taille utilisé (Marqueur de taille Trans5K DNA Marker), et à l'aide de la courbe étalon (annexe 03), la taille de la bande correspond au poids moléculaire d'environ 283 pb (Fig. 58).

Ces résultats montrent qu'il y a eu amplification du fragment du gène C23O suite à l'hybridation des amorces utilisées chez les souches SP54N, SP49F2 et SP57N (Fig. 58). On remarque l'absence de bande chez l'espèce A3NI3. Cette amplification a permis de confirmer qu'il s'agit bien de souches bactériennes hydrocarbonoclastes. Des résultats similaires sont observés par Mesarch et *al.* (2005), Chang et *al.*, (2011) et Wojcieszynska et *al.*(2012).

D'après ces résultats il en ressort que seules les souches *Stenotrophomonas maltophilia* S54N, *Acinetobacter jonhsonii* SP49F2 et *Pseudomonas mendocina* SP57N possèdent ce gène de dégradation des hydrocarbures. Ces résultats sont en accord avec ceux observés par (Heinaru et *al.*, 2000 ; Wojcieszynska et *al.*, 2012 ; Ghosh et *al.*, 2017). La souche A3NI3 possède un gène différent des autres bactéries, codant pour la catechol 2,3-oxygénase, présentant des polymorphismes au niveau des amorces, qui ne sont pas conservées chez les espèces de *Staphylococcus*. En effet la souche *Staphylococcus cohnii* A3NI3, étant l'une des souches bactériennes les plus dégradantes des hydrocarbures, nécessitant l'utilisation d'autres amorces pour la mise en évidence du ce gène C23O. Des résultats similaires sont observés par Chang et *al.* (2011), qui ont rapporté que ce gène est plasmidique chez les espèces d'*Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp. et *Stenotrophomonas* sp., et est chromosomique chez les *Staphylococcus* sp.

L'importance du carrefour métabolique que semble constituer la voie des catéchols laisse à penser que les populations bactériennes ont progressivement développé des enzymes capables de reconnaître des gammes étendues de substrats, afin de pouvoir transformer des composés aromatiques de familles différentes en métabolites de nature catécholique (kita et *al.*, 1999 ; Vaillancourt et *al.*, 2006 ; Lillis et *al.*, 2010 ; Lui et *al.*, 2019).

Vue l'importance de ce gènes de nombreuses études s'y intéressent, aussi bien pour le mettre en évidence comme un marqueur génétique des bactéries hydrocarbonoclastes (Kasuga et *al.*, 2007 ; Yrjala et *al.*, 2010 ; Prince et Walters, 2016), que pour la recherche de la sa diversité génétique (Kasuga et *al.*, 2007 ; Muthukamalam et *al.*, 2017), ainsi que pour sa caractérisation et son clonage (Xie et *al.*, 2013 ; Hassan et Aly, 2018 ; Lui et *al.*, 2019).

Les dioxygénases catalysent deux réactions fondamentales : en premier lieu, l'hydroxylation du composé aromatique, puis dans une deuxième étape, l'ouverture du noyau (Costas et *al.*, 2004 ; Prathibba et Sumathi, 2007). Ces enzymes sont classées selon le mode d'ouverture du noyau aromatique qu'elles catalysent : l'intradiol dioxygénase ou catéchol 1,2-dioxygénase (C12O). Lorsque le clivage se fait en position *ortho* (clivage entre les carbones porteurs des groupements hydroxyles), ou l'extradiol dioxygénase ou catéchol 2,3-dioxygénase (C23O) pour clivage en position *méta* (clivage entre les deux carbones adjacents au diol) (Fig. 59). Ces deux types d'enzymes constituent deux familles distinctes et différentes notamment par la valence de l'atome de fer situé au site actif : les intradiol-dioxygénases présentent un fer ferrique, alors que les extradiol-dioxygénases possèdent un fer ferreux (Calvayrac 2011).

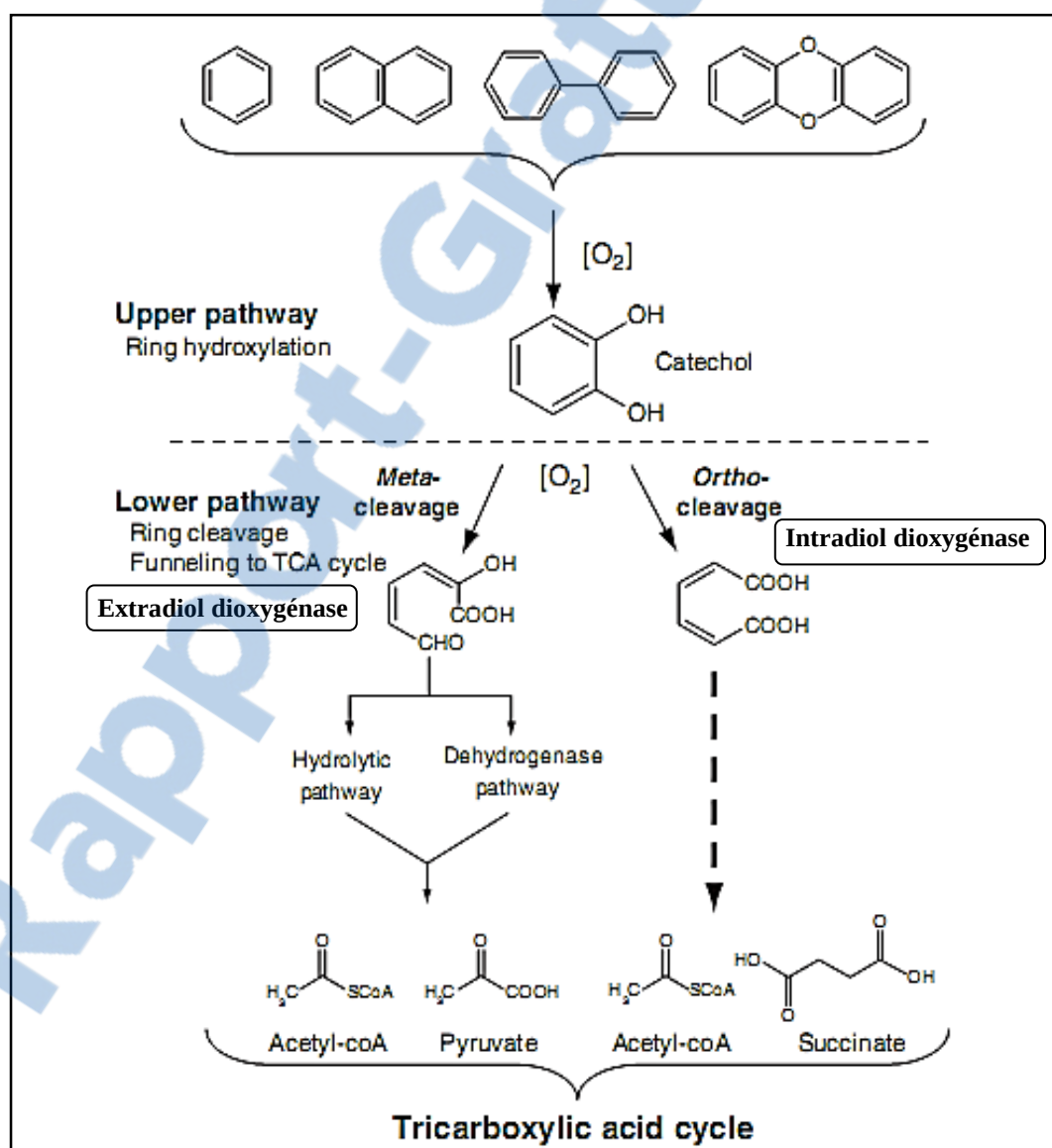


Figure 59 : Voies de clivage du noyau aromatique du catéchol (voies *ortho* et *méta*) catalysées par les catéchol-dioxygénases (George et Hay, 2011).

7.2. Analyse bioinformatique et modélisation de la structure 3D de l'enzyme catéchol 2,3-dioxygénase (C23O)

La première dioxygénase à avoir été séquencée est la catéchol 2,3-dioxygénase, codée par le gène *xylE* situé sur le plasmide TOL de *Pseudomonas putida* mt-2 (Nakai et al., 1983). Cette enzyme catalyse l'oxydation du catéchol en acide 2-hydroxymuconique semialdéhyde. Le gène *xylE* (C23O) est constitué de 924 pb correspondant à la totalité du cadre de lecture ouvert du gène de la catéchol-2,3-dioxygénase (~ 307 aa) qui est très largement répandue dans le monde microbien et se trouve impliqué dans des métabolismes variés (Kasuga et al., 2007 ; Calvayrac, 2011).

Présent chez les *Pseudomonas*, le gène C23O est plasmidique chez ce genre (Chang et al., 2011 ; Ghosh et al., 2017). Séquencé entièrement chez *Pseudomonas mendocina* PC6 (Heinaru et al., 2000), déposée sous le numéro d'accèsion (AY887954.1) sur NCBI-GenBank. C'est l'une des séquences que nous avons considéré comme matrice pour la prédiction de la structure tridimensionnelle (3D) de l'enzyme catéchol-2,3-dioxygénase, pour représenter l'espèce *Pseudomonas mendocina* SP57N isolée dans la présente étude.

Pour représenter la souche *Stenotrophomonas maltophilia* SP54N, nous avons utilisé les données du gène *xylE*, de la souche *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 (Wojcieszynska et al., 2011), dont le numéro d'accèsion sur NCBI-GenBank est (EF694961.1).

De même, *Acinetobacter johnsonii* SP49F2 et *Staphylococcus cohnii* A3NI3, dont les gènes C23O ont été mis en évidence, ils ont été étudié sur la base des travaux respectifs de Heinaru et al. (2000), et Chang et al. (2011).

Ainsi, chez la souche considérée *Acinetobacter johnsonii* XBB1 (plasmid : pXBB1-9), le gène de la catéchol 2,3-dioxygénase (C23O) est présent sur le plasmide, dans la région (CP010351.1 : c307970-307047) du génome, sur NCBI-GenBank. Alors que chez la souche *Staphylococcus cohnii* FDAARGOS_334, considérée pour représenter la souche *Staphylococcus cohnii* A3NI3, le gène C23O est situé dans la région (CP027422.1 : 2409787-2410710) de la séquence nucléotidique chromosomique déposée sur NCBI-GenBank.

Ainsi, les séquences nucléotidiques considérées, du gène C23O, ont été alignées par le programme Multiple Sequence Alignment de Clustal W (Russell, 2014), et les résultats sont montrés en annexe 10. Les séquences en acides aminés de l'enzyme catéchol 2,3-dioxygénase correspondant aux séquences considérées sont alignées en utilisant le même programme d'alignement (Clustal W), et les résultats sont représentés par la figure 60.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

