

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE
LABORATOIRE D'ANALYSES BIOGÉOCHIMIQUES ET ECOLOGIQUES DES
ENVIRONNEMENTS AQUATIQUES

N° /2017

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat Es sciences

En MICROBIOLOGIE
Option : Microbiologie Appliquée

THEME

**Essais d'isolement et d'identification des souches
bactériennes à pouvoir auto-épurateur vis-à vis des
hydrocarbures**

Présentée par : FEKNOUS Nesrine

Directeur de thèse : M. BRANES Zidane

Professeur, Université d'Annaba

Membres de Jury:

Présidente :

M^{me}. ABBACI Nafissa

Professeur, Université d'Annaba

Examineurs :

M^r. HOUHAMDI Moussa

Professeur, Université de Guelma

M^{me}. GRARA Nadjoud

MC A,

Université de Guelma

Année universitaire : 2016/2017

REMERCIEMENTS

*Je ne s'aurais comment exprimer ma reconnaissance et toute ma gratitude à mon Directeur de thèse **Professeur Z. BRANES** pour m'avoir guidée, dirigée, orientée et suivie tout au long de la thèse malgré ses nombreuses responsabilités.*

Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements.

*Je tiens à remercier **Madame ABBACI Nafissa, Professeur** à l'université BADJI- Mokhtar d'Annaba pour m'avoir fait le grand honneur d'accepter de présider le jury de soutenance.*

*Je remercie **M. HOUHAMDI Moussa, Professeur** à l'université de Guelma, **M^{me}. GRARA Nedjoud** Maître de Conférences A à l'université de Guelma pour m'avoir fait honneur d'accepter de juger et évaluer ce travail en qualité d'examineurs.*

*Un grand Merci au **Professeur OUNISSI Makhlouf** directeur du laboratoire d'Analyses Biogéochimiques et Écologiques des Environnements Aquatiques à l'université BADJI Mokhtar d'Annaba pour m'avoir beaucoup aidée à réaliser mon projet de thèse.*

*Je tiens à remercier vivement le **Professeur Christian AMBLARD** Directeur de recherche au CNRS et **Isabelle BATISSON** Maître de Conférence au laboratoire Micro-organismes Génome et Environnement (LMGE) de l'université BLAISE Pascal, Clermont Ferrand II, France pour l'identification moléculaire des souches bactériennes isolées.*

*Je remercie également **Mr. Zaghdoudi Halim**, Maître de conférence A à l'université Badji-Mokhtar de Annaba, pour son aide à réaliser l'analyse statistique de cette étude.*

*J'adresse mes vifs remerciements à l'ensemble du personnel du laboratoire du département de Biochimie en particulier : **Sakina, Adra, Nedjoua, Lazhar, Mohamed, Mounira, Naouri, Sabrina, et Hssen.***

*Un immense merci à tous mes amis (es) et collègues qui m'ont soutenue aidée et encouragée en particulier: **Mahieddine, Faiza, Sameh, Wafa, Mehdi, Lydia et Alima.***

Dédicaces

*Je tiens à exprimer mes sentiments les plus respectueux et ma profonde reconnaissance à mes **très chers parents**, pour leur présence, leur aide et leur compréhension et grâce à qui j'ai pu mener à bien ce travail que Dieu me les préserve.*

*À **Sandra, Lamine** et à mon beau-frère **Ramdhane** pour les encouragements constants qu'ils ont déployé tout au long de ces années de recherche.*

Liste des figures

Figure 1. Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le pétrole brut (Bianchi et al., 1988)	6
Figure 2. La structure chimique des BTEX (Badjagbo, 2009)	8
Figure 3. Structure et nomenclature des HAP. (Les seize HAP prioritaires de la liste de l'EPA)	9
Figure 4. Composition chimique de l'essence et du gazole (Colombano et al., 2008)	13
Figure 5. Processus physico-chimique et biologique affectant le devenir des hydrocarbures pétroliers au sein de la colonne d'eau et des sédiments (Mirales, 2007)	16
Figure 6. Les taxons microbiens qui dégradent le pétrole. les phyla microbiens qui dégradent le pétrole, en rouge, ont été identifiés à partir des trois domaines de la vie (Prince et al., 2007)	17
Figure 7. Phylogénie des principaux groupes de bactéries hydrocarbonoclastes marines. En. 19	
Figure 8. Communauté microbienne impliquée dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers (Head et al., 2006)	26
Figure 9. Sites d'étude et localisation des stations d'échantillonnage (Source: Google Earth images modified, 2015)	28
Figure 10. Technique d'identification par une galerie API 20E	38
Figure 11. Technique d'identification par une galerie API 20NE.....	39
Figure 12. Protocole réalisé pour les essais de croissance des bactéries sélectionnées avec les hydrocarbures	47
Figure 13. Protocole général réalisé	47
Figure 14. Culture timide des bactéries sélectionnées (a: 9.1, b: 1.3 sur gélose eau de mer synthétique-hydrocarbure (pétrole brut+ N/P=1).	52
Figure 15. Culture de la souche 3.1 (a : sans biostimulation, b : avec biostimulation N/P=1) sur gélose eau de mer synthétique -pétrole brut).	52
Figure 16. Aspects macroscopiques des cultures de bactéries sélectionnées : (a) : Souche 9.1, (b) : Souche 8.8, (c): Souche 1.3, (d): Souche 3.1	53
Figure 17. Aspect des cellules après coloration de Gram. (a) : Souche 9.1, (b) : Souche 8.8, (c): Souche 1.3, (d): Souche 3.1	53
Figure 18. Résultats d'identification biochimique de la souche bactérienne « 1.3 » sélectionnée par la galerie biochimique Api 20 NE	55

Figure 19. Résultats d'identification biochimique de la souche bactérienne « 9.1 » sélectionnée par la galerie biochimique Api 20 E	55
Figure 20. Relations évolutives entre les 4 espèces expérimentées et les 11 taxons identifiés	57
Figure 21. Croissance de <i>V.alginolyticus</i> PB-WC 11099 en présence de (a:Hexane, b: Heptane, c: Décane d: Cyclo-hexane) comme seule source de carbone et d'énergie	58
Figure 22. Croissance de <i>Exiguobacterium aurantiacum</i> strain NB11_3A en présence de (a:Hexane, b: Heptane, c: Décane d: Cyclo-hexane) comme seule source de carbone et d'énergie.	60
Figure 23. Croissance de <i>Halomonas venusta</i> strain NY-8 en présence de (a: Hexane, b: Heptane, c: Décane d: Cyclo-hexane) comme seule source de carbone et d'énergie	61
Figure 24. Croissance de <i>Dietzia</i> sp CNJ898PLO4 en présence de (a:hexane, b: heptane, .	62
Figure 25. Croissance de <i>V.alginolyticus</i> PB-WC 11099 en présence de : (a: essence normale, b : essence sans plombs).....	64
Figure 26. Croissance de <i>Exiguobacterium aurantiacum</i> strain NB11_3A en présence de : (a : essence normale, b : essence sans plombs)	65
Figure 27. Croissance de <i>Halomonas venusta</i> strain NY-8 en présence de l'essence (a : essence normale, b : essence sans plombs)	66
Figure 28. Croissance de <i>Dietzia</i> sp CNJ898 PLO4 en présence de : (a : essence normale, b : essence sans plombs).....	67
Figure 29. Croissance de <i>V.alginolyticus</i> PB-WC 11099 en présence de l'essence a : sans bio-stimulation, b : avec bio-stimulation (N/P=1/1).....	69
Figure 30. Croissance de <i>Exiguobacterium aurantiacum</i> strain NB11_3A en présence de l'essence a : sans bio-stimulation ,b : avec bio-stimulation (N/P=1/1)	70
Figure 31. Croissance de <i>Halomonas venusta</i> strain NY-8 en présence de l'essence a : sans bio-stimulation, b : avec bio-stimulation (N/P=1/1).....	71
Figure 32. Croissance de <i>Dietzia</i> sp CNJ898 PLO4 en présence de l'essence a : sans bio-stimulation, b : avec bio-stimulation (N/P=1/1).....	72

Liste des tableaux

Tableau I. Concentrations des hydrocarbures pétroliers totaux (HPT) dans les sédiments portuaires en Algérie (www.eea.europa.eu.2006)	15
Tableau II. Les facteurs affectant la biodégradation des hydrocarbures pétroliers (Oliveira et al., 2015).....	27
Tableau III. Méthodes de mesure des hydrocarbures totaux, azote total et phosphore total	31
Tableau IV. Les primers ARN 16S couples d'amorces utilisées lors des PCR	42
Tableau V. Résultats d'analyse physico-chimiques des échantillons d'eau de mer.....	48
Tableau VI. Résultats de test de sélection des bactéries autochtones suite à leur croissance sur gélose eau de mer synthétique –hydrocarbure.....	50
Tableau VII. Évolution des cultures des espèces sélectionnées sur gélose Eau de mer synthétique-hydrocarbure	52
Tableau VIII. Caractères morphologiques et biochimiques des souches sélectionnées.....	54
Tableau IX. Résultats global de la croissance des bactéries sélectionnées avec les hydrocarbures testés	72
Tableau X. Quantités des hydrocarbures totaux après croissance des souches bactériennes sélectionnées.....	73

Liste des annexes

Annexe 1. Formes Fasta des sequences des souches isolées identifiées	99
Annexe 2. Analyse statistique par MANOVA	117

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNr :	Acide désoxyribonucléique ribosomal
ADNr 16S :	ADN codant la sous unité 16 S de l'ARN ribosomal
API :	Analytical Profile Index
ARN :	Acide ribonucléique
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomique
RNase :	Ribonucléase
BLAST:	Basic Local Alignment Search Tool
BTEX:	BTEX Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylènes (ortho, méta et para)
C :	carbone.
CTAB:	Bromure d'hexadécyl triméthylammonium
C:	Cytosine
d :	densité
DNAPL:	Dense Non Aqueous Phase Liquid.
d'NTPs:	Desoxyribonucléoside tri-phosphate
DO:	Densité Optique.
E:	Est
Eau milli-Q:	eau ultra pure.
Eps :	Exopolysaccharides
ETBE:	Ethyl Tert Butyl Ether.
G:	Guanine
HAP :	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques.
HCB :	Hydrocarbonoclastic Bacteria
HPT :	Concentration d'hydrocarbures pétroliers totaux.
LNAPL :	Light Non Aqueous Phase Liquid.
MDO:	Marine Diesel Oil
MEGA05:	Molecular Evolutionary Génetics Analysis.
MTBE:	Méthyl Tert Butyl Ether.
N:	Azote
NaCl:	Chlorure de sodium
NT :	Azote total

O₂ :	Oxygène moléculaire
P :	Phosphore
PT :	Phosphore total
PCR :	Polymérase Chain Reaction
UV :	Ultra-Violet
RDP :	Ribosomal Database Project II
TE :	Tris Ethylène Diamine Tétra Acétique
THT :	Taux d'hydrocarbures totaux
SDS :	Dodécylsulfate de Sodium
16S :	16 Svedberg
sp. :	Espèce non précise

Unités de mesures

H, min :	Heure, minute.
L, ml, µl :	Litre, millilitre, microlitre.
mM :	milli-molaire.
Nm :	nanomètre.
ppm :	partie par million.
pH :	potentiel hydrogène.
U :	unité.
rpm :	rotation par minutes.
°C :	degré Celsius.
Kg, mg :	kilogramme, milligramme.
Km, m, mm, µm :	kilomètre, mètre, millimètre, micromètre.
t :	tonne.

Liste des acronymes

DDBJ:	DNA Data Bank of Japan
EMBL:	European Molecular Biology Laboratory.
EPA:	American Environmental Protection Agency.
LMGE :	Laboratoire Micro-organismes Génome et Environnement .
NCBI :	National Center for Biotechnology Information .

Résumé

Le littoral algérien est exposé à plusieurs types de pollution, y compris celle des hydrocarbures. Cet environnement riche en huile pourrait être la source de la prolifération des bactéries hydrocarbonoclastes. L'objectif de l'étude était d'isoler et d'identifier les souches bactériennes indigènes des eaux marines de deux ports de la côte Est et de tester leur croissance en présence d'hydrocarbures avec et sans biostimulation tout au long de la prise d'azote et de phosphate. Cinquante-trois souches bactériennes ont été identifiées, dont quatre ont été sélectionnées pour effectuer les tests de croissance. Les résultats ont montré que la croissance et la biodégradation diffèrent d'une espèce à l'autre. Ainsi, les souches testées (*Halomonas venusta* NY-8, *Exiguobacterium aurantiacum* NB11-3A, *Vibrio alginolyticus* Pb-WC11099 et *Dietzia sp.* CNJ898 PLO4) ont été très actives, ce qui a permis d'obtenir une meilleure croissance avec les deux dernières souches pendant la supplémentation en azote et phosphate. De telles souches sont suggérées de participer beaucoup à la biodégradation du pétrole sur les sites pollués.

Les souches les plus performantes ont été identifiées en utilisant les caractères morphologiques, microscopiques, les galeries biochimiques ainsi que par méthodes moléculaires à travers l'ADNr 16S. Enfin, Une analyse par le logiciel MEGA5.05 a permis de générer une matrice de distance élaborée par comparaison des séquences d'ADN selon la méthode de Neighbors joining. Cette matrice est ensuite représentée sous forme d'un arbre phylogénétique. Des analyses de bootstrap avec 1000 itérations ont été effectuées pour vérifier la robustesse de l'arbre.