Staphylococcus cohnii      DARFDIAHLARAELEFSKPKQETLDFFTKFLGMVYTHR-EGQSVYLRGYEDPYPWSLKITE 59
Acinetobacter johnsonii    MNNKPVSRPGHVALRVLDLDESINHYVNVIGLIKGTQDEQGRVYLKAWDEHDDHCLILRE 60
Pseudomonas mendocina      -MKKGVMRPGHVQLRVNLLESALAHYRDLGLIEMDRDEQGRVYLKAWTEVDKFSVVLRE 59
Stenotrophomonas maltophilia -MKKGVMRPGHVQLRVNLLESALAHYRDLGLIEMDRDEQGRVYLKAWTEVDKFSVVLRE 59
      . : : ... * . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Staphylococcus cohnii      APEAGMGHAAMRTSSPEALERAKSLTDGNVDGTWS-EDQFGYKTFEYQS-PDGHNLQL 117
Acinetobacter johnsonii    ADSPGMDCAFKVVSSEELKRLAQALEDYGVSEWIAAGTNLATGERVRFETAPTGHVFEL 120
Pseudomonas mendocina      ADQPGMDFMGFKVIDEDCLNRLTQDLLNYGCLIEITIPAGELKGCGRVRVFQAPSGHFFEL 119
Stenotrophomonas maltophilia ADQPGMDFMGFKVIDEDCLNRLTQDLLNYGCLIEITIPAGELKGCGRVRVFQTPSGHFFEL 119
      * . ** . : : . . . * : : : : : . . . : : * : : *
Staphylococcus cohnii      LWEAEKYVAPPERSKILTRPSKKPLQIGIPVKRIDHLNLMSSDVAVKDSFERHLGFRITTE 177
Acinetobacter johnsonii    YAHKDLYG-N-GMPTTNGVQAKNLKGVHPSRFDHCLMGEGVEASYRLFKDILGFDLAE 178
Pseudomonas mendocina      YADKEYTG-KWGVVEINPEAWPRDLKGMRAVRFDHCLMYGDELQATYELFTEVLGFYLA 178
Stenotrophomonas maltophilia YADKEYTG-KWGLEEINPEAWPRNLKGMRAVRFDHCLLYGDELQATYALFTEVLGFYLA 178
      . : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Staphylococcus cohnii      RVVDGN-VEIGAWSSNLLGHEVACMRDMSGHGLHHLAFFYGTGQHNIDAVEMFRDYD 236
Acinetobacter johnsonii    QVLDGE-TMAAFMSCSNKPHDVAFIFA--PDGKLHHSFFVESWAQVLSAADTIANHD 235
Pseudomonas mendocina      QVIDDNGTRIAQFLSLSTKAHDVAFIQH--AEKGKFHHVSFFLETWEDVLRADLISMTD 236
Stenotrophomonas maltophilia QVIDDDGTVAQFLSLSTKAHDVAFIHC--PEKGKFHHVSFFLETWEDVLRPADLISMTD 236
      :*: : : . : : : : * . * : : : : : : : : : : : : : : :
Staphylococcus cohnii      IQIEAGPDKHGITSQSFYVFFPGGNRIELFGEAGYLHLDAETKTWQMSDIDTGLAVGGA 296
Acinetobacter johnsonii    VSHEIGPTRHGITRGETLYFFDPGSGNRNEVFSGGYIWYSDRPTLTWTADLPRAIFFTER 295
Pseudomonas mendocina      TSIDIGPTRHGLTHGKTIYFFDPGSGNRNEVFCGGDYNQDHPVTLAKDLGKAIFYHNR 296
Stenotrophomonas maltophilia TSIDIGPTRHGLTHGKTIYFFDPGSGNRNEVFCGGDYNQDHPVTLAKDLGKAIFYHNR 296
      . : ** :*: :*: : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
Staphylococcus cohnii      KLPESYFTYGT 307
Acinetobacter johnsonii    KLSETFNVT 306
Pseudomonas mendocina      VLNERFMTVLT 307
Stenotrophomonas maltophilia VLNER----- 301
      * *

```

Figure 60 : Alignement multiple des séquences protéiques de l'enzyme catéchol 2,3-dioxygénase des souches considérées : *Staphylococcus cohnii* FDAARGOS 334 ; *Acinetobacter johnsonii* XBB1 ; *Pseudomonas mendocina* PC6 et *Stenotrophomonas maltophilia* KB2.

Les ressemblances des séquences protéiques du gène C23O sont mise en évidence par l'arbre analysé en utilisant le programme MEGA (version 7.0) (Kumar et al., 2016), par la méthode Neighbor-Joining (bootstrap = 1000), pour générer un phylogénétique. Les résultats sont représentés dans la figure 61.

Ces résultats indiquent que les structures de la catechol 2,3-dioxygénase des souches *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 et *Pseudomonas mendocina* PC6 se ressemblent, et sont plus proches de celle de l'espèce *Acinetobacter johnsonii* XBB1 que de *Staphylococcus cohnii* FDAARGOS 334.

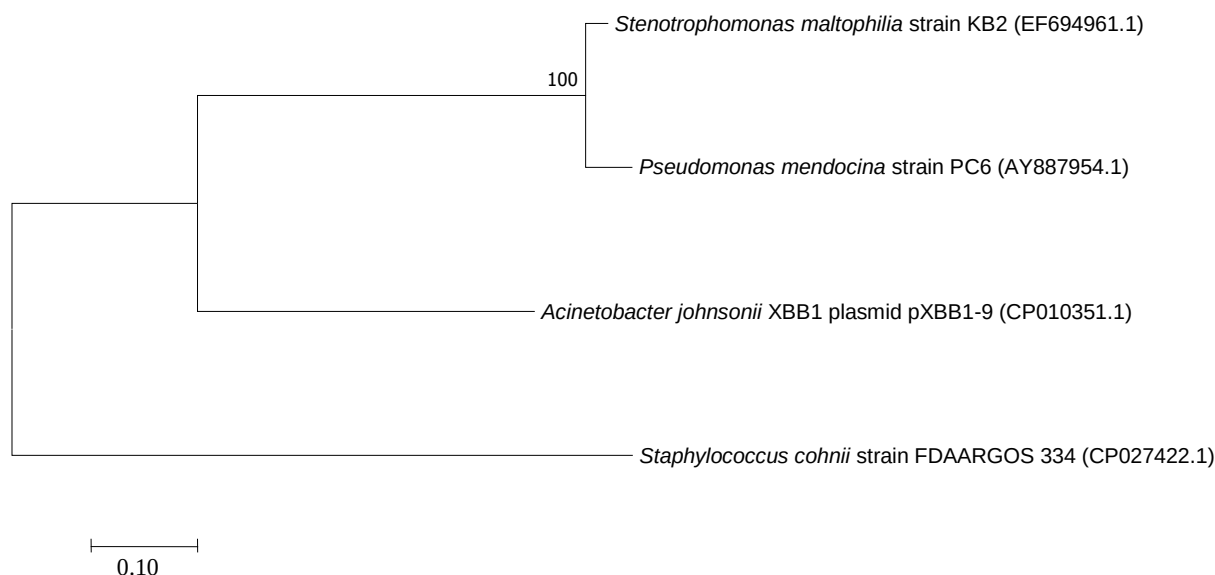


Figure 61 : Arbre phylogénétique généré par les ressemblances des séquences protéiques de la catechol 2,3-dioxygénase des espèces hydrocarbonoclates considérées, construit par la méthode Neighbor-Joining (bootstrap = 1000). Les numéros d'accession sur NCBI-GenBank sont indiqués entre parenthèses. La barre d'échelle représente 0,10 divergence des séquences.

La modélisation de la structure tridimensionnelle de la catechol 2,3-dioxygénase des souches considérées est effectuée en utilisant le programme Swiss-model (Guex et *al.*, 2009 ; Benkert et *al.*, 2011 ; Bienert et *al.*, 2017 ; Bertoni et *al.*, 2017 ; Waterhouse et *al.*, 2018). Les résultats sont montrés sur la figure 62. L'interface du programme SWISS-model est montrée en annexe 11.

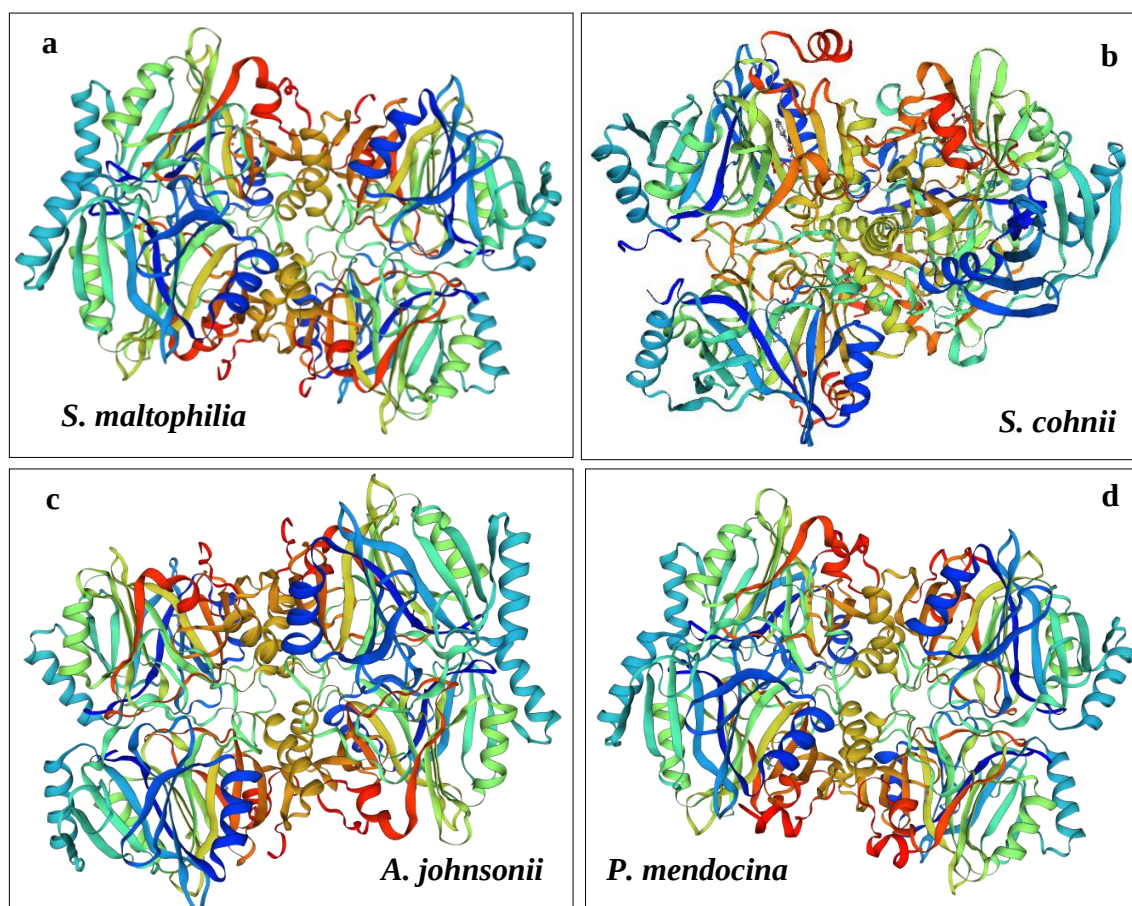


Figure 62 : Structures tridimensionnelles de l'enzyme catechol 2,3-dioxygénase modélisées et prédites par SWISS-modell (Guex et *al.*, 2009 ; Benkert et *al.*, 2011 ; Bienert et *al.*, 2017; Bertoni et *al.*, 2017; Waterhouse et *al.*, 2018). **(a) : *S. maltophilia*** (*Stenotrophomonas maltophilia* KB2), **(b) : *S. cohnii*** (*Staphylococcus cohnii* FDAARGOS 334) ; **(c) : *A. johnsonii*** (*Acinetobacter johnsonii* XBB1) ; **(d) : *P. mendocina*** (*Pseudomonas mendocina* PC6).

Les résultats de la modélisation tridimensionnelle de la catéchol 2,3-dioxygénase (Fig. 62) sont en accord avec ceux Kita et *al.*, (1999), correspondant à la structure cristalline obtenus par la méthode X-ray diffraction avec une résolution de 2,8 Å. Ces résultats montrent que l'enzyme est un homo-tétramère composé de quatre sous-unités identiques (quatre domaines similaires). La structure du site actif révèle un site Fe (II) tétraédrique déformé avec trois ligands endogènes (His153, His214 et Glu265) (Kita et *al.*, 1999 ; Wojcieszynska et *al.*, 2011).

Les sous unités de chaque structure tétramérique de la catéchol 2,3-dioxygénase (Fig. 62), modélisée également par le même programme (SWISS-model), sont montrés sur la figure 63.

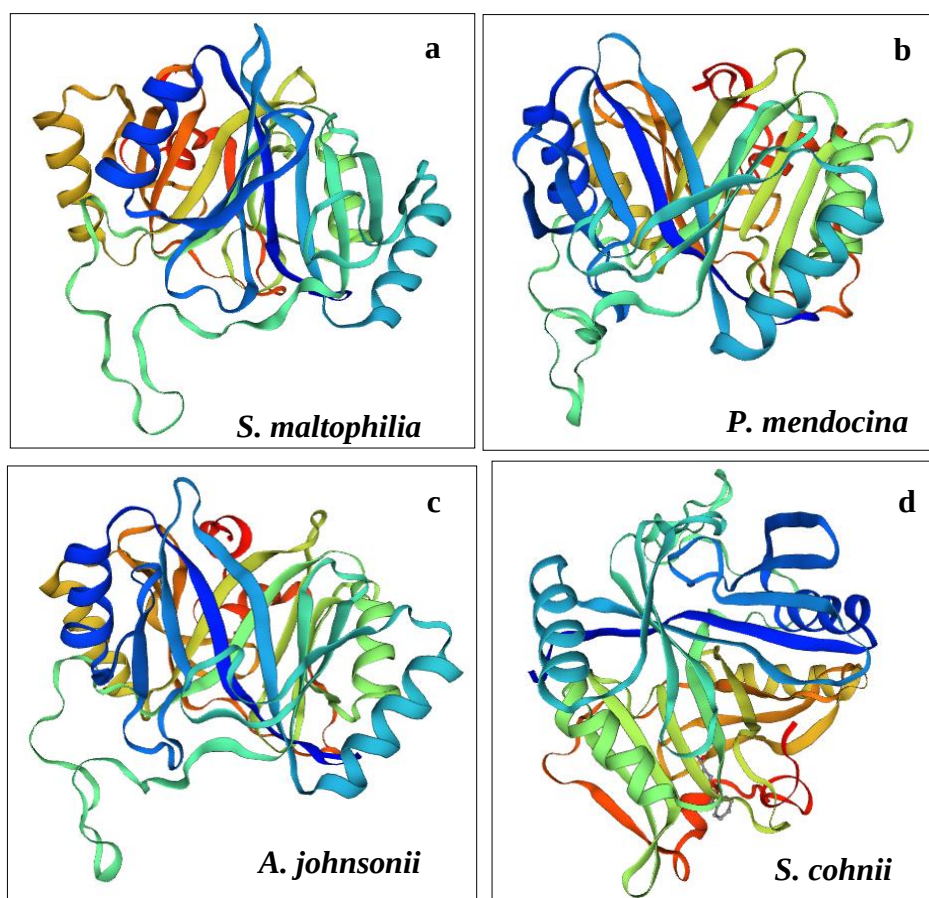


Figure 63 : Structures tridimensionnelles de monomères de l'enzyme catéchol 2,3-dioxygénase modélisées et prédites par SWISS-modell (Guex et *al.*, 2009 ; Benkert et *al.*, 2011 ; Bienert et *al.*, 2017 ; Bertoni et *al.*, 2017 ; Waterhouse et *al.*, 2018). **(a) : *S. maltophilia*** (*Stenotrophomonas maltophilia* KB2), **(b) : *P. mendocina*** (*Pseudomonas mendocina* PC6) ; **(c) : *A. johnsonii*** (*Acinetobacter johnsonii* XBB1) ; **(d) : *S. cohnii*** (*Staphylococcus cohnii* FDAARGOS 334).

Les extradiol-dioxygénases ont trois résidus strictement conservés et deux molécules de solvant responsables de la liaison du fer (Senda et *al.*, 1996; Kovaleva et Lipscomb, 2007). Le site de liaison de Fe est situé dans le domaine C-terminal (Jouanneau, 2010). Dans notre travail nous avons prédit vraisemblablement, l'archétype de l'enzyme catéchol 2,3-dioxygénase, appelée également metapyrocatechase, qui catalyse les réactions de clivage d'une large gamme de composés aromatiques toxiques.

On remarque d'après les structures 3D, tétramériques et monomériques de l'enzyme catechol 2,3-dioxygénase représentées par les figures 62 et 63, que les structures de cette enzyme sont similaires chez les souches bactériennes *Stenotrophomonas maltophilia* KB2, *Acinetobacter johnsonii* XBB1 ; *Pseudomonas mendocina* PC6. Alors que la souche *Staphylococcus cohnii* FDAARGOS 334 présentes certaines différences au niveau de la structure de cette enzyme.

Les résultats de cette analyse bioinformatique (Fig. 60 ; 61 ; 62 et 63) confirment ceux obtenus par l'amplification par PCR de fragment du gène C23O dans la présente étude (Fig. 58), et ceux obtenus par Chang et *al.* (2011). Ces résultats indiquent que la structure de l'enzyme C23O chez l'espèce *staphylococcus cohnii* présente certaines différences dans la structure par rapport aux trois autres espèces (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter johnsonii*, *Pseudomonas mendocina*), et donc présente probablement des différences dans les séquences correspondant aux amorces utilisées pour l'amplification du fragment du gène C23O dans la présente étude. Cela explique l'absence d'amplification du fragment du gène C23O par le couple d'amorces (DEG-Forward et DEG-Reverse) chez la souche *staphylococcus cohnii* A3NI3.

8. EFFET DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES SUR LA DEGRADATION DES HYDROCARBURES

Plusieurs bactéries ont le pouvoir de biodégradation des HAPs. Ces microorganismes sont disponibles dans les sites pollués par les hydrocarbures. Le nombre et la diversité de ces bactéries hydrocarbonoclastes sont influencés par différents facteurs environnementaux, physiques et chimiques, tels que la température, le pH, la salinité, et la source de carbone. Le changement saisonnier et climatique joue aussi un rôle sur le nombre et la diversité des bactéries en général et des bactéries hydrocarbonoclastes en particulier (Abbasnezhad et *al.*, 2011 ; Kolukirik et *al.*, 2011 ; Acosta-González et Marqués, 2016 ; Jiao et *al.*, 2017 ; Kumar et *al.*, 2019).

Etant donné la complexité des produits pétroliers et des conditions environnementales, l'étude de l'effet des conditions environnementales sur la dégradation du pétrole est requise. Ce type d'étude peut fournir des informations au sujet des souches et de leurs conditions de croissance, avant que n'importe quelle intervention de bioremédiation sur place ne soit effectuée. Une série d'essais de biodégradation a été effectuée pour étudier l'effet de dégradation des hydrocarbures par nos quatre souches sélectionnées, à différentes conditions de pH (6 à 9), températures (20 à 40°C), et à différentes concentration en NaCl (0 à 15%).

8.1. Effet de température sur la croissance des souches sélectionnées

Afin d'étudier l'influence de la température sur la croissance des souches hydrocarbonoclastes sélectionnées, et de déterminer leur température optimale correspondante, différentes températures (20°C, 25°C, 30°C, 37°C et 40°C) ont été testées. Les résultats obtenus sont représentés en figure 64.

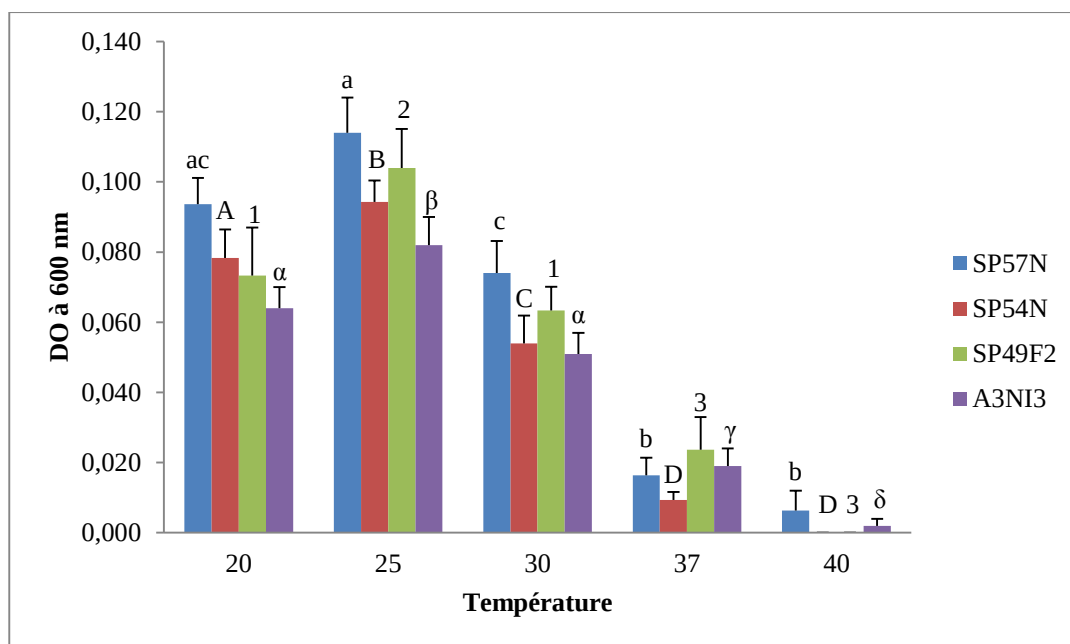


Figure 64 : Effets de la température sur la croissance des quatre souches bactériennes hydrocarbonoclastes sélectionnées en milieu BHSM additionné de 2 % pétrole brut. Les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p < 0,05$).

Les isolats ont la capacité de croître dans une large plage de températures, allant de 20°C à 30°C, avec un taux de croissance optimal à 25°C. Ces résultats sont en accord avec ce de Rouf et *al.* (2011).

De plus, il a été rapporté que dans des conditions contrôlées, la dégradation du diesel et du pétrole brut pouvait aussi bien être effectuée à 25°C, 10°C ou 4°C dans les eaux méditerranéennes (Rodriguez-Blanco et *al.*, 2010).

Le taux de croissance diminue significativement pour les quatre souches à températures 37°C et 40°C. Ainsi, la croissance est nulle à 40°C pour les souches SP54N et SP49F2. Cela a été rapporté également par Deng et *al.* (2014).

8.2. Effets du pH sur la croissance des souches hydrocarbonoclastes sélectionnées

L'effet du pH sur la croissance des souches bactériennes hydrocarbonoclastes sélectionnées est représenté par la figure 65.

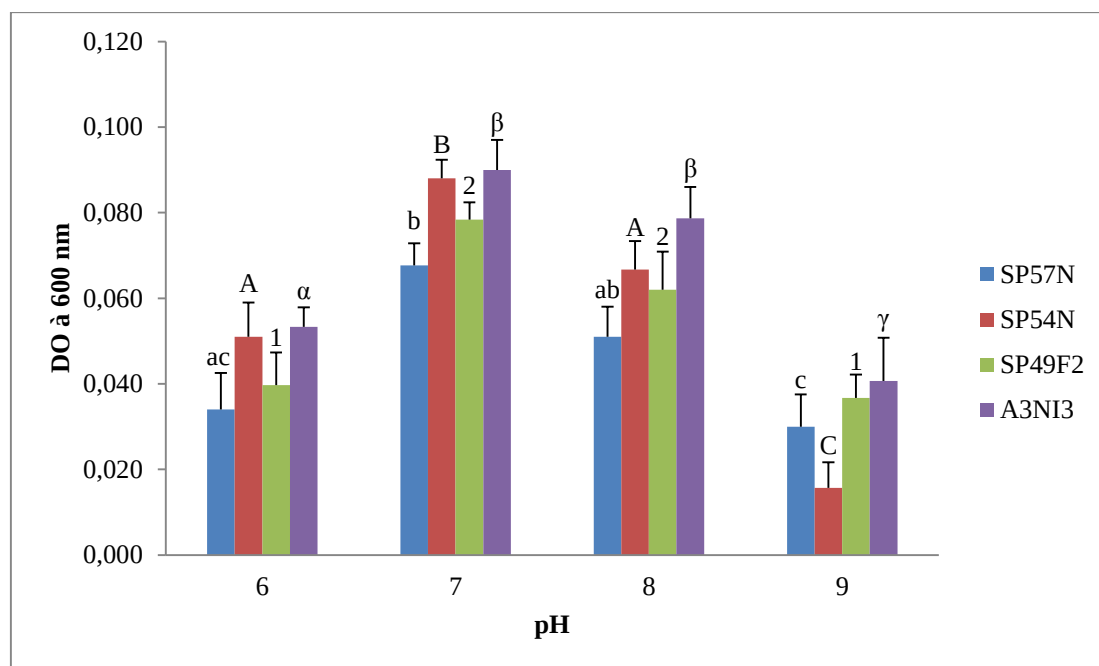


Figure 65 : Effets du pH sur la croissance des quatre souches hydrocarbonoclastes sélectionnées, mise en culture en milieu BHSM additionné de 2% pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie. Les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p < 0,05$).

La croissance optimale des quatre souches bactériennes, en milieu BHSM en présence du pétrole comme seule source de carbone et d'énergie, est observée à pH 7. De plus, ces quatre souches peuvent croître dans un intervalle de pH de 6 à 9 (Fig. 65). Ces résultats sont en accord avec Deng *et al.* (2014). Ainsi, Kumar *et al.*, (2018) ont montré que la dégradation des hydrocarbures par des bactéries isolées du milieu marin est plus importante dans des conditions légèrement basiques. En outre, en milieu marin comme en eau douce, le pH favorable pour la croissance est de 7 à 8 (Vandecasteele, 2005).

Les bactéries sont capables de modifier leurs propriétés en fonction de leur environnement en adaptant leur métabolisme et leur composition membranaire (Kumar *et al.*, 2019). Ainsi, L'étude des conditions optimales de croissance aiderait pour aboutir à une stratégie efficace de bioremédiation (Wang *et al.*, 2013). Le pH dans le milieu bactérien est important puisqu'il

affecte fortement la croissance et le métabolisme bactérien. Par conséquent, l'optimisation des conditions environnementales est très importante pour le perfectionnement de la croissance bactérienne.

8.3. Tolérance des souches sélectionnées au NaCl

Toutes les souches bactériennes (SP57N, SP54N, SP49F2 et A3NI3) présentent un optimum de croissance à concentration 3% en NaCl (m/v), qui correspond à la salinité de l'eau de mer qui est de 37–39.2 ‰ (ou g/Kg) en mer Méditerranées (Effrosynidis et *al.*, 2018), bien qu'à 0 et 6% des croissances intéressantes sont aussi observées (Fig. 66).

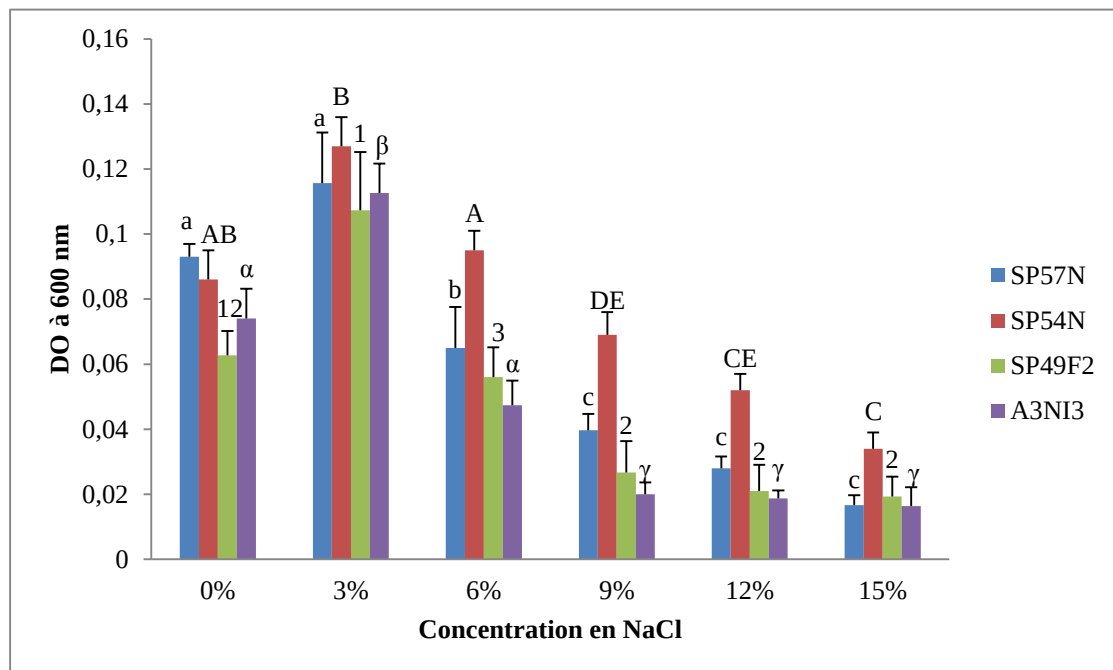


Figure 66 : Effets de la concentration en NaCl sur la croissance des quatre souches hydrocarbonoclastes sélectionnées, mise en culture dans un milieu BHSM additionné de 2 % pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie après incubation pendant 48 h à 25°C. Les histogrammes portant des indices différents sont significativement différents ($p < 0,05$).

Ces résultats concordent avec les travaux de Roder et *al.* (2005), Abou-Elela et *al.* (2010), Daoud et *al.* (2013) et Barbato et *al.* (2019).

9. ETUDE DU POTENTIEL DE DEGRADATION

Cinétiques de croissance des souches bactériennes sélectionnées dans le pétrole brut en cultures simple et en consortium

La variation de biomasse au cours du temps (jour) des quatre souches hydrocarbonoclastes sélectionnées (SP54N, SP57N, A3NI3 et SP59F2), ainsi qu'en consortium (culture mixte contenant les quatre souches simultanément), dans le milieu BHSM en présence du pétrole brut comme seul source de carbone et d'énergie est suivi, en mesurant la concentration microbienne en fonction du temps, ce qui nous a permis de tracer les courbes représentées par la figure 67.

Les quatre souches bactériennes en culture simple et en culture mixte sont cultivées dans 50 ml de milieu BHSM, additionné de 2 % (v/v) de pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie, dans les conditions optimales de croissance (obtenus dans la présente étude), à savoir, pH 7, température 25°C et concentration en NaCl 3 % (m/v). La densité optique à 600 nm est suivie pour évaluer la croissance bactérienne (Kumari et *al.*, 2018).

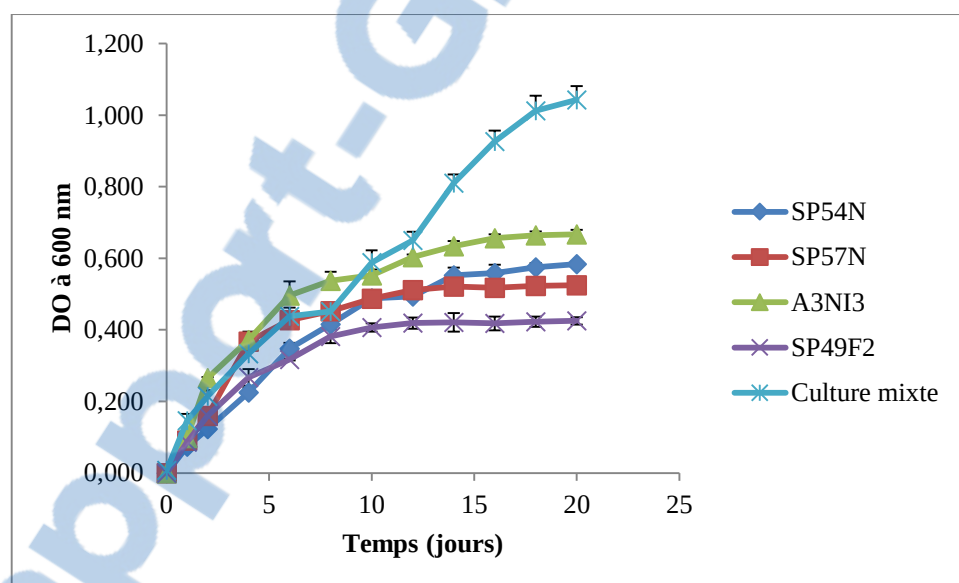


Figure 67 : Cinétiques de croissance des quatre souches bactériennes hydrocarbonoclastes sélectionnées, mise en culture dans un milieu BHSM additionné de 2% pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie, en culture simple et en consortium (culture mixte).

Nous observons l'absence de la phase de latence pour les quatre souches hydrocarbonoclastes sélectionnées (Fig. 67), ce qui démontre une adaptation rapide de ces souches à la source de carbone utilisée (pétrole brut). Selon Atlas et Hazen, (2011), le passage directement à la phase exponentielle exprime la facilité de dégradation des hydrocarbures contenus dans le milieu.

Nous observons également que la concentration microbienne augmente dès le 1^{er} jour d'incubation pour toutes les souches, y compris la culture mixte, jusqu'à atteindre des valeurs maximales. Cette augmentation correspond à la phase exponentielle, phase durant laquelle la dissolution du substrat (pétrole brut) suffit aux besoins métaboliques de la bactérie. D'autre part lorsque la concentration microbienne atteint un certain seuil (croissance maximale), le niveau des exigences nutritionnelles surpassent la vitesse de dissolution du substrat, la biodisponibilité deviendra alors limitante, et la croissance devient linéaire, c'est la phase stationnaire (Dong et *al.*, 2014). Ainsi, Les souches SP54N, SP57N et SP49F2 et A3NI3 atteignent la phase stationnaire respectivement au 14^{ème}, 10^{ème}, 12^{ème} et 16^{ème} jour, alors que et la culture mixte atteint la phase stationnaire au 18^{ème} jour.

Ces résultats confirment que chacune des quatre souches a effectivement la capacité de croître en utilisant le pétrole brut comme unique source de carbone et d'énergie, ce qui témoigne du potentiel de dégradation des hydrocarbures (Fig. 67). Aussi, les quatre souches peuvent croître en consortium dans le pétrole brut (Fig. 67). En conséquence, il apparaît évident que la culture mixte des quatre souches étudiées (SP54N, SP57N, A3NI3 et SP49F2) est la plus biodégradable des hydrocarbures, par le fait d'avoir le taux de croissance le plus significativement important ($DO > 1,053 \pm 0,038$), et donc plus performances et de potentiels pour la bioremédiation. Les cultures mixtes montrent plus d'avantages de dégradation par rapport à la monoculture, y compris la stabilité du consortium, avec une importante adaptation de ces bactéries. Cela signifie une croissance des souches en synergique, avec une co-oxydation des hydrocarbures du pétrole brut. Ces résultats sont en accord avec Crisafi et *al.*, (2016) ; Kumari et *al.*, (2018) ; Obafemi et *al.* (2018) ; Paniagua-Michel et Fathepure (2018). Ainsi, le co-métabolisme joue également un rôle important dans la biodégradation des hydrocarbures et du pétrole (Mc Genity et *al.*, 2012 ; Prince et Walters, 2016 ; Jamal et Pugazhendi, 2018 ; Kumari et *al.*, 2018).

Aussi, Kumari et *al.*, (2018) ont sélectionné des bactéries les plus intéressantes pour la culture en consortium, dont l'espèce *Pseudomonas mendocina*, et *Stenotrophomonas maltophilia* faisaient partie.

Par conséquent, les résultats obtenus dans cette étude précisent que le consortium sélectionné est identifié comme un consortium bactérien qui a le potentiel de dégrader les hydrocarbures contenus dans le pétrole brut.

La membrane cellulaire est la cible principale des dissolvants à effets toxiques tels les

hydrocarbures. Les changements de sa composition jouent un rôle crucial dans le phénomène de la tolérance (Isken et De Bont, 1998). Due à leur tolérance relativement élevée en pétrole brut (jusqu'à 10 %), ces souches hydrocarbonoclastes étudiées indigènes du port d'Oran, parfaitement adaptées à un environnement difficile, sont de bon candidats pour la bioremédiation des hydrocarbures et en particulier les HAPs.

Conclusion et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les sédiments marins du port d'Oran sont fortement contaminés par les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Cette contamination nous a permis de mettre en évidence la présence de bactéries hydrocarbonoclastes potentiellement utilisables en bioremédiation.

Des souches tolérant des concentrations élevées en pétrole brut allant jusqu'à 10 % ont été isolées et caractérisées. L'analyse moléculaire par l'étude d'empreintes génétiques appliquées aux gènes d'ADNr 16 S, ainsi que l'étude du polymorphisme des gènes considérés étudiés par PCR-RFLP, ont permis de mettre en évidence quatre grands groupes bactériens dont nous avons sélectionné les souches les plus performantes représentatives de chaque groupe.

Ainsi, les quatre souches bactériennes sélectionnées ont été identifiées par l'analyse phénotypique et biochimique, et par le séquençage de l'ADNr 16S. Il s'agit de : *Staphylococcus cohnii*, appartenant aux *Bacilli*, et *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas mendocina*, *Acinetobacter johnsonii*, appartenants aux *Gamaprotéobacter*. Ces bactéries sont, en effet, connues pour leur potentiel de biodégradation des HAPs. Les séquences obtenues dans cette étude sont déposées dans la banque de données NCBI/GenBank.

Ces souches bactériennes hydrocarbonoclastes, isolées d'un environnement fortement contaminées par les HAPs, possèdent des systèmes enzymatiques codés par le gène C23O, leur permettant de s'adapter par dégradation de ces substrats et l'utilisation de leur produits comme source de carbone.

Nous avons effectué une caractérisation fonctionnelle des isolats hydrocarbonoclastes sélectionnées par la mise en évidence et la localisation du gène C23O codant pour l'enzyme catéchol 2,3 dioxygénase, l'enzyme clef de la dégradation des hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAPs). Ce gène bien que présent chez les quatre espèces étudiés, est localisé au niveau chromosomique chez *Staphylococcus cohnii* appartenant aux *Bacillia* alors qu'il est plasmidique chez les trois autres espèces appartenant aux *Gamaprotéobacter*. La localisation plasmidique s'avère intéressante dans la mesure qu'elle simplifierait une éventuelle production de cette enzyme par clonage, étude qu'il nous semble intéressante à inscrire en perspective.

Dans ce sens l'étude de l'optimisation de l'activité catéchol 2,3-dioxygénase, de par l'optimisation des conditions physico-chimiques de la croissance des quatre espèces en culture simple ou en consortium a révélé que :

La croissance des bactéries hydrocarbonoclastes est favorisée à un pH variant de 6 à 8 avec un optimum à pH 7 et une température de 25°C. Ces isolats expriment un taux de croissance optimal à 3% de NaCl (m/v) bien qu'y tolérant jusqu'à 15%.

Les cultures simples semblent en effet intéressantes pour la dégradation des HAPs, mais les consortiums bactériens présentent une meilleure croissance, et donc une meilleure activité hydrocarbonoclastes. Cette synergie serait liée à une complémentarité et une coopération métabolique entre les différents microorganismes hydrocarbonoclastes. Ainsi, les microorganismes épurateurs agissent le plus souvent en consortia au sein des environnements pollués, possédant des capacités de dégradation plus importantes que les microorganismes isolés (Kumari et *al.*, 2018; Obafemi et *al.*, 2018; Paniagua-Michel et Fathepure, 2018).

Sur la base de ces résultats il serait intéressant de développer le consortia bactérien autochtone le plus adapté à la bioremédiation in situ sur des parcelles contrôlées au niveau du port d'Oran, en tenant compte des autres polluants tels que les métaux lourds. L'étude écologique de ces fonds marins de par le suivi de la posidonie serait aussi d'un grand intérêt. Des travaux de régénération de cette flore devraient être initiés.

Mais, une bioremédiation ne serait efficace dans le temps, que si elle serait soutenue par des lois réprimant la pollution, et des règles de bonne conduite des usagers du port, et ce en sensibilisant et en se donnant les moyens pour une bonne gouvernance.

Références bibliographiques

A

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107–123. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>
- Abhilash, P. C., Srivastava, S., & Singh, N. (2011). Comparative bioremediation potential of four rhizospheric microbial species against lindane. *Chemosphere*, 82(1), 56–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.10.009>
- Abou-Elela, S. I., Kamel, M. M., & Fawzy, M. E. (2010). Biological treatment of saline wastewater using a salt-tolerant microorganism. *Desalination*, 250(1), 1–5. <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2009.03.022>
- Acosta-González, A., & Marqués, S. (2016). Bacterial diversity in oil-polluted marine coastal sediments. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 24–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.12.010>
- Akbari, S., Abdurahman, N. H., Yunus, R. M., Fayaz, F., & Alara, O. R. (2018). Biosurfactants-a new frontier for social and environmental safety: a mini review. *Biotechnology Research and Innovation*. <https://doi.org/10.1016/j.biori.2018.09.001>
- Aktas, D. F., Sorrell, K. R., Duncan, K. E., Wawrik, B., Callaghan, A. V., & Suflita, J. M. (2017). Anaerobic hydrocarbon biodegradation and biocorrosion of carbon steel in marine environments: The impact of different ultra low sulfur diesels and bioaugmentation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 118, 45–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.12.013>
- Alamgir, A., Khan, M. A., Shaukat, S. S., & Kazmi, J. H. (2018). Impact of indiscriminate disposal of untreated effluents in Korangi creek, Karachi, Pakistan. *Applied Water Science*, 8(6). <http://dx.doi.org/10.1007/s13201-018-0817-4>
- Alegbeleye, O. O., Opeolu, B. O., & Jackson, V. (2016). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds: (acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg rivers, Western Cape, South Africa. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(2), 314–325. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.027>
- Alegbeleye, O. O., Opeolu, B. O., & Jackson, V. A. (2017). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Critical Review of Environmental Occurrence and Bioremediation. *Environmental Management*, 60(4), 758–783. <http://dx.doi.org/10.1007/s00267-017-0896-2>

Alexis Lamiable. (2011) Méthodes de théorie des jeux pour la prédiction de la structure 3D de l'ARN. Thèse Doctorat (PhD). Bio-informatique [q-bio.QM]. Université de Versailles-Saint Quentin en Yveline. Français. tel-00700679.

Alfonso-Gordillo, G., Cristiani-Urbina, E., Flores-Ortiz, C. M., Peralta, H., Cancino-Díaz, J. C., Cruz-Maya, J. A., & Jan-Roblero, J. (2016). *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from gasoline-contaminated soil is capable of degrading methyl tert-butyl ether. *Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 12–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.06.006>

Al-Hawash, A. B., Dragh, M. A., Li, S., Alhujaily, A., Abbood, H. A., Zhang, X., & Ma, F. (2019). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(2), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>

Alloway B.J., & Ayres D.C. (1997). *Chemical Principles of Environmental Pollution*. Blackie Academic and Profesional, an imprint of Chapman and Hall, London, 394.

Aminot A., & Kérouel, R. (2004). *Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses*. Eds. Ifremer, 336.

Andrews, R. J., & Moss, W. N. (2019). Computational approaches for the discovery of splicing regulatory RNA structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.04.007>

Ansari, F. A., Ravindran, B., Gupta, S. K., Nasr, M., Rawat, I., & Bux, F. (2019). Techno-economic estimation of wastewater phycoremediation and environmental benefits using *Scenedesmus obliquus* microalgae. *Journal of Environmental Management*, 240, 293–302. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.03.123>

Aparicio, J. D., Saez, J. M., Raimondo, E. E., Benimeli, C. S., & Polti, M. A. (2018). Comparative study of single and mixed cultures of *actinobacteria* for the bioremediation of co-contaminated matrices. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), 2310–2318. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2018.03.030>

Appolinario, L. R., Tschoeke, D., Paixão, R. V.S., Venas, T., Calegario, G.,... Fabiano, L. (2019). Thompson Metagenomics sheds light on the metabolic repertoire of oil-biodegrading microbes of the South Atlantic Ocean. *Environmental Pollution*. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.007>

Arulazhagan, P., Vasudevan, N., & Yeom, I. T. (2010). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 7(4), 639–652. <https://doi.org/10.1007/BF03326174>

Atlas, R. M., & Hazen, T. C. (2011) Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. *Environmental Science & Technology*, 45(16), 6709–6715. <http://dx.doi.org/10.1021/es2013227>

Ayed, L., Chaieb, K., Cheref, A., & Bakhrouf, A. (2010). Biodegradation and decolorization of triphenylmethane dyes by *Staphylococcus epidermidis*. *Desalination*, 260(1-3), 137–146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2010.04.052>

B

Bäbel, M., & Schreiber, B. C. (2014). Geochemistry of Evaporites and Evolution of Seawater. *Treatise on Geochemistry*, 483–560. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-095975-7.00718-x>

Babu, A.G., Reja, S.I., Akhtar, N., Sultana, M., Deore ,P.S., & Ali, F.I. (2019). *Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): Current Practices and Outlook*. In: Arora P. (eds) *Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds. Microorganisms for Sustainability*, Springer, Singapor. 10. <http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-7462-3>

Baek, G., Kim, J., & Lee, C. (2019). A review of the effects of iron compounds on methanogenesis in anaerobic environments. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 113, 109282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2019.109282>

Bahmani, N., Mirnejad, R., Arabestani, M. R., Mohajerie, P., Hashemi, S. H., Karami, M., & Alikhani, M. Y. (2017). Comparison of PCR-RFLP and PFGE for determining the clonality of *Brucella* isolates from human and livestock specimens. *Saudi Journal of Biological Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.08.017>

Barbato, M., Mapelli, F., Crotti, E., Daffonchio, D., & Borin, S. (2019). Cultivable hydrocarbon degrading bacteria have low phylogenetic diversity but highly versatile functional potential. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 142, 43–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.04.012>

Barman, S. R., Banerjee, P., Mukhopadhyay, A., & Das, P. (2017). Biodegradation of acenaphthene and naphthalene by *Pseudomonas mendocina* : Process optimization, and toxicity

- evaluation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(5), 4803–4812. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.09.012>
- Bartilson, M., & Shingler, V. (1989). Nucleotide sequence and expression of the catechol 2,3-dioxygenase-encoding gene of phenolcatabolizing *Pseudomonas* CF600. *Gene*, 85(1), 233–238. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90487-3](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(89)90487-3)
- Batten, S. D., Raitos, D. E., Danielson, S., Hopcroft, R., Coyle, K., & McQuatters-Gollop, A. (2018). Interannual variability in lower trophic levels on the Alaskan Shelf. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 147, 58–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2017.04.023>
- Beghalem, H., Aliliche, K., Chriki, A., & Landoulsi, A. (2017). Molecular and phenotypic characterization of endophytic bacteria isolated from sulla nodules. *Microbial Pathogenesis*, 111, 225–231. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.08.049>
- Behera, B. K., Das, A., Sarkar, D. J., Weerathunge, P., Parida, P. K., Das, B. K., ... Bansal, V. (2018). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in inland aquatic ecosystems: Perils and remedies through biosensors and bioremediation. *Environmental Pollution*, 241, 212–233. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.05.016>
- Benali, I., Boutiba, Z., Merabet, A., & Chèvre, N. (2015). Integrated use of biomarkers and condition indices in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for monitoring pollution and development of biomarker index to assess the potential toxic of coastal sites. *Marine Pollution Bulletin*, 95(1), 385–394. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.03.041>
- Benali, I., Boutiba, Z., Grandjean, D., de Alencastro, L. F., Rouane-Hacene, O., & Chèvre, N. (2017). Spatial distribution and biological effects of trace metals (Cu, Zn, Pb, Cd) and organic micropollutants (PCBs, PAHs) in mussels *Mytilus galloprovincialis* along the Algerian west coast. *Marine Pollution Bulletin*, 115(1-2), 539–550. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.028>
- Benali, I., Boutiba, Z., Grandjean, D., de Alencastro, L. F., Rouane-Hacene, O., & Chèvre, N. (2017). Spatial distribution and biological effects of trace metals (Cu, Zn, Pb, Cd) and organic micropollutants (PCBs, PAHs) in mussels *Mytilus galloprovincialis* along the Algerian west coast. *Marine Pollution Bulletin*, 115(1-2), 539–550. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.12.028>

- Ben-Ghnaya, A., Charles, G., Hourmant, A., Ben Hamida, J., & Branchard, M. (2009). Physiological behaviour of four rapeseed cultivar (*Brassica napus* L.) submitted to metal stress. *Comptes Rendus Biologies*, 332(4), 363–370. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.12.001>
- Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, 27(3), 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>
- Belles, A., Alary, C., Mamindy-Pajany, Y., & Abriak, N.-E. (2016). Relationship between the water-exchangeable fraction of PAH and the organic matter composition of sediments. *Environmental Pollution*, 219, 512–518. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.05.077>
- Berardi, C., Fibbi, D., Coppini, E., Renai, L., Caprini, C., Scordo, C. V. A., ... Del Bubba, M. (2019). Removal efficiency and mass balance of polycyclic aromatic hydrocarbons, phthalates, ethoxylated alkylphenols and alkylphenols in a mixed textile-domestic wastewater treatment plant. *Science of The Total Environment*, 674, 36–48. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.096>
- Bertin, P. N., Heinrich-Salmeron, A., Pelletier, E., Goulhen-Chollet, F., Arsène-Ploetze, F., Gallien, S., ... Le Paslier, D. (2011). Metabolic diversity among main microorganisms inside an arsenic-rich ecosystem revealed by meta- and proteo-genomics. *The ISME Journal*, 5(11), 1735–1747. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.51>
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports*, 7(1). <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8>
- Bertrand, J.C., & 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., Microorganismes dans les écosystèmes océaniques, Chapitre 13. Eds. Masson, Paris. 85, 343.
- Bhattacharya, A., & Gupta, A. (2013). Evaluation of *Acinetobacter* sp. B9 for Cr (VI) resistance and detoxification with potential application in bioremediation of heavy-metals-rich industrial wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(9), 6628–6637. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1728-4>

- Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T. A. P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., & Schwede, T. (2016). The SWISS-MODEL Repository-new features and functionality. *Nucleic Acids Research*, 45(D1), D313–D319. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>
- Biggar, K. W. (2008). Effect of salt on aerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated groundwater. *Biodegradation*, 20(1), 27–38. <https://doi.org/10.1007/s10532-008-9196-0>
- Boboye B., Olukunle O. F., & Adetuyi F.C. (2010). Degradative activity of bacteria isolated from hydrocarbon-polluted site in Ilaje, Ondo State, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, 4(23): 2484- 2491.
- Bon, M. (2009). Prediction de structures secondaires d'ARN avec pseudo-noeuds. Life Sciences [q-bio]. Thèse Doctorat (PhD). Ecole Polytechnique X, English. pastel-00005806.
- Boopathy, R. (2017). Anaerobic Degradation of Petroleum Hydrocarbons in Sediments. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 475–490. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63664-5.00020-4>
- Bordenave, S., Goni-Urriza, M. S., Caumette, P., & Duran, R. (2007). Effects of Heavy Fuel Oil on the Bacterial Community Structure of a Pristine Microbial Mat. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(19), 6089–6097. <https://doi.org/10.1128/aem.01352-07>
- Bouloubassi, I., Méjanelle, L., Pete, R., Fillaux, J., Lorre, A., & Point, V. (2006). PAH transport by sinking particles in the open Mediterranean Sea: A 1 year sediment trap study. *Marine Pollution Bulletin*, 52(5), 560–571. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.10.003>
- Boutiba, Z., Taleb, Z., Abi-Ayad, S.-M. E.-A. (2003). *Etat de la pollution marine de la cote oranaise*. Eds. Dar El Gharb. Algeria, 69.
- Bovio, E., Gnani, G., Prigione, V., Spina, F., Denaro, R., Yakimov, M., ... Varese, G. C. (2017). The culturable mycobiota of a Mediterranean marine site after an oil spill: isolation, identification and potential application in bioremediation. *Science of The Total Environment*, 576, 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.064>
- Bremond R., & Vuichard R. (1973). *Paramètres de la qualité des eaux*, OSPEPE, Paris.
- Buform, E., Coca, P., Bezzeghoud, M., Udías, A., Bouhadad, Y., & Mattesini, M. (2019). The destructive 1790 Oran (NW Algeria) earthquake in a region of low seismicity. *Tectonophysics*. <https://doi.org/10.1016/j.tecto.2019.03.008>

C

- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., & Budzinski, H. (2007). Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïda, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere*, 70(2), 270–280. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.095>
- Callender E. (2003). *Heavy Metals in the Environment-Historical Trends*. In: B.S. Lollar (Ed.), *Environmental Geochemistry. Treatise on Geochemistry*. Elsevier-Pergamon, Oxford, 67-105. <https://doi.org/10.1016/b0-08-043751-6/09161-1>
- Callender, E. (2014). Heavy Metals in the Environment – Historical Trends. *Treatise on Geochemistry*, 59–89. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-095975-7.00903-7>
- Calvayrac C (2011). Dégradation biologique de la sulcotrione dans un sol agricole : recherche d’une éventuelle biodégradation accélérée et caractérisation de souches bactériennes potentiellement dégradantes. Thèse Doctorat (PhD). Université de Perpignan Via Domitia.
- Cerro-Gálvez, E., Sala, M. M., Marrasé, C., Gasol, J. M., Dachs, J., & Vila-Costa, M. (2019). Modulation of microbial growth and enzymatic activities in the marine environment due to exposure to organic contaminants of emerging concern and hydrocarbons. *Science of The Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.361>
- CGDD-SOeS (Commissariat général au développement durable - Service de l’observation et des statistiques). (2011). *Environnement littoral et marin*. Monographie, 164.
- Chaerun, S. K., Tazaki, K., Asada, R., & Kogure, K. (2004). Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. *Environment International*, 30(7), 911–922. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2004.02.007>
- Chang, C.-H., Lee, J., Ko, B.-G., Kim, S.-K., & Chang, J.-S. (2011). *Staphylococcus* sp. KW-07 contains *nahH* gene encoding catechol 2,3-dioxygenase for phenanthrene degradation and a test in soil microcosm. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 198–203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.11.003>
- Chang, Y., Siddens, L. K., Heine, L. K., Sampson, D. A., Yu, Z., Fischer, K. A., ... Tilton, S. C. (2019). Comparative mechanisms of PAH toxicity by benzo[a]pyrene and dibenzo[def,p]chrysene in primary human bronchial epithelial cells cultured at air-liquid

- interface. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 379, 114644.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2019.114644>
- Chatzinikolaou, E., Mandalakis, M., Damianidis, P., Dailianis, T., Gambineri, S., Rossano, C., ... Arvanitidis, C. (2018). Spatio-temporal benthic biodiversity patterns and pollution pressure in three Mediterranean touristic ports. *Science of The Total Environment*, 624, 648–660. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.111>
- Chebbi, A., Hentati, D., Zaghdien, H., Baccar, N., Rezgui, F., Chalbi, M., ... Chamkha, M. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 122, 128–140.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.05.006>
- Chen, X., He, S., Liu, X., & Hu, J. (2018). Biodegradation and metabolic mechanism of cyprodinil by strain *Acinetobacter* sp. from a contaminated-agricultural soil in China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 159, 190–197.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.047>
- Chen, B., Ye, X., Zhang, B., Jing, L., & Lee, K. (2019). Marine Oil Spills—Preparedness and Countermeasures. *World Seas: An Environmental Evaluation*, 407–426.
<http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-805052-1.00025-5>
- Chmagh, A. A., & Abd Al-Abbas, M. J. (2019). PCR-RFLP by AluI for coa gene of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from burn wounds, pneumonia and otitis media. *Gene Reports*, 15, 100390. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2019.100390>
- Clark C.G. (1997). Ribotyping: a general tool for the study of genetic diversity in microorganisms. *The Journal of Eukaryote Microbiology*, 44, 277–283.
<https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1997.tb05667.x>
- CNUCED, (2016). Étude sur les transports maritimes. Conférence des nations unies sur le commerce et le développement (CNUCED). UNCTAD/RMT.
- Cojan I., & Renard M. (1997). *Sédimentologie*. Eds Dunod, Paris, 2^{ème} édition, collection Sciences Sup., 481.
- Costas, M., Mehn, M. P., Jensen, M. P., & Que, L. (2004). Dioxygen Activation at Mononuclear Nonheme Iron Active Sites: Enzymes, Models, and Intermediates. *Chemical Reviews*, 104(2), 939–986. <https://doi.org/10.1021/cr020628n>

Crisafi, F., Giuliano, L., Yakimov, M. M., Azzaro, M., & Denaro, R. (2016). Isolation and degradation potential of a cold-adapted oil/PAH-degrading marine bacterial consortium from Kongsfjorden (Arctic region). *Rendiconti Lincei*, 27(S1), 261–270. <https://doi.org/10.1007/s12210-016-0550-6>

D

Dachs, J., Bayona, J. M., Raoux, C., & Albaigés, J. (1997). Spatial, Vertical Distribution and Budget of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Western Mediterranean Seawater. *Environmental Science & Technology*, 31(3), 682–688. <https://doi.org/10.1021/es960233j>

Daffonchio, D., Ferrer, M., Mapelli, F., Cherif, A., Lafraya, Á., Malkawi, H. I., ... Fava, F. (2013). Bioremediation of Southern Mediterranean oil polluted sites comes of age. *New Biotechnology*, 30(6), 743–748. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.05.006>

Dai, Y., Zhang, N., Xing, C., Cui, Q., & Sun, Q. (2019). The adsorption, regeneration and engineering applications of biochar for removal organic pollutants: A review. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.161>

Dans, P. D., Gallego, D., Balaceanu, A., Darré, L., Gómez, H., & Orozco, M. (2018). Modeling, Simulations, and Bioinformatics at the Service of RNA Structure. *Chem*. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2018.09.015>

Daoud, L., Kamoun, J., Ali, M. B., Jallouli, R., Bradai, R., Mechichi, T., ... Aloulou, A. (2013). Purification and biochemical characterization of a halotolerant *Staphylococcus* sp. extracellular lipase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57, 232–237. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.03.018>

Dashti, N., Ali, N., Khanafer, M., & Radwan, S. S. (2017). Oil uptake by plant-based sorbents and its biodegradation by their naturally associated microorganisms. *Environmental Pollution*, 227, 468–475. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.089>

Dell'Anno, F., Sansone, C., Ianora, A., & Dell'Anno, A. (2018). Biosurfactant-induced remediation of contaminated marine sediments: Current knowledge and future perspectives. *Marine Environmental Research*, 137, 196–205. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.03.010>

Deng, M.-C., Li, J., Liang, F.-R., Yi, M., Xu, X.-M., Yuan, J.-P., ... Wang, J.-H. (2014). Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter*

- sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. *Marine Pollution Bulletin*, 83(1), 79–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.04.018>
- De Orte, M. R., Bonnail, E., Sarmiento, A. M., Bautista-Chamizo, E., Basallote, M. D., Riba, I., ... Nieto, J. M. (2018). Metal fractionation in marine sediments acidified by enrichment of CO₂: A risk assessment. *Marine Pollution Bulletin*, 131, 611–619. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.04.072>
- De Sousa, B. G., Oliveira, J. I. N., Albuquerque, E. L., Fulco, U. L., Amaro, V. E., & Blaha, C. A. G. (2017). Molecular modelling and quantum biochemistry computations of a naturally occurring bioremediation enzyme: Alkane hydroxylase from *Pseudomonas putida* P1. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 77, 232–239. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.08.021>
- Devi, J. M. (2017). Simulation studies on structural and thermal properties of alkane thiol capped gold nanoparticles. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 74, 359–365. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.03.023>
- De Villers J., Squilbin M. & Yourassowsky C. (2005). *Qualité physicochimique et chimique des eaux de surface*. Institut Bruxellois pour la gestion de l'environnement (IBGE).
- Dong, W., Jiang, S., Shi, K., Wang, F., Li, S., Zhou, J., ... Cui, Z. (2015). Biodegradation of fenoxaprop- P -ethyl (FE) by *Acinetobacter* sp. strain DL-2 and cloning of FE hydrolase gene *afeH*. *Bioresource Technology*, 186, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.039>
- Donnier B. (2007). *Pollution chimique en Méditerranée*. CERBOM (INSERM). Nice.
- Drira, Z., Kmiha-Megdiche, S., Sahnoun, H., Hammami, A., Allouche, N., Tedetti, M., & Ayadi, H. (2016). Assessment of anthropogenic inputs in the surface waters of the southern coastal area of Sfax during spring (Tunisia, Southern Mediterranean Sea). *Marine Pollution Bulletin*, 104(1-2), 355–363. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.035>
- Drwal, E., Rak, A., & Gregoraszczuk, E. L. (2019). Review: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) - action on placental function and health risks in future life of newborns. *Toxicology*, 411, 133–142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2018.10.003>

E

- Ebrahimi, P., Kaur, S., Baronti, L., Petzold, K., & Chen, A. A. (2019). A two-dimensional Replica-Exchange Molecular Dynamics method for simulating RNA folding using sparse experimental restraints. *Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.05.001>
- Eddouaouda, K., Mnif, S., Badis, A., Younes, S. B., Cherif, S., Ferhat, S., ... Sayadi, S. (2011). Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. *Journal of Basic Microbiology*, 52(4), 408–418. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100268>
- EEA, (2006). Priority issues in the Mediterranean environment. European Environment Agency Report N° 4/2006, Copenhagen, 88.
- Effrosynidis, D., Arampatzis, A., & Sylaios, G. (2018). Seagrass detection in the mediterranean: A supervised learning approach. *Ecological Informatics*, 48, 158–170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoinf.2018.09.004>
- Elmorsi, R. R., Abou-El-Sherbini, K. S., Mostafa G. A.-H., & Hamed. M. A. (2019). Distribution of essential heavy metals in the aquatic ecosystem of Lake Manzala, Egypt. *Heliyon*, 5(8), e02276. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02276>
- Eronat, A. H., Bengil, F., & Neşer, G. (2019). Shipping and ship recycling related oil pollution detection in Çandarlı Bay (Turkey) using satellite monitoring. *Ocean Engineering*, 187, 106157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oceaneng.2019.106157>

F

- Fang, X., Mestdagh, S., Ysebaert, T., Moens, T., Soetaert, K., & Van Colen, C. (2019). Spatio-temporal variation in sediment ecosystem processes and roles of key biota in the Scheldt estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.04.001>
- Fang, y., Zhang, l., Wang, j., Zhou, y., & Ye, b. (2017). Biodegradation of Phthalate Esters by a Newly Isolated *Acinetobacter* sp. Strain LMB-5 and Characteristics of Its Esterase. *Pedosphere*, 27(3), 606–615. [https://doi.org/10.1016/s1002-0160\(17\)60355-2](https://doi.org/10.1016/s1002-0160(17)60355-2)
- Fang, Z., Zhang, J., Liu, B., Du, G., & Chen, J. (2013). Biochemical characterization of three keratinolytic enzymes from *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1 for biodegrading keratin

wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 82, 166–172.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.03.008>

Feknous, N., Branes, Z., Rouabhia, K., Batisson, I., & Amblard, C. (2017). Isolation characterization and growth of locally isolated hydrocarbonoclastic marine bacteria (eastern Algerian coast). *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(2).
<http://dx.doi.org/10.1007/s10661-016-5758-5>

Ferrari, V. B., Cesar, A., Cayô, R., Choueri, R. B., Okamoto, D. N., Freitas, J. G., ... de Vasconcellos, S. P. (2019). Hexadecane biodegradation of high efficiency by bacterial isolates from Santos Basin sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 142, 309–314.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.050>

Ferreira, M. M. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbons: a QSPR study. *Chemosphere*, 44(2), 125–146. [http://dx.doi.org/10.1016/s0045-6535\(00\)00275-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0045-6535(00)00275-7)

Fisher S.W. (1995). Mechanisms of bioaccumulation in aquatic systems. *Environmental Contamination and Toxicology*. 142, 87-117.

G

Gachanja, A. N., & Maritim, P. K. (2018). *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-Determination*. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Eds. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14107-1>

Galgani, F., Martínez-Gómez, C., Giovanardi, F., Romanelli, G., Caixach, J., Cento, A., ... Andral, B. (2010). Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from the Western basin of the Mediterranean Sea. *Environmental Monitoring and Assessment*, 172(1-4), 301–317. <http://dx.doi.org/10.1007/s10661-010-1335-5>

Ganesh Kumar, A., Nivedha Rajan, N., Kirubakaran, R., & Dharani, G. (2019). Biodegradation of crude oil using self-immobilized hydrocarbonoclastic deep sea bacterial consortium. *Marine Pollution Bulletin*, 146, 741–750.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.07.006>

Gao, S., Seo, J.-S., Wang, J., Keum, Y.-S., Li, J., & Li, Q. X. (2013). Multiple degradation pathways of phenanthrene by *Stenotrophomonas maltophilia* C6. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 79, 98–104.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.01.012>

- García-Florentino, C., Maguregui, M., Morillas, H., Marcaida, I., Salcedo, I., & Madariaga, J. M. (2018). Trentepohlia algae biofilms as bioindicator of atmospheric metal pollution. *Science of The Total Environment*, 626, 441–450. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.096>
- Garcia-Pineda, O., MacDonald, I., Silva, M., Shedd, W., Daneshgar Asl, S., & Schumaker, B. (2016). Transience and persistence of natural hydrocarbon seepage in Mississippi Canyon, Gulf of Mexico. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 129, 119–129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2015.05.011>
- George, K. W., & Hay, A. G. (2011). Bacterial Strategies for Growth on Aromatic Compounds. *Advances in Applied Microbiology*, 1–33. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-387022-3.00005-7>
- Gherras Touahri, H., Boutiba, Z., Benguedda, W., & Shaposhnikov, S. (2016). Active biomonitoring of mussels *Mytilus galloprovincialis* with integrated use of micronucleus assay and physiological indices to assess harbor pollution. *Marine Pollution Bulletin*, 110(1), 52–64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.029>
- Ghiglione, J. F. (2012). Biodiversité bactérienne en milieu pélagique. Influence des facteurs environnementaux et rôle dans le cycle du carbone. Mémoire d'Habilitation à diriger des recherches de l'Université Pierre et Marie Curie, Ecologie microbienne, 84.
- Ghiara, H., & Caminati, M. (2017). Maritime and logistics advanced producer services within the Mediterranean : the liner shipping companies' positioning strategies in new market areas. *Transportation Research Procedia*, 25, 165–186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trpro.2017.05.388>
- Ghorbannezhad, H., Moghimi, H., & Dastgheib, S. M. M. (2018). Evaluation of heavy petroleum degradation using bacterial-fungal mixed cultures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 164, 434–439. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.046>
- Ghosh, S., Qureshi, A., & Purohit, H. J. (2017). Enhanced expression of catechol 1,2 dioxygenase gene in biofilm forming *Pseudomonas mendocina* EGD-AQ5 under increasing benzoate stress. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 118, 57–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.01.019>
- Giovanella, P., Vieira, G. A. L., Ramos Otero, I. V., Pellizzer, E., de Jesus Fontes, B., & Sette, L. D. (2019). Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile

microorganisms. *Journal of Hazardous Materials*, 121024.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121024>

Glouzon, J.P.S. (2017). Exploration des structures secondaires de l'ARN. Thèse Doctorat (PhD). Faculté des sciences université de sherbrooke, Québec, Canada.

Gomes, M. B., Gonzales-Limache, E. E., Sousa, S. T. P., Dellagnezze, B. M., Sartoratto, A., Silva, L. C. F., ... Oliveira, V. M. (2018). Exploring the potential of halophilic bacteria from oil terminal environments for biosurfactant production and hydrocarbon degradation under high-salinity conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 231–242.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.08.014>

Gong, Y., Zhao, X., Cai, Z., O'Reilly, S. E., Hao, X., & Zhao, D. (2014). A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: Influence on the fate, transport and remediation of oil spills. *Marine Pollution Bulletin*, 79(1-2), 16–33.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.024>

González-Fuenzalida, R. A., Herráez-Hernández, R., Verdú-Andrés, J., Bouzas-Blanco, A., Seco-Torrecillas, A., & Campíns-Falcó, P. (2019). Establishing the occurrence and profile of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediments: The eastern Mediterranean coast of Spain as a case study. *Marine Pollution Bulletin*, 142, 206–215.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.03.042>

Gonzalez, S. V., Johnston, E., Gribben, P. E., & Dafforn, K. (2019). The application of bioturbators for aquatic bioremediation: Review and meta-analysis. *Environmental Pollution*, 250, 426–436. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.023>

Greay, T. L., Gofton, A. W., Zahedi, A., Paparini, A., Linge, K. L., Joll, C. A., & Ryan, U. M. (2019). Evaluation of 16S next-generation sequencing of hypervariable region 4 in wastewater samples: An unsuitable approach for bacterial enteric pathogen identification. *Science of The Total Environment*, 670, 1111–1124.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.278>

Grimes, S., & Bakalem, A. (1993). *La pollution en milieu portuaire : les peuplements macrobenthiques du port de Skikda (Algérie)*. Worksho 'Circulation des eaux et pollution des côtes méditerranéennes des pays du Maghreb'. Rabat 9-11 Nov. 1992, Eds. INOC Izmir (Turquie), 195-202.

- Grimes, S., & Boudjakdji, M., (1996). La pollution en milieu portuaire. Notes préliminaires sur l'impact de la pollution industrielle et domestique sur le *macrozoobenthos* du port d'Oran (Algérie). Environnement côtier. Actes colloques, A.R.C.E (Oran) 16-17, Décembre 1996. 79-91.
- Grimes, S. (2003). Bilan et Diagnostic National de la pollution marine de la côte algérienne liée à des activités menées à terre. Programme d'actions stratégiques (PAS) destiné à combattre la pollution due à des activités menées à terre et de sa stratégie opérationnelle. Rapport PAM/PAS MED/MEDPOL.
- Grimes, S. (2005). Stratégie opérationnelle GIZC en Algérie. Rapport Metap/Banque Mondiale/Mate.
- Grimes, S., Ruellet, T., Dauvin, J.-C., & Boutiba, Z. (2010). Ecological Quality Status of the soft-bottom communities on the algerian coast: General patterns and diagnosis. *Marine Pollution Bulletin*, 60(11), 1969–1977. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.032>
- Grung, M., Petersen, K., Fjeld, E., Allan, I., Christensen, J. H., Malmqvist, L. M. V., ... Ranneklev, S. (2016). PAH related effects on fish in sedimentation ponds for road runoff and potential transfer of PAHs from sediment to biota. *Science of The Total Environment*, 566-567, 1309–1317. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.191>
- Gu, Y.-G., & Gao, Y.-P. (2019). An unconstrained ordination- and GIS-based approach for identifying anthropogenic sources of heavy metal pollution in marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 146, 100–105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.06.008>
- Guex, N., Peitsch, M. C., & Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis*, 30(S1), S162–S173. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200900140>
- Guiraud, J.P. (2003). *Microbiologie alimentaire*. Eds. Dunod. Paris, 89.
- Gupta, P. K., Ranjan, S., & Gupta, S. K. (2019). Phycoremediation of Petroleum Hydrocarbon-Polluted Sites: Application, Challenges, and Future Prospects. Application of Microalgae in Wastewater Treatment, 145–162. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-13913-1_8
- Gwaltney-Brant, S. (2019). *Immunotoxicity Biomarkers*. *Biomarkers In: Toxicology*, 413–425. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-814655-2.00024-4>

H

Haddou, A. (2017). Contamination des sédiments marins superficiels de la baie d'Oran par les métaux lourds et application au laboratoire de bioessais sur la toxicité potentielle d'un sédiment marin sur un outil biologique. Thèse Doctorat en Biologie (PhD). Sciences de l'environnement. Oran, Algérie.

Hänichen, P., Bender, A., Voß, B., Gambaryan-Roisman, T., & Stephan, P. (2019). Drop evaporation of hydrocarbon fluids with deposit formation. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 128, 115–124. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheatmasstransfer.2018.08.102>

Hanson, K. G., Nigam, A., Kapadia, M., & Desai, A. J. (1997). News & Notes: Bioremediation of Crude Oil Contamination with *Acinetobacter* sp. A3. *Current Microbiology*, 35(3), 191–193. <http://dx.doi.org/10.1007/s002849900237>

Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>

Harrison, W., Winnik, M. A., Kwong, P. T. Y., & Mackay, D. (1975). Crude oil spills. Disappearance of aromatic and aliphatic components from small sea-surface slicks. *Environmental Science & Technology*, 9(3), 231–234. <https://doi.org/10.1021/es60101a006>

Hassan, H. A., & Aly, A. A. (2018). Isolation and characterization of three novel catechol 2,3-dioxygenase from three novel haloalkaliphilic BTEX-degrading *Pseudomonas* strains. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 1107–1114. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.113>

Hassanshahian, M., & Boroujeni, N. A. (2016). Enrichment and identification of naphthalene-degrading bacteria from the Persian Gulf. *Marine Pollution Bulletin*, 107(1), 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.04.020>

Hays, S. G., Patrick, W. G., Ziesack, M., Oxman, N., & Silver, P. A. (2015). Better together: engineering and application of microbial symbioses. *Current Opinion in Biotechnology*, 36, 40–49. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.008>

Hazen, T. C., Dubinsky, E. A., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Piceno, Y. M., Singh, N., ... Mason, O. U. (2010). Deep-Sea Oil Plume Enriches Indigenous Oil-Degrading Bacteria. *Science*, 330(6001), 204–208. <https://doi.org/10.1126/science.1195979>

- Heinaru, E., Truu, J., Stottmeister, U., & Heinaru, A. (2000). Three types of phenol and p-cresol catabolism in phenol- and p-cresol-degrading bacteria isolated from river water continuously polluted with phenolic compounds. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(3), 195–205. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00684.x>
- Heuer, H., Hartung, K., Wieland, G., Kramer, I., & Smalla, K. (1999). Polynucleotide Probes That Target a Hypervariable Region of 16S rRNA Genes To Identify Bacterial Isolates Corresponding to Bands of Community Fingerprints. *Applied Environmental Microbiology*, 65(3), 1045-1049.
- Hii, Y. S., Law, A. T., Shazili, N. A. M., Abdul-Rashid, M. K., & Lee, C. W. (2009). Biodegradation of Tapis blended crude oil in marine sediment by a consortium of symbiotic bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63(2), 142–150. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.08.003>
- Hofacker, I. L. (2014). *Energy-Directed RNA Structure Prediction*. *RNA Sequence, Structure, and Function: Computational and Bioinformatic Methods*, 1097, 71–84. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-709-9_4
- Hofacker, I. L., & Lorenz, R. (2013). *Predicting RNA Structure: Advances and Limitations*. *RNA Folding*, 1–19. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-667-2>
- Holt, S.G., Kriey, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. & Williams, S.T. (1998). *Bergey's Manual of determination for Bacteriology*. Williams and Wilkins, New York.
- Hu, C., Dong, J., Gao, L., Yang, X., Wang, Z., & Zhang, X. (2019). Macrobenthos functional trait responses to heavy metal pollution gradients in a temperate lagoon. *Environmental Pollution*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.117>
- Huang, H., Bowler, B. F. J., Oldenburg, T. B. P., & Larter, S. R. (2004). The effect of biodegradation on polycyclic aromatic hydrocarbons in reservoired oils from the Liaohe basin, NE China. *Organic Geochemistry*, 35(11-12), 1619–1634. <http://dx.doi.org/10.1016/j.orggeochem.2004.05.009>
- Hsieh, H.-Y., Huang, K.-C., Cheng, J.-O., Lo, W.-T., Meng, P.-J., & Ko, F.-C. (2019). Environmental effects on the bioaccumulation of PAHs in marine zooplankton in Gaoping coastal waters, Taiwan: Concentration, distribution, profile, and sources. *Marine Pollution Bulletin*, 144, 68–78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.04.048>

I

Ifegwu, O. C., & Anyakora, C. (2015). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Advances in Clinical Chemistry*, 277–304. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.08.001>

IFREMER, 2002. *La surveillance des rejets urbains en Méditerranée*. Guide méthodologique.

Isken, S., & de Bont, J. A. M. (1998). Bacteria tolerant to organic solvents. *Extremophiles*, 2(3), 229–238. <https://doi.org/10.1007/s007920050065>

Islas-Flores, C., Buenrostrogonzalez, E., & Liragaleana, C. (2006). Fractionation of petroleum resins by normal and reverse phase liquid chromatography. *Fuel*, 85(12-13), 1842–1850. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.02.007>

Iwakiri, J., & Asai, K. (2018). *RNA Structure Prediction*. Reference Module in Life Sciences. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.20286-0>

Iwano, S., Ichikawa, M., Takizawa, S., Hashimoto, H., & Miyamoto, Y. (2010). Identification of AhR-regulated genes involved in PAH-induced immunotoxicity using a highly-sensitive DNA chip, 3D-Gene™ Human Immunity and Metabolic Syndrome 9k. *Toxicology in Vitro*, 24(1), 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.08.030>

J

Jacquot, F., Le Dréau, Y., Doumenq, P., Munoz, D., Guiliano, M., Imbert, G., & Mille, G. (1999). The origins of hydrocarbons trapped in the lake of berre sediments. *Chemosphere*, 39(9), 1407–1419. [https://doi.org/10.1016/s0045-6535\(99\)00043-0](https://doi.org/10.1016/s0045-6535(99)00043-0)

Jadeja, N. B., Moharir, P., & Kapley, A. (2018). Genome Sequencing and Analysis of Strains *Bacillus* sp. AKBS9 and *Acinetobacter* sp. AKBS16 for Biosurfactant Production and Bioremediation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2828-x>

Jafarinejad, S. (2017). Oil-Spill Response. *Petroleum Waste Treatment and Pollution Control*, 117–148. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809243-9.00004-3>

Jamal, M. T., & Pugazhendi, A. (2018). Degradation of petroleum hydrocarbons and treatment of refinery wastewater under saline condition by a halophilic bacterial consortium enriched from marine environment (Red Sea), Jeddah, Saudi Arabia. *3 Biotech*, 8(6). <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1296-x>

- Jarmoskaite, I., Denny, S. K., Vaidyanathan, P. P., Becker, W. R., Andreasson, J. O. L., Layton, C. J., ... Herschlag, D. (2019). A Quantitative and Predictive Model for RNA Binding by Human Pumilio Proteins. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.012>
- Jiang, X., Tian, L., Ma, Y., & Ji, R. (2019). Quantifying the bioaccumulation of nanoplastics and PAHs in the clamworm *Perinereis aibuhitensis*. *Science of The Total Environment*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.227>
- Jiang, Y., Qi, H., Zhang, X., & Chen, G. (2012). Inorganic impurity removal from waste oil and wash-down water by *Acinetobacter johnsonii*. *Journal of Hazardous Materials*, 239-240, 289–293. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.08.076>
- Jiang, Y., Zhang, Z., & Zhang, X. (2018). Co-biodegradation of pyrene and other PAHs by the bacterium *Acinetobacter johnsonii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 465–470. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.065>
- Jimoh, A. A., & Lin, J. (2019). Biosurfactant: A new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 184, 109607. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109607>
- Jin, H. M., Choi, E. J., & Jeon, C. O. (2013). Isolation of a BTEX-degrading bacterium, *Janibacter* sp. SB2, from a sea-tidal flat and optimization of biodegradation conditions. *Bioresource Technology*, 145, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.004>
- Jinsheng, S., Fei, G., Xuyun, G., Junli, W., Xiang, L., & Jingjing, L. (2010). Seasonal changes and diversity of bacteria in Bohai Bay by RFLP analysis of PCR-amplified 16S rDNA gene fragments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 275–284. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0456-x>
- Joffin, N. J., Leyral, G. (2001). *Microbiologie technique* : Dictionnaire des techniques. Centre régional de documentation pédagogiques d'Aquitaine, 368.
- Jonker, M. T. O., & Koelmans, A. A. (2002). Sorption of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Polychlorinated Biphenyls to Soot and Soot-like Materials in the Aqueous Environment: Mechanistic Considerations. *Environmental Science & Technology*, 36(17), 3725–3734. <https://doi.org/10.1021/es020019x>
- JORA., (2006). Journal officiel de la république algérienne démocratique et populaire conventions et accords internationaux - lois et décrets arrêtes, décisions, avis,

communications et annonces. Décret exécutif n° 06-141 du 20 Rabie El Aouel 1427 correspondant au 19 avril 2006.

Jouanneau, Y., (2010). *Oxidative inactivation of ring-cleavage extradiol dioxygenases: mechanism and ferredoxin-mediated reactivation*. In: Timmis, K.N. (Ed.), *Microbiology of hydrocarbons, oils, lipids, and derived compounds*, first Eds. Springer, New York, 1^{er}10.

Joy, S., Rahman, P. K. S. M., & Sharma, S. (2017). Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Chemical Engineering Journal*, 317, 232–241. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.054>

K

Kacaniova, M., Kluga, A., Kantor, A., Medo, J., Ziarovská, J., Puchalski, C., & Terentjeva, M. (2019). Comparison of MALDI-TOF MS Biotyper and 16S rDNA sequencing for identification of *Pseudomonas* species isolated from fish. *Microbial Pathogenesis*. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.04.024>

Kadri, T., Rouissi, T., Kaur Brar, S., Cledon, M., Sarma, S., & Verma, M. (2017). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 51, 52–74. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.08.023>

Kahkashan, S., Wang, X., Ya, M., Chen, J., Wu, Y., Cai, Y., ... Aftab, J. (2019). Evaluation of marine sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons along the Karachi coast, Pakistan, 11 years after the Tasman Spirit oil spill. *Chemosphere*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.217>

Kahlon, R. S. (2016). Biodegradation and Bioremediation of Organic Chemical Pollutants by *Pseudomonas*. *Pseudomonas: Molecular and Applied Biology*, 343–417. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31198-2_9

Kao, C., Liu, J., Chen, Y., Chai, C., & Chen, S. (2005). Factors affecting the biodegradation of PCP by NSYSU. *Journal of Hazardous Materials*, 124(1-3), 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.03.051>

Karami, S., Maleki, A., Karimi, E., Poormazaheri, H., Zandi, S., Davari, B., ... Kalantar, E. (2016). Biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by bacteria with highly antibiotic-resistant pattern isolated from wheat field soils in Kurdistan, Iran. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(12). <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5673-9>

- Karlapudi, A. P., Venkateswarulu, T. C., Tammineedi, J., Kanumuri, L., Ravuru, B. K., Dirisala, V. ramu, & Kodali, V. P. (2018). Role of biosurfactants in bioremediation of oil pollution-a review. *Petroleum*, 4(3), 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.petlm.2018.03.007>
- Kasai, Y., & Harayama, S. (2004). *Catabolism of PAHS*. Pseudomonas. Eds Kluwer Academic; Plenum Publishers, New York, 463–490. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9088-4_16
- Kasuga, I., Nakajima, F., & Furumai, H. (2007). Diversity of catechol 2,3-dioxygenase genes of bacteria responding to dissolved organic matter derived from different sources in a eutrophic lake. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(3), 449–458. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00347.x>
- Ke, C.-L., Gu, Y.-G., Liu, Q., Li, L.-D., Huang, H.-H., Cai, N., & Sun, Z.-W. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in wild marine organisms from South China Sea: Occurrence, sources, and human health implications. *Marine Pollution Bulletin*, 117(1-2), 507–511. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.02.018>
- Keith, L., & Telliard, W. (1979). ES&T Special Report: Priority pollutants: I-a perspective view. *Environmental Science & Technology*, 13(4), 416–423. <http://dx.doi.org/10.1021/es60152a601>
- Kerr, R. A. (2010). A Lot of Oil on the Loose, Not So Much to Be Found. *Science*, 329(5993), 734–735. <http://dx.doi.org/10.1126/science.329.5993.734>
- Khudur, L. S., Shahsavari, E., Aburto-Medina, A., & Ball, A. S. (2018). A Review on the Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons: Current State of the Art. *Microbial Action on Hydrocarbons*, 643–667. http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_27
- Kim, K.-H., Jahan, S. A., Kabir, E., & Brown, R. J. C. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*, 60, 71–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>
- King, E.O., Ward, M.K., & Raney, D.E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44, 301-307.
- Kita, A., Kita, S., Fujisawa, I., Inaka, K., Ishida, T., Horiike, K., ... Miki, K. (1999). An archetypical extradiol-cleaving catecholic dioxygenase: the crystal structure of catechol 2,3-dioxygenase (metapyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2. *Structure*, 7(1), 25–34. [http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126\(99\)80006-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0969-2126(99)80006-9)

- Kleindienst, S., Paul, J. H., & Joye, S. B. (2015). Using dispersants after oil spills: impacts on the composition and activity of microbial communities. *Nature Reviews Microbiology*, 13(6), 388–396. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3452>
- Kobayashi, D. Y., Reedy, R. M., Bick, J., & Oudemans, P. V. (2002). Characterization of a Chitinase Gene from *Stenotrophomonas maltophilia* Strain 34S1 and Its Involvement in Biological Control. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(3), 1047–1054. <https://doi.org/10.1128/aem.68.3.1047-1054.2002>
- Konecka, E., & Olszanowski, Z. (2019). Phylogenetic analysis based on the 16S rDNA, *gltA*, *gatB*, and *hcpA* gene sequences of *Wolbachia* sp. from the novel host *Ceratozetes thienemanni* (Acari: Oribatida). *Infection, Genetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.032>
- Kong, Z., Li, L., Xue, Y., Yang, M., & Li, Y.-Y. (2019). Challenges and prospects for the anaerobic treatment of chemical-industrial organic wastewater: A review. *Journal of Cleaner Production*. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.05.233>
- Kotoky, R., Das, S., Singha, L. P., Pandey, P., & Singha, K. M. (2017). Biodegradation of Benzo(a)pyrene by biofilm forming and plant growth promoting *Acinetobacter* sp. strain PDB 4. *Environmental Technology & Innovation*, 8, 256–268. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2017.07.007>
- Kotoky, R., Rajkumari, J., & Pandey, P. (2018). The rhizosphere microbiome: Significance in rhizoremediation of polyaromatic hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Environmental Management*, 217, 858–870. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.04.022>
- Kovaleva, E. G., & Lipscomb, J. D. (2007). Crystal Structures of Fe²⁺ Dioxygenase Superoxo, Alkylperoxo, and Bound Product Intermediates. *Science*, 316(5823), 453–457. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1134697>
- Kress, N. (2019). Seawater Quality for Desalination Plants. *Marine Impacts of Seawater Desalination*, 35–52. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811953-2.00003-7>
- Kronenberg, M., Trably, E., Bernet, N., & Patureau, D. (2017). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Using microbial bioelectrochemical systems to overcome an impasse. *Environmental Pollution*, 231, 509–523. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.048>

- Kucuksezgin, F., Kontas, A., Altay, O., Uluturhan, E., & Darılmaz, E. (2006). Assessment of marine pollution in Izmir Bay: Nutrient, heavy metal and total hydrocarbon concentrations. *Environment International*, 32(1), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.04.007>
- Kukor, J.J. & Olsen, R.H. (1996). Catechol 2,3-dioxygenases functional in oxygen-limited (hypoxic) environments. *Applied of Environmental Microbiology*, 62, 1728-1740.
- Kumar, A., Schimmelmann, A., Sauer, P. E., & Brassell, S. C. (2017). Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in laminated Santa Barbara Basin sediments. *Organic Geochemistry*, 113, 303–314. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2017.07.022>
- Kumar, R., Mishra, A., & Jha, B. (2019). Bacterial community structure and functional diversity in subsurface seawater from the western coastal ecosystem of the Arabian Sea, India. *Gene*. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2019.02.099>
- Kumar, S., Kaushik, G., Dar, M. A., Nimesh, S., López-Chuken, U. J., & Villarreal-Chiu, J. F. (2018). Microbial Degradation of Organophosphate Pesticides: A Review. *Pedosphere*, 28(2), 190–208. [http://doi.org/10.1016/s1002-0160\(18\)60017-7](http://doi.org/10.1016/s1002-0160(18)60017-7)
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874. <http://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kumar Yadav, K., Gupta, N., Kumar, A., Reece, L. M., Singh, N., Rezania, S., & Ahmad Khan, S. (2018). Mechanistic understanding and holistic approach of phytoremediation: A review on application and future prospects. *Ecological Engineering*, 120, 274–298. <http://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.05.039>
- Kumari, S., Regar, R. K., & Manickam, N. (2018). Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in a crude oil by individual and a consortium of bacteria. *Bioresource Technology*, 254, 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.075>

ℒ

- Lal, S., Ratna, S., Said, O. B., & Kumar, R. (2018). Biosurfactant and exopolysaccharide-assisted rhizobacterial technique for the remediation of heavy metal contaminated soil: An advancement in metal phytoremediation technology. *Environmental Technology & Innovation*, 10, 243–263. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.011>

- Lamichhane, S., Bal Krishna, K. C., & Sarukkalige, R. (2017). Surfactant-enhanced remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Journal of Environmental Management*, 199, 46–61. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.037>
- Laredj, F. Z. (2018). Evaluation de l'impact des rejets sur le littoral ouest algérien par l'utilisation des macro-algues « *Ulva lactuca* » et « *Corallina officinalis* » comme bioindicateurs de la pollution marine. Thèse Doctorat en Biologie (PhD). Sciences de l'environnement. Oran, Algérie.
- Lee, D. W., Lee, H., Lee, A. H., Kwon, B.-O., Khim, J. S., Yim, U. H., ... Kim, J.-J. (2018). Microbial community composition and PAHs removal potential of indigenous bacteria in oil contaminated sediment of Taean coast, Korea. *Environmental Pollution*, 234, 503–512. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.11.097>
- Lee, E. Y., Jun, Y. S., Cho, K.-S., & Ryu, H. W. (2002). Degradation Characteristics of Toluene, Benzene, Ethylbenzene, and Xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 52(4), 400–406. <http://doi.org/10.1080/10473289.2002.10470796>
- Lee, M., Woo, S.-G., & Ten, L. N. (2012). Characterization of novel diesel-degrading strains *Acinetobacter haemolyticus* MJ01 and *Acinetobacter johnsonii* MJ4 isolated from oil-contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 2057–2067. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1008-3>
- Lee, H., Lee, D. W., Kwon, S. L., Heo, Y. M., Jang, S., Kwon, B.-O., ... Kim, J.-J. (2019). Importance of functional diversity in assessing the recovery of the microbial community after the Hebei Spirit oil spill in Korea. *Environment International*, 128, 89–94. <http://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.039>
- Lesven, L. (2008). Thèse de Doctorat (PhD). Devenir des Eléments Traces Métalliques au Sein du Sédiment, un Compartiment Clé de l'Environnement Aquatique. Université des Sciences et Technologies de Lille. France.179.
- Li, G., Lang, Y., Gao, M., Yang, W., Peng, P., & Wang, X. (2014). Carcinogenic and mutagenic potencies for different PAHs sources in coastal sediments of Shandong Peninsula. *Marine Pollution Bulletin*, 84(1-2), 418–423. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.04.039>
- Li, J.-Y., Yu, W., Yin, J., Chen, Y., Wang, Q., & Jin, L. (2019). Reduced bioavailability and ecological risks of polycyclic aromatic hydrocarbons in Yangshan port of East China Sea:

Remediation effectiveness in the transition from construction to operation. *Science of The Total Environment*. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.040>

Li, P., Cai, Q., Lin, W., Chen, B., & Zhang, B. (2016). Offshore oil spill response practices and emerging challenges. *Marine Pollution Bulletin*, 110(1), 6–27. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.020>

Li, Z., Nandakumar, R., Madayiputhiya, N., & Li, X. (2012). Proteomic Analysis of 17 β -Estradiol Degradation by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Environmental Science & Technology*, 46(11), 5947–5955. <https://doi.org/10.1021/es300273k>

Lillis, L., Clipson, N., & Doyle, E. (2010). Quantification of catechol dioxygenase gene expression in soil during degradation of 2,4-dichlorophenol. *FEMS Microbiology Ecology*, 73, 363-369. <http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00906.x>

Lin, C. Y., & Tjeerdema, R. S. (2008). *Crude Oil, Oil, Gasoline and Petrol*. Ecotoxicology. Encyclopedia of Ecology, Eds. Elsevier B.V, 797–805. <http://doi.org/10.1016/b978-008045405-4.00382-7>

Lind, C., Esguerra, M., Jespers, W., Satpati, P., Gutierrez-de-Terán, H., & Åqvist, J. (2019). Free energy calculations of RNA interactions. *Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.02.014>

Liu, B., Su, G., Yang, Y., Yao, Y., Huang, Y., Hu, L., ... He, Z. (2019). Vertical distribution of microbial communities in chromium-contaminated soil and isolation of Cr (VI)-Reducing strains. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180, 242–251. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.023>

Liu, H., Yang, C., Tian, Y., Lin, G., & Zheng, T. (2010). Screening of PAH-degrading bacteria in a mangrove swamp using PCR–RFLP. *Marine Pollution Bulletin*, 60(11), 2056–2061. <http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.013>

Liu, Q., Tang, J., Liu, X., Song, B., Zhen, M., & Ashbolt, N. J. (2019). Vertical response of microbial community and degrading genes to petroleum hydrocarbon contamination in saline alkaline soil. *Journal of Environmental Sciences*, 81, 80-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2019.02.001>

Liu, Z., Li, Z., Zhong, H., Zeng, G., Liang, Y., Chen, M., ... Shao, B. (2017). Recent advances in the environmental applications of biosurfactant saponins: A review. *Journal of*

Environmental Chemical Engineering, 5(6), 6030–6038.
<http://doi.org/10.1016/j.jece.2017.11.021>

Liu, Z., Zhang, Y., Bian, C., Xia, T., Gao, Y., Zhang, X., ... Wang, X. (2019). Highly sensitive microbial biosensor based on recombinant *Escherichia coli* overexpressing catechol 2,3-dioxygenase for reliable detection of catechol. *Biosensors and Bioelectronics*, 126, 51–58.
<http://doi.org/10.1016/j.bios.2018.10.050>

Liziard S. (2013). Analyse spatiale et prospective dans le contexte du Changement Climatique. Thèse de Doctorat en Géographie et Aménagement Littoralisation de la façade nord-méditerranéenne (PhD). Université de Nice-Sophia Antipolis, 390.

Lofthus, S., Almås, I. K., Evans, P., Pelz, O., & Brakstad, O. G. (2018). Biodegradation in seawater of PAH and alkylphenols from produced water of a North Sea platform. *Chemosphere*, 206, 465–473. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.006>

Logan, G. A., Jones, A. T., Kennard, J. M., Ryan, G. J., & Rollet, N. (2010). Australian offshore natural hydrocarbon seepage studies, a review and re-evaluation. *Marine and Petroleum Geology*, 27(1), 26–45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpetgeo.2009.07.002>

Logeshwaran, P., Megharaj, M., Chadalavada, S., Bowman, M., & Naidu, R. (2018). Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environmental Technology & Innovation*, 10, 175–193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eti.2018.02.001>

Loh, A., Yim, U. H., Ha, S. Y., & An, J. G. (2018). A preliminary study on the role of suspended particulate matter in the bioavailability of oil-derived polycyclic aromatic hydrocarbons to oysters. *Science of The Total Environment*, 643, 1084–1090.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.129>

Loh, A., Shankar, R., Ha, S. Y., An, J. G., & Yim, U. H. (2019). Suspended particles enhance biodegradation of oil in sea. *Science of The Total Environment*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.390>

Loncle, D., Amaudrie, M., & Jacoty, C. (1993). *Génie génétique*. Biosciences et techniques. Eds. Doin. Parie, 456.

Lorenz, R., Bernhart, S. H., Höner zu Siederdisen, C., Tafer, H., Flamm, C., Stadler, P. F., & Hofacker, I. L. (2011). ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology*, 6(1), 26.
<https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>

- Lourenço, R. A., Magalhães, C. A., Taniguchi, S., Siqueira, S. G. L., Jacobucci, G. B., Leite, F. P. P., & Bícago, M. C. (2019). Evaluation of macroalgae and amphipods as bioindicators of petroleum hydrocarbons input into the marine environment. *Marine Pollution Bulletin*, 145, 564–568. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.05.052>
- Louvado, A., Gomes, N. C. M., Simões, M. M. Q., Almeida, A., Cleary, D. F. R., & Cunha, A. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons in deep sea sediments: Microbe–pollutant interactions in a remote environment. *Science of The Total Environment*, 526, 312–328. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.048>
- Lu, Y., Zheng, G., Zhou, W., Wang, J., & Zhou, L. (2019). Bioleaching conditioning increased the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to promote their removal during co-composting of industrial and municipal sewage sludges. *Science of The Total Environment*, 665, 1073–1082. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.174>
- Luo, X., Gong, S., Sun, F. J., Wang, Z. H., & Qi, J. S. (2017). Effect of volcanic activity on hydrocarbon generation: Examples in Songliao, Qinsui, and Bohai Bay Basins in China. *Journal of Natural Gas Science and Engineering*, 38, 218–234. <https://doi.org/10.1016/j.jngse.2016.12.022>
- Luong, S., Tocheri, M. W., Sutikna, T., Wahyu Saptomo, E., Jatmiko, & Roberts, R. G. (2018). Incorporating terpenes, monoterpenoids and alkanes into multiresidue organic biomarker analysis of archaeological stone artefacts from Liang Bua (Flores, Indonesia). *Journal of Archaeological Science: Reports*, 19, 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2018.02.037>
- Luquet, F. & Corrieu, G. (2005). *Bactéries lactiques et probiotiques*. Sciences et techniques agroalimentaires. Eds. Tec & Doc. Paris, 306.
- Lyu, Z., Shao, N., Akinyemi, T., & Whitman, W. B. (2018). Methanogenesis. *Current Biology*, 28(13), R727–R732. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.021>

M

- Ma, Y., Halsall, C. J., Xie, Z., Koetke, D., Mi, W., Ebinghaus, R., & Gao, G. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons in ocean sediments from the North Pacific to the Arctic Ocean. *Environmental Pollution*, 227, 498–504. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.087>
- Ma, Z., Liu, J., Dick, R. P., Li, H., Shen, D., Gao, Y., ... Ling, W. (2018). Rhamnolipid influences biosorption and biodegradation of phenanthrene by phenanthrene-degrading strain

- Pseudomonas* sp. Ph6. *Environmental Pollution*, 240, 359–367.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.125>
- Madigan, M. & Martinko, J. (2007). *Brock-Biologie des micro-organismes*, Collection Les manuels 11^{ème} Eds., 1047.
- Mahjoubi, M., Jaouani, A., Guesmi, A., Ben Amor, S., Jouini, A., Cherif, H., ... Cherif, A. (2013). Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential. *New Biotechnology*, 30(6), 723–733. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2013.03.004>
- Maletić, S. P., Beljin, J. M., Rončević, S. D., Grgić, M. G., & Dalmacija, B. D. (2019). State of the art and future challenges for polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: sources, fate, bioavailability and remediation techniques. *Journal of Hazardous Materials*, 365, 467–482. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.11.020>
- Mallick, S., & Dutta, T. K. (2008). Kinetics of phenanthrene degradation by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y involving 2-hydroxy-1-naphthoic acid in a novel metabolic pathway. *Process Biochemistry*, 43(9), 1004–1008. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2008.04.022>
- Mangwani, N., Shukla, S. K., Rao, T. S., & Das, S. (2014). Calcium-mediated modulation of *Pseudomonas mendocina* NR802 biofilm influences the phenanthrene degradation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 301–309. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.10.003>
- Mansouri, A., Abbes, C., & Landoulsi, A. (2017). Combined intervention of static magnetic field and growth rate of *Microbacterium maritopicum* CB7 for Benzo(a)Pyrene biodegradation. *Microbial Pathogenesis*, 113, 40–44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.008>
- Mapelli, F., Scoma, A., Michoud, G., Aulenta, F., Boon, N., Borin, S., ... Daffonchio, D. (2017). Biotechnologies for Marine Oil Spill Cleanup: Indissoluble Ties with Microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 35(9), 860–870. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.04.003>
- Marchal, N., Bourdon, J.L. (1982). *Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries*. Eds. Doin. Paris.
- Marchal, N., Bourdon, J.L., & Richard, C.L. (1991). *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries*. Eds. Doin. 65-49.

- Marini, M., & Frapiccini, E. (2013). Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments in the deeper area of the Northern Adriatic Sea (Mediterranean Sea). *Chemosphere*, 90(6), 1839–1846. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.080>
- Mau, S., Valentine, D. L., Clark, J. F., Reed, J., Camilli, R., & Washburn, L. (2007). Dissolved methane distributions and air-sea flux in the plume of a massive seep field, Coal Oil Point, California. *Geophysical Research Letters*, 34(22), L22603 <https://doi.org/10.1029/2007gl031344>
- McCarrick, S., Cunha, V., Zapletal, O., Vondráček, J., & Dreij, K. (2019). In vitro and in vivo genotoxicity of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Pollution*, 246, 678-687 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.092>
- McGenity, T. J., Folwell, B. D., McKew, B. A., & Sanni, G. O. (2012). Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquatic Biosystems*, 8(1), 10. <https://doi.org/10.1186/2046-9063-8-10>
- McIntyre, A., & He, X. (2018). *Global Marine Pollution—A Brief History. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Third Eds. Encyclopedia of Ocean Sciences, V6, 231-235. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.11429-0>
- Meckenstock, R. U., & Mouttaki, H. (2011). Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 22(3), 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.02.009>
- Mehdi, H., & Giti, E. (2008). Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and correlation between biofilm formation, biosurfactant production and crude oil biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62(2), 170–178. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2008.01.004>
- Mehta, A., Bodh, U., & Gupta, R. (2017). Fungallipases: a review. *Journal of Biotech Research*, 8, 58-77. <http://www.btsjournals.com/assets/2017v8p58-77.pdf>
- Meng, L., Li, W., Bao, M., & Sun, P. (2019). Effect of surfactants on the solubilization, sorption and biodegradation of benzo (a) pyrene by *Pseudomonas aeruginosa* BT-1. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2019.01.007>
- Meng, Y., Liu, X., Lu, S., Zhang, T., Jin, B., Wang, Q., ... Xi, B. (2019). A review on occurrence and risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in lakes of China. *Science of The Total Environment*, 651, 2497–2506. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.162>

- Mengual, B., Le Hir, P., Cayocca, F., & Garlan, T. (2019). Bottom trawling contribution to the spatio-temporal variability of sediment fluxes on the continental shelf of the Bay of Biscay (France). *Marine Geology*. <https://doi.org/10.1016/j.margeo.2019.05.009>
- Mesarch, M. B., Nakatsu, C. H., & Nies, L. (2000). Development of Catechol 2,3-Dioxygenase-Specific Primers for Monitoring Bioremediation by Competitive Quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 678–683. <https://doi.org/10.1128/aem.66.2.678-683.2000>
- Mesarch, M. B., Nakatsu, C. H., & Nies, L. (2004). Bench-scale and field-scale evaluation of catechol 2,3-dioxygenase specific primers for monitoring BTX bioremediation. *Water Research*, 38(5), 1281–1288. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.10.05>
- Mille, G., Asia, L., Guiliano, M., Malleret, L., & Doumenq, P. (2007). Hydrocarbons in coastal sediments from the Mediterranean sea (Gulf of Fos area, France). *Marine Pollution Bulletin*, 54(5), 566–575. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.12.009>
- Minoru, S., Shihoko, T., Yoshitoyo, K., Yu, S. & Shigenobu, K. (2009). *Rapid identification of HACEK group bacteria using 16S rRNA gene PCR-RFLP*. Interface Oral Health Science © Springer 2010, 262-264. https://doi.org/10.1007/978-4-431-99644-6_71
- Mir, Z. A., Ali, S., Tyagi, A., Ali, A., Bhat, J. A., Jaiswal, P., ... Oves, M. (2017). Degradation and conversion of endosulfan by newly isolated *Pseudomonas mendocina* ZAM1 strain. *3 Biotech*, 7(3). <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0823-5>
- Mnif, S., Chebbi, A., Mhiri, N., Sayadi, S., & Chamkha, M. (2017). Biodegradation of phenanthrene by a bacterial consortium enriched from Sercina oilfield. *Process Safety and Environmental Protection*, 107, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2017.01.023>
- Mohanram, R., Jagtap, C., & Kumar, P. (2016). Isolation, screening, and characterization of surface-active agent-producing, oil-degrading marine bacteria of Mumbai Harbor. *Marine Pollution Bulletin*, 105(1), 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.040>
- Mondal, M., Halder, G., Oinam, G., Indrama, T., & Tiwari, O. N. (2019). Bioremediation of Organic and Inorganic Pollutants Using Microalgae. *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, 223–235. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63504-4.00017-7>

- Moscoso, F., Teijiz, I., Deive, F. J., & Sanromán, M. A. (2012). Efficient PAHs biodegradation by a bacterial consortium at flask and bioreactor scale. *Bioresource Technology*, 119, 270–276. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.095>
- Moussavi, G., & Ghorbanian, M. (2015). The biodegradation of petroleum hydrocarbons in an upflow sludge-blanket/fixed-film hybrid bioreactor under nitrate-reducing conditions: Performance evaluation and microbial identification. *Chemical Engineering Journal*, 280, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.05.117>
- Mukherjee, A. K., Bhagowati, P., Biswa, B. B., Chanda, A., & Kalita, B. (2017). A comparative intracellular proteomic profiling of *Pseudomonas aeruginosa* strain ASP-53 grown on pyrene or glucose as sole source of carbon and identification of some key enzymes of pyrene biodegradation pathway. *Journal of Proteomics*, 167, 25–35. <http://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.07.020>
- Mukherjee, P., & Roy, P. (2016). Genomic Potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in Bioremediation with an Assessment of Its Multifaceted Role in Our Environment. *Frontiers in Microbiology*, 7, 967. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00967>
- Moura, T. G. Z., Garcia-Alonso, L., & del Rosal, I. (2018). Influence of the geographical pattern of foreign trade on the inland distribution of maritime traffic. *Journal of Transport Geography*, 72, 191–200. <http://doi.org/10.1016/j.jtrangeo.2018.09.008>
- Murray, J. R., & Penning, T. M. (2018). Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Comprehensive Toxicology*, 87–153. <http://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.95691-5>
- Muthukamalam, S., Sivagangavathi, S., Dhrishya, D., & Sudha Rani, S. (2017). Characterization of dioxygenases and biosurfactants produced by crude oil degrading soil bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(4), 637–647. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.007>
- Muthusamy, S., Peng, C., & Ng, J. C. (2018). Genotoxicity evaluation of multi-component mixtures of polyaromatic hydrocarbons (PAHs), arsenic, cadmium, and lead using flow cytometry based micronucleus test in HepG2 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 827, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.01.002>