Le dosage des hydrocarbures avant et après croissance des souches testées a révélé que toutes les souches semblent dégrader les hydrocarbures avec des taux différents. Ainsi, la dégradation maximale est obtenue avec *Halomonas venusta strain NY-8* en présence de heptane, suivi par la dégradation d'hexane avec *Exiguobacterium aurantiacum strain NB11_3A* de *Vibrio alginolyticus PB- WC 11099* avec heptane et *Dietzia sp CNJ898 PLO4* avec l'essence.

Mots clés: Bactéries Hydrocarbonoclastes, Croissance, Biodégradation, Cote Est Algérienne.

Abstract

The Algerian coastline is being exposed to several types of pollution, including that of hydrocarbons. This environment rich in oil could be the source of proliferation of hydrocarbonoclastes bacteria. The objective of the study was to isolate and identify indigenous bacterial strains from marine waters of two ports in the Eastern coast, and to test their growth in the presence of hydrocarbons with and without biostimulation throughout the intake of nitrogen and phosphate. Fifty three bacterial strains were identified from which four were selected to perform the growth tests. Results showed that the growth and the biodegradation differ from one species to another. Thus, the strains tested (*Halomonas venusta* NY-8, *Exiguobacterium aurantiacum* NB11-3A, *Vibrio alginolyticus* Pb-WC11099 and *Dietzia sp* CNJ898 PL04) were very active, in which better growth was obtained with the last two strains during nitrogen and phosphate supplementation. Such strains are suggested to participate a lot in the biodegradation of oil at polluted sites.

The most efficient strains were identified using morphological, microscopic, biochemical galleries as well as molecular methods through 16S rDNA. Finally, an analysis by the MEGA5.05 software made it possible to generate a distance matrix elaborated by comparing the DNA sequences according to the method of Neighbors joining. This matrix is then represented as a phylogenetic tree. Bootstrap analyzes with 1000 iterations were carried out to check the robustness of the tree. .

The determination of the hydrocarbons before and after growth of the tested strains revealed that all the strains appear to degrade the hydrocarbons with different rates. Thus, the maximum degradation is obtained with *Halomonas venusta strain NY-8* in the presence of heptane, followed by the degradation of hexane of *Exiguobacterium aurantiacum strain NB11_3A* and *Vibrio alginolyticus* PB-WC 11099 for heptane and *Dietzia sp CNJ898 PLO4* with gasoline.

Keywords: Hydrocarbonoclastics Bacteria, Growth, Biodegradation, Algerian coast.

ملخص

يتعرض الساحل الجزائري لعدة أنواع من التلوث، بما في ذلك النفط والغاز. يمكن أن تكون هذه البيئة الغنية بالنفط مصدر انتشار البكتيريا hydrocarbonoclastes. وكان الهدف من هذه الدراسة هو عزل وتحديد السلالات البكتيرية الأصلية في المياه البحرية من اثنين من الموانئ على الساحل الشرقي واختبار نموها في وجود الهيدروكربونات مع وبدون bioestimulation في جميع أنحاء جني النيتروجين والفوسفات. وقد تم تحديد ثلاثة وخمسون السلالات البكتيرية، وقد تم اختيار أربعة منها لأداء فحوصات النمو. وأظهرت النتائج أن النمو والتحلل البيولوجي تختلف من نوع إلى آخر. وهكذا، فإن سلالات اختبار

(*Halomonas venusta* نيو-8، *WC11099*، *NB11-3A Exiguobacterium aurantiacum*

Vibrio alginolyticus و *Dietzia* س. *CNJ898 PL04*) كانت نشطة جدا، مما أدى إلى نمو أفضل مع سلالات الماضيين خلال النيتروجين والفوسفات التكميلية. واقترحت هذه السلالات للمشاركة في العديد من التحلل البيولوجي للنفط في المواقع الملوثة.

وقد تم التعرف على أفضل سلالات أداء باستخدام المورفولوجية والمجهريّة والمعارض البيوكيميائية وكذلك الأساليب الجزيئية عن طريق الحمض النووي المؤتلف S16. وأخيرا، وتحليل من قبل البرنامج MEGA5.05 قد ولدت مصفوفة من المسافة التي وضعتها مقارنة تسلسل الحمض النووي وفقا لطريقة الانضمام الجيران. ثم يتم عرض هذه المصفوفة مثل شجرة النشوء والتطور. وأجريت تحليل التمهيد مع 1000 التكرارات لاختبار متانة الأشجار.

كشفت جرعة من الهيدروكربونات قبل وبعد نمو سلالات اختبار أن جميع سلالات يبدو أن تتحلل المواد الهيدروكربونية مع أسعار مختلفة. وبالتالي، يتم الحصول على الحد الأقصى للتدهور مع *Halomonas venusta* سلالة 8-NY في وجود هيببتان، الهكسان تليها تدهور مع *Exiguobacterium aurantiacum* مع *Vibrio alginolyticus PB- WC 1109* , *NB11_3A* مع *Dietzia* س *CNJ898 PLO4* مع البنزين.

كلمات البحث: البكتيريا Hydrocarbonoclastes، النمو، التحلل البيولوجي، الساحل الشرقي الجزائر.

Table des matières

LISTE DES FIGURES	I
LISTE DES TABLEAUX	III
LISTE DES ANNEXES	IV
LISTE DES ABREVIATIONS	V
LISTE DES ACRONYMES	VI
RESUME	VII
ABSTRACT	VIII
ملخص	IX
TABLE DES MATIERES	X
INTRODUCTION	1
1 LE PETROLE	5
2 LES PRINCIPALES FAMILLES DES HYDROCARBURES	6
2.1 LES HYDROCARBURES SATURES PARMIS LESQUELS ON DISTINGUE	6
2.1.1 <i>Les alcanes linéaires (n-alcanes)</i>	6
2.1.2 <i>Les alcanes ramifiés</i>	6
2.1.3 <i>Les cycloalcanes</i>	7
2.2 LES HYDROCARBURES AROMATIQUES	7
2.2.1 <i>Les hydrocarbures mono-aromatiques</i>	7
2.2.2 <i>Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)</i>	9
2.3 LES COMPOSES POLAIRES (LES COMPOSES N, S, O)	10
3 ORIGINE DES HYDROCARBURES PETROLIERS DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN	10
3.1 ORIGINE ANTHROPIQUE	11
3.1.1 <i>Les suintements naturels (sources géochimiques)</i>	11
3.1.2 <i>Les accidents pétroliers</i>	11
3.1.3 <i>Le déballastage (Slops)</i>	12
3.1.4 <i>Le dégazage (Sludges)</i>	12
3.2 ORIGINE BIOGENIQUE	13
4 LE LITTORAL ALGERIEN	14
1 LES MICRO-ORGANISMES HYDROCARBONOCLASTES	16
2 LES GROUPES DE BACTERIES HYDROCARBONOCLASTES MARINES (BHCM)	18

3	ADAPTATION DES BACTERIES HYDROCARBONOCLASTES (HCB) AUX HYDROCARBURES	20
4	LES CONSORTIUMS BACTERIENS.....	20
4.1	LES FACTEURS LIMITANT L'ACTION DES HCB.....	21
4.2	FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX AFFECTANT L'ACTIVITE DES HCB.....	21
4.2.1	<i>La température</i>	22
4.2.2	<i>Oxygène</i>	22
4.2.3	<i>Le pH</i>	23
4.2.4	<i>La salinité</i>	23
4.2.5	<i>La pression hydrostatique</i>	24
4.3	LA COMPOSITION CHIMIQUE DES HYDROCARBURES.....	24
4.4	LA CONCENTRATION DU PETROLE.....	25
4.5	LES BIOSURFACTANTS.....	25
4.6	LES ELEMENTS NUTRITIFS	25
1	SITES D'ETUDE ET ECHANTILLONNAGE.....	28
1.1	ANALYSE DES ECHANTILLONS DE L'EAU DE MER.....	29
1.1.1	<i>Analyses physico-chimiques</i>	29
1.1.2	<i>Le dosage des hydrocarbures totaux</i>	29
1.1.2.1	Principe.....	29
1.1.2.2	Technique.....	30
	LES HYDROCARBURES SONT DETECTES EN 5 ETAPES :	30
1.1.3	<i>Le dosage de l'azote total (NT)</i>	30
1.1.3.1	Principe.....	30
	TECHNIQUE.....	30
1.1.4	<i>Le dosage du Phosphore total (PT)</i>	30
1.1.4.1	Principe.....	30
1.1.4.2	Technique.....	31
1.2	ANALYSES BACTERIOLOGIQUES	31
1.2.1	<i>Isolement bactériologique</i>	31
1.2.1.1	Technique.....	32
1.2.2	<i>Sélection bactérienne</i>	32
1.2.2.1	Technique.....	32
1.2.2.2	Lecture.....	33
1.2.3	<i>Identification bactériologique</i>	33
1.2.3.1	Étude des caractères morphologiques :	33
1.2.3.1.1	Technique	34
1.2.3.2	Étude des caractères physiologiques	35

1.2.3.2.1	Le test de la mobilité	35
1.2.3.2.2	Technique	35
1.2.3.2.3	Lecture	35
1.2.3.3	Le test de la catalase	35
1.2.3.3.1	Principe	35
1.2.3.3.2	Technique	35
1.2.3.3.3	Lecture	36
1.2.3.4	Le test de l'oxydase	36
1.2.3.4.1	Principe	36
1.2.3.4.2	Technique	36
1.2.3.4.3	Lecture	36
1.2.3.5	Etude des caractères biochimiques	36
1.2.3.5.1	Principe	36
1.2.3.5.2	Technique	37
1.3	ANALYSES MOLECULAIRES	40
1.3.1	<i>Extraction et purification de l'ADN génomique bactérien</i>	40
1.3.1.1	Principe	40
1.3.1.2	Technique	41
1.3.2	<i>Amplification des gènes d'ADNr 16 S par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)</i>	42
1.3.2.1	Principe	42
1.3.2.2	Technique	42
1.3.3	<i>Séquençage</i>	43
1.4	ANALYSES PHYLOGENETIQUES DES SEQUENCES	43
1.5	CONSERVATION DES SOUCHES BACTERIENNES	44
2	ÉTUDE DU POTENTIEL DE BIODEGRADATION DES HYDROCARBURES	44
2.1	ESSAIS DE CROISSANCE DES BACTERIES SELECTIONNEES EN PRESENCE DES HYDROCARBURES SATURES (ALCANES)	44
2.1.1	<i>Technique</i>	44
2.1.2	<i>Lecture</i>	45
2.2	ESSAI DE CROISSANCE DES BACTERIES SELECTIONNEES EN PRESENCE DES HYDROCARBURES RAFFINES (CARBURANTS)	45
2.2.1	<i>Technique</i>	45
2.2.2	<i>Lecture</i>	45
2.3	ETUDE COMPARATIVE DE LA CROISSANCE DES BACTERIES SELECTIONNEES (AVEC ET SANS BIO-STIMULATION) EN PRESENCE D'UN HYDROCARBURE RAFFINE (ESSENCE NORMALE)	45
2.3.1	<i>Technique</i>	46
2.3.2	<i>Lecture</i>	46
2.4	DOSAGE DES HYDROCARBURES	47
3	RESULTATS DES ANALYSES DES ECHANTILLONS DE L'EAU DE MER	48
3.1	LES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES	48

3.2	IDENTIFICATION BACTERIOLOGIQUE	49
3.2.1	<i>Les souches hydrocarbonoclastes</i>	49
3.2.2	<i>Identification morphologique</i>	53
3.2.3	<i>Identification biochimique</i>	55
3.2.4	<i>Identification moléculaire</i>	56
3.3	RESULTATS PHYLOGENETIQUES	57
4	CROISSANCE DES BACTERIES SELECTIONNEES EN PRESENCE DES HYDROCARBURES SATURES (LES ALCANES)	57
4.1	<i>VIBRIO ALGINOLYTICUS</i> PB-WC 11099.....	58
4.2	<i>EXIGUOBACTERIUM AURANTIACUM</i> STRAIN NB11_3A	59
4.3	<i>HALOMONAS VENUSTA</i> STRAIN NY-8	61
4.4	<i>DIETZIA SP</i> CNJ898 P LO4	62
5	ESSAI DE CROISSANCE DES BACTERIES SELECTIONNEES EN PRESENCE DES HYDROCARBURES RAFFINES (CARBURANTS)	63
5.1	<i>VIBRIO ALGINOLYTICUS</i> PB-WC 11099.....	64
5.2	<i>EXIGUOBACTERIUM AURANTIACUM</i> STRAIN NB11_3A	65
5.3	<i>HALOMONAS VENUSTA</i> STRAIN NY-8	66
5.4	<i>DIETZIA SP</i> CNJ898 P LO4	67
6	ÉTUDE COMPARATIVE DE LA CROISSANCE DES BACTERIES SELECTIONNEES (AVEC ET SANS BIO-STIMULATION) EN PRESENCE D'UN HYDROCARBURE RAFFINE (ESSENCE NORMALE)	68
6.1	<i>VIBRIO ALGINOLYTICUS</i> PB-WC 11099	69
6.2	<i>EXIGUOBACTERIUM AURANTIACUM</i> STRAIN NB11_3A	70
6.3	<i>HALOMONAS VENUSTA</i> STRAIN NY-8	71
6.4	<i>DIETZIA SP</i> CNJ898 P LO4	72
7	DOSAGE DES HYDROCARBURES TOTAUX APRES CROISSANCE <i>IN VITRO</i>	73
8	ANALYSE STATISTIQUE	74
	CONCLUSION	75
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	78
	PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES	121
	ARTICLES INTERNATIONAUX	121
	COMMUNICATIONS NATIONALES.....	121
	COMMUNICATIONS INTERNATIONALES	121

Introduction

Introduction

La civilisation moderne et l'activité de l'homme sont indéniablement les causes principales de la contamination de l'hydrosphère (**Lambert et al., 1981; Salomon, 2003 & Houma et al., 2005 a**). Le milieu marin sert de réceptacle mondial à l'ensemble des déchets produits par les activités humaines, qu'ils proviennent de l'urbanisation, de l'agriculture, de l'industrialisation et du transport maritime. Ces déchets rejetés dans le milieu marin ne deviennent véritablement polluants que s'ils portent atteinte aux organismes marins et par voie de conséquence à l'espèce humaine qu'exploite les ressources marines (**Ramade, 1982**).

Ramade, (1982) définit la pollution marine comme une altération de la qualité du milieu marin, le plus vaste des écosystèmes de la biosphère.

La mer est le lieu privilégié de toutes sortes de pollutions dont 80% proviennent des activités terrestres et 20 % des activités maritimes. Ces dernières sont génératrices de divers types de pollutions : atmosphériques (cheminées des navires), marines (substances liquides nocives, chute à la mer de la cargaison contenant des substances toxiques ou rejets de déchets domestiques). Toutefois, la plus symbolique, la plus ancienne et la plus médiatisée des pollutions marines restent sans doute ,pour l'opinion publique, la pollution par hydrocarbures (**Borloo, 2009**).

Pulgarin, (2012) rapporte que le déversement d'hydrocarbures pétroliers est une problématique environnementale fréquente dans le monde entier; en effet, plus de 10 000 galons de pétrole ont été reportés dans la base de données internationale des déversements pétroliers. Ces déversements entraînent une dégradation dans les écosystèmes et représentent un risque pour la santé humaine.

D'après **Baillache et al., (1974)** la pollution marine par les hydrocarbures est de deux types, la première connue sous le terme de déballastage, est produite essentiellement par les pétroliers. Elle est composée d'eau de mer mélangée à du pétrole et provient des cuves de transports. Les autres rejets d'hydrocarbures en mer, appelés communément dégazage, correspondent aux rejets d'huiles de vidange et² de résidus de fioul générés par les moteurs de l'ensemble des navires.

L'impact des incidents de déversements d'hydrocarbures sur les milieux marins est énorme et les méthodes physiques et chimiques éliminent rapidement la majorité du pétrole échoué, mais une part importante reste sur le site pollué (**Roling et al., 2002**). Les méthodes conventionnelles pour enlever le pétrole des écosystèmes aquatiques sont: nettoyage

mécanique, nettoyage chimique et la dégradation microbienne. La biodégradation microbienne est le mécanisme majeur pour éliminer le pétrole et les produits dispersants des environnements aquatiques (Ventikos et al., 2004). Selon Alexander, (1994) ; Bertin et al., (2007) & Massalha et al., (2007) le processus biologique comme la bioremédiation constituerait une technologie propre et prometteuse parce qu'elle est simple, efficace, et moins coûteuse en comparaison avec d'autres alternatives comme les méthodes physiques et chimiques. La biodégradation des hydrocarbures est l'un des premiers mécanismes conduisant à la transformation de ces polluants en produits moins toxiques (Soltani, 2004). La bioremédiation est un processus qui utilise des microorganismes pour dégrader ou éliminer différents polluants, tels que les composés organiques (Wang et al., 2014 ; Cao et al., 2015) hydrocarbures et métaux lourds (Alisi et al., 2009 ; Plociniczak et al., 2013) de l'environnement. Selon Molina et al., (2009), ces microorganismes montrent un potentiel élevé d'adaptation aux pollutions par les hydrocarbures dans les stations de traitement ainsi que les sites pollués.

Les hydrocarbures pétroliers dans la nature sont dégradés par divers groupes de microorganismes, qui sont capables d'utiliser les hydrocarbures comme nutriments (Das et al., 2011). Les microorganismes capables de biodégrader des hydrocarbures saturés (n-alcanes) sont largement répartis dans la nature (Atlas et al., 1991, Zhang et al., 2011) tels que *Rhodococcus* (Van Hamme et al., 2001), *Alcanivorax* (Liu et al. 2010) , *Pseudomonas* (Zhang et al., 2011), *Dietzia* DQ12-45-1b (Xing-Biao et al., 2011), *Acinetobacter lwoffii* (Marchal et al., 2003), *Exiguobacterium aurantiacum* et *Burkholderia capacia* (Gita et al. Al., 2008). Une étude sur la biodégradation des hydrocarbures aromatiques de Moxley et al., (2010) rapporte la capacité de *Vibrio sp.* KM1 à croître avec l'acide benzoïque comme seule source de carbone et d'énergie, la polyvalence métabolique de *Halomonas* a également été associée à un grand potentiel biotechnologique (Arahal et al., 2006 ; Simon et al., 2008), *Halomonas sp.* et *Marinobacter sp.* ont dégradés plusieurs HAP, dont le naphthalène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène, le fluor, le pyrène, le benz [a] anthracène et le benzo [a] pyrène comme seules sources de carbone (Dastgheib et al., 2012).

De nombreux micro-organismes parviennent dans des conditions particulières, à se développer sur des substrats organiques de synthèse. Cette propriété est à la base de la bioremédiation (dépollution biologique) qui consiste à éliminer de l'environnement des polluants chimiques grâce à des micro-organismes capables d'utiliser ces polluants comme source de carbone et/ ou d'énergie (Perry et al., 2004) . Tout échantillon de sol renferme en

abondance des organismes capables de dégrader des hydrocarbures et il en est de même pour le milieu marin (**Pelmont, 2005**).

La biodégradation par les populations naturelles de micro-organismes est le mécanisme le plus fondamental et le plus fiable par le biais duquel des milliers de polluants xénobiotiques, y compris le pétrole brut, sont éliminés de l'environnement (**Cappello et al., 2007**). Selon **Röling et al., (2002)** dans le processus de dégradation naturels qui élimine le pétrole restant, les bactéries sont les agents prédominants de la dégradation des hydrocarbures dans l'environnement .

Mc Genity et al., (2012) affirme que le devenir de ce pétrole dans le milieu dépend de sa propre composition et des conditions climatiques. L'élimination des hydrocarbures qui le composent est gouvernée par des facteurs abiotiques (dispersion, évaporation, dissolution, émulsification...) et biotiques (biodégradation). Même s'il est relativement lent, ce processus permet une dégradation quasi-complète (transformation en CO₂) des hydrocarbures (**Sauret, 2011**). L'effet des hydrocarbures sur les communautés microbiennes fait intervenir des mécanismes complexes dépendant de leurs capacités métaboliques, influencés par les paramètres environnementaux et la durée d'exposition aux polluants (**Röling et al., 2002 ; Yakimov et al., 2004 ; Bordenave et al., 2007**) .

Selon **Van der Meer et al., (1992)** l'activité humaine, au travers des multiples sources de pollution et par la mondialisation des déplacements, favorise l'apparition de nouvelles souches capables de biodégrader des hydrocarbures.

D'après **Yakimov et al., (2005) & Head et al., (2006)** de nombreuses études ont montré que des microorganismes hydrocarbonoclastes (HCB : hydrocarbonoclastic bacteria) étaient sélectionnés suite à une contamination. Aussi, dans de nombreux écosystèmes il existe déjà une communauté microbienne indigène capable d'une importante biodégradation de pétrole. **Olajire et al., (2014)** affirme qu'il y a de nombreux avantages de ces micro-organismes indigènes pour la dégradation des hydrocarbures. L'évolution a permis l'émergence d'une grande diversité de micro-organismes présentant de larges capacités de biodégradation. Les organismes les mieux adaptés pour la bioremédiation sont souvent les espèces indigènes d'un habitat pollué particulier. Les micro-organismes indigènes peuvent par définition survivre et se multiplier en présence de substances toxiques. Bien que certaines souches microbiennes aient été sélectionnées pour leur capacité de bioremédiation, elles sont généralement moins efficaces que les populations natives. De plus, il est en fait illégal d'introduire des bactéries génétiquement modifiées dans des environnements naturels en

raison des effets potentiels inconnus sur les populations naturelles et la difficulté de prévenir leur propagation dans d'autres niches d'environnementales (Perry et al., 2004). Les microorganismes dégradant les hydrocarbures existent généralement en très faible abondance dans les environnements marins. L'identification des organismes clés qui jouent un rôle dans la biodégradation des polluants est importante pour la compréhension, l'évaluation et le développement des stratégies de bioremédiation in situ. Il est donc très essentiel de caractériser les communautés bactériennes, d'identifier les dégradants responsables et d'élucider le potentiel catalytique de ces dégradants (Sivaraman, 2011).

L'objectif fixé dans ce travail est d'isoler et identifier des bactéries autochtones hydrocarbonoclastes du littoral Est-Algérien à partir des milieux marins exposés de manière chronique à la pollution par les hydrocarbures.

Des essais de culture in vitro au laboratoire ont été réalisés avec des suivis de la croissance des souches bactériennes sélectionnées en présence de concentrations connues de différentes classes d'hydrocarbures.

La présentation de ces résultats s'articule autour de deux parties :

- alcanes : Hexane C_6H_{14} , Heptanes C_7H_{16} , Décane $C_{10}H_{22}$, Cyclo-hexane C_6H_{12} comme seule source de carbone et d'énergie.
- hydrocarbures raffinés les carburants « essences ».

Par ailleurs, nous avons aussi estimés les taux d'hydrocarbures biodégradés par les différentes souches bactériennes sélectionnées en fin de croissance.

Partie 1

Synthèse

Bibliographique

Chapitre 1

Les hydrocarbures

et la

Pollution Marine

1 Le pétrole

Le pétrole brut ou le pétrole est une ressource précieuse et il est formé par conversion anaérobie de la biomasse sous haute pression et de la température (**Atlas et al., 1998**). Le pétrole brut est constitué d'un mélange de milliers de composés organiques formés à partir de différents matériaux organiques. Ces matériaux subissent des transformations chimiques sous l'effet de diverses conditions géologiques qui ont lieu pendant de longues périodes de temps (**Wang et al., 2003**).

Les pétroles bruts sont des mélanges extrêmement complexes d'hydrocarbures et de composés non-hydrocarbonés (**Lefebvre, 1978**). Les hydrocarbures, au sens chimique du terme, sont des composés organiques exclusivement constitués d'hydrogène et de carbone, associés sous la forme de molécules d'une grande diversité, de la plus simple, le méthane (CH₄), constituant principal du gaz naturel, aux plus complexes que l'on trouve dans les fractions lourdes des pétroles bruts et dans les schistes bitumineux (**Vandecasteele, 2005**). Les hydrocarbures font partie de la vie quotidienne, ils sont présents de façon ubiquiste dans l'environnement en raison de la multiplicité de leurs origines à la fois naturelles et anthropiques (**Commendatore et al., 2004; Volkman et al., 1992**).

Les pétroles bruts sont constitués de différentes familles des composés dont la composition chimique varie énormément selon leur origine géographique et géologique (**Tissot et al., 1984**). Les hydrocarbures constituent la fraction la plus importante d'un brut pétrolier, ils représentent entre 65 et 95 % de la plupart des pétroles bruts. Les composés pétroliers peuvent être classés en quatre familles principales qui sont présentes en proportions variables selon l'origine : les hydrocarbures saturés (30 à 70 %), les hydrocarbures aromatiques et poly-aromatiques (20 à 40 %), les composés polaires (5 à 25 %) et les asphaltes (0 à 10 %) (**Figure 1**) (**Soltani, 2004**).