N

- Nakai, C., Kagamiyama, H., Nozaki, M., Nakazawa, T., Inouye, S., Ebina, Y., & Nakazawa, A. (1983). Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOI plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 2923 -2928.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000). *Performances stand for antimicrobial disk susceptibility test, approved standard*. Eds 7, NCCLS. Wayne, Pa, 20, 1247-1258.
- Neely, R.-N., Neimainis, V.-P., & Dwyer L. (1980). *Référence sur la qualité des eaux. Guide des parametres de la qualité des eaux environnement*. Canada. Direction de la qualité des eaux, Ottawa. Canada.
- Neethu, C. S., Mujeeb Rahiman, K. M., Rosmine, E., Saramma, A. V., & Mohamed Hatha, A. A. (2015). Utilization of agro-industrial wastes for the production of lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Arctic and optimization of physical parameters. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 703–709. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.09.002>
- Noaman, V., & Shayan, P. (2009). A new PCR-RFLP method for detection of *Anaplasma marginale* based on 16S rRNA. *Veterinary Research Communications*, 34(1), 43–50. <http://dx.doi.org/10.1007/s11259-009-9331-3>
- Nogales, B., & Bosch, R. (2019). *Microbial Communities in Hydrocarbon-Polluted Harbors and Marinas*. In: McGenity T. (Eds) *Microbial Communities Utilizing Hydrocarbons and Lipids: Members, Metagenomics and Ecophysiology*. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer, Cham.
- Nogales, B., Lanfranconi, M. P., Piña-Villalonga, J. M., & Bosch, R. (2011). Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(2), 275–298. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00248.x>
- Nogales, J., García, J. L., & Díaz, E. (2017). Degradation of Aromatic Compounds in *Pseudomonas*: A Systems Biology View. *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids*, 1–49. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-39782-5_32-1
- Nolan, D. P. (2019). Physical Properties of Hydrocarbons and Petrochemicals. Handbook of Fire and Explosion Protection Engineering Principles for Oil, Gas, Chemical, and Related Facilities, 65–88. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-816002-2.00004-0>

Notar, M., Leskovšek, H., & 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. [http://dx.doi.org/10.1016/s0025-326x\(00\)00092-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0025-326x(00)00092-8)

Nwinyi, O. C., Ajayi, O. O., & Amund, O. O. (2016). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by two strains of *Pseudomonas*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(3), 551–562. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.04.026>

Nzila, A. (2018). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons under anaerobic conditions: Overview of studies, proposed pathways and future perspectives. *Environmental Pollution*, 239, 788–802. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.074>

O

Obafemi, Y. D., Taiwo, O. S., Omodara, O. J., Dahunsi, O. S., & Oranusi, S. (2018). Biodegradation of crude petroleum by bacterial consortia from oil-contaminated soils in Ota, Ogun State, South-Western, Nigeria. *Environmental Technology & Innovation*, 12, 230–242. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2018.09.006>.

Obré, A., & Buttaux, R. (1982). *Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries*. Eds Doin, 482.

Odoh, C. K., Zabbey, N., Sam, K., & Eze, C. N. (2019). Status, progress and challenges of phytoremediation - An African scenario. *Journal of Environmental Management*, 237, 365–378. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.090>

O.I.E. (2009). Office International de l'eau, indicateur de qualité, REFEA. France.

Olguín E.J., & Sánchez-Galván G. (2019). Phycoremediation: Challenges and Applications. *Comprehensive Biotechnology*, 6, 253-260. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00352-9>

Oliveira, F. R., Patel, A. K., Jaisi, D. P., Adhikari, S., Lu, H., & Khanal, S. K. (2017). Environmental application of biochar: Current status and perspectives. *Bioresource Technology*, 246, 110–122. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.122>

OMI/PNUE, (2002). *Système Régional d'Information; Partie D, Guides Opérationnels et Documents Techniques, Fascicule 1: Guide pour la lutte contre la pollution marine accidentelle en Méditerranée, Guide du REMPEC*.

Onni, T., Sanna, G., Cubeddu, G. P., Marogna, G., Lollai, S., Leori, G., & Tola, S. (2010). Identification of coagulase-negative *staphylococci* isolated from ovine milk samples by PCR–RFLP of 16S rRNA and *gap* genes. *Veterinary Microbiology*, 144(3-4), 347–352. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.016>

OPECST (Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques), (2011). La pollution de la Méditerranée : état et perspectives à l'horizon 2030. Rapport n° 652, 188.

Ouahid, E. A., Mohamed, R., meryam, O., Ali Yahya, H. saleh, Latrach, L., Soufiane, F., & Abdelhafid, C. (2019). Evaluation of the energetic valorization of the lagoon and Mediterranean algae (*Caulerpa prolifera* & *Corallina elongata*) by anaerobic digestion. *Scientific African*, 5, e00111. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00111>

P

PAM/PEC, (2011). Plan d'action pour la mediterranee, Analyse Statistique Base de Données Alertes et Accidents. Centre regional mediterraneen pour l'intervention d'urgence contre la pollution marine accidentelle (REMPEC). www.rempec.org

Panda, J., & Sarkar, P. (2011). Bioremediation of chromium by novel strains *Enterobacter aerogenes* T2 and *Acinetobacter* sp. PD 12 S2. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(5), 1809–1817. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0702-2>

Paniagua-Michel, J., & Fathepure, B. Z. (2018). Microbial Consortia and Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Marine Environments. *Microbial Action on Hydrocarbons*, 1–20. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1840-5_1

Parales, R. E., & Ju, K.-S. (2011). Rieske-Type Dioxygenases. *Comprehensive Biotechnology*, 115–134. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-088504-9.00328-7>

Perelo, L. W. (2010). Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of Hazardous Materials*, 177(1-3), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.12.090>

Patel, A. B., Mahala, K., Jain, K., & Madamwar, D. (2018). Development of mixed bacterial cultures DAK11 capable for degrading mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Bioresource Technology*, 253, 288–296. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.049>

- Patel, A. B., Singh, S., Patel, A., Jain, K., Amin, S., & Madamwar, D. (2019). Synergistic biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by mixed bacterial cultures. *Bioresource Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.097>
- Pathak, V. M., & Navneet. (2017). Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0145-9>
- Pi, Y., Meng, L., Bao, M., Sun, P., & Lu, J. (2016). Degradation of crude oil and relationship with bacteria and enzymatic activities in laboratory testing. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 106, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.10.015>
- Plan Bleu (2010). Les transports maritimes de marchandises en Méditerranée : perspectives 2025. Plan Bleu, Valbonne (Les Cahiers du Plan Bleu 7), 60.
- PNUE/PAM-Plan Bleu, (2009). Etat de l'environnement et du développement en Méditerranée. PNUE/PAM-Plan Bleu, Athènes, 204.
- Prabakaran, K., Nagarajan, R., Eswaramoorthi, S., Anandkumar, A., & Franco, F. M. (2019). Environmental significance and geochemical speciation of trace elements in Lower Baram River sediments. *Chemosphere*, 219, 933-953. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.11.158>
- Prathibha, K., & Sumathi, S. (2007). Biodegradation of mixture containing monohydroxybenzoate isomers by *Acinetobacter calcoaceticus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(6), 813–823. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9545-x>
- Prince, R. C., & Walters, C. C. (2016). *Biodegradation of oil hydrocarbons and its implications for source identification*. Standard Handbook Oil Spill Environmental Forensics, 869–916. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803832-1.00019-2>
- PSEM, (2013). Atlas des villes portuaires du Sud et de l'Est de la Méditerranée (Synthèse). Agence d'urbanisme et d'agglomération marseillaise.

Q

- Qiao, M., Bai, Y., Cao, W., Huo, Y., Zhao, X., Liu, D., & Li, Z. (2018). Impact of secondary effluent from wastewater treatment plants on urban rivers: Polycyclic aromatic hydrocarbons and derivatives. *Chemosphere*, 211, 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.167>

Qu, H., Gong, J.-H., Tan, X.-C., Yuan, P.-Q., Cheng, Z.-M., & Yuan, W.-K. (2019). Dissolution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Subcritical and Supercritical Water: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Chemical Engineering Science*. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.10.042>

R

Ramadass, K., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2018). Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas* spp. on bioremediation. *Science of The Total Environment*, 636, 968–974. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.379>

Reddig, N., Pursche, D., Krebs, B., & Rompel, A. (2004). Mononuclear manganese (III) catechol compounds as substrate adduct complexes for manganese-substituted intradiol cleaving catechol dioxygenases. *Inorganica Chimica Acta*, 357(9), 2703–2712. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2004.02.021>

Remili, S., & Kerfouf, A. (2010). Impact of fecal pollution of coastal recreational areas of Oran (Algeria North West). Proceedings of the 1^{ère} Édition Francophone Days of Hydric Environments Microbiology (Agadir, Morocco), 134-141.

Reza Poursoltani, M., Gibling, M. R., & Pe-Piper, G. (2018). Diagenesis, burial history, and hydrocarbon potential of Cambrian sandstone in the northern continental margin of Gondwana: a case study of the Lalun Formation of Central Iran. *Journal of Asian Earth Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.jseaes.2018.09.003>

Rilling, J. I., Acuña, J. A., Nannipieri, P., Cassan, F., Maruyama, F., & Jorquera, M. A. (2018). Current opinion and perspectives on the methods for tracking and monitoring plant growth-promoting bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.12.012>

Roder, A., Hoffmann, E., Hagemann, M., & Berg, G. (2005). Synthesis of the compatible solutes glucosylglycerol and trehalose by salt-stressed cells of *Stenotrophomonas* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 243(1), 219–226. <http://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.12.005>

Rodier, J. (1984). L'analyse de l'eau, Eaux naturelles, Eaux résiduaires et Eaux de mer, 7^{ème} édition, Eds DULOD, Paris.

Rodier J. (2009). *L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer*, 9^{ème} édition (Entièrement mise à jour), Eds Dunod, Paris. 1579.

- Rodrigo J. J. S., Santos, E. C., Bento, F. M., Peralba, M. C. R., Selbach, P. A., Sá, E. L. S., & Camargo, F. A. O. (2005). Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp. isolated from a petrochemical sludge landfarming site. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 56(3), 143–150. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2005.06.005>
- Rodríguez-Blanco, A., Antoine, V., Pelletier, E., Delille, D., & Ghiglione, J.-F. (2010). Effects of temperature and fertilization on total vs. active bacterial communities exposed to crude and diesel oil pollution in NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution*, 158(3), 663–673. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.10.026>
- Rontani, J.F., & Giusti, G. (1987). Photosensitized oxidation of pristine in sea water: effect of photochemical reactions on tertiary carbons. *Journal of Photochemistry and Photobiology A*, 40, 107-120.
- Rouf, R., Karaba, S. M., Dao, J., & Cianciotto, N. P. (2011). *Stenotrophomonas maltophilia* strains replicate and persist in the murine lung, but to significantly different degrees. *Microbiology*, 157(7), 2133–2142. <http://doi.org/10.1099/mic.0.048157-0>
- Rosa-Jiménez, C., Perea-Medina, B., Andrade, M. J., & Nebot, N. (2018). An examination of the territorial imbalance of the cruising activity in the main Mediterranean port destinations: Effects on sustainable transport. *Journal of Transport Geography*, 68, 94–101. <http://doi.org/10.1016/j.jtrangeo.2018.02.003>
- Russell, D. J. (Ed.). (2014). Multiple Sequence Alignment Methods. *Methods in Molecular Biology*. <http://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7>

S

- Salamat, N., Lamoochi, R., & Shahaliyan, F. (2018). Metabolism and removal of anthracene and lead by a *B. subtilis*-produced biosurfactant. *Toxicology Reports*, 5, 1120–1123. <http://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.11.004>
- Salehi, M., Biria, D., Shariati, M., & Farhadian, M. (2019). Treatment of normal hydrocarbons contaminated water by combined microalgae – Photocatalytic nanoparticles system. *Journal of Environmental Management*, 243, 116–126. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.131>
- Saini, A., Bekele, D., Chadalavada, S., Fang, C., & Naidu, R. (2019). A review of electrokinetically enhanced bioremediation technologies for PHs. *Journal of Environmental Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2019.08.010>

- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425. <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sauret, C. (2011). Écologie des communautés bactériennes marines soumises a une pollution pétrolière. Influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions. Thèse de Doctorat. Microbiologie environnementale. Université Pierre Et Marie Curie.
- Saxena, D., Levin, R., & Firer, M. A. (2000). Removal of chromate from industrial effluent by a new isolate of *Staphylococcus cohnii*. *Water Science and Technology*, 42(1-2), 93–98. <http://dx.doi.org/10.2166/wst.2000.0297>
- Senda, T., Sugiyama, K., Narita, H., Yamamoto, T., Kimbara, K., Fukuda, M., ... Mitsui, Y. (1996). Three-dimensional Structures of Free Form and Two Substrate Complexes of an Extradiol Ring-cleavage Type Dioxygenase, the BphC Enzyme from *Pseudomonas* sp. Strain KKS102. *Journal of Molecular Biology*, 255(5), 735–752. <http://dx.doi.org/10.1006/jmbi.1996.0060>
- Schaum, J., Cohen, M., Perry, S., Artz, R., Draxler, R., Frithsen, J. B., ... Phillips, L. (2010). Screening Level Assessment of Risks Due to Dioxin Emissions from Burning Oil from the BP Deepwater Horizon Gulf of Mexico Spill. *Environmental Science & Technology*, 44(24), 9383–9389. <http://dx.doi.org/10.1021/es103559w>
- Schmidt, J., Krohn, S., Buenger, L., Zeller, K., Schneider, H., Treuheit, M., ... Haak, R. (2019). Molecular characterization of intact cell-derived and cell-free bacterial DNA from carious dentine samples. *Journal of Microbiological Methods*, 158, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.01.012>
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M., & Imboden, D.M. (2003). *Environmental Organic Chemistry*. In: Wiley-Interscience. Eds. Hoboken, New York, 1313.
- Seo, J.-S., Keum, Y.-S., & Li, Q. (2009). Bacterial Degradation of Aromatic Compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(1), 278–309. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph6010278>
- Shahadat, M., Teng, T. T., Rafatullah, M., Shaikh, Z. A., Sreekrishnan, T. R., & Ali, S. W. (2017). Bacterial biofloculants: A review of recent advances and perspectives. *Chemical Engineering Journal*, 328, 1139–1152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2017.07.105>

- Sharma, B., Dangi, A. K., & Shukla, P. (2018). Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *Journal of Environmental Management*, 210, 10–22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.12.075>
- Shuona, C., Hua, Y., Jingjing, C., Hui, P., & Zhi, D. (2017). Physiology and bioprocess of single cell of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation of co-existed benzo[a]pyrene and copper. *Journal of Hazardous Materials*, 321, 9–17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.09.002>
- Singh, H. K. A. G., Yusup, S., & Wai, C. K. (2016). Physicochemical Properties of Crude Rubber Seed Oil for Biogasoline Production. *Procedia Engineering*, 148, 426–431. <http://dx.doi.org/10.1016/j.proeng.2016.06.441>
- Sizmur, T., Fresno, T., Akgül, G., Frost, H., & Moreno-Jiménez, E. (2017). Biochar modification to enhance sorption of inorganics from water. *Bioresource Technology*, 246, 34–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.082>
- Soliman, Y. S., Alansari, E. M. A., Sericano, J. L., & Wade, T. L. (2019). Spatio-temporal distribution and sources identifications of polycyclic aromatic hydrocarbons and their alkyl homolog in surface sediments in the central Arabian Gulf. *Science of The Total Environment*, 658, 787–797. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.093>
- Soltani, M. (2004). Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. Thèse de Doctorat (PhD), Université de Pierre et Marie curie Paris 6. 284 p.
- Sourri, P., Doulgeraki, A. I., Tassou, C. C., & Nychas, G.-J. E. (2019). A single enzyme PCR-RFLP assay targeting V1-V3 region of 16S rRNA gene for direct identification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* from other *Alicyclobacillus* species. *Journal of Applied Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00498-8>
- Soussan, L., Pen, N., Belleville, M.-P., Marcato, J. S., & Paolucci-Jeanjean, D. (2016). Alkane biohydroxylation: Interests, constraints and future developments. *Journal of Biotechnology*, 222, 117–142. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.02.007>
- Speight, J. G. (2011). *Chemical and Physical Properties of Hydrocarbons*. Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes, 325–353. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7506-8632-7.10009-x>

- Speight, J. G., & El-Gendy, N. S. (2018). Bioremediation of Marine Oil Spills. *Introduction to Petroleum Biotechnology*, 419–470. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805151-1.00011-4>
- Staninska-Pięta, J., Piotrowska-Cyplik, A., Juzwa, W., Zgoła-Grześkowiak, A., Wolko, Ł., Sydow, Z., ... Cyplik, P. (2019). The impact of natural and synthetic surfactants on bacterial community during hydrocarbon biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 142, 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.05.010>
- Stepanyan, O. V., & Voskoboinikov, G. M. (2006). Effect of oil and oil products on morphofunctional parameters of marine macrophytes. *Russian Journal of Marine Biology*, 32(S1), S32–S39. <http://dx.doi.org/10.1134/s1063074006070042>
- Sting, R., Eisenberg, T., & Hrubenja, M. (2019). Rapid and reasonable molecular identification of bacteria and fungi in microbiological diagnostics using rapid real-time PCR and Sanger sequencing. *Journal of Microbiological Methods*. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.03.005>
- Suharjo, R., Sawada, H., & Takikawa, Y. (2014). Phylogenetic study of Japanese *Dickeya* spp. and development of new rapid identification methods using PCR–RFLP. *Journal of General Plant Pathology*, 80(3), 237–254. <https://doi.org/10.1007/s10327-014-0511-9>
- Sulkin, E.S., & Willet, J.C. (1940). A Triple Sugar Ferrous Sulfate Medium for use in Identification of Enteric Organisms. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 25(6), 649-653.
- Sumathi, G., Jeyasekaran, G., Jeya Shakila, R., Sivaraman, B., Arunkumar, G., Manimaran, U., & Sukumar, D. (2015). Molecular identification of grouper species using PCR-RFLP technique. *Food Control*, 51, 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.026>
- Sun, R., Sun, Y., Li, Q. X., Zheng, X., Luo, X., & Mai, B. (2018). Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and marine organisms: Implications of anthropogenic effects on the coastal environment. *Science of The Total Environment*, 640-641, 264–272. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.320>
- Sun, S., Wang, Y., Zang, T., Wei, J., Wu, H., Wei, C., ... Li, F. (2019). A biosurfactant-producing *Pseudomonas aeruginos* S5 isolated from coking wastewater and its application for bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioresource Technology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.087>

Sun, Y., Wu, S., & Gong, G. (2019). Trends of research on polycyclic aromatic hydrocarbons in food: A 20-year perspective from 1997 to 2017. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.11.015>

Sutherland J.B., Raffi F., Khan A. A., & Cerniglia C.E. (1995). *Mechanisms of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation*. In: Microbial Transformation and degradation of toxic organic chemicals. Eds. Wiley-Liss. New York.

T

Tang, G., Liu, M., Zhou, Q., He, H., Chen, K., Zhang, H., ... Cai, M. (2018). Microplastics and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Xiamen coastal areas: Implications for anthropogenic impacts. *Science of The Total Environment*, 634, 811–820. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.336>

Tanti, B., Ray, S. K., & Buragohain, A. K. (2011). Differentiation of petroleum hydrocarbon-degrading *Pseudomonas* spp. based on PCR-RFLP of the 16S-23S rDNA intergenic spacer region. *Folia Microbiologica*, 57(1), 47–52. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0088-z>

Tarafdar, A., Sarkar, T. K., Chakraborty, S., Sinha, A., & Mastro, R. E. (2018). Biofilm development of *Bacillus thuringiensis* on MWCNT buckypaper: Adsorption-synergic biodegradation of phenanthrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157, 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.090>

Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.-G., Muntau, H., van Leeuwen, H. P., & Lobinski, R. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and Applied Chemistry*, 72(8), 1453–1470. <https://doi.org/10.1351/pac200072081453>

Tian, L., Ma, P., & Zhong, J.-J. (2002). Kinetics and key enzyme activities of phenanthrene degradation by *Pseudomonas mendocina*. *Process Biochemistry*, 37(12), 1431–1437. [https://doi.org/10.1016/s0032-9592\(02\)00032-8](https://doi.org/10.1016/s0032-9592(02)00032-8)

Tigini, V., Giansanti, P., Mangiavillano, A., Pannocchia, A., & Varese, G. C. (2011). Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4), 866–873. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.12.001>

- Tiralerdpanich, P., Sonthiphand, P., Luepromchai, E., Pinyakong, O., & Pokethitiyook, P. (2018). Potential microbial consortium involved in the biodegradation of diesel, hexadecane and phenanthrene in mangrove sediment explored by metagenomics analysis. *Marine Pollution Bulletin*, 133, 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.06.015>
- Tiwari, B., Manickam, N., Kumari, S., & Tiwari, A. (2016). Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas* sp. *Bioresource Technology*, 216, 1102–1105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.047>
- Toncu, D.-C., Mirzaei, M., & Soleimani, S. (2018). Emulsified jet fuel flame characterization with image processing. *Journal of the Energy Institute*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.joei.2018.04.002>
- Tripathi, R., Gupta, A., & Thakur, S. I. (2019). An integrated approach for phycoremediation of wastewater and sustainable biodiesel production by green microalgae, *Scenedesmus* sp. ISTGA1. *Renewable Energy* 135 617-625. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.12.056>
- Tripathi, V., Gaur, V. K., Dhiman, N., Gautam, K., & Manickam, N. (2019). Characterization and properties of the biosurfactant produced by PAH-degrading bacteria isolated from contaminated oily sludge environment. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05591-3>
- Twigg, M. S., Tripathi, L., Zompra, A., Salek, K., Irorere, V. U., Gutierrez, T., ... Banat, I. M. (2018). Identification and characterisation of short chain rhamnolipid production in a previously uninvestigated, non-pathogenic marine pseudomonad. *Applied Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9202-3>

u

- Ulrich, A. C., Guigard, S. E., Foght, J. M., Semple, K. M., Pooley, K., Armstrong, J. E., & Shiaris, M. P. (1989). Phenanthrene mineralization along a natural salinity gradient in an Urban Estuary, Boston Harbor, Massachusetts. *Microbial Ecology*, 18(2), 135–146. <https://doi.org/10.1007/bf02030122>
- UNEP/MAP/MED POL (2012). Releases, emissions and sources of pollutants in the Mediterranean region: An assessment of 2003-2008 trends. United Nations Environment Programme, Mediterranean Action Plan, Athens.
- Urszula, G., Izabela, G., Danuta, W., & Sylwia, Ł. (2009). Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for

monocyclic hydrocarbon degradation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(2), 285–291.
<http://dx.doi.org/10.1590/s1517-83822009000200014>

U.S-EPA, (2016). Toxic and Priority Pollutants under the Clean Water Act, Priority Pollutant List. Date retrieved 29.10.2016.

V

Vagge, G., Cutroneo, L., Castellano, M., Canepa, G., Bertolotto, R. M., & Capello, M. (2018). The effects of dredging and environmental conditions on concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in the water column. *Marine Pollution Bulletin*, 135, 704–713.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.08.006>

Vaillancourt, F. H., Bolin, J. T., & Eltis, L. D. (2006). The Ins and Outs of Ring-Cleaving Dioxygenases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 41(4), 241–267.
<https://doi.org/10.1080/10409230600817422>

Vandecandelaere, I., Nercessian, O., Faimali, M., Segart, E., Mollica, A., Achouak, W., ... Vandamme, P. (2010). Bacterial diversity of the cultivable fraction of a marine electroactive biofilm. *Bioelectrochemistry*, 78(1), 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2009.07.004>

Vandecasteele, J.P. (2005). *Microbiologie pétrolière: Concepts implications environnementales applications industrielles*. Technip, 1.

Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.02.006>

Vasudevan, V., Gayathri, K. V., & Krishnan, M. E. G. (2018). Bioremediation of a pentacyclic PAH, Dibenz(a,h)Anthracene- A long road to trip with bacteria, fungi, autotrophic eukaryotes and surprises. *Chemosphere*, 202, 387–399.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.074>

Venkidasamy, K., & Megharaj, M. (2016). Identification of Electrode Respiring, Hydrocarbonoclastic Bacterial Strain *Stenotrophomonas maltophilia* MK2 Highlights the Untapped Potential for Environmental Bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1965.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01965>

Vergeynst, L., Kjeldsen, K. U., Lassen, P., & Rysgaard, S. (2018). Bacterial community succession and degradation patterns of hydrocarbons in seawater at low temperature. *Journal of Hazardous Materials*, 353, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.03.051>

Viggor, S., Jõesaar, M., Vedler, E., Kiiker, R., Pärnpuu, L., & Heinaru, A. (2015). Occurrence of diverse alkane hydroxylase alkB genes in indigenous oil-degrading bacteria of Baltic Sea surface water. *Marine Pollution Bulletin*, 101(2), 507–516. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.10.064>

Vila, J., Tauler, M., & Grifoll, M. (2015). Bacterial PAH degradation in marine and terrestrial habitats. *Current Opinion in Biotechnology*, 33, 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.01.006>

Vilcáez, J., York, J., Youssef, N., & Elshahed, M. (2018). Stimulation of methanogenic crude oil biodegradation in depleted oil reservoirs. *Fuel*, 232, 581–590. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2018.06.018>

W

Wakeham, S. G., & Lee, C. (2019). Limits of our knowledge, part 2: Selected frontiers in marine organic biogeochemistry. *Marine Chemistry*. <http://doi.org/10.1016/j.marchem.2019.02.005>

Walker, D. B., Baumgartner, D. J., Gerba, C. P., & Fitzsimmons, K. (2019). Surface Water Pollution. *Environmental and Pollution Science*, 261–292. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814719-1.00016-1>

Wang, B., Teng, Y., Xu, Y., Chen, W., Ren, W., Li, Y., ... Luo, Y. (2018). Effect of mixed soil microbiomes on pyrene removal and the response of the soil microorganisms. *Science of The Total Environment*, 640-641, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.290>

Wang, J., Jiang, L.-H., Zhou, Y., & Ye, B.-C. (2017). Enhanced biodegradation of di- n-butyl phthalate by *Acinetobacter* species strain LMB-5 coated with magnetic nanoparticles. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 116, 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.024>

Wang, J., Ohno, H., Ide, Y., Ichinose, H., Mori, T., Kawagishi, H., & Hirai, H. (2019). Identification of the cytochrome P450 involved in the degradation of neonicotinoid insecticide acetamiprid in *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.03.042>

- Wang, J., & Wang, S. (2019). Preparation, modification and environmental application of biochar: a review. *Journal of Cleaner Production*. <http://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.282>
- Wang, W., Chen, X., Yan, H., Hu, J., & Liu, X. (2019). Complete genome sequence of the cyprodinil-degrading bacterium *Acinetobacter johnsonii* LXL_C1. *Microbial Pathogenesis*, 127, 246–249. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.016>
- Wang, Y., Feng, J., Lin, Q., Lyu, X., Wang, X., & Wang, G. (2013). Effects of crude oil contamination on soil physical and chemical properties in Momoge wetland of China. *Chinese Geographical Science*, 23(6), 708–715. <http://doi.org/10.1007/s11769-013-0641-6>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <http://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Wei, K., Yin, H., Peng, H., Lu, G., & Dang, Z. (2018). Bioremediation of triphenyl phosphate by *Brevibacillus brevis*: Degradation characteristics and role of cytochrome P450 monooxygenase. *Science of The Total Environment*, 627, 1389–1395. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.028>
- WHO - World Health Organization. (2003). *Guidelines for safe recreational water 1034 environments*. V 1: Coastal and fresh waters, 219.
- Widdel, F., & Rabus, R. (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3), 259–276. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(00\)00209-3](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(00)00209-3)
- Wilson, S. C., & Jones, K. C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environmental Pollution*, 81(3), 229–249. [http://dx.doi.org/10.1016/0269-7491\(93\)90206-4](http://dx.doi.org/10.1016/0269-7491(93)90206-4)
- Winkler, J., Eltis, L. D., Dwyer, D. F., & Rohde, M. (1995). Tetrameric structure and cellular location of catechol 2,3-dioxygenase. *Archives of Microbiology*, 163(1), 65–69. <https://doi.org/10.1007/BF00262205>
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221–271.

Woese, C. R., Fox, G. E., Zablen, L., Uchida, T., Bonen, L., Pechman, K., ... Stahl, D. (1987). Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature*, 254(5495), 83–86. <https://doi.org/10.1038/254083a0>

Wojcieszynska, D., Hupert-Kocurek, K., Greń, I., & Guzik, U. (2011). High activity catechol 2,3-dioxygenase from the cresols – Degrading *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(6), 853–858. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.06.006>

Wolfgang, L., & Karl-heinz, S. (2009). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, V3: The Firmicutes. Springer-Verlag New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>

Wong, Y.-S., Ong, S.-A., Teng, T.-T., Aminah, L. N., & Kumaran, K. (2012). Production of Biofloculant by *Staphylococcus cohnii* ssp. from Palm Oil Mill Effluent (POME). *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(7), 3775–3781. <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-012-1147-z>

X

Xie, S., Liu, J., Li, L., & Qiao, C. (2009). Biodegradation of malathion by *Acinetobacter johnsonii* MA19 and optimization of cometabolism substrates. *Journal of Environmental Sciences*, 21(1), 76–82. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(09\)60014-0](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(09)60014-0)

Xie, Y., Yu, F., Wang, Q., Gu, X., & Chen, W. (2013). Cloning of Catechol 2,3-Dioxygenase Gene and Construction of a Stable Genetically Engineered Strain for Degrading Crude Oil. *Indian Journal of Microbiology*, 54(1), 59–64. <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0411-2>

Xue, D., Zeng, X., Lin, D., & Yao, S. (2018). Thermostable ethanol tolerant xylanase from a cold-adapted marine species *Acinetobacter johnsonii*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2018.06.019>

Y

Yakan, S. D., Focks, A., Klasmeier, J., & Okay, O. S. (2017). Numerical evaluation of bioaccumulation and depuration kinetics of PAHs in *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Pollution*, 220, 1244–1250. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.009>

Yan, B., Du, C., Xu, M., & Liao, W. (2012). Decolorization of azo dyes by a salt-tolerant *Staphylococcus cohnii* strain isolated from textile wastewater. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 6(6), 806–814. <http://dx.doi.org/10.1007/s11783-012-0453-4>

- Yang, G. C. C. (2019). Integrated electrokinetic processes for the remediation of phthalate esters in river sediments: A mini-review. *Science of The Total Environment*, 659, 963–972. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.334>
- Yerushalmi, R., Baldrige, K. K., & Scherz, A. (2003). An Experimental Look into Subelectron Charge Flow. *Journal of the American Chemical Society*, 125(42), 12706–12707. <https://doi.org/10.1021/ja035946y>
- Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. and Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1613–1617. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001755>
- Youngblood, W. W., & Blumer, M. (1975). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: homologous series in soils and recent marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 39(9), 1303–1314. [http://doi.org/10.1016/0016-7037\(75\)90137-4](http://doi.org/10.1016/0016-7037(75)90137-4)
- Yrjala, K., Keskinen, A.-K., Åkerman, M.-L., Fortelius, C., & Sipilä, T. P. (2010). The rhizosphere and PAH amendment mediate impacts on functional and structural bacterial diversity in sandy peat soil. *Environmental Pollution*, 158(5), 1680–1688. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.11.026>
- Yu, Z., Lin, Q., Gu, Y., Du, F., Wang, X., Shi, F., ... Yu, Y. (2019). Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in wild marine fish from the coastal waters of the northern South China Sea: Risk assessment for human health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180, 742–748. <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.065>
- Yunker, M. B., Macdonald, R. W., Ross, P. S., Johannessen, S. C., & Dangerfield, N. (2015). Alkane and PAH provenance and potential bioavailability in coastal marine sediments subject to a gradient of anthropogenic sources in British Columbia, Canada. *Organic Geochemistry*, 89-90, 80–116. <http://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2015.10.002>

Z

- Zarco-Fernández, S., García-García, A., Sanz-Landaluze, J., Pecheyran, C., & Muñoz-Olivas, R. (2018). In vivo bioconcentration of a metal mixture by Danio rerio eleutheroembryos. *Chemosphere*, 196, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.141>

- Zhang, C., Lu, J., Wu, J., & Luo, Y. (2017). Removal of phenanthrene from coastal waters by green tide algae *Ulva prolifera*. *Science of The Total Environment*, 609, 1322–1328. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.187>
- Zhang, D., Palmer, J., Teh, K. H., Biggs, P., & Flint, S. (2019). 16S rDNA high-throughput sequencing and MALDI-TOF MS are complementary when studying psychrotrophic bacterial diversity of raw cows' milk. *International Dairy Journal*. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.06.001>
- Zhang, S., Gedalanga, P. B., & Mahendra, S. (2017). Advances in bioremediation of 1,4-dioxane-contaminated waters. *Journal of Environmental Management*, 204, 765–774. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.05.033>
- Zhang, S., Hu, Z., & Wang, H. (2019). Metagenomic analysis exhibited the co-metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons by bacterial community from estuarine sediment. *Environment International*, 129, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.028>
- Zhao, J., Li, J., Cao, Q., Bai, Y., Wu, W., & Ma, Y. (2019). Quasi-continuous hydrocarbon accumulation: An alternative model for the formation of large tight oil and gas accumulations. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 174, 25–39. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2018.10.076>
- Zheng, H., Liu, X., Liu, G., Luo, X., Li, F., & Wang, Z. (2018). Comparison of the ecotoxicological effects of biochar and activated carbon on a marine clam (*Meretrix meretrix*). *Journal of Cleaner Production*, 180, 252–262. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.115>
- Zhu, M., Feng, X., Qiu, G., Feng, J., Zhang, L., Brookes, P. C., ... He, Y. (2019). Synchronous response in methanogenesis and anaerobic degradation of pentachlorophenol in flooded soil. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.04.040>
- Zuo, P., Qu, S., & Shen, W. (2019). Asphaltenes: Separations, structural analysis and applications. *Journal of Energy Chemistry*, 34, 186–207. <https://doi.org/10.1016/j.jechem.2018.10.004>

Annexes

Annexe 01 : la coloration de Gram**1. Réactifs de la coloration de Gram****Violet de gentiane :**

- Phénol.....2,0 g
- Violet de gentiane.....1,0 g
- Éthanol à 90°.....10 ml
- Eau distillée.....100 ml

Fuschine :

- Fuchsine basique.....10 g
- Phénol 50 g
- Éthanol..... 100 ml
- Eau distillée..... 1 l

2. Protocole de la coloration de Gram

- Une colonie est suspendue dans une goutte d'eau et étalée à l'aide de l'anse ;
- Les cellules sont fixées à la flamme ;
- Le frottis est coloré au violet de Gentiane pendant 1-2 minutes ;
- Les bactéries sont fixées au lugol (Fluka) pendant 30 secondes ;
- La préparation est abondamment rincée à l'eau distillée afin d'évacuer l'excès de colorant puis elle est décolorée (éthanol 95 %, 5 sec) et rincée de nouveau abondamment à l'eau distillée ;
- Une deuxième coloration avec de la fuschine est réalisée (1-2 min) ;
- La préparation est rincée à l'eau et séchée à température ambiante.

Annexe 02 : Protocole d'extraction d'ADN selon le kit EasyPure® Bacteria Genomic DNA (TransBionovo Co., Ltd., Chine)

Composition du Kit :

Component	EE161-01/11 (50 rxns)
Resuspension Buffer 11 (RB11)	12 ml
Lysis Buffer11 (LB11)	6 ml
Binding Buffer11 (BB11)	10 ml
Clean Buffer11 (CB11)	55 ml
Wash Buffer11 (WB11)	12 ml
Elution Buffer (EB)	25 ml
RNase A (10 mg/ml)	1ml/-
Proteinase K (20 mg/ml)	1 ml
Genomic Spin Columns with Collection Tubes	50 each

Procédures Avant de commencer : ajouter le volume approprié d'éthanol à 96-100% dans BB11 et WB11.

- Préparer un mélange lysozyme / RB11 frais pour chaque utilisation (4 mg de lysozyme / 200 µl de RB11).
- Préparer de l'éthanol à 70% pour l'extraction des bactéries à Gram positif.

1. Lyse des bactéries

- **Lyse des bactéries Gram-négatives :**

- (a). Transférer 1 ml de culture jeune de bactéries Gram-négatives (de 24 h) à un tube eppendorf de 1,5 ml, puis centrifuger le tube à 12 000 g durant 1 min, éliminer le surnageant.
- (b). Ajouter 100 µl de LB11 et 20 µl de Protéinase K au tube eppendorf, puis resuspendre les bactéries par le vortex.

(c). Incuber à température 55°C pendant 15 min (La solution doit être claire après l'incubation, si non entendre l'incubation à 30 min, et vortexer chaque 5 min).

- **Lyse des bactéries Gram-positives :**

(a). Transférer 1 ml de culture jeune de bactéries Gram-positives (de 24 h), à un tube eppendorf de 1,5 ml, puis centrifuger le tube à 12 000 g durant 1 min, et éliminer le surnageant.

b). Remettre en suspension les bactéries en ajoutant 200 µl de RB11 (contenant 4 mg de lysozyme) dans le tube. Incuber à 37 °C pendant au moins 60 minutes (Remarque : la durée d'incubation peut être étendue à 3 heures si une grande quantité de bactéries est utilisée) et centrifuger le tube à 10 000 g pendant 1 minute. Jeter complètement le surnageant. (Remarque : pour extraire les bactéries Gram-positif, le remettre en suspension dans 500 µl d'éthanol à 70%, incuber pendant 20 minutes dans de la glace, puis centrifuger à 10 000 g pendant 1 minute. Jeter le surnageant. Procéder ensuite à l'étape précédente.

(c). Ajouter 100 µl de LB11 et 20 µl de protéinase K dans le tube. Resuspendre les bactéries en vortexant.

(d). Incuber à 55 ° C pendant 15 minutes. (La solution doit être limpide après l'incubation. Si ce n'est pas le cas, prolongez le temps d'incubation à 30 minutes, vortexez toutes les 5 minutes.)

2. Ajouter 20 µl de RNase A dans le tube, mélanger et incuber à température ambiante pendant 2 minutes.

3. Ajouter 400 µl de BB11 (s'assurer que l'éthanol à 96-100 % est ajouté) et agiter au vortex pendant 30 minutes.

4. Transférer tout le contenu dans une colonne de centrifugation, centrifuger à 12 000 g pendant 30 secondes et jeter le flux traversant.

5. Ajouter 500 µl de CB11, centrifuger à 12 000 g pendant 30 secondes et rejeter le liquide traversant le filtre, garder juste la phase retenu par le filtre.

6. Répétez l'étape 5 une fois.

7. Ajoutez 500 µl de WB11 (s'assurer que l'éthanol à 96-100 % est ajouté), centrifugez à 12 000 g pendant 30 secondes et jetez. Jeter le produit qui a traversé le filtre (garder juste la phase retenu par le filtre).

8. Répétez l'étape 7 une fois.

9. Centrifuger à 12 000 g pendant 2 minutes pour éliminer le résidu WB11.

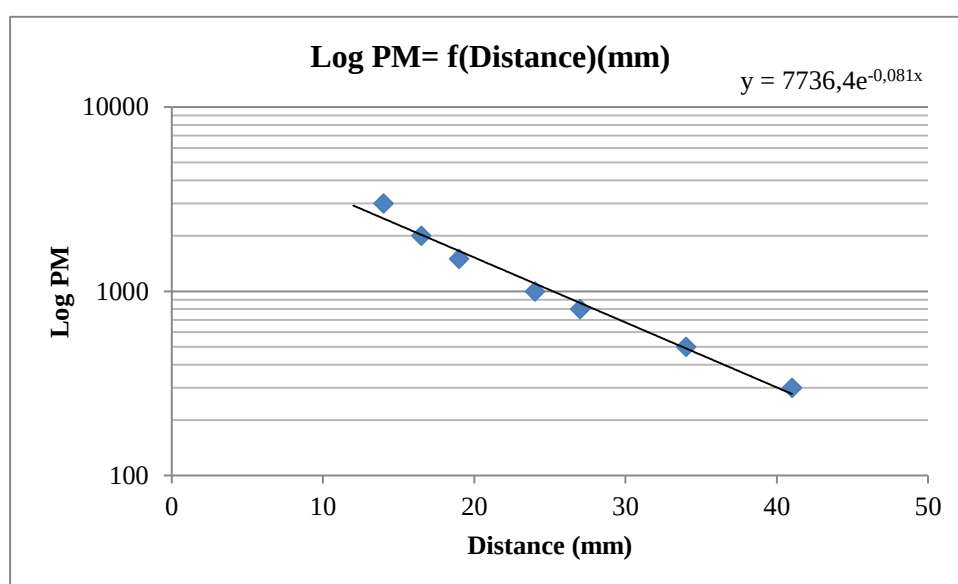
10. Placez la colonne de centrifugation dans un tube à centrifuger stérile de 1,5 ml. Ajouter 50-200 µl de tampon d'élution (préchauffé à 65 ° C) ou d'eau distillée stérile (pH> 7,0) au centre de la colonne. Incuber à température ambiante pendant 2 minutes. Centrifuger à 12 000 g pendant 1 minute pour éluer l'ADN génomique.

11. Répétez l'étape 10 une fois. Stocker l'ADN isolé à -20 ° C.

Remarques

- Utilisez des tubes et des embouts de pipette stériles pour éviter les contaminations.

Annexe 03 : Coubre étalon des poids moléculaires des bandes génomiques standards du marqueur de taille Trans5K DNA Marker, pour l'analyse de l'électrophorèse d'ADN



Annexe 04 : Composition des milieux de culture bactérienne

La composition donnée est pour un volume final d'un litre.

Gélose nutritive (GN) :

- Extrait de viande.....1,0 g
- Extrait de levure.....2,5 g
- Peptone.....5,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Agar.....15,0 g

pH = 7,0.

Milieu citrate de Simmons :

- Sulfate de Mg.....0,2 g
- Phosphate monoammoniaqué.....1 g
- Phosphate bipotassique.....1 g
- Citrate de sodium.....2 g
- NaCl.....5 g
- Bleu de bromothymol.....0,08 g
- Agar.....15 g

pH=6,8 ± 0,2.

Milieu gélose viande-foie (Vf) :

- base viande foie.....30,0 g
- glucose.....2,0 g
- agar.....6,0 g

pH = 7,4.

Milieu TSI :

- Peptone 20,0 g
- Extrait de boeuf 3,0 g
- Extrait de levure 3,0 g
- Saccharose 10,0 g
- Lactose.....10,0 g
- Agar 12,0 g
- Glucose monohydraté..... 1,0 g
- Chlorure de sodium..... 5,0 g
- Citrate ferrique ammoniacal..... 0,30 g
- Thiosulfate de sodium 0,30 g
- Rouge de phénol..... 0,025 g

pH =7,4 ± 0,2.

Milieu Chapman :

- Peptone.....10,0 g
- Extrait de viande de bœuf.....1,0 g
- Chlorure de sodium.....75,0 g
- Mannitol.....10,0 g
- Rouge de phénol.....0,025 g
- Agar-Agar.....15,0 g

pH = 7,4

Milieu King A:

- Peptone dite.....20,0 g
- Glycérol.....10,0 g
- Sulfate de potassium.....10,0 g
- Chlorure de magnésium.....1,4 g
- Agar purifié.....12,0 g

pH = 7,2

Milieu King B :

- Peptone..... 20,0 g
- Glycérol.....10,0 g
- Hydrogénophosphate de potassium.....1,5 g
- Sulfate de magnésium heptahydraté.....1,5 g
- Agar.....12,0 g

pH = 7,2.

Milieu Salmonella-Shigella (SS) :

- Peptone.....5,0 g
- Extrait de viande.....5,0 g
- Lactose.....10,0 g
- Citrate de sodium.....10,0 g
- Citrate de fer III.....1,0 g
- Sels biliaires.....8,5 g
- Vert brillant.....3,3 mg
- Rouge neuter.....25 mg
- Thiosulfate de sodium.....8,5 g
- Agar.....12,0 g

pH = 7,3.

Bouillon nutritif :

- Tryptone 10,0 g
- Extrait de viande.....5,0 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g

pH= 7,2.

Bouillon lactosé au BCP :

- Peptone.....5,0 g
- Extrait de viande 3,0 g
- Lactose 5,0 g
- Pourpre de bromocrésol.....25,0 mg

pH = 6,7 ± 0,2.



Bouillon infusion cœur-cervele (BHIB) :

- Infusion de cervelle de veau.....12,5 g
- Infusion de cœur de bœuf.....5,0 g
- Peptone.....10,0 g
- Glucose.....2,0 g
- Chlorure de sodium.....2,0 g
- Phosphatase di sodique.....5 g

pH= 7.4.

Bouillon indole-mannitol (Bouillon de Schubert):

- Tryptone.....12 g
- Tryptophane.....1 g
- Mannitol.....9 g
- Bile de boeuf déshydratée.....25 g
- Chlorure de sodium.....5 g
- Phosphate monopotassique.....1,5 g
- Phosphate di-potassique.....3,5 g
- Lauryl-sulfate de sodium.....0,2 g

pH = 7

Réactif de Kovacs :

- p-diméthylamino-benzaldéhyde..... 5,0 g
- Alcool iso-amylque 75 ml
- Acide chlorhydrique pur 25 ml

Annexe 05 : L'extraction de l'ADN total (chromosomique et plasmidique) :

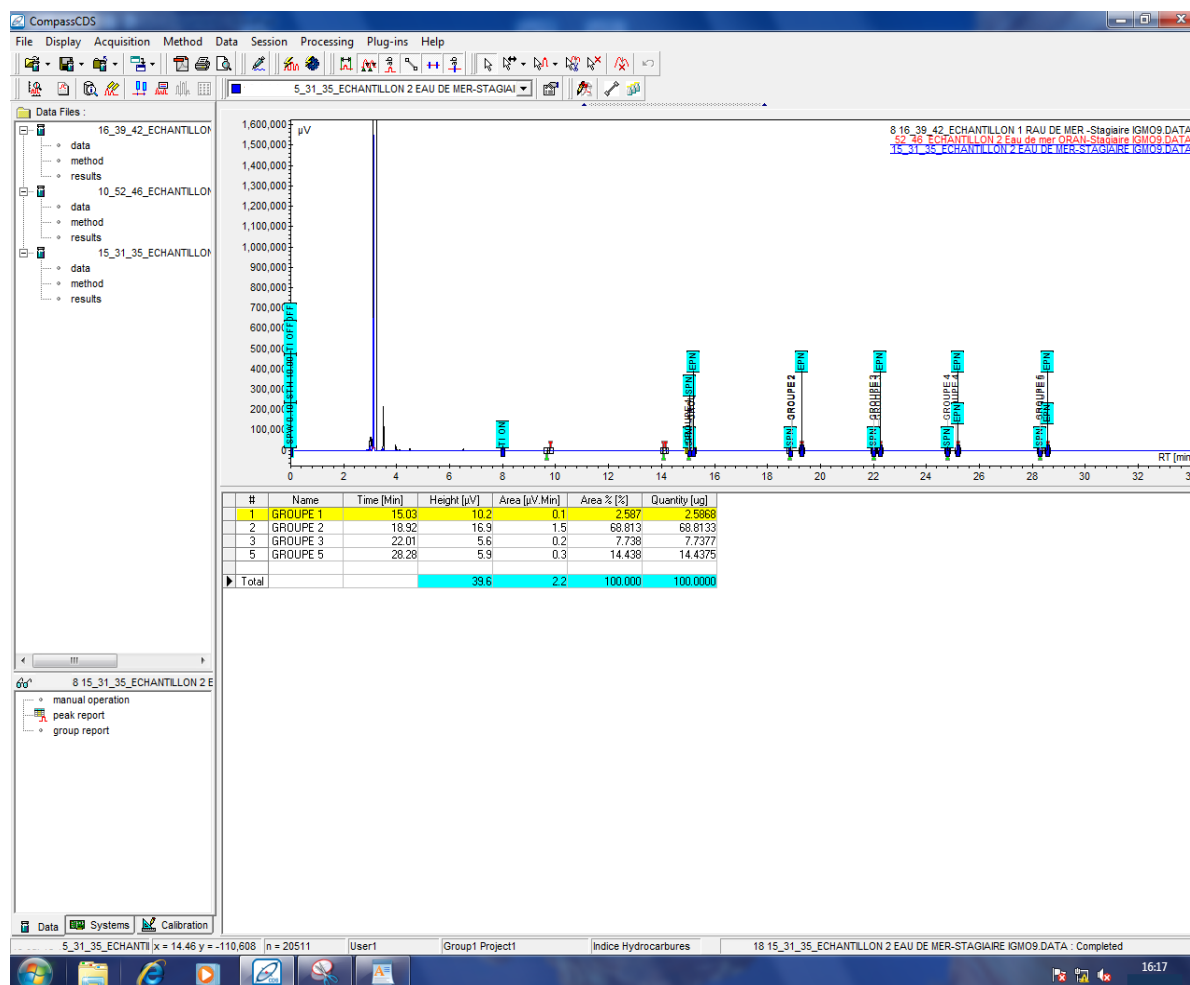
L'extraction de l'ADN total est réalisée à partir d'une culture jeune en boîte de Pétrie sur milieu GN. Ainsi, une colonie isolée est retirée avec une pointe en plastique stérile et resuspendue dans 100 µl d'eau stérile désionisée dans un tube eppendorf stérile. Puis 100 µl de mélange chloroforme / alcool isoamylique (24 : 1) sont ajoutés aux suspensions, et après vortexer pendant 5 s. Le mélange est centrifugé à 16 000 g pendant 5 min à 4° C. 5 à 10 µl de la phase aqueuse supérieure sont utilisés comme source d'ADN matrice pour les réactions de PCR. Le reste du mélange est stocké à 4°C jusqu'à utilisation (Ruiz-Barba et *al.*, 2005).

Annexe 06 : Tube de Mac Farland N° 0,5 (1,5 x10⁸ UFC/ml) (NCCLS, 2000)

BaCl₂ (0,18 M).....0,5 ml

H₂SO₄ (0,048 M) 99,5 ml

Après 24 heures d'incubation des souches étudiées dans du bouillon nutritif (BN) à 25°C, il faut comparer le tube de la suspension bactérienne avec le tube de l'étalon Mac Farland 0,5 (1,5 x10⁸ UFC/ml). Les tubes sont observés contre une fiche de papier blanc avec lignes noires. Si c'est nécessaire, la turbidité peut être diminuée en ajoutant plus de bouillon nutritif stérile, ou bien augmentée par l'augmentation de la durée d'incubation.

Annexe 07 : Interface du logiciel Compass CDC associé au détecteur de l'appareil CG-**FID****Annexe 08 : Alignement des séquences partielles de l'ADNr 16S :**

1. CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment (La souche *Stenotrophomonas maltophilia* SP54N)