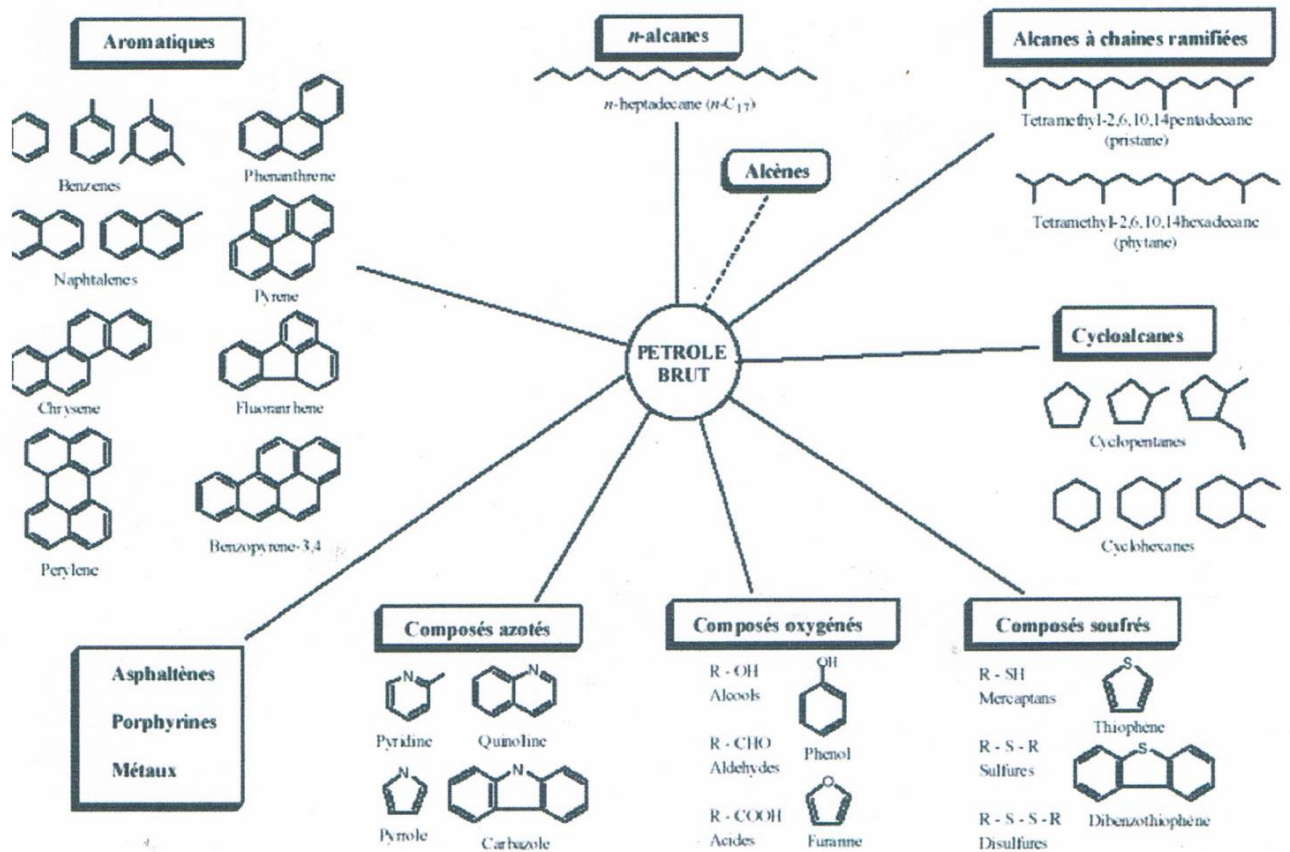


Figure 1. Composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans le pétrole brut (Bianchi et al., 1988)

2 Les principales familles des hydrocarbures

2.1 Les hydrocarbures saturés parmi lesquels on distingue

2.1.1 Les alcanes linéaires (n-alcane)

Leur longueur varie de 7 à 40 atomes de carbones, constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier léger et peuvent atteindre dans certains cas 60 %) (Soltani, 2004).

2.1.2 Les alcanes ramifiés

Les plus abondants sont les iso-alcane (groupement méthyle en position 2), les autres composés ramifiés antéiso (groupement méthyle en position 3) ou polyramifiés tels que les isoprénoïdes (exemples : pristane, phytane) sont beaucoup moins nombreux. Ces composés se trouvent dans le pétrole brut dans des proportions sensiblement égales à celles

des n-alcanes. Le pétrole brut d'origine fossile ne contient en général pas d'alcènes (**Figure 1**) (**Soltani, 2004**).

2.1.3 Les cycloalcanes

Les cycloalcanes renferment des composés cycliques (à 5 ou 6 atomes de carbone) saturés et le plus souvent substitués. Quelques dérivés polycycliques sont aussi présents et certains d'entre eux tels les stéranes et les triteranes sont caractéristiques d'un pétrole brut. Cette famille peut représenter entre 30 et 50 % des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut (**Figure 1**) (**Soltani, 2004**).

2.2 Les hydrocarbures aromatiques

Plusieurs familles d'hydrocarbures aromatiques et poly-aromatiques dont le nombre de noyaux varie de 2 à 6 sont présentes dans le pétrole brut. Ces composés sont dominés par des composés mono-, di- et tri- aromatiques (**Figure 1**) (**Neff, 1979**). En général, les hydrocarbures aromatiques sont moins abondants que les alcanes, et ne représentent que 10 à 30 % des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier (**Bertrand et al., 1989**). Les hydrocarbures aromatiques sont séparés en 02 groupes distincts :

- Les hydrocarbures mono-aromatiques ;
- Et les hydrocarbures aromatiques polycycliques

2.2.1 Les hydrocarbures mono-aromatiques

Les hydrocarbures mono-aromatiques forment une des grandes classes de composés aromatiques présents dans l'environnement avec les hydrocarbures chloro-aromatiques. (**Vandecasteele, 2005**). La production naturelle principale de composés mono-aromatiques provient de la dégradation de la lignine (**Vandecasteele, 2005**). Ces hydrocarbures mono-aromatiques peuvent aussi avoir une origine biosynthétique. C'est le cas par exemple, du p-cymène (ou *p*-isopropyltoluène), un composant des huiles essentielles. C'est aussi celui du styrène, présent dans divers produits naturels comme certains fruits, ou encore certaines plantes. Cependant, ce dernier est aussi un produit pétrochimique de gros tonnage et représente un polluant important (**Phale et al., 2007**). En fait, les quantités considérables d'hydrocarbures mono-aromatiques rencontrées dans l'environnement sont en grande majorité d'origine pétrolière, ou pétrochimique, et sont la conséquence des pollutions très nombreuses engendrées par l'activité humaine (**Andreoni et al., 2007**). Parmi ceux-ci, le benzène, le toluène, l'éthylbenzène et les xylènes, désignés sous le sigle de BTEX. Les structures de

certaines hydrocarbures BTEX sont présentées dans la **figure 2**, sont particulièrement importants du fait de leur abondance dans les essences, et de leurs utilisations en pétrochimie (**Phale et al., 2007**). Les BTEX existent à l'état naturel dans le pétrole brut, le goudron et le charbon. Leurs sources d'émission dans l'environnement sont principalement d'origines industrielles et anthropiques. Ils sont utilisés massivement comme réactifs de synthèse et solvants dans divers secteurs industriels (**Kelly et al., 2005**). Ils servent d'additifs antidétonants dans l'essence pour améliorer l'indice d'octane (**Forget, 1997**). Ils entrent également dans la composition des peintures, caoutchouc, adhésifs et résines. Ces composés ont une solubilité dans l'eau importante, et une volatilité notable qui décroissent respectivement avec le nombre d'atomes de carbone (**Andreoni et al., 2007**). Leur solubilité élevée leur confère ainsi une mobilité importante, dans les eaux et les sols (transfert et migration dans les aquifères) et une accessibilité importante pour les microorganismes. Cependant, leur hydrophobicité provoque une forte toxicité pour la membrane cytoplasmique (ils vont ainsi modifier la structure de la membrane et diminuer son efficacité). Les hydrocarbures mono-aromatiques sont ainsi toxiques pour les cellules eucaryotes.

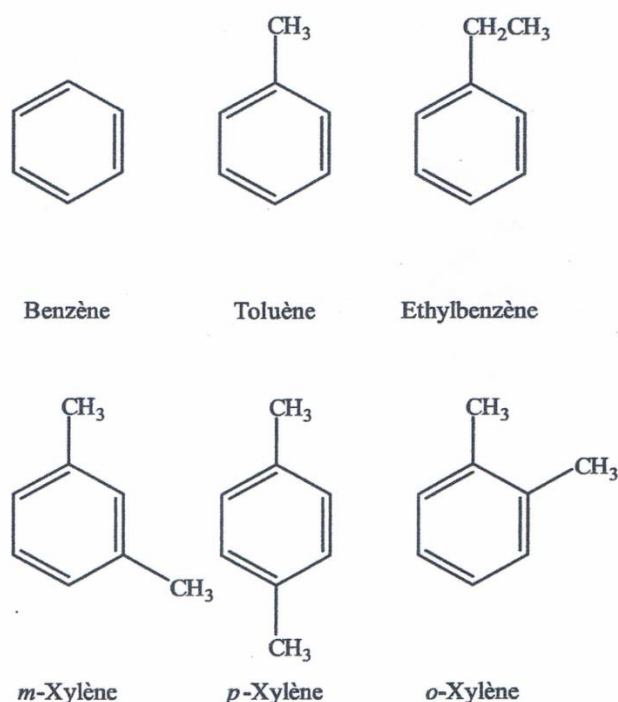


Figure 2. La structure chimique des BTEX (Badjagbo, 2009)

2.2.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des composés organiques hydrophobes issus de la combustion incomplète des matières carbonées. Ces molécules sont constituées, au sens strict, d'atomes de carbone et d'hydrogène. Leur arrangement en structure cyclique comporte au moins deux cycles aromatiques condensés de type benzène (**Blumer, 1976; Cerniglia, 1992; Meinschein, 1961**). Les HAP sont des polluants ubiquistes détectés dans tous les écosystèmes, des régions polaires aux tropiques (**Blumer et al., 1975; Keith et al., 1979; Wilcke, 2007**). Les activités anthropiques constituent la part la plus importante des émissions de HAP : processus de production et de dispersion de matières créosotées (chemins de fer), industries des hydrocarbures et associé(e)s (brai de goudron, asphalte et épandage de boues), déversements accidentels, trafic routier, effluents domestiques, dépôts atmosphériques (**Bjørseth et al., 1979; Cerniglia, 1992; Denier van der Gon et al., 2007; Edwards, 1983; Johnsen et al., 2007; Kim et al., 2003; Shuttleworth et al., 1995; Whitacre et al., 2008**). Les HAP sont classés en deux catégories : les « légers » à faible poids moléculaire, 2 à 3 cycles aromatiques, et les « lourds », à 4 cycles et plus (**Cerniglia, 1992**). Seize d'entre eux ont été jugés comme prioritaires à éliminer des sols dès les années 70 (**Keith et al., 1979**). Les structures des 16 HAP non substitués retenus comme polluants prioritaires par l'*American Environmental Protection Agency* (EPA) sont présentés dans la **figure 3**.

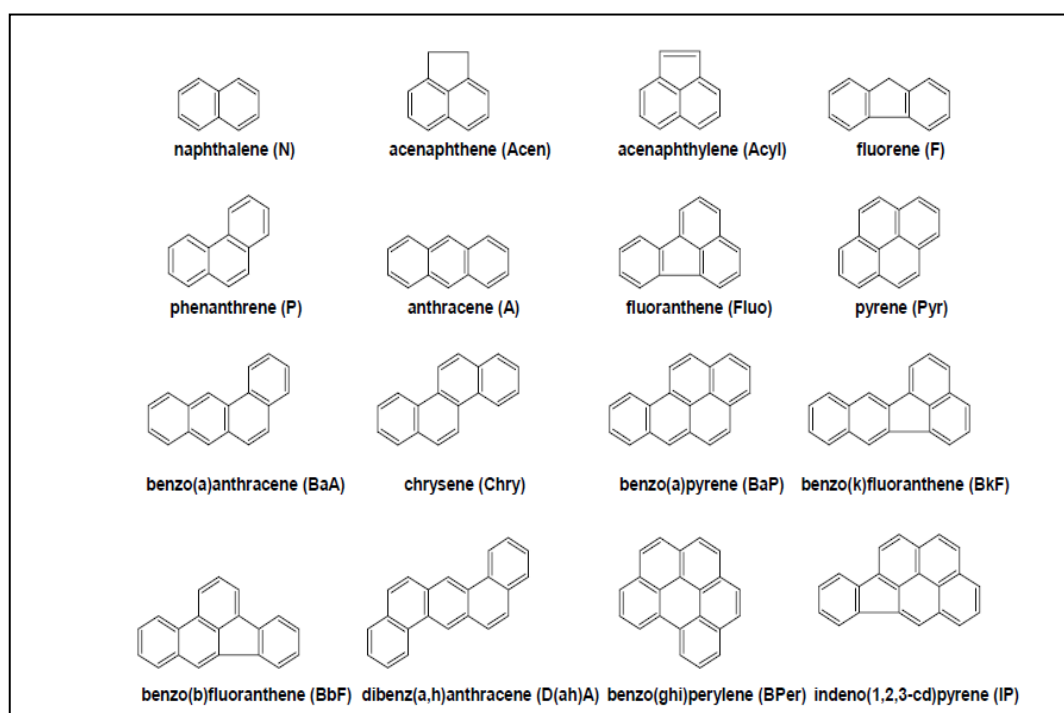


Figure 3. Structure et nomenclature des HAP. (Les seize HAP prioritaires de la liste de l'EPA)

2.3 Les composés polaires (les composés N, S, O)

Ce sont, en général, des constituants mineurs d'un pétrole brut (Lefebvre, 1978), à l'exception des pétroles très lourds ; les dérivés soufrés sont dans la plupart des cas plus abondants que les composés oxygénés ou azotés (Bertrand et al., 1989) :

- Composés azotés : pyridines, quinoléines,....
- Composés soufrés : mercaptans, sulfures, disulfures,...
- Composés oxygénés : phénols, acides carboxyliques, alcools, aldéhydes,.... (Figure 1)

(Soltani, 2004)

2.4 Les asphaltènes et les résines

Les asphaltènes et les résines sont des composés lourds et fonctionnalisés (composés non-hydrocarbonés), de structure chimique complexe à base de cycles aromatiques condensés, de naphthéno aromatiques, de ramifications et d'hétéroatomes (Boukir et al., 1998); constituent une faible partie du pétrole brut, 1 à 5 % du pétrole léger alors qu'un pétrole lourd peut contenir plus de 25 % d'asphaltènes et 20 % de résines (Fig.1) (Soltani, 2004). Enfin, des métaux sont présents dans les pétroles bruts à l'état de traces. Le vanadium, le nickel sont généralement les plus abondants mais du fer, du cuivre et de l'uranium ont également été détectés (Bertrand et al., 1989; Escobar et al., 2012; Lefebvre, 1978).

3 Origine des hydrocarbures pétroliers dans l'environnement marin

L'eau, compte tenu de ses propriétés physico-chimiques, est trop souvent utilisée comme un vecteur d'évacuation de déchets (Emilian Koller, 2004). Les eaux douces et océaniques sont devenues le réceptacle de pollutions multiples chimiques, organiques, radioactives, microbiologiques d'origines variées : urbaine, industrielle, agricole (Emilian Koller, 2004).

Les hydrocarbures sont très répandus dans les milieux marins. Chaque année, des millions de tonnes d'hydrocarbures entrent les milieux marins, principalement à partir de sources anthropiques, mais aussi à partir de sources naturelles comme les plantes, les algues et les bactéries. La pollution marine par le pétrole brut provient des accidents de pétroliers, des opérations de déballastage, de lavage des citernes, de l'infiltration naturelle. (Samiullah, 1985) et des rejets volontaires de raffineries (Sauret, 2011), ainsi que l'huile de cale usagée

qui s'accumule en petites quantités à l'intérieur des parties inférieures du navire. La décharge illégale de l'huile de cale dans la mer représente environ 10 % du total des huiles qui entrent dans la pollution de la mer. **Nievas et al., 2006** soulignent que les eaux d'huile de cale sont toxiques dans la nature et ils sont préoccupants en raison de leur longue persistance dans l'environnement.

3.1 Origine anthropique

3.1.1 Les suintements naturels (sources géochimiques)

Selon **Pelmont, 2005** il existe des suintements naturels de produits pétroliers à partir des sédiments marins. La dispersion annuelle des hydrocarbures sur toute la surface des océans se chiffrerait par milliers de tonnes, les mers ont depuis fort longtemps l'habitude de cette pollution discrète. Ponctuellement ou chroniquement, ces gisements présentent des résurgences (cas du golfe du Mexique -USA et du golfe de San Jorge - Argentine) qui libèrent du pétrole dans les milieux marins sus-jacents. Néanmoins d'après **Sauret, (2011)** là où un écoulement naturel n'a que peu de conséquences sur l'écosystème marin car il est généralement adapté à cet apport continu.

3.1.2 Les accidents pétroliers

Les aspects les plus évidents sont les grandes catastrophes très médiatisées comme les marées noires qui provoquent une forte mortalité de la faune aquatique, bords de mers englués sans oublier les conséquences économiques engendrées pour les riverains vivant de la pêche ou du tourisme (**Soltani, 2004**), les pollutions les plus redoutables émanent des fiouls lourds, formant des goudrons et des gommes récalcitrants comme lors du naufrage de l'Erika, le 11 Décembre 1999 au sud du Finistère, ou encore celui du Prestige au large des côtes espagnoles survenu le 13 Novembre 2002 qui a été particulièrement catastrophique suite à la rupture d'un pétrolier en charge (77 000 t de fioul lourd) au large de la Galice : le plus grand déversement de fioul lourd (estimé à 64 000 t) en venant souiller plus de 3000 km de littoral (**Albakjaji, 2011**). Les composants les plus légers ont en effet une meilleure tendance à s'évaporer dans l'atmosphère. Les accidents maritimes ne sont pas les seuls responsables de la souillure des mers car ils interviennent pour moins de 10% de la pollution par le pétrole, mais leur gravité vient du caractère massif des épandages et des effets dommageables spectaculaires sur l'environnement (**Pelmont, 2005**).

3.1.3 Le déballastage (Slops)

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

3.1.4 Le dégazage (Sludges)

Les produits pétroliers sont introduits dans l'environnement marin sous forme de produits raffinés : carburants et huiles, leurs compositions dépendent de l'origine du pétrole et des opérations subites au cours du raffinage. On dénombre environ 230 composants pour l'essence et de l'ordre de 2000 pour un fuel lourd (Soltani, 2004) .

On distingue deux types de carburants : les carburants lourds tels que le naphta et les fuels lourds, et les carburants légers tels que les essences et les gazoles (Figure 4). Les carburants lourds ont une densité (d) supérieure à 1 et vont donc s'accumuler au niveau du plancher de la nappe. En quantité suffisante, ils vont constituer une phase non miscible appelée DNAPL (Dense Non Aqueous Phase Liquid). Au contraire, les carburants légers ont une densité (d) inférieure à 1 et vont donc s'accumuler à la surface de la nappe. La phase non miscible sera appelée LNAPL (Light Non Aqueous Phase Liquid) (Saada et al., 2004).

L'essence est composée de quatre principales classes structurales d'hydrocarbures : Les n-alcanes ou des n-paraffines (hydrocarbures saturés linéaires); Isoalcane ou isoparaffines (hydrocarbures saturés ramifiés); Cycloalcanes ou des naphènes (saturés alcanes cycliques); et les aromatiques (Figure 4) (Marchal et al., 2003).

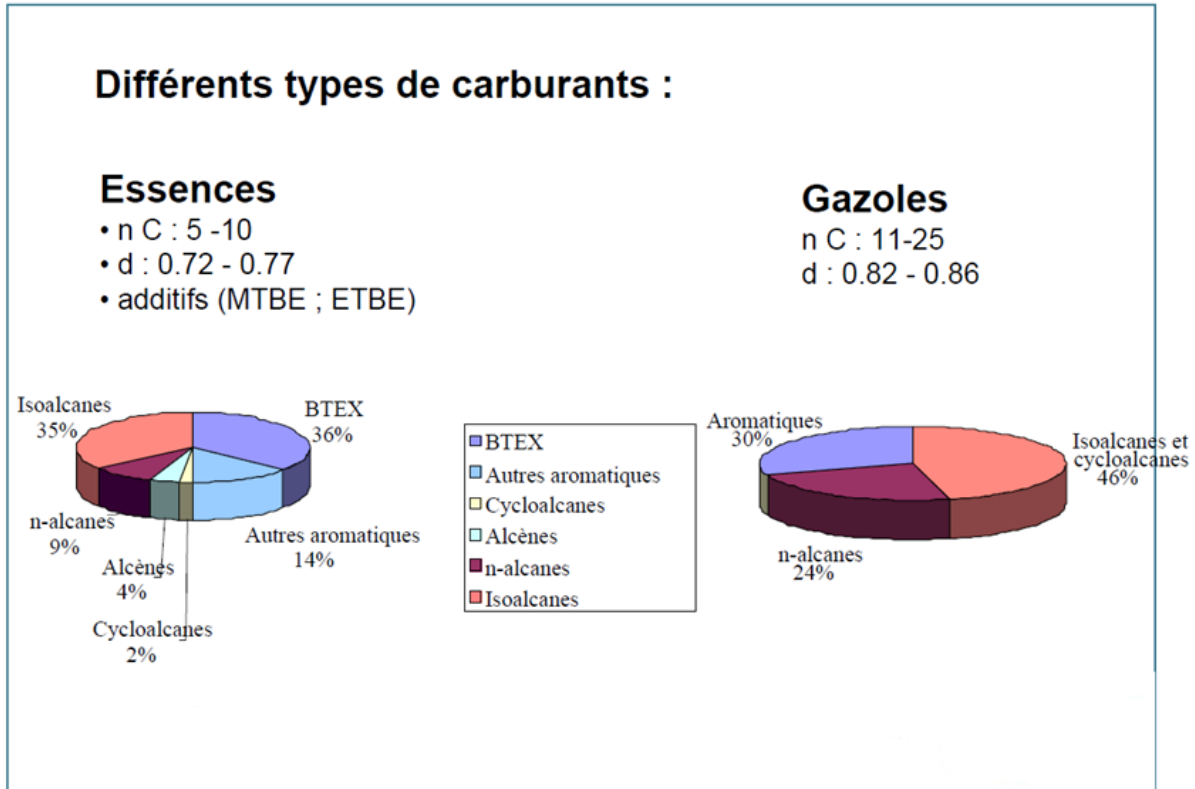


Figure 4. Composition chimique de l'essence et du gazole (Colombano et al., 2008)

Le dégazage correspond aux rejets d'huiles de vidange et de résidus de fuel générés par les moteurs de l'ensemble des navires. Les pollutions dues aux vidanges des moteurs, aux huiles et résidus de fuel concernent en effet tous les types de navires : transport de cargaison (tankers, vraquiers, porte-containers..), transport de passagers (bateaux de croisières, ferry..) et bateaux de pêche. Compte tenu de l'utilisation d'un fuel brut de bas de gamme pour la propulsion du navire, seule une partie du fuel peut être consommée par les machineries lorsqu'un navire fait route. Outre ces résidus de fuel, un navire consomme une importante quantité d'huiles de graissage, qui fuient des machineries et s'accumulent dans les fonds de cales des navires (Noémie et al., 2003).

3.2 Origine biogénique

Albro, (1976) ; Bachofen, (1982) & Saliot, (1981) signalent qu'une quantité non négligeable d'hydrocarbures peut provenir de l'activité de nombreux micro-organismes et des plantes aquatiques (phytoplancton, macrophytes).

Les espèces phytoplanctoniques et les macro-algues synthétisent des n-alcanes dont les longueurs de chaînes varient respectivement de n-C14 à n-C32 et de n-C20 à n-C30 (Saliot,

1981), avec un maximum à n-C15 ou n-C17 (Blumer et al., 1971 ; Gelpi et al.,1970 ; Clark et al. ,1967; Youngblood et al.,1971).

4 Le littoral algérien

Les principaux problèmes de pollution du littoral algérien incluent les eaux usées urbaines et industrielles non traitées, les nappes d'hydrocarbures de pétrole et l'érosion côtière (www.eea.europa.eu.2006). La pollution par les hydrocarbures de pétrole est très courante le long du littoral algérien, compte tenu des voies du trafic maritime pétrolier qui passent à proximité, selon le rapport réalisé par l'AAE en 2006 (www.eea.europa.eu.2006) 150 millions de tonnes d'hydrocarbures y sont transportées chaque année sur les 500 millions de tonnes/an d'hydrocarbures transportées au total en mer méditerranée, ce qui correspond au transit de 1800 pétroliers par an. En outre, plus de 50 millions de tonnes d'hydrocarbures empruntent chaque année les terminaux pétroliers des principaux ports algériens (Arzew, Bethioua, Bejaia et Skikda), avec d'importantes fuites en mer (10 000 tonnes/an). Selon **JORA N°63 du 08 Octobre 2006** la méditerranée restera une route importante pour le transport d'hydrocarbures et de gaz. Par ailleurs d'importantes quantités d'hydrocarbures sont exportées à partir des ports algériens et tunisiens. Les opérations de déballastage sont également responsables de déversement de quelques 12 000 tonnes supplémentaires d'hydrocarbures par an dans les eaux côtières du fait que les installations de réception disponibles ne peuvent pas répondre aux quantités de ballast. De plus, une pollution par les hydrocarbures est imputable aux rejets d'eaux usées industrielles et urbaines de boues toxiques provenant de raffineries de pétrole à Alger, Oran et Skikda et de la production de gaz naturel. En raison de la présence d'activités pétrolières en Algérie, les sédiments portuaires et côtiers présentent de fortes concentrations en hydrocarbures pétroliers totaux ainsi qu'en hydrocarbures aromatiques polycycliques «HAP» (**tableau 1**) (www.eea.europa.eu.2006).

Chapitre 1 : Les hydrocarbures et la pollution marine

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

Principaux ports d'Algérie	Concentrations d'hydrocarbures pétroliers totaux (HPT en mg/kg)
Oran	1500-17 000
Arzew	930-8600
Bethioua	67-940
Mostaganem	1600-8800
Ténès	680-990
Alger	1900-31000
Bejaia	140-260
Jijel	180-430
Ancien port de Skikda	450-2000
Nouveau port de Skikda	79-120
Annaba	130-6200

En raison de l'ampleur des dégâts, la pollution d'origine anthropique est donc devenue une préoccupation mondiale (Megharaj et al., 2011). Un large corpus de recherche sur la bioremédiation de ces molécules s'est mis en place ces dernières décennies (Head et al., 1999). Les pollutions liées aux hydrocarbures entraînent un nombre considérable d'effets négatifs sur la santé humaine, la qualité de l'air et de l'eau, la détérioration des écosystèmes terrestres et marins, la biodiversité, la contamination des chaînes alimentaires (O'Rourke et al., 2003). Parmi les différents processus impliqués dans le devenir des hydrocarbures, la biodégradation des hydrocarbures pétroliers par les micro-organismes est considérée comme un processus majeur (Leahy et al., 1990).

Chapitre 2 :

Les

Hydrocarbonoclastes

de l'Environnement

Marin

1 Les micro-organismes hydrocarbonoclastes

On sait depuis quelques décennies qu'une fois déversé dans l'eau de mer, le pétrole est soumis à l'action d'un certain nombre de facteurs physico-chimique conduisant à son élimination partielle. On note ainsi successivement (**Figure 5**) des phénomènes de dispersion du pétrole, d'évaporation des molécules les plus volatiles, de photo-oxydation des hydrocarbures lourds, d'émulsification des composés hydrophobes, d'adsorption et d'agrégation des hydrocarbures avec la matière organique particulaire et de dissolution de ses composés en matière organique dissoute (**Bianchi et al., 1988**). Mais en plus de ces facteurs physico-chimiques, la biodégradation par les micro-organismes est indéniablement le processus le plus abouti dans l'élimination des polluants d'origine pétrolière (**Atals, 1981**).