```

SP54N          GTTTGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGC 60
S. maltophilia (FJ906801.1) GTTTGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGC 60
S. maltophilia (GQ267816.1) GTTTGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGC 60
*****

SP54N          AGCACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAA 120
S. maltophilia (FJ906801.1) AGCACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAA 120
S. maltophilia (GQ267816.1) AGCACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAA 120
*****

SP54N          TCTACTCTGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACG 180
S. maltophilia (FJ906801.1) TCTACTCTGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACG 180
S. maltophilia (GQ267816.1) TCTACTCTGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACTTACGCTAATACCGCATACGACCTACG 180
*****

```

SP54N		GGTGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTA	240
S. maltophilia (FJ906801.1)		GGTGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTA	240
S. maltophilia (GQ267816.1)		GGTGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTA	240

SP54N		GTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG	300
S. maltophilia (FJ906801.1)		GTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG	300
S. maltophilia (GQ267816.1)		GTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG	300

SP54N		CCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG	360
S. maltophilia (FJ906801.1)		CCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG	360
S. maltophilia (GQ267816.1)		CCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG	360

SP54N		ACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTA	420
S. maltophilia (FJ906801.1)		ACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTA	420
S. maltophilia (GQ267816.1)		ACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTA	420

SP54N		AAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCC	480
S. maltophilia (FJ906801.1)		AAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCC	480
S. maltophilia (GQ267816.1)		AAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCC	480

SP54N		AAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCG	540
S. maltophilia (FJ906801.1)		AAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCG	540
S. maltophilia (GQ267816.1)		AAAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCG	540

SP54N		TTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTCTGTTAAGTCCGTTGTGAAAG	600
S. maltophilia (FJ906801.1)		TTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTCTGTTAAGTCCGTTGTGAAAG	600
S. maltophilia (GQ267816.1)		TTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGTGGTCTGTTAAGTCCGTTGTGAAAG	600

SP54N		CCCTGGGCTCAACCTGGGACTGCACTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTA	660
S. maltophilia (FJ906801.1)		CCCTGGGCTCAACCTGGGACTGCACTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTA	660
S. maltophilia (GQ267816.1)		CCCTGGGCTCAACCTGGGACTGCACTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTA	660

SP54N		GCGGAATTCTTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAG	720
S. maltophilia (FJ906801.1)		GCGGAATTCTTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAG	720
S. maltophilia (GQ267816.1)		GCGGAATTCTTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAG	720

SP54N		GCAGCTACCTGGACCAACATTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA	780
S. maltophilia (FJ906801.1)		GCAGCTACCTGGACCAACATTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA	780
S. maltophilia (GQ267816.1)		GCAGCTACCTGGACCAACATTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA	780

SP54N		GATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCAC	840
S. maltophilia (FJ906801.1)		GATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCAC	840
S. maltophilia (GQ267816.1)		GATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCAC	840

SP54N		GCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA	900
S. maltophilia (FJ906801.1)		GCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA	900
S. maltophilia (GQ267816.1)		GCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA	900

SP54N		CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAG	929
S. maltophilia (FJ906801.1)		CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAG	929
S. maltophilia (GQ267816.1)		CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAG	929

2. CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment (La souche *Acinetobacter johnsonii* SP49F2)

```

Strain SP49F2      GGTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATCGGCCACACCGTGGTAAGCGTCTCCTTG 60
A. johnsonii(CP010350.1) GGTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATCGGCCACACCGTGGTAAGCGTCTCCTTG 60
A. johnsonii(NR_117624.1) GGTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATCGGCCACACCGTGGTAAGCGTCTCCTTG 60
* * * * *

Strain SP49F2      CGGTTAGACTACCTACTTCTGGTGCAACAAATCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA 120
A. johnsonii(CP010350.1) CGGTTAGACTACCTACTTCTGGTGCAACAAATCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA 120
A. johnsonii(NR_117624.1) CGGTTAGACTACCTACTTCTGGTGCAACAAATCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACA 120
* * * * *

Strain SP49F2      AGGCCCGGGAACGTATTACCCGCGGCATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTC 180
A. johnsonii(CP010350.1) AGGCCCGGGAACGTATTACCCGCGGCATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTC 180
A. johnsonii(NR_117624.1) AGGCCCGGGAACGTATTACCCGCGGCATTCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTC 180
* * * * *

Strain SP49F2      ATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGATCGGCTTTTTGAGATTAGCATCCT 240
A. johnsonii(CP010350.1) ATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGATCGGCTTTTTGAGATTAGCATCCT 240
A. johnsonii(NR_117624.1) ATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGATCGGCTTTTTGAGATTAGCATCCT 240
* * * * *

Strain SP49F2      ATCGCTAGGTAGCAACCCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAA 300
A. johnsonii(CP010350.1) ATCGCTAGGTAGCAACCCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAA 300
A. johnsonii(NR_117624.1) ATCGCTAGGTAGCAACCCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAA 300
* * * * *

Strain SP49F2      GGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCGCCTTCCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCCTT 360
A. johnsonii(CP010350.1) GGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCGCCTTCCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCCTT 360
A. johnsonii(NR_117624.1) GGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCGCCTTCCTCCAGTTTGTCACTGGCAGTATCCTT 360
* * * * *

Strain SP49F2      AAAGTTCCCGGCTTAACCCGCTGGCAATAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT 420
A. johnsonii(CP010350.1) AAAGTTCCCGGCTTAACCCGCTGGCAATAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT 420
A. johnsonii(NR_117624.1) AAAGTTCCCGGCTTAACCCGCTGGCAATAAGGAAAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTT 420
* * * * *

Strain SP49F2      AACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATGTAAGTTCCC 480
A. johnsonii(CP010350.1) AACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATGTAAGTTCCC 480
A. johnsonii(NR_117624.1) AACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATGTAAGTTCCC 480
* * * * *

Strain SP49F2      GAAGGCACCAATCCATCTCTGAAAGTTCTTACTATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCG 540
A. johnsonii(CP010350.1) GAAGGCACCAATCCATCTCTGAAAGTTCTTACTATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCG 540
A. johnsonii(NR_117624.1) GAAGGCACCAATCCATCTCTGAAAGTTCTTACTATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCG 540
* * * * *

Strain SP49F2      CGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCAATTG 600
A. johnsonii(CP010350.1) CGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCAATTG 600
A. johnsonii(NR_117624.1) CGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCAATTG 600
* * * * *

Strain SP49F2      AGTTTTAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACT 660
A. johnsonii(CP010350.1) AGTTTTAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACT 660
A. johnsonii(NR_117624.1) AGTTTTAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTGCGCCACT 660
* * * * *

Strain SP49F2      AAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTAT 720
A. johnsonii(CP010350.1) AAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTAT 720
A. johnsonii(NR_117624.1) AAAGCCTCAAAGGCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTAT 720
* * * * *

Strain SP49F2      CTAATCCTGTTTGCTCCCCATGCTTTTCGTACCTCAGCGTCAGTATTAGGCCAGATGGCTG 780
A. johnsonii(CP010350.1) CTAATCCTGTTTGCTCCCCATGCTTTTCGTACCTCAGCGTCAGTATTAGGCCAGATGGCTG 780
A. johnsonii(NR_117624.1) CTAATCCTGTTTGCTCCCCATGCTTTTCGTACCTCAGCGTCAGTATTAGGCCAGATGGCTG 780
* * * * *