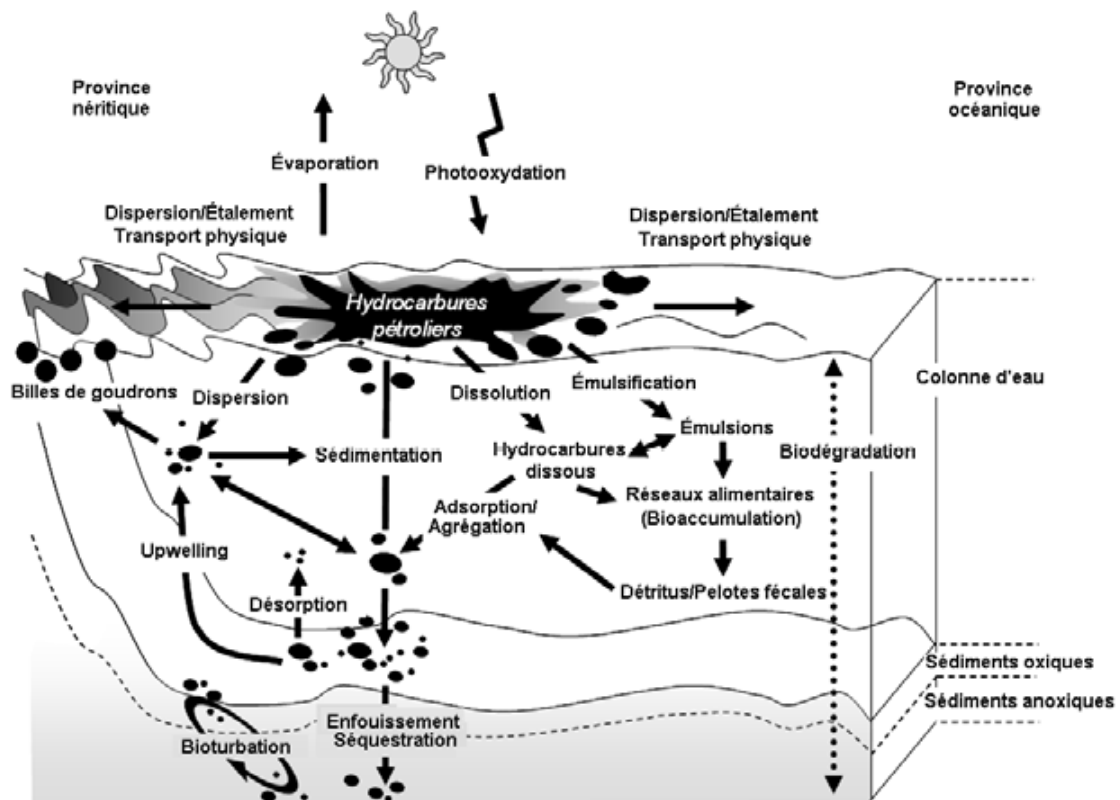


Figure 5. Processus physico-chimique et biologique affectant le devenir des hydrocarbures pétroliers au sein de la colonne d'eau et des sédiments (Mirales, 2007)

De nombreux micro-organismes (procaryotes et eucaryotes) présentent la capacité de dégrader les hydrocarbures, ils sont qualifiés d'hydrocarbonoclastes (**Figure 6**). Ces micro-organismes sont largement répandus dans le milieu marin, à la fois dans la colonne d'eau et dans les sédiments (**Bertrand et al., 1989**). **Prince, 2005** à répertorié une liste de 9 genres

de cyanobactéries, 103 genres de champignons, 14 genres d'algues qui sont connus pour dégrader ou de transformer d'hydrocarbures et 79 genres bactériens qui peuvent utiliser des hydrocarbures comme source unique de carbone et d'énergie. Parmi ces derniers quelques genres majoritaires sont : *Acinetobacter*, *Alcanivorax*, *Alcaligenes*, *Cycloclasticus*, *Flavobacterium*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Thalassolituus*, *Oleispira* et *Vibrio* , il à été établi que les bactéries étaient qualitativement et quantitativement les plus efficaces dans cette fonction. Les bactéries qui dégradent les hydrocarbures ont été isolés il y a près d'un siècle (Naughton et al., 1999), ils constituent le groupe de bactéries marine hydrocarbonoclastes (Klein et al., 2008). Les bactéries constituent le groupe le plus important d'un point de vue taxonomique , non seulement en raison de vaste nombre d'espèces et de genres de biodégradation existants ,mais aussi à cause de leur polyvalence métabolique (Abalos et al., 2004).

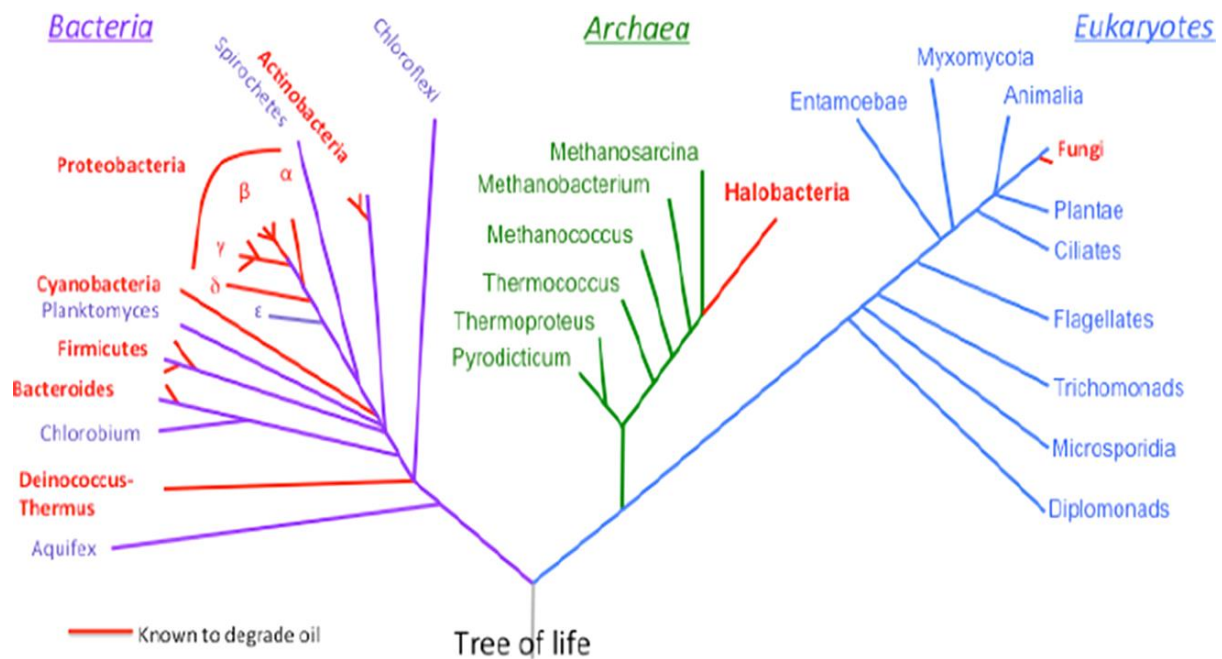


Figure 6. Les taxons microbiens qui dégradent le pétrole. les phyla microbiens qui dégradent le pétrole, en rouge, ont été identifiés à partir des trois domaines de la vie (Prince et al., 2007)

Les bactéries sont capables de dégrader de nombreux hydrocarbures sous des conditions aérobies et anaérobies (Head et al., 2014 ; Prince et al., 2007), et différents endroits dans l'environnement marin abritent ces endroits physiologiques distincts. Ainsi, la dégradation aérobie des hydrocarbures par les bactéries dans la colonne d'eau de mer et sédiments oxiques même dans les profondeurs d'eau (Prince et al., 2013). Alors que la dégradation anaérobie des hydrocarbures se réalise principalement dans les sédiments

anoxiques et à l'intérieur. La biodégradation de l'huile d'hydrocarbures se produit facilement dans une profondeur de 2000-5000 m (Bazylinski et al., 1989 ; Schwarz et al., 1974) dans l'arctique (Mc Farlin et al., 2014) et l'antarctique (Delille et al., 1998).

La dégradation aérobie des hydrocarbures par des micro-organismes a été largement étudiée et les bactéries marines capables de dégrader le pétrole ont été isolées à partir de différents sites dans le monde entier (Head et al., 2006) montrant la nature cosmopolite de ces bactéries. Les micro-organismes qui dégradent les hydrocarbures existent généralement en très faible abondance en milieu marin. Cependant la pollution par les hydrocarbures de pétrole, peut stimuler leur croissance et cause des changements dans la structure des communautés microbiennes de la zone contaminée (Caruso et al., 2004) exemple selon (Hassanshahian et al., 2010) la contamination par le pétrole peut induire des changements majeurs dans les communautés microbiennes marines dans le golfe persique et la mer Caspienne, car lorsque la pollution par le pétrole brut se produit, le nombre de bactéries qui dégrade les hydrocarbures augmente.

2 Les groupes de bactéries hydrocarbonoclastes marines (BHCM)

Des groupes bactériens typiques sont déjà connus pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures dans les milieux marins comprennent *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Sphingomonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Dietzia*, et *Gordonia* (Barth, 2003). Ils ont été isolés sous forme de dégradeurs d'alcanes ou de composés aromatiques tels que le toluène, le naphthalène et phénanthrène. Plusieurs bactéries marines capables de dégrader les hydrocarbures pétroliers ont été nouvellement isolées (Fig.7). Ceux-ci sont des bactéries des genres *Alcanivorax* (Ghanavati et al., 2008), *Cycloclasticus* (Yakimov et al., 1998), *Marinobacter* (Dyksterhouse et al., 1995), *Neptunomonas*, *Oleiphilus* (Gauthier et al., 1992) and *Oleispira* (Golyshin et al., 2002) parmi les γ -Proteobacteria, et le genre *Planococcus* parmi les bactéries Gram positif (Yakimov et al., 2003). Par exemple, les souches *Alcanivorax* peuvent croître sur n-alcanes et les alcanes ramifiés (Figure 7), mais ne peut pas utiliser tous les sucres ou des acides aminés comme source de carbone. De même, les souches de *Cycloclasticus* poussent sur des hydrocarbures aromatiques, le naphthalène, le phénanthrène et anthracène (Figure 7), alors

que les souches d' *Oleispira* et *Oleiphilus* poussent sur les hydrocarbures aliphatiques, alcanols et alcanolates (Figure 7) .

Vibrio, *Pseudoalteromonas* , *Marinomonas* et *Halomonas* ont été isolés comme des bactéries marines capables de dégrader le phénanthrène ou chrysène (Engelhardt et al., 2001). Certaines bactéries isolées à partir d' environnements marins qui dégradent les hydrocarbures ont été classés en plusieurs genres qui incluent les souches de bactéries terrestres exemple le naphtalène est dégradé par le genre *Staphylococcus* et *Micrococcus* (Melcher et al., 2002) ,le 2 - methylphenanthrene par *Sphingomonas* (Zhuang et al., 2003) et les alcanes par *Geobacillus* (Gilewicz et al., 1997) .

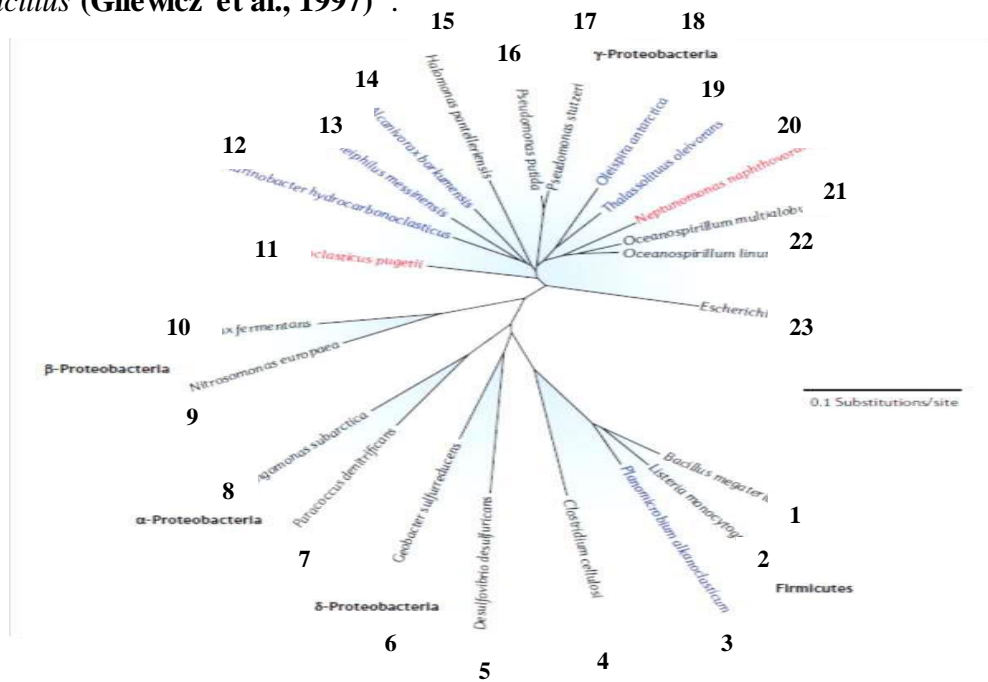


Figure 7. Phylogénie des principaux groupes de bactéries hydrocarbonoclastes marines. En

Légende:

- | | |
|---|---|
| 1. <i>Bacillus megaterium</i> | 16. <i>Pseudomonas putida</i> |
| 2. <i>Listeria monocytogenes</i> | 17. <i>Pseudomonas stutzeri</i> |
| 3. <i>Planomicrobium alkanoclasticum</i> | 18. <i>Oleispira Antarctica</i> |
| 4. <i>Clostridium cellulosi</i> | 19. <i>Thalassolituus oleivorans</i> |
| 5. <i>Desulfovibrio desulfuricans</i> | 20. <i>Neptunomonas naphthovorans</i> |
| 6. <i>Geobacter sulfurreducens</i> | 21. <i>Oceanospirillum multilobuliferum</i> |
| 7. <i>Paracoccus denitrificans</i> | 22. <i>Oceanospirillum linum</i> |
| 8. <i>Sphingomonas subarctica</i> | 23. <i>Escherichia coli</i> |
| 9. <i>Nitrosomonas europaea</i> | |
| 10. <i>Rhodospirillum rubrum</i> | |
| 11. <i>Cycloclasticus pugetii</i> | |
| 12. <i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i> | |
| 13. <i>Oleiphilus messinensis</i> | |
| 14. <i>Alcanivorax borkumensis</i> | |
| 15. <i>Halomonas pantelleriensis</i> | |

3 Adaptation des bactéries hydrocarbonoclastes (HCB) aux hydrocarbures

L'adaptation de certaines communautés bactériennes aux hydrocarbures s'explique par trois mécanismes majeurs :

- Le pétrole stimule la prolifération des hydrocarbonoclastes (les milieux pollués chroniquement sont plus riches en hydrocarbonoclastes). En cas d'apport soudain de pétrole, l'abondance relative de ces HCB permet d'assurer la mise en place rapide d'un consortium de dégradation ;
- Les bactéries sont capables de transférer les gènes de catabolisme des hydrocarbures par conjugaison, la probabilité pour que ce type d'échange survienne dans un environnement chroniquement pollué est plus grande (**Hada et al., 1981, Leahy et al., 1990**) ;
- Enfin, dans les zones polluées, des mécanismes d'induction des enzymes d'intérêt ont été retrouvés en présence de pétrole (**Suzuki et al., 2001, Priefert et al., 2004**).

4 Les consortiums bactériens

La biodégradation totale d'un pétrole n'est donc possible que grâce à la mise en place d'un consortium bactérien comprenant des groupes dont les équipements enzymatiques complémentaires permettent la biodégradation quasi-totale de ces différents types d'hydrocarbures (**Head et al., 2006**). Depuis de nombreuses études effectuées autant en microcosmes (**Rolling et al., 2002, Sei et al., 2003, Cappello et al., 2007**) que sur des échantillons naturels (**Peterson et al., 2003, Yakimov et al., 2004, Mascarelli, 2010**) ont confirmé qu'après un apport soudain de pétrole, le ratio entre HCB et bactéries totales augmentait fortement. On assiste en générale à une baisse de la diversité totale des communautés bactériennes au profit de certaines espèces avantagées sélectivement par la nouvelle source de matière organique et particulièrement bien adaptées à la présence de certains hydrocarbures. L'élimination conjointe des bactéries sensibles au pétrole et la stimulation des HCB conduit souvent à une augmentation de l'abondance bactérienne et à un regain d'activité globale de la communauté dans les premiers jours après la pollution (**Atlas, 1981**). Rapidement un consortium de biodégradation se met en place. Les bactéries capables

de métaboliser les molécules les plus simples sont sélectionnées en premier. Lorsque ces composés viennent à disparaître, d'autres bactéries ayant eu le temps de s'acclimater aux molécules les plus complexes (les hydrocarbures aromatiques polycycliques par exemple) prolifèrent à leur tour et prennent l'ascendant sur le reste de la communauté. cela se traduit par une alternance de différents groupes qui se poursuit jusqu'à l'élimination quasi-complète des hydrocarbures (**Head et al., 2006**). Toutes les espèces bactériennes ne présentant pas un taux similaire de dégradation des hydrocarbures, la biodégradation des différents composés entraîne une variation des sources de carbone disponibles dans le milieu au fur et à mesure du processus de biodégradation (**Head et al., 2006 ; Coulon et al., 2007 ; Dubinsky et al., 2013**). Cette évolution constante des sources de carbone disponibles entraîne elle aussi une modification de la diversité au sein de la communauté microbienne indigène au cours du temps.

4.1 Les facteurs limitant l'action des HCB

Deux facteurs essentiels viennent limiter ou ralentir l'action des micro-organismes sur les hydrocarbures :

- leur faible solubilité dans l'eau et ;
- leurs effets toxiques sur les cellules vivantes.

Dans le premier cas intervient un problème d'accessibilité. Les substrats hydrophobes ont tendance à former une phase distincte, et la faible vitesse de leur diffusion en milieu aqueux retarde leur biodégradation. Cet inconvénient est amoindri par dispersion en émulsion (**Iqbal et al., 1995**). Le caractère lipophile des hydrocarbures est la principale source des effets toxiques en provoquant des altérations de la structure membranaire (**Sikkema et al., 1995**). Les aliphatiques à courte chaîne et les aromatiques légers sont plus diffusibles et sont plus toxiques pour la faune et la flore que le pétrole lui-même (**Pelmont, 2005**).

4.2 Facteurs environnementaux affectant l'activité des HCB

Des conditions environnementales défavorables à la croissance bactérienne, et par conséquent à la métabolisation des hydrocarbures, représentent donc le principal obstacle à la biodégradation in situ (**Juhasz et al., 2000 ; Coulon et al., 2007 ; Dash et al., 2013**).

1.1 Les facteurs physico-chimiques

Les facteurs physico-chimiques influant sur la vitesse de biodégradation microbienne sont : la température, l'oxygène disponible, le pH, la salinité et la pression hydrostatique (**Leahy et al., 1990 ; Atlas, 1981**).

4.2.1 La température

La température est un facteur important pour la biodégradation. L'activité microbienne ralentit à basse températures et en raison à des diminutions du taux d'éléments nutritifs et le transport des déchets à travers la membrane (**Whyte et al., 1998**). Une diminution de température est généralement accompagnée par une diminution de la vitesse de biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de l'activité enzymatique. Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation (**Sandvik et al., 1986 ; Song et al., 1990 ; Walworth et al., 2001**).

La température affecte également :

- la viscosité et la solubilité des hydrocarbures : à basse températures la viscosité du pétrole augmente et l'émulsification est plus difficile.
- la volatilisation des composés de faible poids moléculaire : à basse températures la volatilisation des composés de faible poids moléculaire toxiques pour les micro-organismes, ralentit.
- par son effet direct sur la chimie des polluants (**Venosa et al., 2003**).

Pour les buts de biodégradation, les températures peuvent aller de 15 à 45 ° C (coïncidant avec la température optimale des micro-organismes mésophiles) (**Feitkenhauer et al., 2003**) cependant, l'optimum est à 30-40 ° C. L'oxydation des hydrocarbures a été observée à la fois à des températures proches de zéro (**Zobell, 1973 ; Dellile, 2000**) et à des températures autour de 70 °C (**Mateles et al., 1967**).

4.2.2 Oxygène

Les ressources en oxygène constituent un facteur particulièrement important dans la biodégradation des hydrocarbures (**Cerniglia, 1992**). L'étape initiale du catabolisme des hydrocarbures aliphatiques, cycliques et aromatiques par les bactéries et les champignons inclut l'oxydation de ces substrats par l'intermédiaire d'hydroxylases et d'oxygénases, pour lesquelles l'oxygène moléculaire est indispensable (**Leahy et al., 1990 ; Atlas, 1981 ; Bertrand et al., 1989**). Les conditions aérobies sont, par suite, nécessaire pour cette voie d'oxydation microbienne des hydrocarbures dans l'environnement. Le problème de la limitation de l'oxygène moléculaire dans les couches superficielles des colonnes d'eau est

inexistant, en effet la concentration en oxygène est suffisamment élevée pour assurer l'activité des micro-organismes hydrocarbonoclastes (**Soltani, 2004**). En milieu anaérobie, l'oxygène est remplacé par d'autres types d'accepteurs d'électrons mais le rendement y est donc particulièrement réduit, la dégradation y est donc particulièrement lente (ex : sédiments) (**Coates et al., 1997**). Les sédiments aquatiques, sont généralement anoxiques, à l'exception de la fine couche superficielle. **Bertrand et al., (1986)** **Leahy et al., (1990)** ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures a lieu essentiellement dans la partie superficielle des sédiments (0-1cm), où la concentration en oxygène est de 8 ppm, alors qu'elle est plus faible en profondeur. La dégradation anaérobie des hydrocarbures par les micro-organismes peut se produire mais à des vitesses négligeables et son importance écologique est considérée comme de moindre importance (**Soltani, 2004**). La dégradation des hydrocarbures pétroliers est beaucoup plus efficace en conditions oxygènes qu'anoxiques (**Widdel et al., 2001**).

4.2.3 Le pH

L'influence du pH a été très peu étudiée, mais il ne semble jouer qu'un rôle relativement mineur en milieu marin. Contrairement à la plupart des écosystèmes aquatiques, les sols peuvent avoir des valeurs de pH très variables, allant de 2,5 à 11,0. Des valeurs extrêmes de pH, ce qui est le cas pour quelques types de sols, pourraient avoir une influence négative sur la capacité des micro-organismes à dégrader les hydrocarbures. La croissance des bactéries hétérotrophes et des champignons étant favorisée par un pH proche de la neutralité (**Leahy et al., 1990**). **Dibble et al., (1979)** ; **Hambrick et al., (1980)** ont trouvé que la dégradation des hydrocarbures est plus élevée dans des conditions légèrement basiques. Quelque soit la valeur qu'il peut atteindre, le pH des milieux marins n'atteint jamais des valeurs suffisamment extrêmes pour inhiber la biodégradation.

4.2.4 La salinité

La salinité moyenne des milieux océaniques est de l'ordre de 3,5 ‰ et l'intervalle de variation se situe en général entre les limites de 3,3 ‰ et 3,7‰. Ces concentrations en sels sont compatibles avec la croissance des micro-organismes hydrocarbonoclastes (**Bertrand et al., 1989**). La présence de très fortes salinités dans les marais salants seraient un frein à la dégradation en raison du manque d'oxygène régnant dans ces zones (**Ward et al., 1978**).

4.2.5 La pression hydrostatique

C'est un facteur important dans la dégradation des hydrocarbures. Dans le cas d'un accident pétrolier, l'attention est généralement portée sur le pétrole qui s'étale à la surface de l'eau mais une grande partie de ce pétrole coule au fond de la mer. Or la profondeur moyenne des mers et océans est de 3800m , ce qui correspond à une pression de 380 bars, un environnement qui ralentit fortement l'activité métabolique des micro-organismes, le manque d'oxygène, et la faible température qui règnent au fond des océans s'ajoutent à la forte pression et rendent la dégradation des hydrocarbures particulièrement lente par rapport à la surface (**Leahy et al., 1990**).

4.3 La composition chimique des hydrocarbures

La composition d'un pétrole détermine sa toxicité et son potentiel de dégradation. La vitesse de biodégradation est plus élevée pour les hydrocarbures saturés, viennent ensuite les hydrocarbures aromatiques légers, les hydrocarbures aromatiques à haut poids moléculaire, les composés polaires ayant la vitesse de dégradation la plus faible. Les hydrocarbures saturés incluent les n-alcane, les alcane ramifiés et les cycloalcane (naphènes). Les alcane normaux ou à chaînes linéaires sont les plus abondants et les plus dégradables : les n- alcane à nombre de carbone supérieur à 44 peuvent être métabolisés par les micro-organismes mais ceux ayant de 10 à 24 atomes de carbone (C10-C24) sont généralement plus facilement dégradables. Les alcane ramifiés sont plus récalcitrants à la biodégradation que les n-alcane et plus le nombre de ramifications augmente, moins ces composés sont susceptibles à la dégradation microbienne. Les hydrocarbures cycliques constituent une fraction importante des hydrocarbures dans la plupart des bruts pétroliers, ils sont plus difficilement dégradables que les deux séries précédentes à cause de leur toxicité suite à l'interaction avec la membrane cellulaire des micro-organismes (**Sikkema et al., 1995**). Les expériences montrent sans équivoque que la biodégradation des cycloalcane est très limitée (**Atlas, 1981**). Les polyaromatiques sont moins toxiques pour les micro-organismes, mais ils sont rarement métabolisés et quand ils le sont leur biodégradation est lente : ce qui explique leur accumulation dans l'environnement. Les asphaltènes et les résines constituent une faible partie du pétrole brut, 1 à 5 % du pétrole léger alors qu'un pétrole lourd peut contenir plus de 25 % d'asphaltènes et 20 % de résines. Cette dernière classe de composés pétroliers n'est pas biodégradable ou très lentement dégradable.

La biodégradabilité des pétroles bruts est très fortement dépendante de leur composition (Atlas, 1975) ; à une température déterminée, un pétrole léger est plus susceptible d'être biodégradé qu'un pétrole lourd, et plus le pétrole est raffiné plus il est dégradé rapidement (Sauret, 2011). Une fois déversé dans l'eau, le pétrole prend diverses formes qui conditionnent fortement le temps qu'il sera nécessaire pour l'éliminer. Selon sa consistance, il va former un film hydrophobe à l'interface eau-air, former des émulsions dans la colonne d'eau ou couler au fond des océans sous forme de goudron sous l'action de processus hydrodynamiques (Cooney, 1984). Sous l'action du vent et des vagues, le pétrole dans l'eau et l'eau dans le pétrole peuvent former des émulsions, ce qui augmente la surface du pétrole et par conséquent favorise l'attaque microbienne. Par contre les grandes masses ou les nappes de mousses pétrolières de viscosité très importante et qui ont un rapport surface/volume faible inhibent la croissance (Soltani, 2004).