Strain SP49F2      CCTTCGCCATCGGTATTCCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTA 840
A. johnsonii(CP010350.1) CCTTCGCCATCGGTATTCCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTA 840
A. johnsonii(NR_117624.1) CCTTCGCCATCGGTATTCCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTA 840
* * * * *

```

Strain SP49F2	CCATCCTCTCCCATACTCTAGCTTCCCAGTATCGAATGCAATTCCTAAGTTAAGCTCAGG	900
A. johnsonii (CP010350.1)	CCATCCTCTCCCATACTCTAGCTTCCCAGTATCGAATGCAATTCCTAAGTTAAGCTCAGG	900
A. johnsonii (NR_117624.1)	CCATCCTCTCCCATACTCTAGCTTCCCAGTATCGAATGCAATTCCTAAGTTAAGCTCAGG	900

Strain SP49F2	GATTTACATCCGACTTAAAAAGCCGCTACGCACGCTTTACGCCAGTAAATCCGATTA	960
A. johnsonii (CP010350.1)	GATTTACATCCGACTTAAAAAGCCGCTACGCACGCTTTACGCCAGTAAATCCGATTA	960
A. johnsonii (NR_117624.1)	GATTTACATCCGACTTAAAAAGCCGCTACGCACGCTTTACGCCAGTAAATCCGATTA	960

Strain SP49F2	ACGCTCGCACCTCTGGA	978
A. johnsonii (CP010350.1)	ACGCTCGCACCTCTGTA	978
A. johnsonii (NR_117624.1)	ACGCTCGCACCTCTGTA	978

3. CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment (La souche <i>Pseudomonas mendocina</i> SP57N)		
Strain SP57N	AGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGG	60
P. mendocina (CP002620.1)	AGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGG	60
P. mendocina (NR_043421.1)	AGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGG	60

Strain SP57N	ATGAGAGGAGCTTGCTCCTTGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGC	120
P. mendocina (CP002620.1)	ATGAGAGGAGCTTGCTCCTTGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGC	120
P. mendocina (NR_043421.1)	ATGAGAGGAGCTTGCTCCTTGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTTC	120

Strain SP57N	CTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAACGAACGCTAATACCGCGTACGTCCTACGGGAGA	180
P. mendocina (CP002620.1)	CTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAACGAACGCTAATACCGCGTACGTCCTACGGGAGA	180
P. mendocina (NR_043421.1)	CTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAACGAACGCTAATACCGCGTACGTCCTACGGGAGA	180

Strain SP57N	AAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGG	240
P. mendocina (CP002620.1)	AAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGG	240
P. mendocina (NR_043421.1)	AAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGG	240

Strain SP57N	TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACA	300
P. mendocina (CP002620.1)	TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACA	300
P. mendocina (NR_043421.1)	TGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACA	300

Strain SP57N	CTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT	360
P. mendocina (CP002620.1)	CTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT	360
P. mendocina (NR_043421.1)	CTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAAT	360

Strain SP57N	GGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCA	420
P. mendocina (CP002620.1)	GGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCA	420
P. mendocina (NR_043421.1)	GGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCA	420

Strain SP57N	CTTTAAGTTGGGAGGAAGGSCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGA	480
P. mendocina (CP002620.1)	CTTTAAGTTGGGAGGAAGGSCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGA	480
P. mendocina (NR_043421.1)	CTTTAAGTTGGGAGGAAGGSCAGTAAGTTAATACCTTGCTGTTTTGACGTTACCGACAGA	480

Strain SP57N	ATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAAT	540
P. mendocina (CP002620.1)	ATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAAT	540
P. mendocina (NR_043421.1)	ATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAAT	540

Strain SP57N	CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCG	600
P. mendocina (CP002620.1)	CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCG	600
P. mendocina (NR_043421.1)	CGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCG	600

Strain SP57N	GGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGA	660
P. mendocina (CP002620.1)	GGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGA	660
P. mendocina (NR_043421.1)	GGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGA	660

Strain SP57N	ATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC	720
P. mendocina (CP002620.1)	ATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC	720
P. mendocina (NR_043421.1)	ATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGAC	720

Strain SP57N	CACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC	780
P. mendocina (CP002620.1)	CACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC	780
P. mendocina (NR_043421.1)	CACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC	780

Strain SP57N	CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTG	840
P. mendocina (CP002620.1)	CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTG	840
P. mendocina (NR_043421.1)	CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTG	840

Strain SP57N	GCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAA	900
P. mendocina (CP002620.1)	GCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAA	900
P. mendocina (NR_043421.1)	GCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAA	900

Strain SP57N	TGAATTGACGGGGGCCGCAAAAGCGGT	928
P. mendocina (CP002620.1)	TGAATTGACGGGGGCCGCAAAAGCGGT	928
P. mendocina (NR_043421.1)	TGAATTGACGGGGGCCGCAAAAGCGGT	928

4. CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment (La souche *Staphylococcus cohnii* A3NI3)

Strain A3NI3	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGC	60
S. cohnii (CP027422.1)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGC	60
S. cohnii (CP019597.1)	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGC	60

Strain A3NI3	GAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT	120
S. cohnii (CP027422.1)	GAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT	120
S. cohnii (CP019597.1)	GAACAGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT	120

Strain A3NI3	AACCTACCTATAAGACTGGAATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATGCCGGATAACATTTA	180
S. cohnii (CP027422.1)	AACCTACCTATAAGACTGGAATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATGCCGGATAACATTTA	180
S. cohnii (CP019597.1)	AACCTACCTATAAGACTGGAATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATGCCGGATAACATTTA	180

Strain A3NI3	GAACCGCAGGTTCTAAAGTGAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCC	240
S. cohnii (CP027422.1)	GAACCGCAGGTTCTAAAGTGAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCC	240
S. cohnii (CP019597.1)	GAACCGCAGGTTCTAAAGTGAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACCCGCGCC	240

Strain A3NI3	GTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGA	300
S. cohnii (CP027422.1)	GTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGA	300
S. cohnii (CP019597.1)	GTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGA	300

Strain A3NI3	GGGTGATCGGCCACACTGGAACGTAGACACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG	360
S. cohnii (CP027422.1)	GGGTGATCGGCCACACTGGAACGTAGACACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG	360
S. cohnii (CP019597.1)	GGGTGATCGGCCACACTGGAACGTAGACACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAG	360

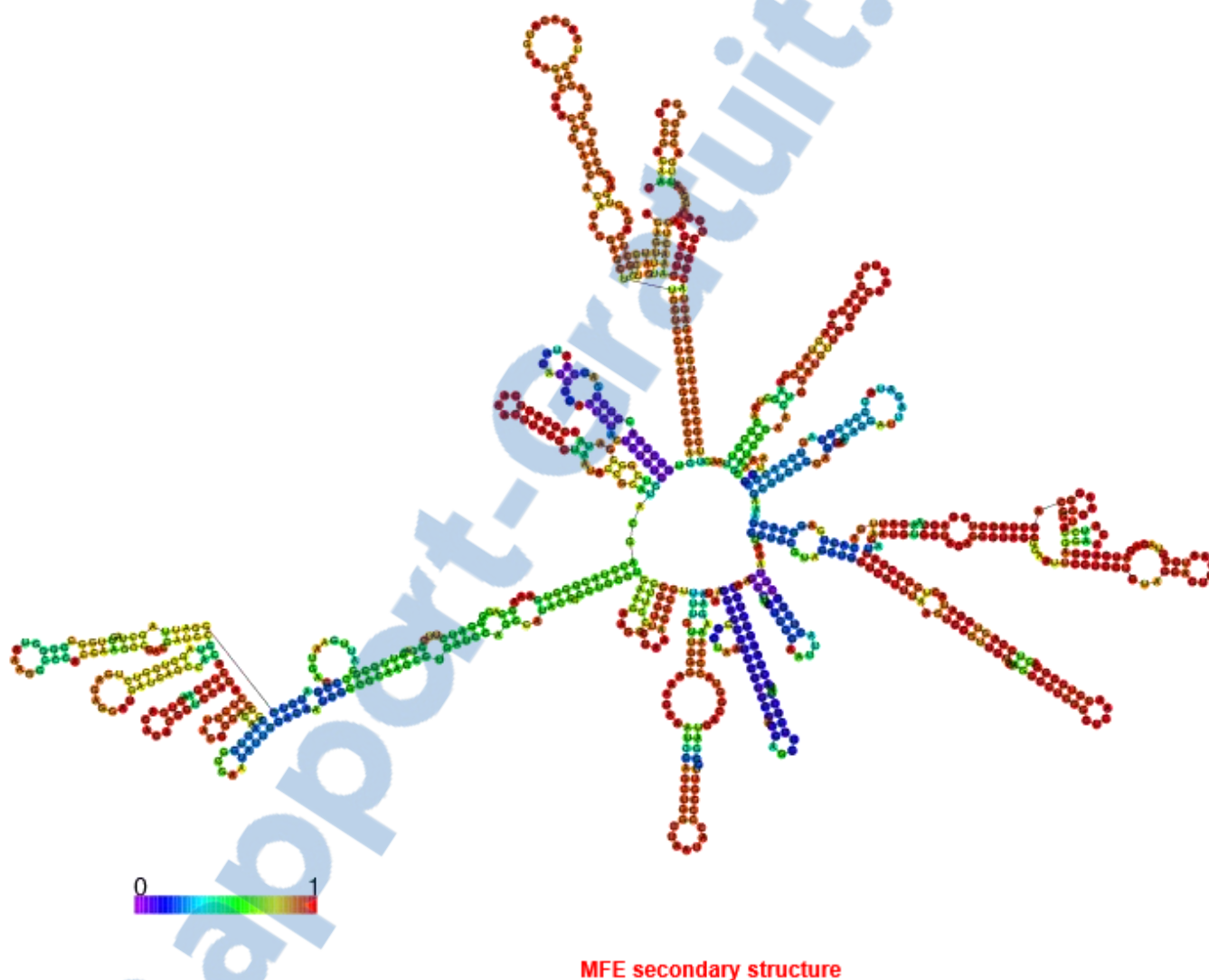
Strain A3NI3	GGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCT	420
S. cohnii (CP027422.1)	GGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCT	420
S. cohnii (CP019597.1)	GGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCT	420

Strain A3NI3	TCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAAGTGTGCACGTCTT	480
S. cohnii (CP027422.1)	TCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAAGTGTGCACGTCTT	480
S. cohnii (CP019597.1)	TCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAAGTGTGCACGTCTT	480

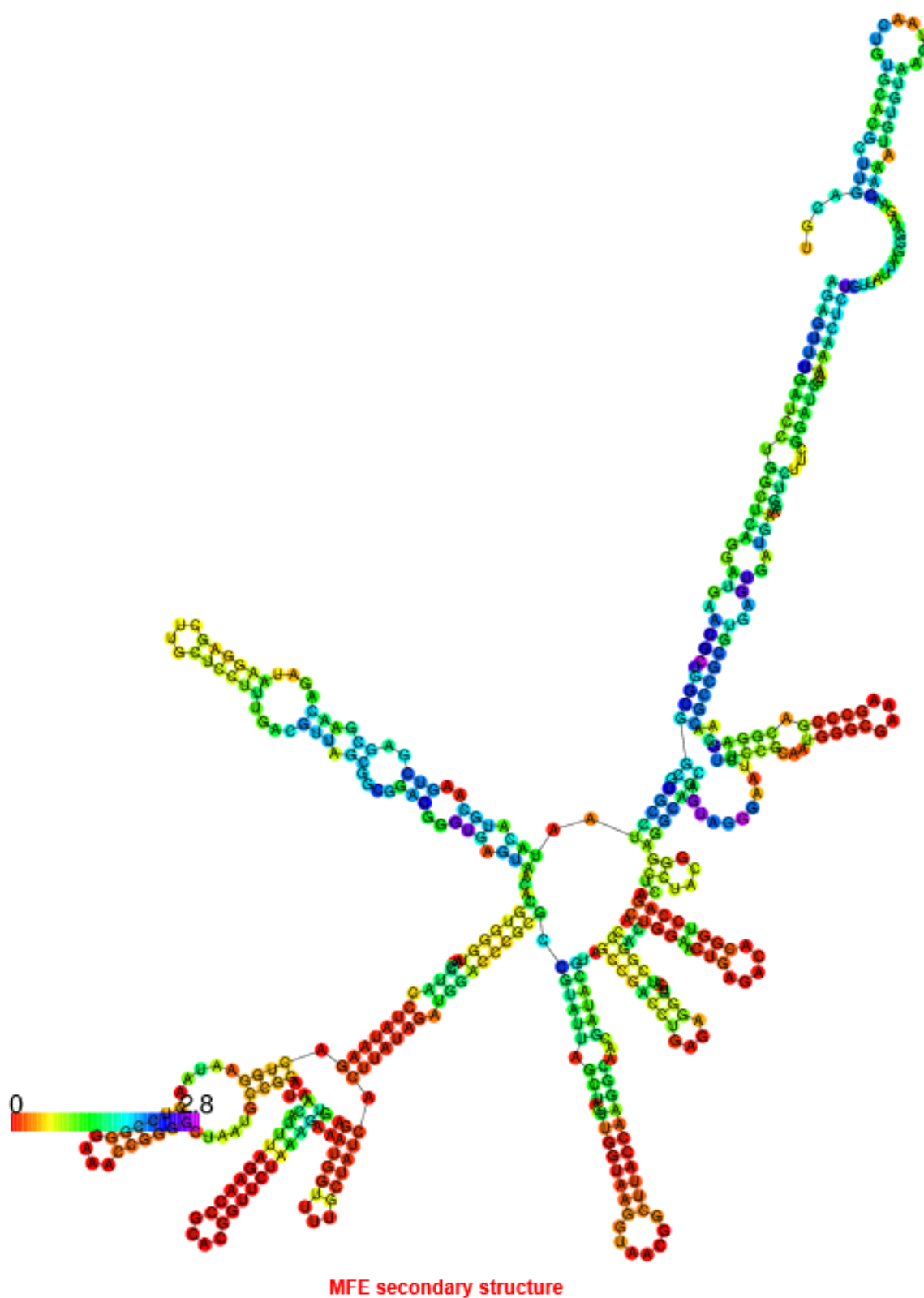
Strain A3NI3	GACGT	484
S. cohnii (CP027422.1)	GACGT	485
S. cohnii (CP019597.1)	GACGT	485

Annexe 09 : Structure secondaire du fragment d'ARN 16S des souches hydrocarbonoclastes sélectionnées prédite par le logiciel RNAFold

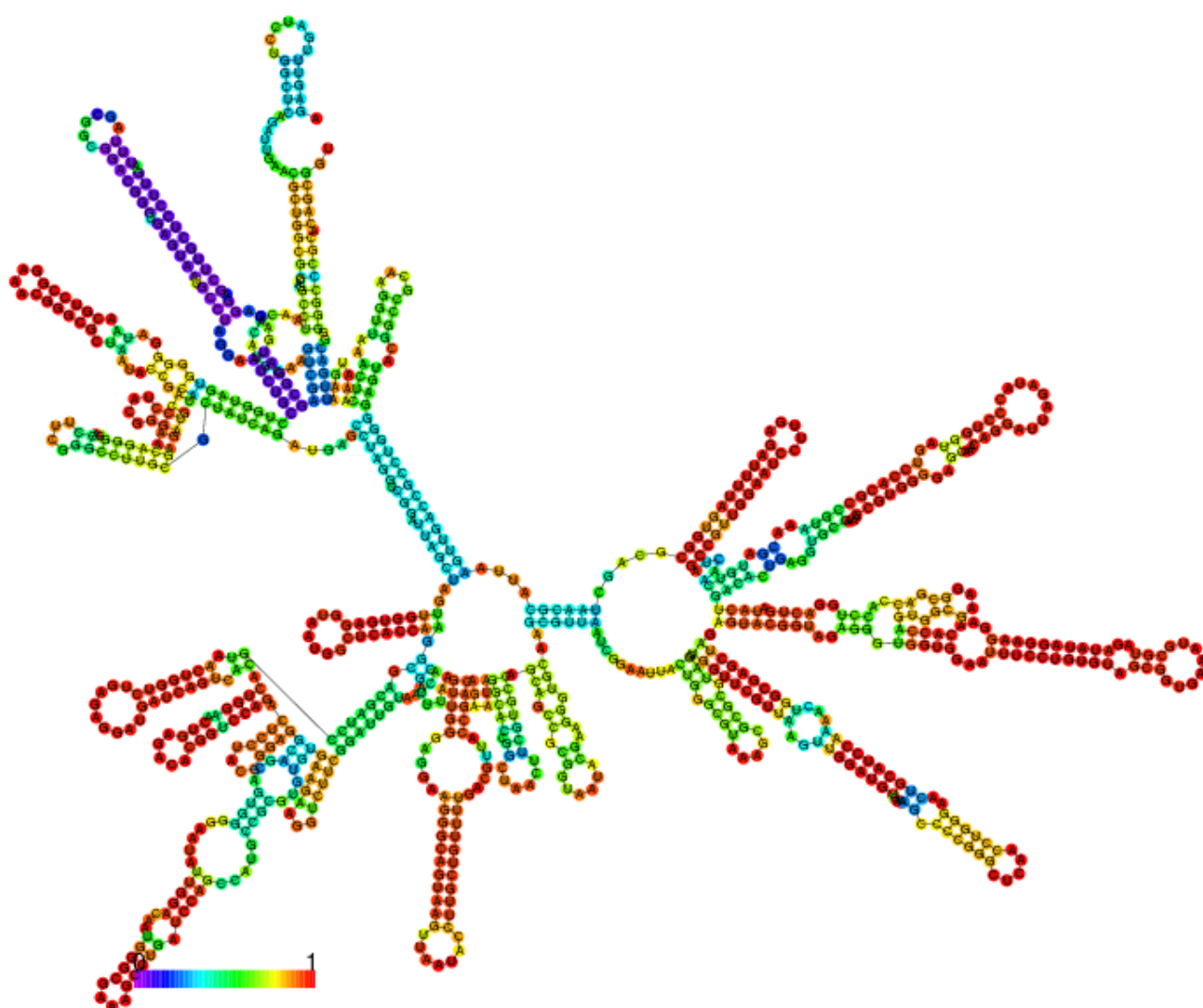
(a) : *Stenotrophomonas maltophilia* SP54N ; (b) : *Staphylococcus cohnii* A3NI3 ; (d) : *Pseudomonas mendocina* SP57N ; (c) : *Acinetobacter johnsonii* SP49F2 ;



(a) : Structure secondaire du fragment d'ARNr 16S de la souche *Stenotrophomonas maltophilia* SP54N prédite par le logiciel RNAFold.



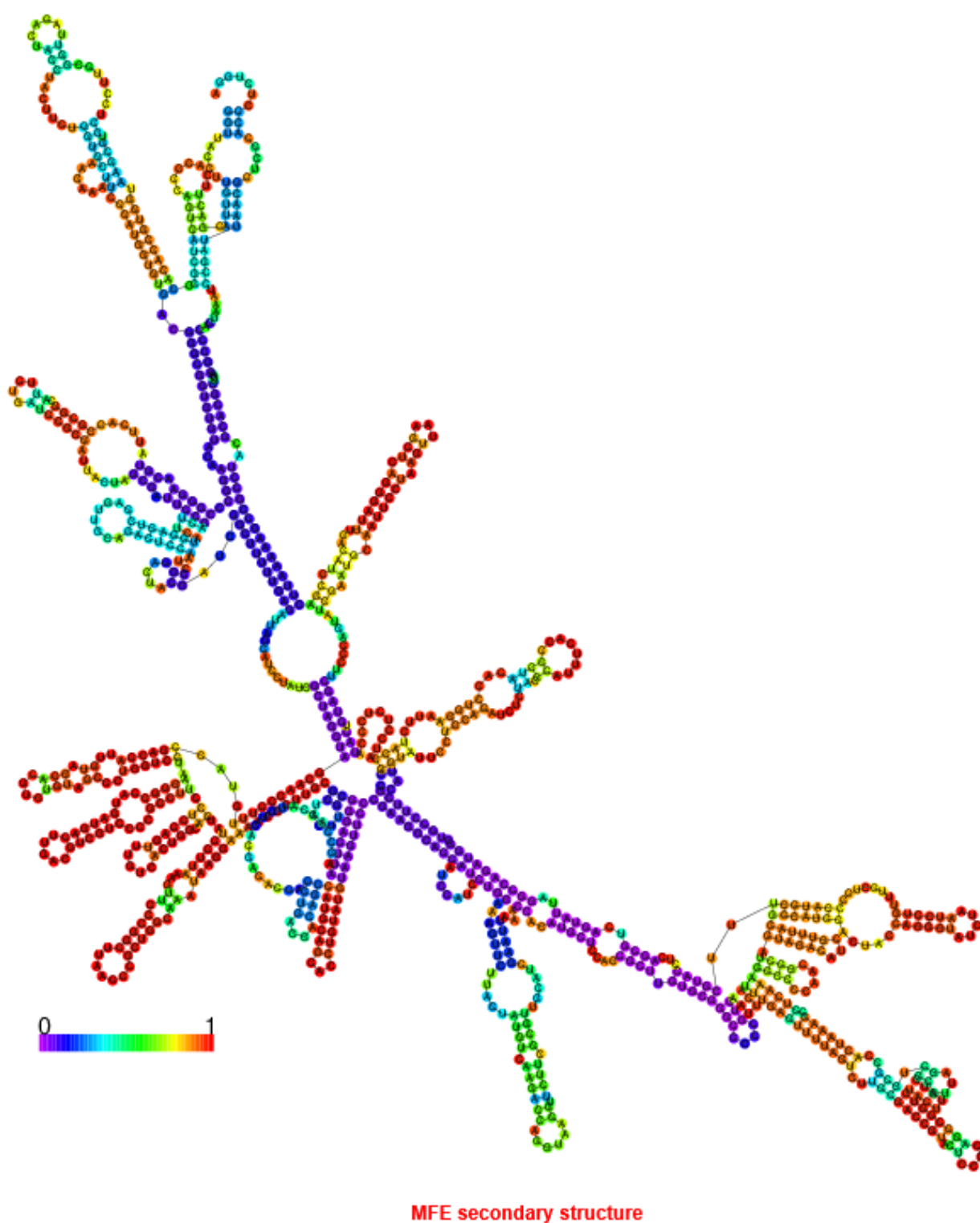
(b) : Structure secondaire du fragment d'ARNr 16S de la souche *Staphylococcus cohnii* A3NI3 prédite par le logiciel RNAFold.



MFE secondary structure

(c) : Structure secondaire du fragment d'ARNr 16S de la souche *Pseudomonas mendocina* SP57N prédite par le logiciel RNAFold.





(d) : Structure secondaire du fragment d'ARNr 16S de la souche *Acinetobacter johnsonii* SP49F2 prédite par le logiciel RNAFold.

Annexe 10 : Alignement des séquences du gène C23O des souches hydrocarbonoclaste.

Les numéros d'accèsion sur GenBank sont mis entre parenthèses :

(AY887954.1): *Pseudomonas mendocina* strain PC6 catechol 2,3-dioxygenase gene (*nahH*).

(EF694961.1): *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 catechol 2,3-dioxygenase (*xylE*) gene.

(CP010351.1:c307970-307047): *Acinetobacter johnsonii* XBB1 plasmid pXBB1-9; catechol 2,3-dioxygenase gene (*nahH*).

(CP027422.1:2409787-2410710): *Staphylococcus cohnii* strain FDAARGOS_334 chromosome, catechol 2,3-dioxygenase gene (CatE).

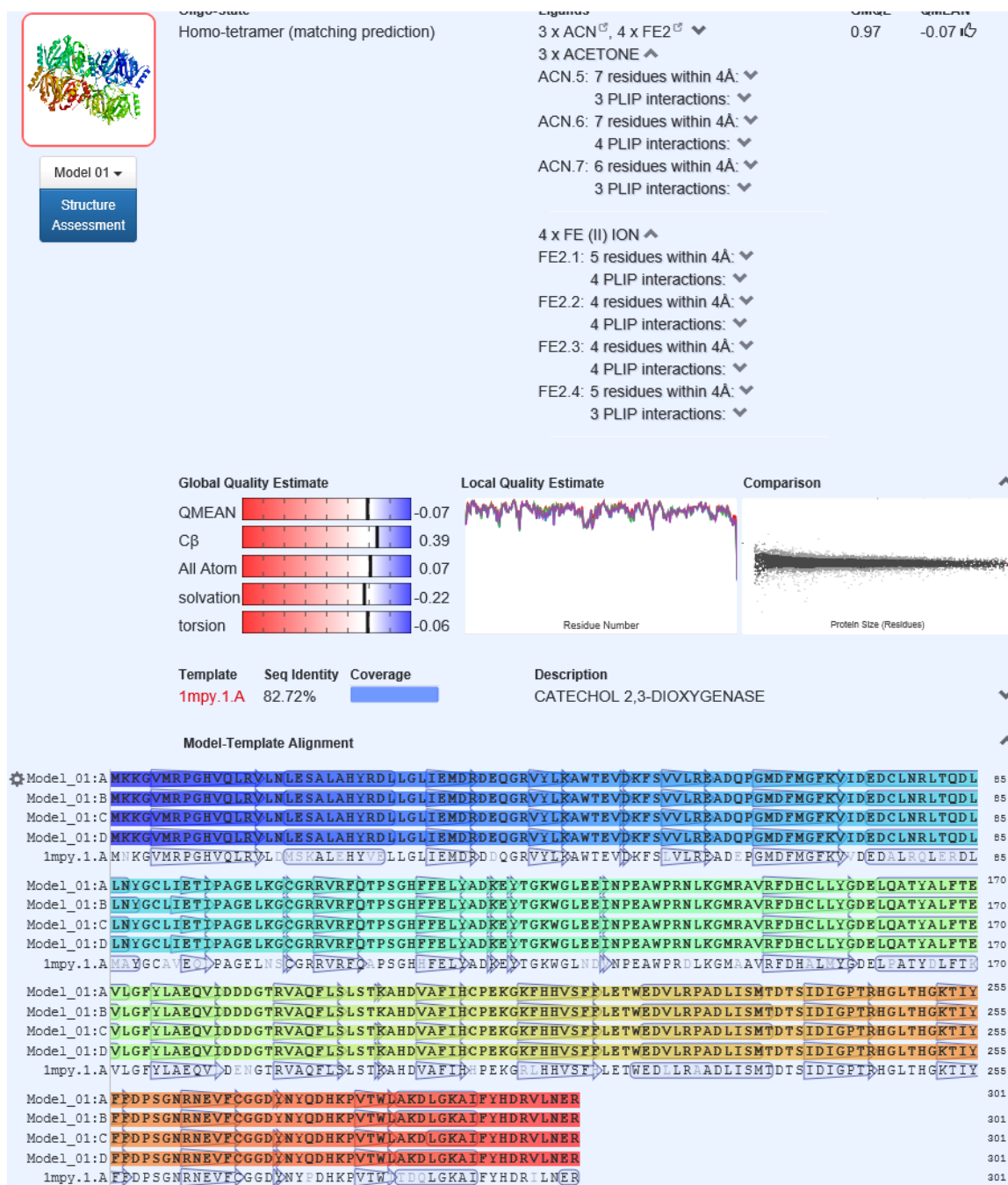
CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

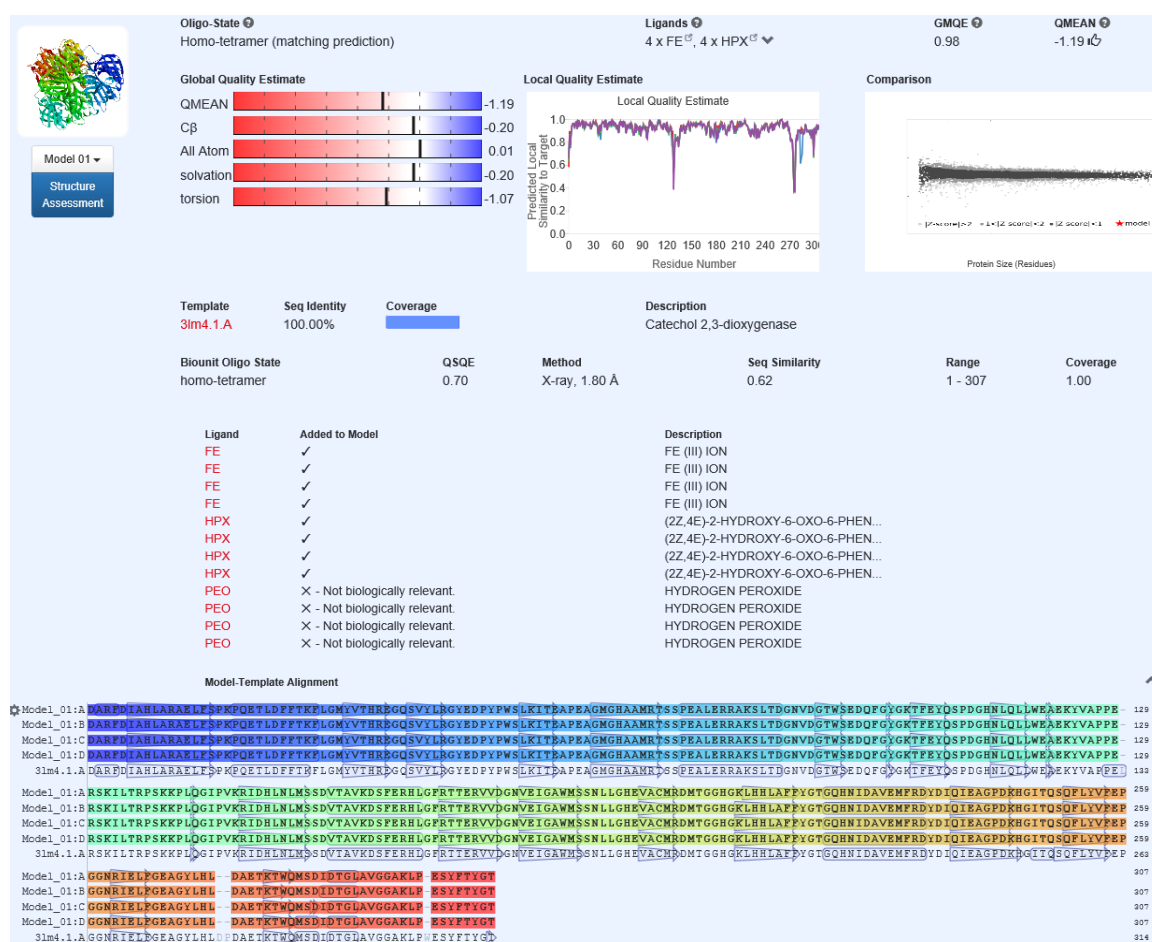
CP027422.1:2409787-2410710	TCGCTTTTACACAACCTCT-----CATTATATCCTAATCAAACCTATAAAAAAA	50
CP010351.1:c307970-307047	--GATGAATAATAAACCACTTTTACGTCGCGGCCATGTCGCGCTCAGAGTTTATAGATCTA	58
AY887954.1	-----ATGAAAAAAGGCGTAATGCGCCCCGGTCACGTCCAGCTTCGCGTACTGAACCTG	54
EF694961.1	-----ATGAAAAAAGGCGTAATGCGCCCCGGTCACGTCCAGCTTCGCGTACTGAACCTG	54
	* * * * *	
CP027422.1:2409787-2410710	GTTAC--AGTTCAAATAATAAGTTGATTTTAAATGTTATTAAATAGACAT-TATTC	107
CP010351.1:c307970-307047	GATGAATCAATTAATCATTTATGTCAATGTCA-TTGGTTTGATTAAACTGGACAAGATGA	117
AY887954.1	GAGAGCGCCCTGGCCCACTACCGCGACCTGC-TCGGTCTGATCGAAATGGACCGCGACGA	113
EF694961.1	GAGAGCGCCCTGGCCCACTACCGCGACCTGC-TCGGTCTGATCGAAATGGACCGCGACGA	113
	* * * * *	
CP027422.1:2409787-2410710	TAGAGTACGGAATAATAATTAACCTAAATGAATACCATCAGGTCCAGCTAATAATTTA	167
CP010351.1:c307970-307047	ACAGGGACGAGTCTATTTAAAAGCTTGGGATGAGCATGACCATCA-----TTG	165
AY887954.1	GCAAGGGCGCGTCTACCTGAAGGCTGGACCGAGGTCGACAAATT-----CTC	161
EF694961.1	GCAAGGGCGCGTCTACCTGAAGGCTGGACCGAGGTCGACAAATT-----CTC	161
	* * * * *	
CP027422.1:2409787-2410710	TGTGTTGTTTCTGGAAAATGAAAATCTACACACGCTAAACCATAAGTTCTATGATTTTCT	227
CP010351.1:c307970-307047	CCTAATACTGCGTGAAGCGGACTCTCCTG-----GTATGGATTGTATGGCGTTTA	215
AY887954.1	CGTGGTGTCTGCGCGAGGCCGATCAGCCGG-----GCATGGATTTCATGGGCTTCA	211
EF694961.1	CGTGGTGTCTGCGCGAGGCCGATCAACCGG-----GCATGGATTTCATGGGCTTCA	211
	* * * * *	
CP027422.1:2409787-2410710	ATACGTTTACACTTGATAACCAATTATTCACCTACGAGATGTTGGTGATAACCATTGAA	287
CP010351.1:c307970-307047	AAG-----T-CGTAGCGAATCCGAGTTAAACGCTCTGGCTCAAGC-CTTAGAAG	263
AY887954.1	AGG-----T-GATCGACGAGGATTGCCTGAACCGCCTGACCCAGGA-CCTGCTCA	259
EF694961.1	AGG-----T-GATCGACGAGGATTGCCTGAACCGCCTGACCCAGGA-CCTGCTCA	259
	* * * * *	
CP027422.1:2409787-2410710	GCTAAATAAACCGCACTGTCTAGTTTCTACAGAAGAAGGTACCAAAACCAAGTAATTTT	347
CP010351.1:c307970-307047	ACTATGGGGTTAGTATTGAATGGATTGCCGCCGGAACCACTTAGCCACCGG----TGAG	319
AY887954.1	ATTATGGCTGCCTGATCGAAACCATCCCCGCCGCGCAACTCAAGGGGTGTGG----CCGA	315
EF694961.1	ATTATGGCTGCCTGATCGAAACCATCCCCGCCGCGTGAACCTCAAGGGTTGCGG----TCGG	315
	** * * * *	
CP027422.1:2409787-2410710	TAATATTGCTTAACCTCTATTTAATCGAATTGTTTTAAATTTATATATCCAATAACTT	407
CP010351.1:c307970-307047	CGTGTAACGCTTTACTGCACCCACTGGTCATGT-TTTTGAACCTATATGCTCATAAAGATT	378
AY887954.1	CGGGTGCCTTCCAGGCACCGTCCGGGCACTT-CTTCGAACCTCTATGCGGACAAGGAATA	374
EF694961.1	CGGGTGCCTTCCAGGCACCGTCCGGGCACTT-TTTCGAGCTCTACGCCGACAAGGAGTA	374
	* * * * *	
CP027422.1:2409787-2410710	TCATCAGGAATACC---TTGCCACTTCTT-ATCTGAGACATAAGTTA-GTAATTTAGGTA	462
CP010351.1:c307970-307047	ATATGGGAATGGCA---TGCCCTACTACCAATCCAGGCGTACAAGCGAAGAATTTGAAAGG	435
AY887954.1	CACCGGCAAAATGGGGGTCGAGGAGATCAATCCCGAGGCTGGCCGCGCATTTAAAGGG	434
EF694961.1	CACCGGCAAAATGGGGGTCGAGGAGATCAATCCCGAAGCCTGGCCGCGCAACCTCAAGGG	434
	* * * * *	

CP027422.1:2409787-2410710	CATTTAATGGTTTTGTTTCTAAAACTGCTTTTTTCAT-----	498
CP010351.1:c307970-307047	CGTGCATCCGAGCCGTTTCGATCATTTGCGCGTTAATGGGTGAAGGAGTCGAGGCAAGTTA	495
AY887954.1	CATGCGCGCCGTCGCTTTTCGACCACTGCCTGATGTATGGCGACGAGCTGCAGGCGACCTA	494
EF694961.1	CATGCGCGCGGTGCGTTTCGACCACTGCCTGCTGTATGGCGACGAGCTGCAGGCGACCTA	494
	* * * * * * * * *	
CP027422.1:2409787-2410710	-----TTTCAATAGACCATTTCATCAATGGGATTAT-CTAC	532
CP010351.1:c307970-307047	CCGTCTATTTAAAGATATTTTAGGTTTTGACTTAGCCGAGCAAGTGCTGGATGGCGAAAC	555
AY887954.1	CGAACTGTTCACTGAGGTGCTCGGTTTCTACCTGGCCGAGCAGGTGATCGACGACAACGG	554
EF694961.1	TGCGCTGTTCAACCGAGGTGCTCGGTTTCTACCTGGCCGAGCAGGTGATCGACGACGACGG	554
	* * * * *	
CP027422.1:2409787-2410710	ATAAAACTCCAAGCCGTTTCCTTCCGTATCTTCTAAATATAATGAAGTTGAAATGTCGTG	592
CP010351.1:c307970-307047	CATGA---TGGCTGCTTTTATGTGATGTAGTAACAAACCTCATGTATGACCTTCATCTT	612
AY887954.1	CACGCGCATCGCGCAGTTTCTCAGCCTGTGACCAAGGCCACGACGTGGCCTTTATCCA	614
EF694961.1	CACCCGCTGCGCGAGTTTCTCAGCCTGTGACCAAGCGCACGACGTGGCCTTCATCCA	614
	* * * * *	
CP027422.1:2409787-2410710	TTCGCCACCATTGATAGGTATTTTATAT-----TCACTGAATTGCACAAGCAAGTCTGCT	647
CP010351.1:c307970-307047	---TGCGCCAGATAAGGGAAAATTACATCATATGTCATTTTGTGGAATCTTGGGCGCA	669
AY887954.1	---GCACGCGGAGAAGGGCAAGTTCCATCAGTTTCGTTCTTCTGGAACCTGGGAAGA	671
EF694961.1	---TTGCCCGGAAAAGGCAAGTTCCACCATGTGTCGTTCTTCTGGAACCTGGGAAGA	671
	* * * * *	
CP027422.1:2409787-2410710	AAGTCT---GTTTTAGACGGTAATTTTATC-----GCTAAGTGAAATAAAC	690
CP010351.1:c307970-307047	AGTTTATCTGCTGCAGACACGATTGCCAATCATGATGTTTCTCATGAAATTGGGCCAAC	729
AY887954.1	CGTGCTGCGCGCCGCCGACCTGATTTCCATGACCGACACCTCGATCGACATCGGCCCCGAC	731
EF694961.1	CGTGCTGCGCCCAGCCGACCTGATCTCCATGACCGATACCTCCATCGACATAGGCCCGAC	731
	* * * * *	
CP027422.1:2409787-2410710	----CTGCTTCTGAAAC-----AAGAGGTCTCTTCCCATATTGATTTGATTAAGTGTC	741
CP010351.1:c307970-307047	ACGACATGGTATTACCCGTGGAGAAACATTGTACTTTTTTGACCCATCTGGTAATCGCAA	789
AY887954.1	CCGCCACGGCCTGACCCATGGCAAGACCATCTACTTCTTCGATCCCTCGGGTAACCGTAA	791
EF694961.1	CCGCCACGGCCTGACTCAGGCAAGACCATCTACTTCTTCGACCCCTCGGGCAACCGCAA	791
	* * * * *	
CP027422.1:2409787-2410710	TGAAGTGATTTCAGATTACCAACCTCATATTGAATTGTAGAATATGATTCATTTACTACAT	801
CP010351.1:c307970-307047	TGAAGTGTTTAGTGCGCGGTATAT-----CTG	816
AY887954.1	CGAGGTGTTCTGCGGTGGCGATTA-----CAA	818
EF694961.1	CGAGGTGTTCTGTGGCGGCGATTA-----CAA	818
	* * * * *	
CP027422.1:2409787-2410710	TTAATCCAATAATATCTCCATAAAATTTTTTCATTTCATCTTTATCTCTTACATTTAATA	861
CP010351.1:c307970-307047	GTATTTCGGATCGTCCGACTTTAACATGGACTGCAGATGAACCTACCGCGCGGATTTTCTT	876
AY887954.1	CTACCAGGACCACAAGCCCGTGACCTGGCTGGCCAAGGACCTGGGCAAGGCAATTTTTTA	878
EF694961.1	CTACCAGGACCACAAGCCCGTGACCTGGCTGGCCAAGGACCTGGGCAAGGCCATTTTTTA	878
	* * * * *	
CP027422.1:2409787-2410710	TAATGCCATTTACAAAATGGGCACTTTCGTTATGGAACATATTTAACACCTTTCTAATTG	921
CP010351.1:c307970-307047	TACTGAACGCAAACTCAGTGAACTTTCTTTAATGTCAT-----GACCTG	921
AY887954.1	CCACGACCGGGTGCTCAACGAACGTTTCATGACCGTTCT-----CACCTA	923
EF694961.1	CCACGACCGGGTGCTCAACGAACG-----	902
	* * *	
CP027422.1:2409787-2410710	CTT 924	
CP010351.1:c307970-307047	ATT 924	
AY887954.1	A-- 924	
EF694961.1	--- 902	

Annexe 11 : interface du programme SWISS-model (<https://swissmodel.expasy.org/>)

(1)-*Stenotrophomonas maltophilia*



(2)- *Staphylococcus cohnii*

Identification and Characterization of an Indigenous Hydrocarbonoclastic Bacterial Strain *Stenotrophomonas maltophilia* newly Isolated from Seawater and Marine Sediments of Oran Harbor Northwestern Algeria

Bendadeche Faiza^{1*}, Baba Hamed Mohamed Bey² and Abi Ayad Sidi-Mohammed El-Amine¹

¹Laboratory of Aquaculture and Bioremediation (AquaBior), Department of Biotechnology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Oran 1 Ahmed Ben Bella, Oran, Algeria

²Higher School of Biological Sciences, Oran, Algeria

*Corresponding author: Faiza Bendadeche, Laboratory of Aquaculture and Bioremediation (AquaBior), Department of Biotechnology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Oran 1 Ahmed Ben Bella, Oran, Algeria, E-Mail: faizabendadeche@yahoo.com

Received: May 18, 2018; Accepted: January 19, 2019; Published: January 30, 2019

Abstract

Microorganisms have an important role in the bioremediation of petroleum contaminants that cause great concern about their persistent toxicity, carcinogenicity and difficult elimination. In this study, crude oil-degrading bacterial strain SP54N was isolated from the contaminated marine sediments and seawater at the harbor of Oran, Northwestern Algeria, using Bushnell-Hass salt medium. This strain could support high concentrations of crude oil (up to 10% v/v), and was identified as *Stenotrophomonas maltophilia* by sequencing and analyzing the 16s rDNA with the BLAST program on the NCBI website. The effects of pH, temperature and salinity on rate growth of strain SP54N, in BHSM medium supplemented with 2% (v/v) of crude oil as sole carbon and energy source, were studied. The results show that maximum growth rate was obtained at pH 7, temperature 25°C and 3% (w/v) of salinity, at 140 rpm. Moreover, *Stenotrophomonas maltophilia* could effectively utilize crude oil as its sole carbon and energy source. Therefore, *Stenotrophomonas maltophilia* SP54N can be used as an excellent degrader to develop one eco-friendly and cost-effective method for the bioremediation of harbor of Oran, as indigenous bacteria, and marine environments polluted by oil and petroleum hydrocarbons, and could be useful for biotechnological applications.

Keywords: Bioremediation; Crude oil; 16s rDNA; Marine sediments

Abbreviations: PAHs: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; BHSM: Bushnell Hass Mineral Salt Medium; TSI: Triple-Sugar-Iron

Introduction

Aromatic hydrocarbons and oil are the most important environmental pollutants. Hydrocarbon contamination in seawater and sediments has been considered as an international threat for environmental reasons [1]. Hydrocarbon pollution in the harbor and marine environments emerged from the emission of waste product processing, the utilization production, drilling, transportation and storage of petroleum product and from the oil spill accidents. The discharge of petroleum products in the environment causes environmental damage affecting directly or indirectly ecological systems and human health [2,3]. Several

Citation: Bendadeche F, Baba Hamed MB, Abi Ayad SMEA. Identification and Characterization of an Indigenous Hydrocarbonoclastic Bacterial Strain *Stenotrophomonas Maltophilia* Newly Isolated from Seawater and Marine Sediments of Oran Harbor, Northwestern Algeria. *Biotechnol Ind J*. 2019;15(1):185.

©2019 Trade Science Inc.

restoration techniques have been tested to eliminate or reduce hydrocarbon contaminants in recent decades. Bioremediation is an important strategy for utilizing biological activities for the rapid removal of environmental pollutants [4]. It has been confirmed that the application to be more appropriate and practical for cleaning-up petroleum hydrocarbons in contaminated harbors and marine environments [1].

Biodegradation by natural microbial population is the best reliable mechanism to eliminate xenobiotic pollutants, like crude oil from the environment [5]. Hydrocarbon-degrading microorganisms living in marine environments would be more adapted for restoring the hydrocarbon contamination in the sea. Various hydrocarbons degrading bacteria were isolated from marine environments such as *Psychrobacter sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Micrococcus*, and *Spingomonas*. Though, the number of the bacterial species capable of degrading petroleum hydrocarbons isolated from the sea is less than that isolated from sediments [6-8].

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) is a group of major environmental xenobiotic pollutants which raise significant concern over their toxicity, teratogenicity and carcinogenicity [9,10]. Previous studies confirmed that enormous bacteria, archaea, and fungi have the petroleum-degrading abilities [11,12]. However, these microorganisms were mainly isolated from terrestrial soils and sediments as well as marine sediments [13].

Our aim in present work is to isolate indigenous hydrocarbonoclastic bacterial strains with the abilities to degrade crude oil from contaminated marine sediments and seawater of Oran harbor and characterize the strain SP54N with its high growth rate on crude oil.

Materials and Methods

Samples collection

Samples of marine sediments and seawater of few millimeters of the surface of the sediments (-40 m depth) were collected, in sterile flasks, at the harbor of Oran, Northwestern Algeria (35°42' 44''N; 0°38'28''W) (FIG. 1), in October, 2013, and transported immediately to the laboratory.



FIG. 1. Localization of sampling site of the Oran harbor, Northwestern Algeria.

Enrichment, isolation, and selection of hydrocarbon-degrading bacteria

A synthetic Bushnell Hass Mineral Salt Medium (BHSM) was used for isolation of hydrocarbon-degrading bacteria [14]. The pH was adjusted to 7.2 and then sterilized by autoclaving at 121°C for 20 min. After the BHSM was cooled, it was supplemented with 2% (v/v) of crude oil (Supplied by the Hassi-Messaoud oil Refinery, Algeria) as sole carbon and energy source. The crude oil was sterilized by 0.22 µm filter membrane.

From mixed sediments and seawater (of -40 m depth) 2 ml was taken after decantation, and added to 500 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml BHSM, and incubated for 7 days at 25°C at 140 revolutions per minute (rpm) in a shaker incubator (Heidolph Inkubator 1000 coupled with Heidolph Unimax 1010, Germany). From the enrichment culture product, 1 ml aliquots were transferred to fresh BHSM medium for subsequent subculture. Then, 1 ml inocula from the flask were streaked on a series of four further subcultures on BHSM medium supplemented with 4%, 6%, 8% then 10% of crude oil (v/v) successively as sole carbon and energy source. Each subculture was incubated at 30°C and 140 rpm for 72 hours. Inoculums from the flask of 10% (v/v) of crude oil were streaked out into BHSM agar medium supplemented with 10% of crude oil (v/v) and incubated at 25°C for 3 to 7 days. Phenotypically different colonies were purified in nutrient agar medium (Sigma-Aldrich, Germany). Pure cultures were then inoculated another time in fresh BHSM medium with 10% (v/v) to be sure that it used crude oil as sole carbon and energy source, then stored at -20°C until characterization.

Morphological and biochemical characteristics

The typical biochemical and physiological characteristics of strain SP54N, including Gram staining, motility (Mannitol mobility medium), respiratory type (meat-liver agar), Triple-Sugar-Iron test (TSI test), Citrate utilization test (Simmons' Citrate agar), were systematically analyzed according to Bergey's Manual of determination for bacteriology [15]. All mediums were purchased from Sigma-Aldrich (Germany). The oxidase activity was determined by kit oxidase test (Sigma-Aldrich, Germany) and the catalase activity was determined by bubble formation in a 3% (w/v) hydrogen peroxide solution. All biochemical tests below were performed in triplicate.

Molecular identification

DNA extraction: Genomic DNA of strain SP54N was extracted from grown cells using an EasyPure® Bacteria Genomic DNA Kit (TransBionovo Co., Ltd., China) by following the manufacturer's instructions. The DNA samples were stored at -20°C until use.

16s rDNA gene sequence analysis: The DNA sample were used as the template for PCR amplification of the 16s rDNA gene using the universal primers ben27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') and ben1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGCTT-3'), synthesized by Sigma (Germany). The 16s rDNA gene was amplified with the following mixture: 2 µL of DNA template (20 ng), 1µL of ben27F (25 µM), 1 µL of ben1492R (25 µM), 1.0 µL of dNTP (5 mM), 4.0 µL of MgCL₂ (25 mM), 5 µL of 10X buffer solution (20 mM), 0.5 µL of Taq DNA polymerase (5 µL⁻¹), and ddH₂O up to final volume of 50 µL. PCR conditions were described as below: 95°C for 5 minutes; 35 cycles, 94°C for 1 minute. PCR products were checked by running 1.5% agarose gel electrophoresis. This 16s rDNA was partially sequenced by Genewiz. The sequence similarity was searched by the National Centre for Biotechnology Information BLAST. Analysis of 16s rDNA

gene sequence data was performed using Clustal W and the software package MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 7.0 [16,17] and the phylogenetic tree was inferred using neighbor-joining methods.

Effects different culture conditions on the growth of the hydrocarbon degrading isolate

The effects of pH, temperature and medium salinity on the growth rate of the strain SP54N were investigated using BHSM medium with 2% (v/v) of crude oil at 140 rpm shaking rate, in 250 ml sterile flasks with 50 ml BHSM medium.

In the effects of culture conditions tests, initial pH in the medium was adjusted to 6.0, 7.0, 8.0 and 9.0 with 1M HCl or 1M NaOH at 25°C. The incubation temperature was controlled at 20°C, 25°C, 30°C, 37°C, and 40°C at pH 7. The concentration of NaCl in the medium was adjusted to 0%, 3%, 6%, 9%, 12% and 15% (w/v) at 25°C and pH 7. The growth was assessed indirectly by measuring the turbidity (OD 600 nm) with the spectrophotometer (Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis Spectrometer, USA) after 48 hours of incubation.

Growth kinetics of the hydrocarbon degrading isolate

The strain SP54N was grown at an optimal culture conditions on BHSM supplemented by 3% (w/v) of NaCl and 2% of crude oil (v/v) as sole carbon and energy source at 25°C, pH 7 and 140 rpm on a orbital shaker (Heidolph Inkubator 1000 coupled with Heidolph Unimax 1010, Germany) for about 20 days. Cultures were performed in triplicate in 250 ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml of medium, while the growth was assessed by measuring the optical density at 600 nm.

Nucleotide sequence submission

The 16s rDNA gene sequence of the crude oil-degrading bacteria strain SP54N was submitted in the NCBI-Gene Bank under the accession number MG738221.

Results

Isolation of hydrocarbon-degrading bacteria

24 crude oil degrading bacterial strains were isolated from sediments and seawater of Oran harbor, by enrichment culture and dilution subcultures with an increasing concentration of crude oil (2% to 10%, v/v) and purified on a plate. The degradation experiments demonstrated that these isolates exhibited their variable growth rate and degradability of crude oil in the BHSM medium with 2% to 10% (v/v) of crude oil as their sole carbon and energy source. Among, strain SP54N possessed a high growth rate on crude oil as a sole carbon and energy source, and supported a high concentration of crude oil (up to 10% v/v).

Identification of stain SP54N

To determine phylogenetic relationships between strain SP54N and other representatives strains of the genus *Stenotrophomonas*, about 1500 pb fragments of the 16s rDNA gene were amplified by PCR (**FIG. 2**) using universal primers and only 932 pb were sequenced (GenBank ID: MG738221). This continuous stretch sequence was analyzed by the BLAST tool on the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website using the Gen Bank database. The calculation of the sequence similarity showed that partial 16s rDNA gene sequence of strain SP54N has a high similarity score of 99% to those of the bacterial strains *Stenotrophomonas maltophilia*. Subsequently, a phylogenetic tree was constructed using similar 16s rDNA sequences (**FIG. 3**). The phylogenetic tree was performed using the Neighbor-Joining method [18]. The bootstrap

consensus tree inferred from 1000 replicates [19]. The analysis involved 8 nucleotide sequences, codon positions included were 1st+2nd+3rd and all positions containing gaps and missing data were eliminated.

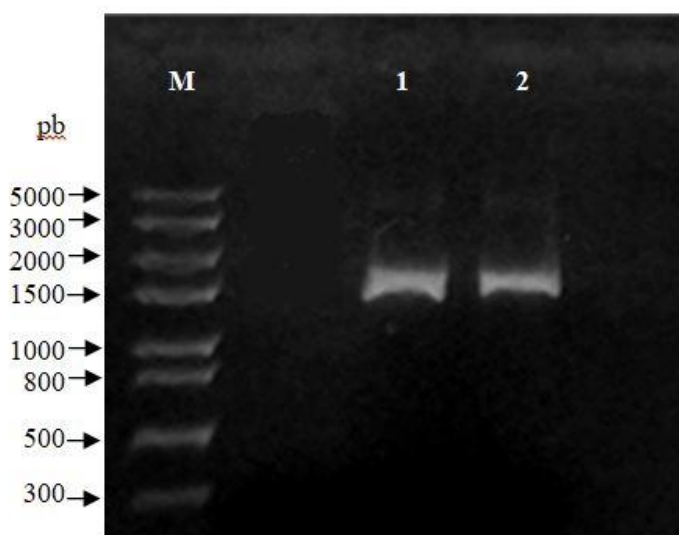


FIG. 2. Electrophoresis of the 16s rDNA PCR product of the bacterial strain SP54N on 1% and 5% of agarose; M: Trans5K DNA Marker; lane 1 and 2: 16s rDNA.

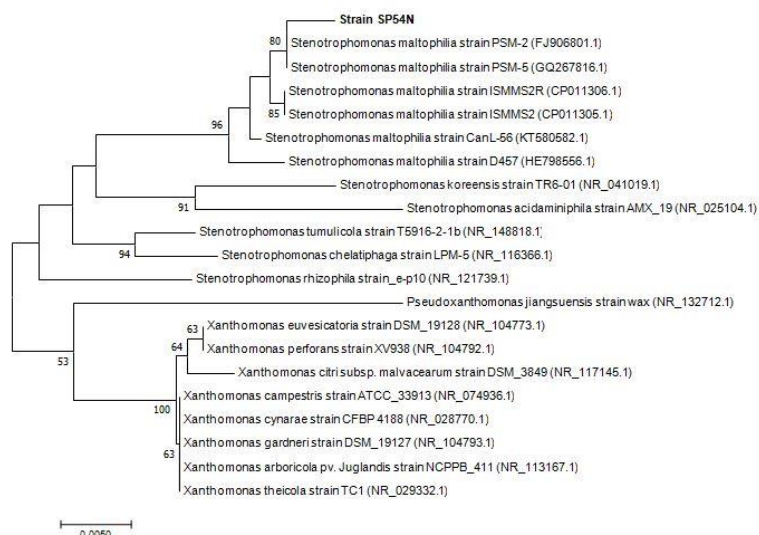


FIG. 3. Phylogenetic tree of the partial 16s rDNA sequence of strain SP54N and the closest related species obtained from the GenBank database (NCBI); The calculation was performed according to the Neighbor-Joining method (bootstrap=1000); GenBank accession numbers are shown in parentheses; The scale bar presents 0.0050 sequence divergence.

The phylogenetic tree indicated that the bacterial strain SP54N was related species *Stenotrophomonas maltophilia* (FIG. 3). Thus, strain SP54N was identified as *Stenotrophomonas maltophilia*. To highlight sequence similarity and differences between strain SP54N and the two closest strains PSM-5 (GQ267816.1) and PSM-2 (FJ906801.1) from GenBank matches, ClustalW multiple sequence alignment was used [15], and results are shown in FIG. 4. Results exposed in FIG. 3 and 4 showed that strain SP54N has some differences with related strains so that it could be a new species of *Stenotrophomonas maltophilia*.

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

```

SP54N      GTTTGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGC 60
S. maltophilia (FJ906801.1) GTTTGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGC 60
S. maltophilia (GQ267816.1) GTTTGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGC 60
*****

SP54N      AGCACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAA 120
S. maltophilia (FJ906801.1) AGCACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAA 120
S. maltophilia (GQ267816.1) AGCACAGAGGAGCTTGCTCCTTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAA 120
*****

SP54N      TCTACTCTGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACCTACGCTAATACCGCATACGACCTACG 180
S. maltophilia (FJ906801.1) TCTACTCTGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACCTACGCTAATACCGCATACGACCTACG 180
S. maltophilia (GQ267816.1) TCTACTCTGTCGTGGGGGATAACGTAGGGAACCTACGCTAATACCGCATACGACCTACG 180
*****

SP54N      GGTGAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC CGGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTA 240
S. maltophilia (FJ906801.1) GGTGAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC CGGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTA 240
S. maltophilia (GQ267816.1) GGTGAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGC CGGATTGAATGAGCCGATGTCGGATTAGCTA 240
*****

SP54N      GTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG 300
S. maltophilia (FJ906801.1) GTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG 300
S. maltophilia (GQ267816.1) GTTGGCGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAG 300
*****

SP54N      CCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG 360
S. maltophilia (FJ906801.1) CCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG 360
S. maltophilia (GQ267816.1) CCACACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGG 360
*****

SP54N      ACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTA 420
S. maltophilia (FJ906801.1) ACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTA 420
S. maltophilia (GQ267816.1) ACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTA 420
*****

SP54N      AAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCC 480
S. maltophilia (FJ906801.1) AAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCC 480
S. maltophilia (GQ267816.1) AAGCCCTTTTGTGGGAAAGAAATCCAGCTGGCTAATACCCGGTTGGGATGACGGTACCC 480
*****

SP54N      AAAGAATAAGCACCGGCTA ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCG 540
S. maltophilia (FJ906801.1) AAAGAATAAGCACCGGCTA ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCG 540
S. maltophilia (GQ267816.1) AAAGAATAAGCACCGGCTA ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCG 540
*****

SP54N      TTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTCGTTTAAGTCCGTTGTGAAAG 600
S. maltophilia (FJ906801.1) TTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTCGTTTAAGTCCGTTGTGAAAG 600
S. maltophilia (GQ267816.1) TTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTCGTTTAAGTCCGTTGTGAAAG 600
*****

SP54N      CCCTGGGCTCAACCTGGGACTG CAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTA 660
S. maltophilia (FJ906801.1) CCCTGGGCTCAACCTGGGACTG CAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTA 660
S. maltophilia (GQ267816.1) CCCTGGGCTCAACCTGGGACTG CAGTGGATACTGGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTA 660
*****

SP54N      GCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAG 720
S. maltophilia (FJ906801.1) GCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAG 720
S. maltophilia (GQ267816.1) GCGGAATTCCTGGTGTAGCAGTGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCATGGCGAAG 720
*****

SP54N      GCAGCTACCTGGACCAACACTG CACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA 780
S. maltophilia (FJ906801.1) GCAGCTACCTGGACCAACACTG CACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA 780
S. maltophilia (GQ267816.1) GCAGCTACCTGGACCAACACTG CACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA 780
*****

SP54N      GATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCAC 840
S. maltophilia (FJ906801.1) GATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCAC 840
S. maltophilia (GQ267816.1) GATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCAATTTGGCAC 840
*****

SP54N      GCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCGCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA 900
S. maltophilia (FJ906801.1) GCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCGCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA 900
S. maltophilia (GQ267816.1) GCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCGCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAA 900
*****

SP54N      CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAG 929
S. maltophilia (FJ906801.1) CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAG 929
S. maltophilia (GQ267816.1) CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAG 929
*****

```

FIG. 4. Alignment sequence of partial 16s rDNA sequence gene of unknown stain SP54N and the two closest strains *Stenotrophomonas maltophilia* (code number in GenBank: in parentheses).

The colonies of strain SP54N were light yellow, circular, smooth, convex, with entire margins and 1 mm to 2 mm in diameter after incubation at 25°C for 24 hours on a nutrient agar plate (**FIG. 5a**). The gram strain showed that strain SP54N belonged one of the Gram-negative rod-shaped bacteria (**FIG. 5c**). The **FIG. 5b** shows colonies of strain SP54N in BHSM agar medium with 10% of crude oil (v/v). The results of the biochemical characteristics of strain SP54N are summarized in **TABLE 1**.

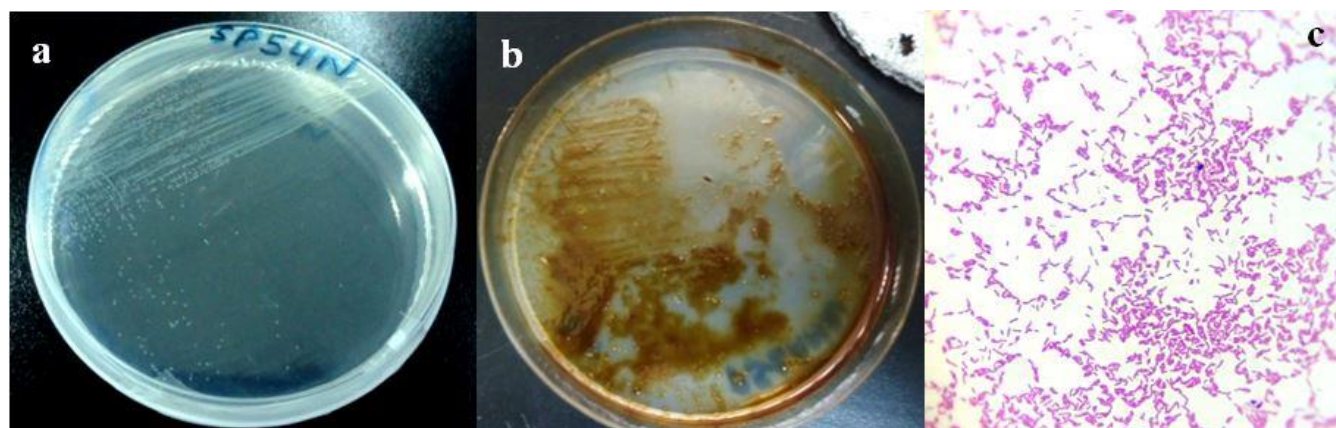


FIG. 5. Morphological properties of the colonies and cells of strain SP54N; a: Colonies of strain SP54N on the nutrient agar plate; b: Colonies of strain SP54N on the BHSM medium agar plate with 10% (v/v) of crude oil; c: Gram-negative bacterium of strain SP54N (10 × 100).

TABLE 1. Morphological and biochemical characteristics of strain SP54N.

Characteristics	Results
Gram staining	-
Shape	Rod-shaped
Oxidase test	-
Catalase test	+
Motility	+
Mannitol	-
Respiratory type	Strict aerobia
TSI test	K/K
H ₂ S production	-
Gas production	-
Citrate utilization	-
+: Positive reaction; -: Negative reaction	

Effects of different biodegradation conditions

In order to understand the crude oil degradation environmental characteristics by the isolate strain SP54N, the environmental factors affecting degradation were investigated, including initial pH, temperature, and NaCl concentration.

Results obtained from the effect of different pH on the growth rate of strain SP54N in crude oil as a sole carbon and energy source are represented in **FIG. 6a**. As shown in this curve, the strain could grow at pH 6-9 with the optimum growth rate at pH 7.

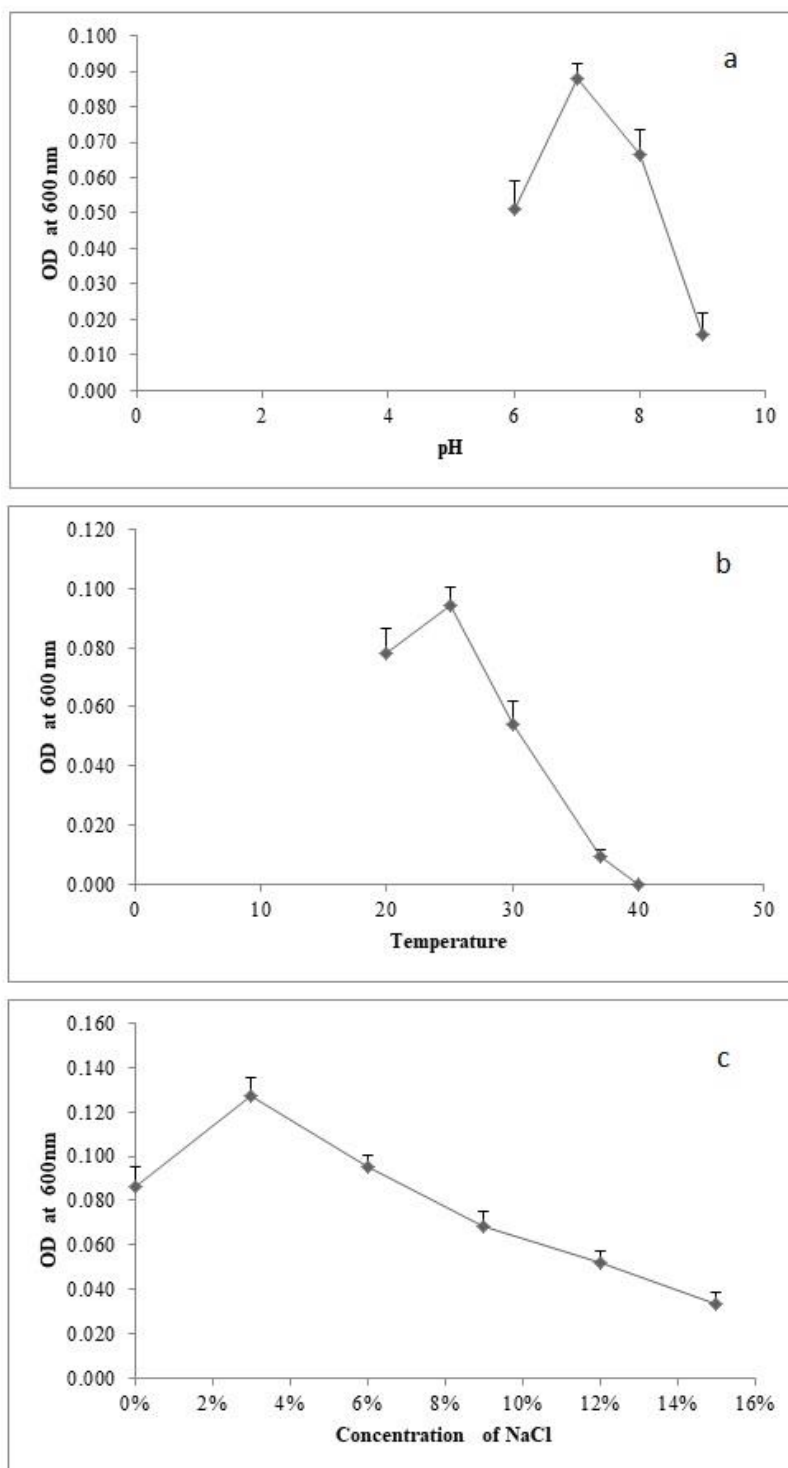


FIG. 6. Effects of pH (a), temperature (b), and medium salinity (c) on the growth rate of strain SP54N on BHSM medium supplemented with 2% crude oil (v/v) as sole carbon and energy source for 48h at 140 rpm; Experiments were performed in triplicate.

Effects of different temperature in the growth rate of strain SP54N on crude oil as a sole carbon and energy source are illustrated in **FIG. 6b**. The results demonstrated that this strain could utilize crude oil at temperature 20°C to 37°C, with a maximum growth rate at temperature 25°C. Strain SP54N can grow in temperatures less than 20°C.

Results obtained from the effect of different concentration of NaCl on rate growth of strain SP54N on crude oil as sole carbon and energy source are represented in **FIG. 6c**. From the curve, it can be seen that the optimum concentration of NaCl for the highest growth rate of strain SP54N was 3% (w/v). However, this bacterial strain can tolerate high salt concentrations (up to 15% w/v).

Growth kinetics of the hydrocarbon degrading isolate

The bacterial stain SP54N was cultured under optimal culture conditions obtained in this study, pH 7, 3% (w/v) of NaCl at 25°C, on BHSM medium with 2% (v/v) of crude oil as sole carbon and energy source over 20 days. The optical density at 600 nm was measured to assess bacterial growth, and the results are shown in **FIG. 7**. The strain started the logarithmic growth phase from the 1st day to 13th day, and then the stationary phase was attained at day 14.

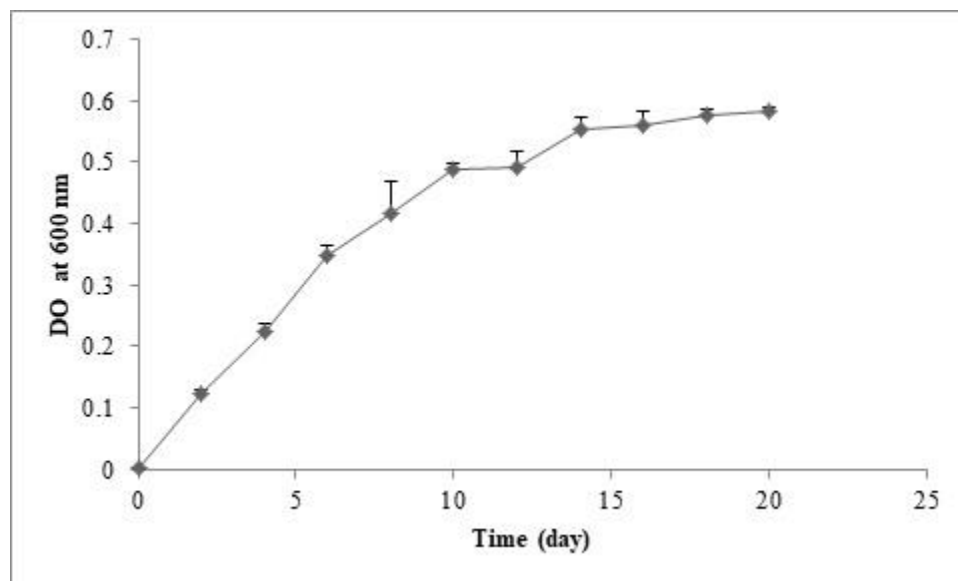


FIG. 7. Growth kinetics of the SP54N strain on crude oil (v/v) as a sole source of carbon and energy over 20 days; Bars represent standard deviation.

Discussion

Strain SP54N was one of the hydrocarbon-degrading bacteria belonging to *Stenotrophomonas maltophilia*, which was firstly isolated from seawater and sediment of the harbor of Oran-Algeria, and had potential to develop a method to remediate marine environments polluted by petroleum hydrocarbons.

The molecular identification of the SP54N strain was considered. Therefore, the partial sequence of 16s rDNA gene (932 bp) confirmed the identification as *Stenotrophomonas maltophilia* species with 99% of similarity (**FIG. 3 and 4**). Furthermore,

the morphological characteristics of strain SP54N were very similar to those of the reported strains *Stenotrophomonas maltophilia*. The result of the biochemical characteristics of strain SP54N is summarized in **TABLE 1**.

The study of the effect of culture conditions on petroleum hydrocarbons degradation is very important because it can provide information about the microorganism and their growth requirements, before any contribution for bioremediation. To reveal the crude-oil-degrading conditions of strain SP54N, pH from 6 to 9, temperature from 20°C to 40°C and NaCl concentration from 0% to 15% (w/v) were investigated, as shown in **FIG. 6** respectively.

Maximum growth was obtained at pH 7.0 (**FIG. 6a**). This result is in agreement with those obtained by Neethu et al., [20], Deng et al., [1] and by Kumari et al., [21], who showed that the maximum growth rate of *Stenotrophomonas maltophilia*, isolated from contaminated soil refinery was at pH 7.5. According to Vandecasteele, extreme pH inhibited the biodegradation of the oil [22]. However, in the marine environment as fresh water, the favorable range of pH was between 7 and 8.

From the curve of **FIG. 6b**, we note that our isolate strain grows in a wide range of temperature, from 20°C to 37°C (and less than 20°C). These results are according to those obtained with Rouf et al., [23]. Also, Rodriguez-Blanco and Antoine reported that the degradation of crude oil might as well be done at 4°C, 10°C and 25°C with controlled conditions in Mediterranean water [24]. Temperature is the most important factor influencing the biodegradation rate by affecting directly bacterial metabolism [25].

Concerning salinity, it may have a positive impact on hydrocarbon degrading aptitude. There is a correlation between the mineralization rate of several hydrocarbons and salinity [26]. However, contamination by both salt and oil posed a problem for cleaning up using bioremediation, because externally added bacteria do not support high salinity [27].

In this study, results obtained for optimum salinity test showed that strain SP54N supported a high concentration of NaCl and grown in a large range of salinity (0% to 15%, w/v), with a maximum growth rate at 3% (w/v) of NaCl (**FIG. 6c**). These results are consistent with those obtained by Roder et al., who showed that *Stenotrophomonas maltophilia* decreased growth rate when exposed to more than 3% (w/v) of NaCl [28].

For results obtained from the kinetics of growth on crude oil by the isolated bacterial strain (**FIG. 7**), under the optimal conditions, the stationary phase was attained at day 14. These results indicate that this bacterial strain had effectively the ability to degrade crude oil.

Several strains of *Stenotrophomonas sp.* were previously reported to own their hydrocarbon-degrading capacity [29,30]. Other *Stenotrophomonas sp.* strains have demonstrated the ability to degrade organic pollutants, such as pesticides, insecticides, chitin, steroid hormones, and Keratin [31-35]. Also, this species possessed the ability to remediate the hydrocarbon contaminated environments [36,37].

Strains of *Stenotrophomonas maltophilia* were capable of utilizing crude oil as a sole carbon and energy source [38], and could polycyclic aromatic hydrocarbons (HAPs), such as naphthalene, fluorene, and anthracene [39], Phenanthrene [39,40],

benzo[a]pyrene [41]. In addition, Urszula, et al., showed that *Stenotrophomonas maltophilia* (strain KB2) was capable to degrade high concentrations of aromatic compounds, and might utilize phenol as a sole carbon and energy source of, and different kind of aromatic compounds such as protocatechuic acid (3,4-DBH), 4-hydroxybenzoic acid (4-HB), benzoic acid, vanillic acid and catechol [42].

Mahjoubi et al., showed that *Stenotrophomonas maltophilia*, isolated from petroleum contaminated sediments and seawater at the refinery harbor of the Bizerte coast, in the north of Tunisia, were the most active hydrocarbonoclastic isolated strain with significant production of biosurfactants and high emulsification activity of crude oil (up to 46%), and suggest by their results that *Stenotrophomonas maltophilia* may constitute a potential candidate for bioremediation, and could be useful for biotechnological applications [7]. It was demonstrated that this species had the ability to utilize a wide range of aromatic substrate as a sole carbon source, and could degrade 80% of phenanthrene in 48 hours comparing to *Pseudomonas* that degraded 70% of phenanthrene in 40 days [43,44]. Moreover, *Stenotrophomonas maltophilia* is a very powerful and useful means in the biotreatment of sole and wastewater decontamination [7].

The isolated strain from contaminated marine sediments and seawater in our study tolerate significant concentrations of NaCl (up to 15% w/v) and crude oil (up to 10% v/v) because of the polluted area and mechanisms of induction of developed enzymes of interest and this tolerance may reflect the evolutionary adaptation. Thus, strain SP54N may be a new species of *Stenotrophomonas maltophilia*. This adaptation translates in high stability which gives bacteria the ability to answer more quickly to a new source of hydrocarbons than bacteria without spoilage [45-48].

Conclusion

In the present study, a firstly isolated marine petroleum hydrocarbon-degrading bacterium strain SP54N, from mixture seawater and marine sediments of the Oran harbor-Algeria, was identified as *Stenotrophomonas maltophilia* according to its phenotypic and phylogenetic characteristics, possessed an outstanding growth capacity in crude oil, and excellent adaptability in pH and salinity, and could be used as a good degrader, to establish one eco-friendly, and cost-effective method for the removal of hydrocarbon contaminants in diverse marine environments polluted by petroleum hydrocarbons and crude oil, particularly in harbor of Oran.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgment

This study was funded by Laboratory of (AquaBior), Department of Biotechnology, University of Oran 1 Ahmed Ben, Faculty of Nature and Life Sciences, Oran-Ministry of Higher Education and Scientific Research (Algeria). The authors thank the scientific group of Aquaculture and Bioremediation Laboratory (AquaBior) for their fruitful help for the development of this work.

Funding

This study was funded by the Laboratory of Aquaculture and Bioremediation (AquaBior) and by the Ministry of Higher Education and Scientific Research, Algeria.

REFERENCES

- [1] Deng MC, Li J, Liang FR, et al. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. *Mar Pollut Bull.* 2014;83(1):79-86.
- [2] Jiang Z, Huang Y, Xu X, et al. Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton. *Acta Ecologica Sinica.* 2010;30(1):8-15.
- [3] Gong Y, Zhao X, Cai Z, et al. A review of oil, dispersed oil and sediment interactions in the aquatic environment: influence on the fate, transport and remediation of oil spills. *Mar Pollut Bull.* 2014;79(1-2):16-33.
- [4] Hassanshahian M, Emtiazi G, Cappello S. Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Mar Pollut Bull.* 2012;64(1):7-12.
- [5] Cappello S, Caruso G, Zampino D, et al. Microbial community dynamics during assays of harbor oil spill bioremediation: a microscale simulation study. *J Appl Microbiol.* 2007;102(1):184-94.
- [6] Hii YS, Law AT, Shazili NA, et al. Biodegradation of Tapis blended crude oil in marine sediment by a consortium of symbiotic bacteria. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2009;63(2):142-50.
- [7] Mahjoubi M, Jaouani A, Guesmi A, et al. Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification, and characterization of the biotechnological potential. *New Biotechnol.* 2013. 2013;30(6):723-33.
- [8] Varjani SJ. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour Technol.* 2017;223:277-86.
- [9] Lee RF, Anderson JW. The significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. *Mar Pollut Bull.* 2005;50(7):705-23.
- [10] Song X, Xu Y, Li G, et al. Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. *Mar Pollut Bull.* 2011;62:2122-28.
- [11] Liu R, Zhang Y, Ding R, et al. Comparison of archaeal and bacterial community structures in heavily oil-contaminated and pristine soils. *J Biosci Bioeng.* 2009;108(5):400-07.
- [12] Atlas RM, Hazen T C. Oil biodegradation and bioremediation: A totale of the two worst spills in U.S. history. *Environ Sci Technol.* 2011;45:6709-15.
- [13] Liu SH, Zeng GM, Niu QY, et al. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. *Bioresour Technol.* 2017;224:25.
- [14] Mehdi H, Giti E. Investigation of alkane biodegradation using the microtiter plate method and the correlation between biofilm formation, biosurfactant production, and crude oil biodegradation. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2008;62(2):170-78.
- [15] Holt SG, Kriey NR, Sneath PHA, et al. *Bergey's Manual of determination for Bacteriology.* Williams and Wilkins, New York. 1998.
- [16] Sievers F, Higgins DG. Clustal Omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. In *Multiple sequence alignment methods.* Humana Press, Totowa, NJ. 2014;105-116.

- [17] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870-04.
- [18] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4(4):406-25.
- [19] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985;39(4):783-91.
- [20] Neethu CS, Rahiman KM, Rosmine E, et al. Utilization of agro-industrial wastes for the production of lipase from *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Arctic and optimization of physical parameters. *Biocataly Agric Biotechnol.* 2015;4(4):703-09.
- [21] Kumari S, Regar RK, Manickam N. Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in crude oil by individual and a consortium of bacteria. *Bioresour Technol.* 2018;254:174-79.
- [22] Vandecasteele JP. Microbiologie pétrolière: Concepts implications environnementales applications industrielles. *Technip.* 2005;1:534-35.
- [23] Rouf R, Karaba SM, Dao J, et al. *Stenotrophomonas maltophilia* strains replicate and persist in the murine lung, but to significantly different degrees. *Microbiology.* 2011;157(7):2133-42.
- [24] Rodríguez-Blanco A, Antoine V, Pelletier E, et al. Effects of temperature and fertilization on total vs. active bacterial communities exposed to crude and diesel oil pollution in NW Mediterranean Sea. *Environ Pollut.* 2010;158(3):663-73.
- [25] Wang Y, Feng J, Lin Q, et al. Effects of crude oil contamination on soil physical and chemical properties in Momoge wetland of China. *Chin Geogr Sci.* 2013;23(6):708-15.
- [26] Shiaris MP. Phenanthrene mineralization along a natural salinity gradient in an urban estuary, Boston Harbor, Massachusetts. *Microb Ecol.* 1989;18(2):135-46.
- [27] Malkawi HI, Fatmi LM, Al-deeb TM. Mutational analysis of oil-degrading genes in bacterial isolates from oil contaminated soil at the Jordanian oil refinery. *World Appl Sci J.* 2009;6(2):208-20.
- [28] Roder A, Hoffmann E, Hagemann M, et al. Synthesis of the compatible solutes glucosylglycerol and trehalose by salt-stressed cells of *Stenotrophomonas* strains. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;243(1):219-26.
- [29] Lee EY, Jun YS, Cho KS, et al. Degradation characteristics of toluene, benzene, ethylbenzene, and xylene by *Stenotrophomonas maltophilia* T3-c. *J Air Waste Manage Assoc.* 2002;52(4):400-06.
- [30] Tiwari B, Manickam N, Kumari S, et al. Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas* sp. *Bioresour Technol.* 2016;216:1102-05.
- [31] Chen S, Yang L, Hu M, et al. Biodegradation of fenvalerate and 3-phenoxybenzoic acid by a novel *Stenotrophomonas* sp. strain ZS-S-01 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011;90(2):755-67.
- [32] Tang H, Li J, Hu H, et al. A newly isolated strain of *Stenotrophomonas* sp. hydrolyzes acetamiprid, a synthetic insecticide. *Process Biochem.* 2012;47(12):1820-25.
- [33] Kobayashi DY, Reedy RM, Bick J, et al. Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(3):1047-54.
- [34] Li Z, Nandakumar R, Madayiputhiya N, et al. Proteomic analysis of 17 β -estradiol degradation by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Environ Sci Technol.* 2012;46(11):5947-55.
- [35] Fang Z, Zhang J, Liu B, et al. Biochemical characterization of three keratinolytic enzymes from *Stenotrophomonas maltophilia* BBE11-1 for biodegrading keratin wastes. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2013;82:166-72.

- [36] Mukherjee P, Roy P. Genomic potential of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation with an assessment of its multifaceted role in our environment. *Front Microbiol.* 2016;7:967.
- [37] Venkidusamy K, Megharaj M. Identification of electrode respiring, hydrocarbonoclastic bacterial strain *Stenotrophomonas maltophilia* MK2 highlights the untapped potential for environmental bioremediation. *Front Microbiol.* 2016;7:1965.
- [38] Kumari S, Regar RK, Manickam N. Improved polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in crude oil by individual and a consortium of bacteria. *Bioresour Technol.* 2018;254:174-9.
- [39] Arulazhagan P, Vasudevan N, Yeom IT. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment. *Int J Environ Sci Tech.* 2010;7(4):639-52.
- [40] Gao S, Seo JS, Wang J, et al. Multiple degradation pathways of phenanthrene by *Stenotrophomonas maltophilia* C6. *Int Biodeterior Biodegradation* 2013;79:98-104.
- [41] Shuona C, Hua Y, Jingjing C, et al. Physiology and bioprocess of a single cell of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation of co-existed benzo [a] pyrene and copper. *J Hazard Mat.* 2017;321:9-17.
- [42] Urszula G, Izabela G, Danuta W, et al. Isolation and characterization of a novel strain of *Stenotrophomonas maltophilia* possessing various dioxygenases for monocyclic hydrocarbon degradation. *Braz J Microbiol.* 2009;40(2):285-91.
- [43] Wojcieszynska D, Hupert-Kocurek K, Greń I, et al. High activity catechol 2, 3-dioxygenase from the cresols-Degrading *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2011;65(6):853-58.
- [44] Kahlon RS. Biodegradation and bioremediation of organic chemical pollutants by *Pseudomonas*. In *Pseudomonas*. *Mol Appl Biol.* 2016;343-417.
- [45] Girvan MS, Campbell CD, Killham K, et al. Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ Microbiol.* 2005;7(3):301-13.
- [46] Maila MP, Randima P, Drønen K, et al. Soil microbial communities: Influence of geographic location and hydrocarbon pollutants. *Soil Biol Biochem.* 2006;38(2):303-10.
- [47] Bordenave S, Goni-Urriza MS, Caumette P, et al. Effects of heavy fuel oil on the bacterial mat. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(19):6089-97.
- [48] Molina M, Gonzalez N, Bautista L, et al. Isolation and genetic identification of PAH-degrading bacteria from the microbial consortium. *Biodegradation.* 2009;20(6):789-800.

Crude Oil Degradation Potential of Indigenous Hydrocarbonoclastic Bacterial Strain *Acinetobacter johnsonii* Firstly Isolated from Marine Sediments of Oran Port, Algeria

Faiza Bendadeche¹, Mohamed Bey Baba Hamed² and Sidi-Mohammed El-Amine Abi Ayad¹

1. Laboratory of Aquaculture and Bioremediation (AquaBior), Department of Biotechnology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Oran 1 Ahmed Ben Bella, Oran 31000, Algeria

2. Higher School of Biological Sciences of Oran, Oran 31000, Algeria

Abstract: Petroleum contaminants caused great damages to environment and human health. Among, the port of Oran is subject of pollution mainly by PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) as a result of the large flow of ships. Thus bioremediation by indigenous microorganisms is an important means for their reduction and elimination. In the present work, a hydrocarbonoclastic bacterium strain SP49F2 was considered, firstly isolated from the contaminated marine sediments and seawater at the port of Oran (Algeria), using Bushnell-Hass mineral salt medium, and identified on the basis of morphological and biochemical characteristics and molecular tools by analysis of partial 16S rRNA gene sequence, using the Basic Local Alignment Search Tool program on the data base of NCBI (National Centre for Biotechnology Information), and the EzBioCloud 16S rRNA database. Kinetic of growth of this isolate on crude oil during 20 days of culture was studied at temperature 25 °C, 3% (w/v) of NaCl concentration and pH 7, at 140 rpm (Revolutions Per Minute). Strain SP49F2 was identified molecularly as *Acinetobacter johnsonii*, and might support high concentrations of crude oil (up to 10%, v/v). Results of growth kinetic on crude oil as sole energy and carbon source by the isolate strain showed that the stationary phase was attained at day 12. Thus, strain *Acinetobacter johnsonii* SP49F2 could efficiently utilize crude oil as its sole carbon and energy source, and could be used as a wonderful native biological alternative for the bioremediation of the port of Oran, and marine area polluted by petroleum hydrocarbons, as an eco-friendly efficacy degrader, and may be suitable for biotechnological applications.

Key words: Crude oil, *Acinetobacter johnsonii*, bioremediation, marine sediments, 16S rDNA.

1. Introduction

Among the environmental pollutants, the PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) are the most common, presenting mutagenic, toxic and carcinogenic properties [1]. When compared to the other chemicals of ecological concern, petroleum products such as gasoline, diesel, or lubricants are widely used. However, through oil spills accidents, and leaks during fuel production, exploration, transport, and storage, petroleum-based products are

scattered into the environment [2].

Petroleum hydrocarbons present serious risks to the health of all living organisms in the world. For the remediation and management of petroleum hydrocarbons, various methods such as chemical, physical, and biological are presently usable. Between these methods, bioremediation is considered as an interesting substitution for removing petroleum hydrocarbons from contaminated areas, as an economical, cost-effective and eco-friendly method [2, 3].

There are hundreds of species of fungi, archaea and bacteria that can degrade oil. Hydrocarbon-degrading

Corresponding author: Faiza Bendadeche, Ph.D., main research field: biotechnology and bioremediation.

microorganisms are ubiquitous, but represent only a small part of the microbial communities [4]. It has been confirmed that the application of microorganisms is more appropriate, provides practical means for cleaning-up of contamination by petroleum hydrocarbons from harbors and marine environments, especially by indigenous microorganisms [5, 6]. In addition, native hydrocarbons-degrading bacteria proliferating in contaminated area as marine sediments are better adapted and more suitable for restoring the hydrocarbon contamination in sea [6, 7].

The aim of the present work is to isolate indigenous hydrocarbon-degrading bacterial strains from contaminated marine sediments and seawater of the port of Oran (Algerian coast), with the capability to utilize crude oil, and to study the firstly isolated bacterial strain SP49F2, with its outstanding growth rate on crude oil as carbon and energy source.

2. Material and Methods

2.1 Sampling Site Localization and Samples Collection

Mixed seawater and marine sediment samples of few millimeter of sediments surface were collected, in October 2013, from -40 m depth at port of Oran (Algerian coast) (latitude: 35°42'44" N; longitude: 0°38'28" W), and transported immediately to the Aquaculture and Bioremediation laboratory (AquaBior).

2.2 Procedure of Enrichment, Isolation and Selection of Hydrocarbonoclastics Bacteria

For the isolation of hydrocarbon-degrading bacteria a synthetic BHMS (Bushnell-Haas Mineral Salt) medium was used [8]. Sterilization of the BHMS medium was performed by autoclaving at 121 °C for 20 min, after adjusting pH at 7.2. Then, sterile crude oil (from the Hassi-Messaoud oil Refinery, Algeria) was added to cool BHMS medium as sole source of carbon and energy. Sterilization of crude oil was carried out using 0.22 µm filter membrane.

To enrich culture, 2 mL of mixed seawater and marine sediments (from 40 m depth), after decantation, was taken and added to 100 mL BHMS, with 2% (v/v) of crude oil, in 500 mL Erlenmeyer flask, and incubated at 25 °C and 140 rpm (Revolutions Per Minute) in a shaker incubator (Heidolph Inkubator 1000 coupled with Heidolph Unimax 1010, Germany), for 7 days. For subsequent subculture, 1 mL of product of the enrichment culture was inoculated in fresh BHMS medium, then from the product of this last subculture, 1 mL was transferred to a series of four supplementary serial subcultures successively with 4%, 6%, 8% then 10% of crude oil (v/v) as sole carbon and energy source on BHMS medium. Every subculture was incubated for 72 h at 25 °C and 140 rpm. From the product of the last subculture flask, of 10% (v/v) of crude oil, inoculums were streaked out into BHMS agar medium plate, with addition of 10% (v/v) of crude oil, and incubated for 7 days at 25 °C. Purification of different colonies phenotypically was carried out in nutrient agar medium. Morphologically distinct pure cultures with higher visible growth rate and crude oil degradation on BHSM medium supplemented with 10% (v/v) of crude oil were selected, and stored at -20 °C until use.

2.3 Physiological and Biochemical Characteristics

The physiological and biochemical typical characteristics of strain SP49F2, such as Gram staining, the oxidase activity (established by kit oxidase test (Sigma-Aldrich, Germany)), respiratory type (meat-liver agar), motility (Mannitol mobility medium), the catalase activity (defined by bubble formation in a 3% (w/v) solution of hydrogen peroxide), citrate utilization test (Simmons' Citrate agar), TSI (Triple-Sugar-Iron) test, and the ability to growth in Chapman agar medium, Schubert medium, SS (*Salmonella-Shigella*) agar medium and BCPL (Brain-Heart Infusion Broth), were systematically analyzed according to Holt, et al. [9]. All biochemical tests above were carried out in triplicate.

2.4 Molecular Identification

2.4.1 DNA Extraction

From grown cells, genomic DNA of strain SP49F2 was extracted using an EasyPure® Bacteria Genomic DNA Kit (TransBionovo Co., Ltd., China), according to the manufacturer's instructions. The extracted DNA was stored at -20 °C until analysis.

2.4.2 16S rRNA Gene Sequencing and Phylogenetic Analyses

PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification of the 16S rRNA gene was conducted using DNA template sample with the universal primers, forward primer ben27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-3') and reverse primer ben1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGCTT-3'), synthesized by Sigma (Germany). The PCR reaction mixture, with a total volume of 50 µL, contained the following: 1 µL of DNA template (40 ng), 1 µL of ben27F (25 µM), 1 µL of ben1492R (25 µM), 2.0 µL of dNTP (2.5 mM), 2.0 µL of MgCl₂ (50 mM), 5 µL of 10× buffer solution (20 mM), 0.5 µL of taq DNA polymerase (5 U L⁻¹), and ddH₂O. The PCR programmer was: 95 °C for 5 min; 35 cycles, 94 °C for 1 min denaturation, 55 °C for 1 min annealing and 72 °C for 2 min extension; and final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gel and then partially sequenced by Genewiz. Sequence similarity was sought utilizing the alignment method and on the EzBioCloud 16S rRNA database [10], using reference sequences, and the NCBI (National Centre for Biotechnology Information) database, using published 16s rDNA sequences. Data analysis of the partial 16S rDNA gene sequence was performed using MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software package Version 7.0 [11], and using neighbor-joining methods the phylogenetic tree was carried out.

2.4.3 Nucleotide Sequence Submission

The partial 16S rDNA gene sequence of the hydrocarbonoclastic bacteria strain SP49F2 was submitted to the NCBI-GeneBank under the accession

number MK334629.

2.5 Kinetic of Growth on Crude Oil at Optimal Culture Conditions of the Isolate Bacteria

The strain SP49F2 was grown on BHMS medium with 2% of crude oil (v/v) as sole source of carbon and energy, under optimal cultivation conditions (studied previously), such as 3% (w/v) of NaCl, pH 7 and temperature 25 °C for about 20 days on an orbital shaker at 140 rpm (Heidolph Inkubator 1000 coupled with Heidolph Unimax 1010, Germany). Cultures were carried out in 250 mL flasks containing 50 mL of BHSM medium (Fig. 4), in triplicate. The growth rate of the isolate strain was estimated indirectly by measuring the OD (Optical Density 600 nm) with spectrophotometer (Perkin Elmer Lambda 35 UV/Vis Spectrometer, USA).

3. Results

3.1 Isolation of Hydrocarbonoclastic Bacteria

Hydrocarbonoclastic strains were enriched and separated by culturing contaminated seawater and marine sediment sampled from the port of Oran, Algeria, using enrichment cultures and dilution subcultures with increasing concentrations of crude oil (2%-10%, v/v). These isolates showed variable growth rates on the BHMS medium, supplemented with 2%-10% (v/v) of crude oil as the sole carbon and energy source (data not shown). Amongst, strain SP49F2 possessed remarkable growth rate, and efficiency of crude oil utilization, as sole carbon and energy source, and could support high concentrations of crude oil (up to 10%, v/v).

3.2 Identification of Stain SP49F2

Phylogenetic relationships between strain SP49F2 and other representative strains of the genus *Acinetobacter* were established. For that, about 1,500 pb of the 16S rDNA gene were amplified using universal primers by PCR (Fig. 1), then partial fragment of 987 pb from this gene was sequenced (GenBank ID:

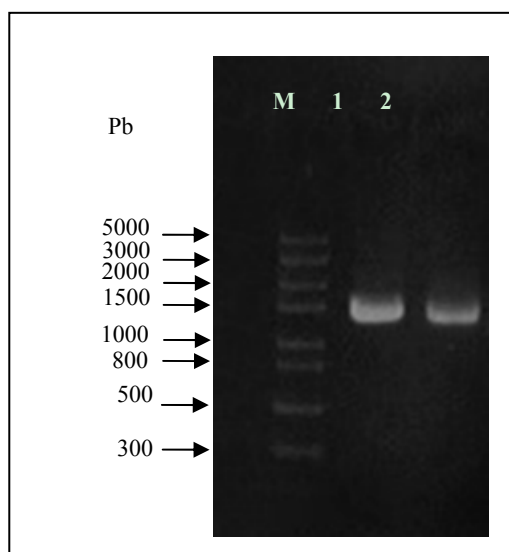


Fig. 1 Electrophoretis of the 16S rDNA gene PCR product of the bacterial strain SP49F2 on 1.5% agarose. Lanes 1 and 2: 16S rDNA; M: Trans5K DNA Marker.

MK334629). This continuous sequence was analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool program (www.ncbi.nih.gov/blast) by the GenBank database on the NCBI and the EzBioCloud database in EzTaxon. Sequence similarity calculation using alignment by BLAST on NCBI database revealed that the partial 16S rDNA gene sequence of the isolate strain SP49F2 belonged to *Acinetobacter* genus, with a high sequence similarity, of 100% with *Acinetobacter johnsonii* XBB1 (CP010350.1), and 100% with *Acinetobacter johnsonii* strain ATCC 17909 (NR_117624.1), and using alignment by EzBioCloud sequences, it had 99.90% of similarity with *Acinetobacter johnsonii* CIP 64.6 (APON01000005). Afterward, two phylogenetic trees were carried out using similar 16S rDNA sequences (Figs. 2a and 2b), using the Neighbor-Joining Method, based on the two programmes of alignment (EzBioCloud and NCBI databases).

The phylogenetic trees indicated that the bacterial strain SP49F2 was related to species *Acinetobacter johnsonii* (Figs. 2a and 2b). For that, the strain SP49F2 was identified as *Acinetobacter johnsonii*.

The isolate strain SP49F2 was found to be Gram negative, strict aerobic, motile, coccobacilli-shaped

bacteria (Fig. 3a). The colonies on nutrient agar plate were whitish, smooth, circular, convex, opaque and > 0.5 mm in diameter after incubation for 24 h at 25 °C (Fig. 3b). Biochemical characteristics results of strain SP49F2 are regrouped in Table 1.

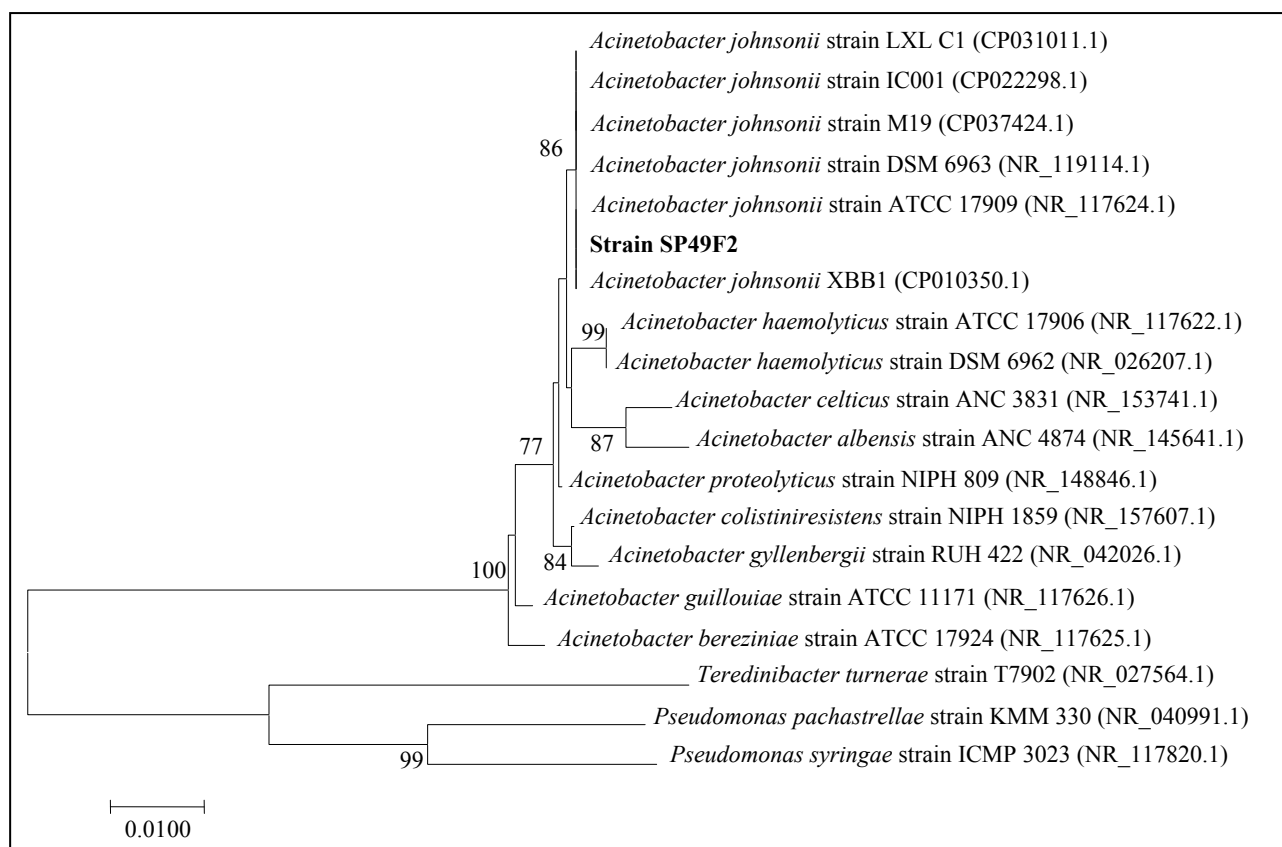
3.3 Growths Kinetic of the Hydrocarbonoclastic of the Isolated Bacterial Train

The bacterial stain SP49F2 was grown on BHMS medium, supplemented with 2% (v/v) of crude oil as sole carbon and energy source, during 20 days, on their optimal culture conditions (pH 7; temperature 25 °C and 3% (w/v) of NaCl concentration, studied previously). The growth rate of this bacterial isolate was measured at the optical density 600 nm, and the results are shown in Fig. 4. As shown in the curve, strain SP49F2 started the logarithmic growth phase from the first to 12th day, and then the stationary phase was attained at day 12.

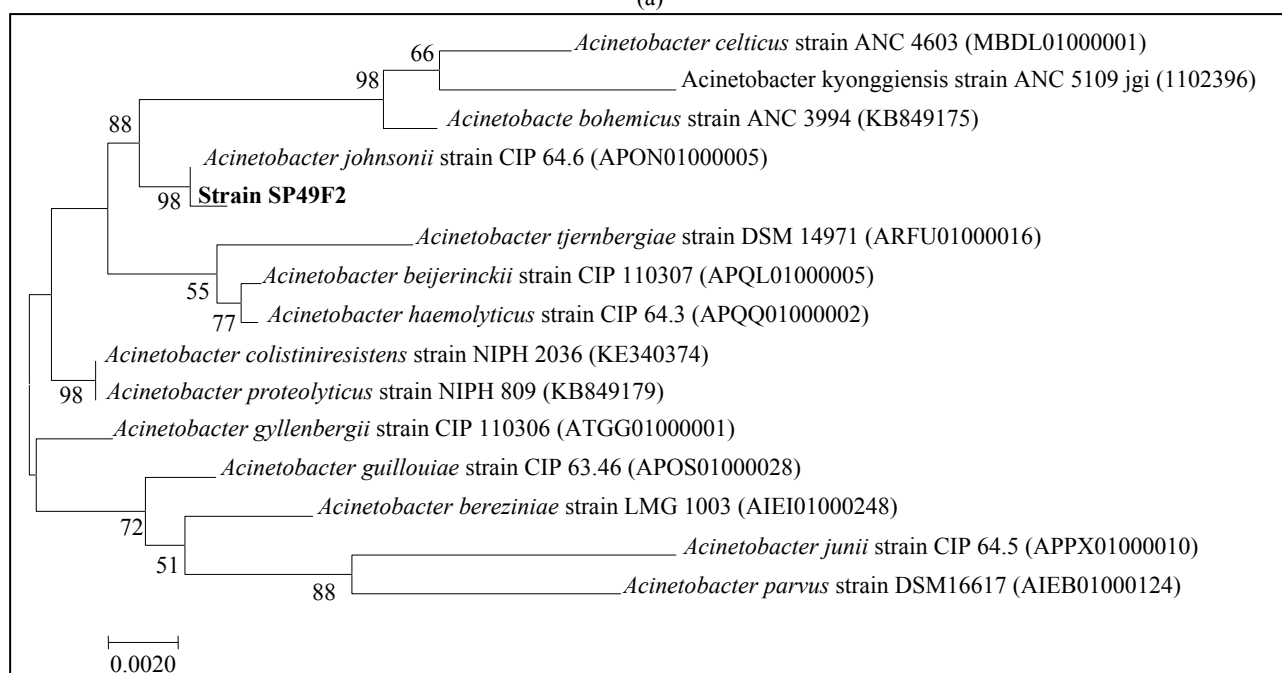
4. Discussion

The strain SP49F2 was one of hydrocarbonoclastic bacterium memberships to *Acinetobacter johnsonii*, firstly isolated from marine sediment and seawater from the port Oran, Algeria, having potential to develop a method to bioremediate marine environments polluted by petroleum hydrocarbons.

Partial sequence analysis of the 16S rDNA gene (978 bp) confirmed the identification as *Acinetobacter johnsonii* specie, with a similarity of 100% with *Acinetobacter johnsonii* XBB1 (CP010350.1), and 100% with *Acinetobacter johnsonii* strain ATCC 17909 (NR_117624.1), using BLAST alignment on NCBI database, and 99.90% of similarity with *Acinetobacter johnsonii* CIP 64.6 (APON01000005), using BLAST alignment on EzBioCloud database. In addition, the morphological characteristics of the strain SP49F2 were very similar to those of the *Acinetobacter johnsonii* reported previously. The results of the biochemical characteristics of the SP49F2 strain are shown in Table 1.



(a)



(b)

Fig. 2 Phylogenetic trees of the 16S rDNA sequence of the SP49F2 strain and the closest-related species: (a) From the NCBI database; (b): From EzBioCloud database. The scale bar represents the sequence divergence. GenBank accession numbers are indicated in parenthesis. Calculations were carried out using the neighbor Neighbor-Joining method (bootstrap = 1,000) using the software MEGA 7.0.

Table 1 Morphological and biochemical characteristics of the isolated bacterial strain SP49F2.

Characteristics	Results
Gram staining	- (Fig. 3a)
Shape	Coccobacilli (Fig. 3a)
Oxidase test	-
Catalase test	+
Motility	+
Mannitol	-
Respiratory type	Strict aerobic
TSI test	K/K
H ₂ S production	-
Gas production	-
Citrate utilization	-
Chapman	+
SS	-
Lactose	-
Glucose	-
Saccharose	-
Indole	-

Notes: “+”, positive reaction; “-”, negative reaction.

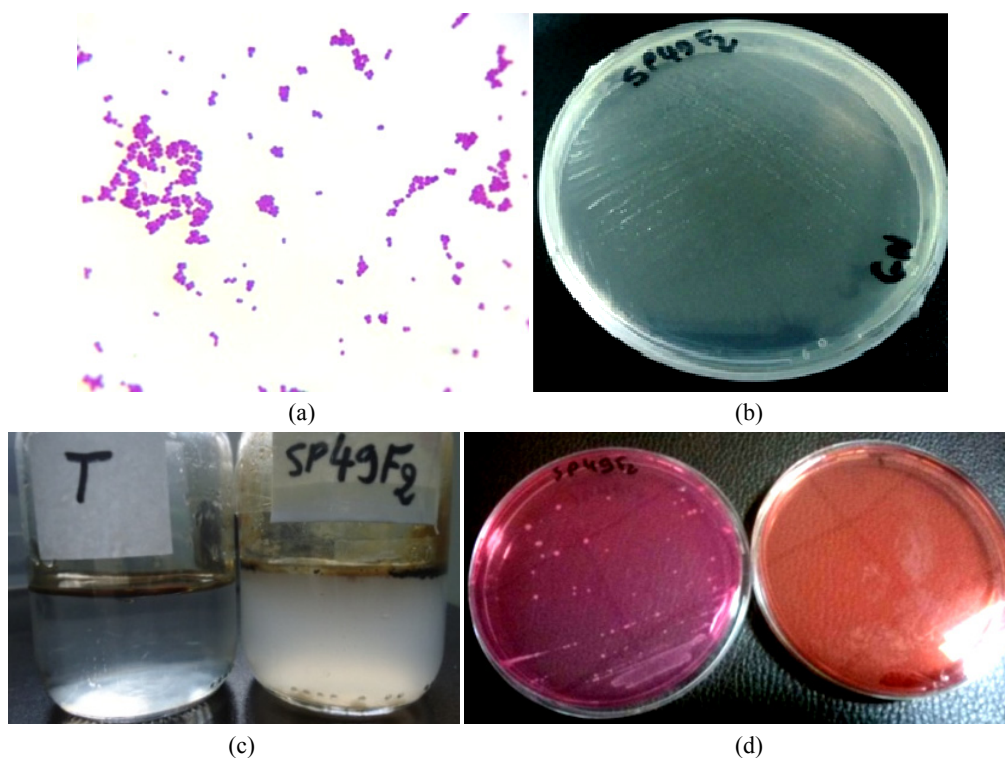


Fig. 3 Colonies growth and cells morphological aspects of the bacterial strain SP49F2 on different culture medium; (a): Gram negative bacterium of strain SP49F2 (10 × 100); (b): Colonies of the strain SP49F2 on the nutrient agar plate after 24 h of incubation; (c): Colonies of the strain SP49F2 on the Chapman medium agar plate after 24 h of incubation; on the right: Chapman medium agar without culture (control); (d): Growth of the strain SP49F2 on BHMS with 2% (v/v) of crude oil as sole carbon and energy source after 7 days of incubation, on the left, BHMS with 2% (v/v) of crude oil without culture (control).

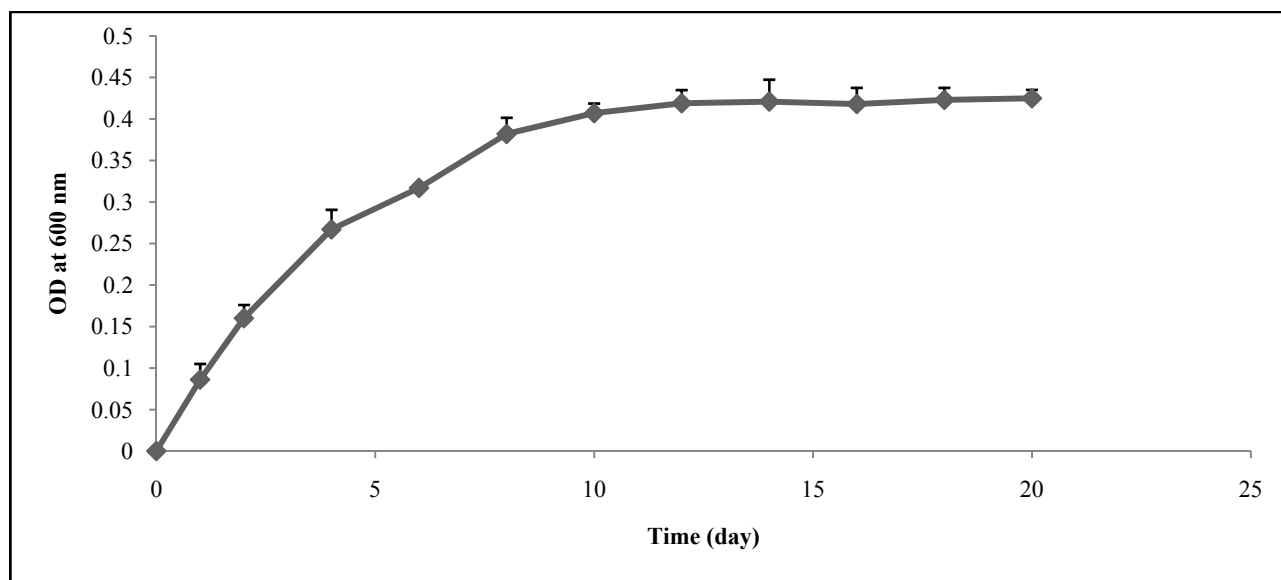


Fig. 4 Growth kinetic of the bacterial strain SP49F2 on 2% of crude oil (v/v) as sole source of carbon and energy at temperature 25 °C, pH 7 and 140 rpm over 20 days of incubation. Bars represent standard deviation and experiments were performed in triplicate.

From results obtained from kinetic of biodegradation of crude oil by the isolated bacterial strain in Fig. 4, the stationary phase was attained at day 12. These results indicate that this bacterial strain SP49F2 had effectively the ability to degrade and use crude oil as the sole source of carbon and energy.

Formerly, numerous strains of *Acinetobacter* sp. were informed to own their hydrocarbon-degrading aptitude [3, 12, 13]. Also, this species possessed the capability to remediate the hydrocarbon-contaminated environments [14]. Recent studies demonstrated production of biosurfactant by *Acinetobacter* sp. with potential application on hydrocarbon bioremediation [15, 16].

Other studies showed the ability of strains of *Acinetobacter* sp. to the bioremediation of polluted environments by various compounds, such as pharmaceutical compounds, presenting ubiquitous pollutants, effecting aquatic organisms and human health, including SMX (Sulfamethoxazole), SD (Sulfadiazine), SMT (Sulfamethazine), THM (Trimethoprim), TCS (Triclosan), DFC (Diclofenac) and CBZ (Carbamazepine) [17]. Also, *Acinetobacter* sp. had capability to degrade herbicide used in agriculture, including FE (Fenoxaprop-P-Ethyl) [18],

and DEHP (Di-2-Ethylhexyl Phthalate), one of PAEs (Phthalic Acid Esters), representing a group of refractory and hazardous compounds blended in plastics [19]. Bhattacharya and Gupta [20] and Panda and Sarkar [21] demonstrated potential and application of *Acinetobacter* sp. in bioremediation and detoxification of heavy-metals-rich industrial wastewater and in tannery effluents such as Cr (VI).

Moreover, strains of *Acinetobacter* sp. were capable to use crude oil as a sole carbon and energy source [14, 22, 23], and were described as the most dominant genus in marine sediments [15].

Strains of *Acinetobacter johnsonii* were capable of biodegradation of organophosphate pesticide, such as malathion (*O,O*-dimethyl-S-[1,2-di(ethoxyl-carbonyl) ethyl] phosphoro-dithioate) used in agriculture [24], removal of inorganic impurity from waste oil and wash-down water [25], and biodegradation of fungicide, such as cyprodinil (4-cyclopropyl-6-methyl-N-phenylpyrimidin-2-amine), used worldwide on agriculture as a broad-spectrum anilinopyrimidine, affecting the ecosystem, and causing slight acute toxicity as well as groundwater contamination [19, 26].

In addition, *Acinetobacter johnsonii* could biodegrade

diesel [12], and PAHs, such as pyrene, naphthalene, phenanthrene, and anthracene, and possessed catechol 2,3-dioxygenase enzyme exhibiting the higher capacity to degrade PAHs [27]. Xue, et al. [28] isolated bacterial from marine deep sea sediments and identified as *Acinetobacter johnson*.

The isolate strain *Acinetobacter johnsonii* SP49F2 from contaminated marine sediments and sea water, in our study tolerates significant concentrations of crude oil (up to 10%, v/v), because of the polluted area and the induction of developed enzymes of interest. This tolerance may reflect the evolutionary adaptation that results in the high stability, allowing bacteria with the ability to react faster than bacteria without spoilage to new sources of hydrocarbons [29].

Therefore, as an indigenous microorganism, *Acinetobacter johnsonii* SP49F2 is a very important and useful means for the bioremediation and decontamination of marine sediments such as the port of Oran.

5. Conclusion

In the present paper, indigenous marine hydrocarbon-degrading bacterium strain SP49F2 was identified as *Acinetobacter johnsonii*, isolated from mixed seawater and marine sediment at the port of Oran (Algeria), according to phenotypic and phylogenetic characteristics, which is adapted to polluted environment and possessed high growth capacity in crude oil as sole carbon and energy source. Therefore, the isolate strain SP49F2 could be used as a convenient degrader, to initiate an advantageous eco-friendly method for the removal of hydrocarbon contaminations in different marine environments polluted by hydrocarbons, in especially, the port of Oran, Algeria.

Acknowledgments

The authors thank scientific group of Aquaculture and Bioremediation Laboratory (AquaBior) for their fruitful help for the development of this work.

References

- [1] Mnif, S., Chebbi, A., Mhiri, N., Sayadi, S., and Chamkha, M. 2017. "Biodegradation of Phenanthrene by a Bacterial Consortium Enriched from Sercina Oil Field." *Process Saf Environ Prot* 107: 44-53. doi: 10.1016/j.psep.2017.01.023.
- [2] Logeshwaran, P., Megharaj, M., Chadalavada, S., Bowman, M., and Naidu, R. 2018. "Petroleum Hydrocarbons (PH) in Groundwater Aquifers: An Overview of Environmental Fate, Toxicity, Microbial Degradation and Risk-Based Remediation Approaches." *Environmental Technology & Innovation* 10: 175-93. doi: 10.1016/j.eti.2018.02.001.
- [3] Tiralerdpnich, P., Sonthiphand, P., Luepromchai, E., Pinyakong, O., and Pokethitiyook, P. 2018. "Potential Microbial Consortium Involved in the Biodegradation of Diesel, Hexadecane and Phenanthrene in Mangrove Sediment Explored by Metagenomics Analysis." *Mar Pollut Bull* 133: 595-605. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.06.015.
- [4] Atlas, R. M., and Hazen, T. C. 2011. "Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History." *Environ Sci Technol* 45 (16): 6709-15. doi: 10.1021/es2013227.
- [5] Deng, M.-C., Li, J., Liang, F.-R., Yi, M., Xu, X.-M., Yuan, J.-P., et al. 2014. "Isolation and Characterization of a Novel Hydrocarbon-Degrading Bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the Crude Oil-Contaminated Seawater at the Daya Bay, Southern China." *Mar. Pollut. Bull.* 83 (1): 79-86. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.04.018.
- [6] Mohanram, R., Jagtap, C., and Kumar, P. 2016. "Isolation, Screening and Characterization of Surface-Active Agent-Producing, Oil-Degrading Marine Bacteria of Mumbai Harbor." *Mar. Pollut. Bull.* 105 (1): 131-8. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.02.040.
- [7] Capello, S., Caruso, G., Zampio, D., Monticelli, L. S., Maimone, G., Denaro, R., Tripodo, B., Trousselier, M., Yakimov, M. M., and Giuliano, L. 2007. "Microbial Community Dynamics during Assay of Harbor Oil Spill Bioremediation: A Microscale Simulation Study." *J. App. Microbiol.* 102: 184-94. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03071.x.
- [8] Mehdi, H., and Giti, E. 2008. "Investigation of Alkane Biodegradation Using the Microtiter Plate Method and Correlation between Biofilm Formation, Biosurfactant Production and Crude Oil Biodegradation." *Int Biodeterior Biodegradation* 62: 170-8. doi: 10.1016/j.ibiod.2008.01.004.
- [9] Holt, S. G., Kriey, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., and Williams, S. T., eds. 1998. *Bergey's Manual of*

Determination for Bacteriology. New York: Williams and Wilkins.

- [10] Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., and Chun, J. 2017. "Introducing EzBioCloud: A Taxonomically United Database of 16S rRNA Gene Sequences and Whole-Genome Assemblies." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 67: 1613-7. doi: 10.1099/ijsem.0.001755.
- [11] Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. 2016. "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets." *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-4. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- [12] Lee, M., Woo, S.-G., and Ten, L. N. 2012. "Characterization of Novel Diesel-Degrading Strains *Acinetobacter haemolyticus* MJ01 and *Acinetobacter johnsonii* MJ4 Isolated from Oil-Contaminated Soil." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 28 (5): 2057-67. doi: 10.1007/s11274-012-1008-3.
- [13] Fang, Y., Zhang, L., Wang, J., Zhou, Y., and Ye, B. 2017. "Biodegradation of Phthalate Esters by a Newly Isolated *Acinetobacter* sp. Strain LMB-5 and Characteristics of Its Esterase." *Pedosphere* 27 (3): 606-15. doi: 10.1016/s1002-0160(17)60355-2.
- [14] Obafemi, Y. D., Taiwo, O. S., Omodara, O. J., Dahunsi, O. S., and Oranusi, S. 2018. "Biodegradation of Crude Petroleum by Bacterial Consortia from Oil-Contaminated Soils in Ota, Ogun State, South-Western, Nigeria." *Environmental Technology & Innovation* 12: 230-42. doi: 10.1016/j.eti.2018.09.006.
- [15] Mahjoubi, M., Jaouani, A., Guesmi, A., Ben Amor, S., Jouini, A., Cherif, H., et al. 2013. "Hydrocarbonoclastic Bacteria Isolated from Petroleum Contaminated Sites in Tunisia: Isolation, Identification and Characterization of the Biotechnological." *New Biotechnol.* 30 (6): 723-33. doi: 10.1016/j.nbt.2013.03.004.
- [16] Jadeja, N. B., Moharir, P., and Kapley, A. 2018. "Genome Sequencing and Analysis of Strains *Bacillus* sp. AKBS9 and *Acinetobacter* sp. AKBS16 for Biosurfactant Production and Bioremediation." *Appl. Biochem. Biotechnol.* 187 (20): 518-30. doi: 10.1007/s12010-018-2828-x.
- [17] Wang, W., Chen, X., Yan, H., Hu, J., and Liu, X. 2018. "Complete Genome Sequence of the Cyprodinil-Degrading Bacterium *Acinetobacter johnsonii* LXL_C1." *Microbial Pathogenesis* 127: 246-9. doi: 10.1016/j.micpath.2018.11.016.
- [18] Dong, W., Jiang, S., Shi, K., Wang, F., Li, S., Zhou, J., et al. 2015. "Biodegradation of Fenoxaprop-P-Ethyl (FE) by *Acinetobacter* sp. Strain DL-2 and Cloning of FE Hydrolase Gene *afeH*." *Bioresource Technology* 186: 114-21. doi: 10.1016/j.biortech.2015.03.039.
- [19] Wang, J., Jiang, L.-H., Zhou, Y., and Ye, B.-C. 2017. "Enhanced Biodegradation of Di-n-butyl Phthalate by *Acinetobacter* Species Strain LMB-5 Coated with Magnetic Nanoparticles." *International Biodeterioration & Biodegradation* 116: 184-90. doi: 10.1016/j.ibiod.2016.10.024.
- [20] Bhattacharya, A., and Gupta, A. 2013. "Evaluation of *Acinetobacter* sp. B9 for Cr (VI) Resistance and Detoxification with Potential Application in Bioremediation of Heavy-Metals-Rich Industrial Wastewater." *Environmental Science and Pollution Research* 20 (9): 6628-37. doi: 10.1007/s11356-013-1728-4.
- [21] Panda, J., and Sarkar, P. 2011. "Bioremediation of Chromium by Novel Strains *Enterobacter aerogenes* T2 and *Acinetobacter* sp. PD 12 S2." *Environmental Science and Pollution Research* 19 (5): 1809-17. doi: 10.1007/s11356-011-0702-2.
- [22] Hanson, K. G., Nigam, A., Kapadia, M., and Desai, A. J. 1997. "News & Notes: Bioremediation of Crude Oil Contamination with *Acinetobacter* sp. A3." *Current Microbiology* 35 (3): 191-3. doi: /10.1007/s002849900237.
- [23] Huang, H., Bowler, B. F. J., Oldenburg, T. B. P., and Larter, S. R. 2004. "The Effect of Biodegradation on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Reservoired Oils from the Liaohe Basin, NE China." *Organic Geochemistry* 35 (11-12): 1619-34. doi: 10.1016/j.orggeochem.2004.05.009.
- [24] Xie, S., Liu, J., Li, L., and Qiao, C. 2009. "Biodegradation of Malathion by *Acinetobacter johnsonii* MA19 and Optimization of Cometabolism Substrates." *Journal of Environmental Sciences* 21 (1): 76-82. doi: 10.1016/s1001-0742(09)60014-0.
- [25] Jiang, Y., Qi, H., Zhang, X., and Chen, G. 2012. "Inorganic Impurity Removal from Waste Oil and Wash-Down Water by *Acinetobacter johnsonii*." *Journal of Hazardous Materials* 239-240: 289-93. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.08.076.
- [26] Chen, X., He, S., Liu, X., and Hu, J. 2018. "Biobegradation and Metabolic Mechanism of Cyprodinil by Strain *Acinetobacter* sp. from a Contaminated-Agricultural Soil in China." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 159: 190-7. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.04.047.
- [27] Jiang, Y., Zhang, Z., and Zhang, X. 2018. "Co-biodegradation of Pyrene and Other PAHs by the Bacterium *Acinetobacter johnsonii*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 163: 465-70. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.07.065.
- [28] Xue, D., Zeng, X., Lin, D., and Yao, S. 2018. "Thermostable Ethanol Tolerant Xylanase from a

140 **Crude Oil Degradation Potential of Indigenous Hydrocarbonoclastic Bacterial Strain *Acinetobacter johnsonii* Firstly Isolated from Marine Sediments of Oran Port, Algeria**

Cold-Adapted Marine Species *Acinetobacter johnsonii*.”
Chinese Journal of Chemical Engineering 37 (5):
1166-70. doi: 10.1016/j.cjche.2018.06.019.

[29] Girvan, M. S., Campbell, C. D., Killham, K., Prosser, J. I.,

and Glover, L. A. 2005. “Bacterial Diversity Promotes
Community Stability and Functional Resilience after
Perturbation.” *Environ. Microbiol.* 7 (3): 301-13. doi:
0.1111/j.1462-2920.2004.00695.x.

Résumé

Le port d'Oran est sujet à pollution, principalement par les HAPs vu le flux importants de navires. L'élimination de ces xénobiotiques nécessite un traitement adapté. La diminution de la concentration en pollution à un seuil tolérable peut faire démarrer une bioremédiation bactérienne naturelle. Pour cela une identification et caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes du milieu s'avèrent nécessaires. Dans le présent travail, nous avons isolé des bactéries hydrocarbonoclastes indigènes des sédiments marins du port d'Oran. Quatre souches sont sélectionnées par la PCR-RFLP du gène d'ADNr 16S. L'étude morphologique, biochimique et le séquençage de l'ADNr 16S ont permis leur l'identification comme étant *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas mendocina*, *Acinetobacter johnsonii* et *Staphylococcus cohnii*. Ces souches supportent des concentrations de pétrole brut allant jusqu'à 10% (v/v). Une caractérisation fonctionnelle par l'étude du gène C23O, indique que ces isolats possèdent ce gène de localisation plasmidique, sauf pour l'espèce *Staphylococcus cohnii*. Des optimums de croissance sont obtenus à 25°C, 3% de NaCl (m/v) et pH 7 pour les quatre isolats, qui ont effectivement la capacité d'utiliser le pétrole brut comme seule source de carbone. Ces isolats présentent une meilleure croissance en consortium. Ainsi, ils pourraient être une alternative biologique dans la biorestauration de la contamination par les HAPs.

Mots-clés :

Bactéries hydrocarbonoclastes; Bioremédiation; Port d'Oran; Hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAPs); ADNr16S; PCR-RFLP; catéchol 2,3-dioxygénase; Consortium bactérien; Caractérisation fonctionnelle; Identification.