4.4 La concentration du pétrole

Plus le pétrole est déversé rapidement et en quantités importante (accidents pétroliers par exemple) plus les dommages sur la faune marine macro et microscopique sont importants, et plus l'élimination totale des polluants est lente et longue (Sauret, 2011).

4.5 Les biosurfactants

Les biosurfactants sont des composés amphiphiles produits par les bactéries, les champignons et les levures. Ils appartiennent à différentes classes y compris les glycolipides, les lipopeptides, les acides gras, des phospholipides, des lipides neutres et des lipopolysaccharides (Rosenberg, 1986). La croissance des micro-organismes présents sur les hydrocarbures pose des problèmes particuliers, car les hydrocarbures ne sont pas miscibles dans l'eau, de nombreuses bactéries sont capables d'émulsionner les hydrocarbures en solution en produisant des agents tensio-actifs biologiques qui augmentent l'adhérence des cellules au substrat (Figure 8). Les biosurfactants réduisent la tension superficielle, ce qui augmente la surface des composés insolubles et ce qui conduit à l'augmentation de la biodisponibilité et la biodégradation subséquente des hydrocarbures (Batista et al., 2006).

4.6 Les éléments nutritifs

Lors de déversements, le pétrole fournit une grande quantité de carbone utilisable par les bactéries alors qu'il ne contient que très peu d'azote et de phosphore (sous forme de molécules particulièrement récalcitrantes à la dégradation la plupart du temps). Il se crée alors

un déséquilibre entre les sources de carbone, azote et phosphore, les rapports stœchiométriques classiques entre les différents éléments sont bouleversés (C : N : P =106 :16 :1). Le développement des bactéries hydrocarbonoclastes est alors drastiquement limité par les ressources en nutriments inorganiques (Atlas et al.,1972) la biodisponibilité des nutriments limitant pour la croissance et la biomasse, en particulier l'azote et le phosphore, est un facteur clé dans le processus de bioremédiation naturelle des hydrocarbures (Figure 8). Il semblerait que la disponibilité des nutriments puisse avoir un rôle important dans la structuration des communautés dégradant le pétrole. De plus, en milieu limité les bactéries hydrocarbonoclastes seraient en compétition pour les nutriments avec les bactéries non dégradantes et le phytoplancton (Sauret, 2011).

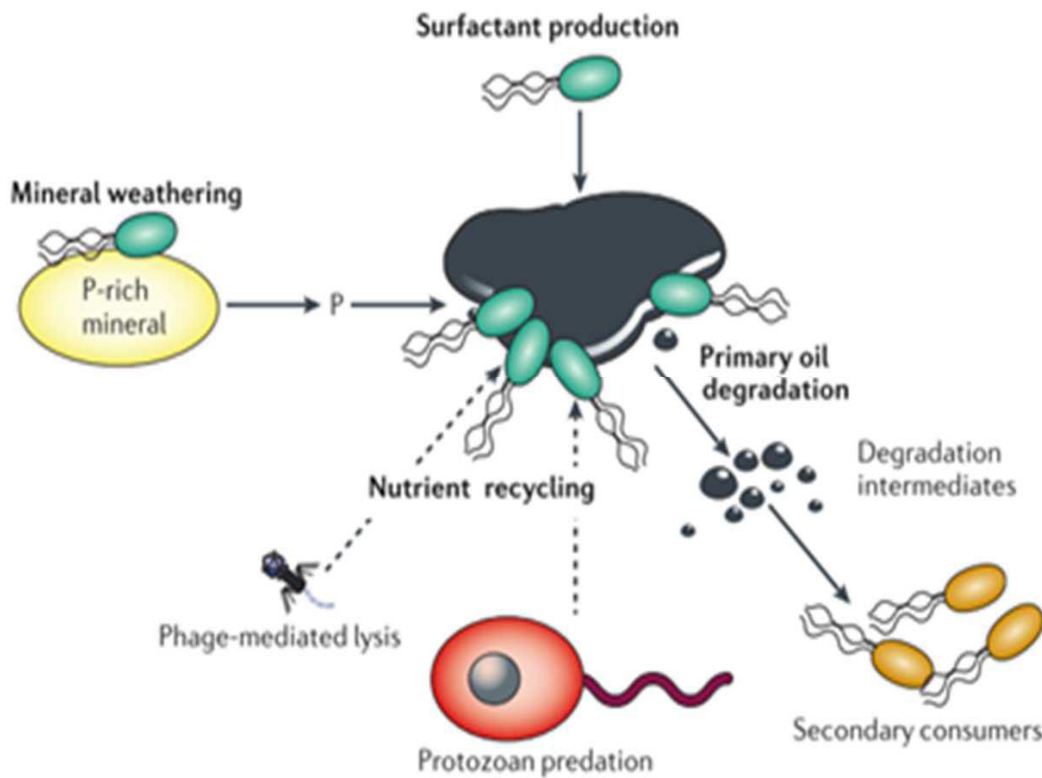


Figure 8. Communauté microbienne impliquée dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers (Head et al., 2006)

Tableau II. Les facteurs affectant la biodégradation des hydrocarbures pétroliers (Oliveira et al., 2015)

Facteurs	Rôle dans la décomposition des hydrocarbures pétroliers
Biodisponibilité	La composition et la concentration en hydrocarbures affectent le taux et l'efficacité de la biodégradation microbienne
Température	Affecte le comportement physicochimique des hydrocarbures (la viscosité, la diffusion, la solubilité). Affecte la physiologie et la diversité des microorganismes indigènes
pH	Inhibe l'activité microbienne en régulant le métabolisme microbien
Nutriments	Affecte la croissance microbienne et par conséquent les taux de biodégradation.
Oxygène	Bien que la biodégradation des hydrocarbures puisse s'effectuer en conditions anaérobies et aérobies, la biodégradation aérobie présente un rendement beaucoup plus élevé. Une réduction de la concentration en oxygène entraîne donc une réduction de l'efficacité de la biodégradation
Salinité	Les variations de salinité modifient la structure et la diversité des communautés microbiennes indigènes en sélectionnant pour des espèces halophiles ou halotolérantes. Ceci peut avoir un effet indirect sur la biodégradation des hydrocarbures dans les milieux de transition comme les milieux estuariens en ajoutant un facteur de sélection supplémentaire sur les communautés indigènes
Matière Organique	La présence de matière organique entraîne une séquestration des hydrocarbures, diminuant ainsi leur disponibilité pour la biodégradation microbienne.
Diversité de la communauté microbienne indigène	La présence de bactéries hydrocarbonoclastes au sein de la communauté bactérienne indigène favorisera une réponse rapide et efficace lors de l'introduction d'hydrocarbures pétroliers dans le milieu. Une communauté "adaptée" présentera donc une efficacité de dégradation des hydrocarbures supérieure à celle d'une communauté "non-adaptée"

Partie 2

Matériel

et Méthodes

1 Sites d'étude et échantillonnage

Les échantillons d'eau de mer ont été prélevés des deux ports situés au niveau du littoral Est - algérien dans les villes côtières d'Annaba et d'El-Kala (**Figure 9**).

Le port d'Annaba fait partie des dix principaux ports de commerce d'Algérie, il est limité à l'ouest par le mont de l'Edough, au nord par Cap de Garde, au sud par les dunes qui se prolongent vers l'Est jusqu'au Cap Rosa.

Le port d'El-Kala est un petit port caractérisé par une très forte activité de pêche, situé à 80 km à l'Est d'Annaba et proche de la frontière algéro-tunisienne.

Les échantillons d'eau de mer ont été prélevés au niveau des ports dans des stations polluées par des huiles de moteurs et d'hydrocarbures. Nous avons choisis deux sites à fortes activités maritimes avec quatre stations de prélèvements pour le port de Annaba : **station 1**: $36^{\circ}54'15.21''\text{N } 7^{\circ}46'28.72''\text{E}$, **station 2**: $36^{\circ}53'47.71''\text{N } 7^{\circ}45'40.39''\text{E}$, **station 3**: $36^{\circ}53'45.52''\text{N } 7^{\circ}46'70.26''\text{E}$ et **station 4** : $36^{\circ}54'10.09''\text{N } 7^{\circ}46'39.68''\text{E}$ et deux stations pour le port d'El-Kala : **station 1** : $36^{\circ}54'05.91''\text{N } 8^{\circ}25'15.07''\text{E}$, **station 2** : $36^{\circ}53'56.62''\text{N } 8^{\circ}25'25.84''\text{E}$.

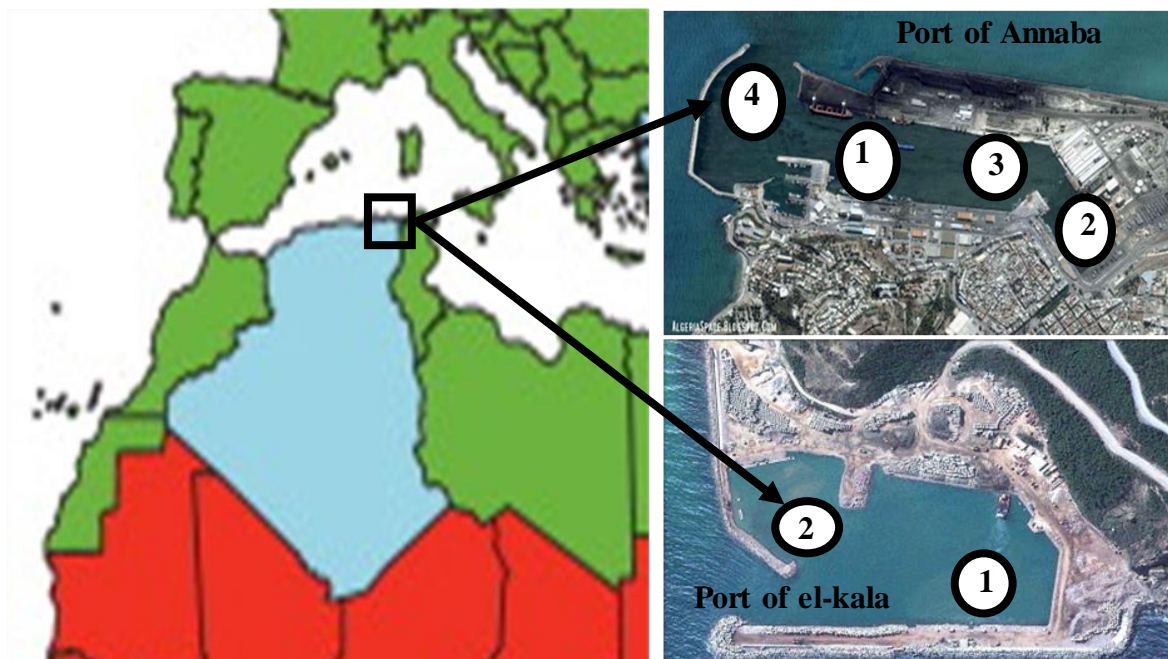


Figure 9. Sites d'étude et localisation des stations d'échantillonnage (Source: Google Earth images modified, 2015)

1.1 Analyse des échantillons de l'eau de mer

1.1.1 Analyses physico-chimiques

Les sources de pollution en milieu portuaire sont multiples. Les plans d'eau portuaires, situés parfois en aval de bassins versants, constituent le réceptacle naturel de nombreuses pollutions d'origine extérieure. Les polluants le plus souvent déversés en zone portuaire appartiennent aux familles de produits suivants :

- Substances chimiques ou pétrochimiques
- gas-oil et produits assimilés : Marine Diesel Oil (MDO), mazout...
- fiouls lourds ; pétrole brut lourd, léger ; huiles de lubrification (le plus souvent usagées).
- essences et produits assimilés : essence auto, supercarburant, super sans plomb, super 95, super 98, essence avion (**Kremer, 2007**).

Les échantillons d'eau de mer des deux sites (port d'Annaba et port d'El-Kala) ainsi que l'eau du Cap de garde (utilisée ici dans cette étude pour effectuer les tests de croissance) sont prélevés dans des flacons de capacité d'un litre et acheminés au laboratoire d'analyses physico-chimiques des sols et des eaux pour déterminer le taux d'hydrocarbures totaux, les concentrations en azote total et celui du phosphore total. Les dosages sont réalisés dans les 24 heures qui suivent le prélèvement.

Le cap de Garde est localisée dans la partie Nord Est du massif de l'Edough et plus précisément au Nord Est de la ville de Annaba, se prolonge dans la mer méditerranée avec une longueur de 1785 m et une largeur de 785 m. La zone est limitée au Nord-Ouest et Sud-Est par la mer méditerranéenne et au Sud- Ouest par le prolongement du massif de l'Edough.

1.1.2 Le dosage des hydrocarbures totaux

1.1.2.1 Principe

Les hydrocarbures totaux sont des composés organiques provenant de la distillation du pétrole. Il est important de connaître leur concentration pour déterminer le degré de pollution de l'eau de mer.

Le dosage des hydrocarbures totaux à été réalisé par une méthode alternative (**Tableau 3**) faisant l'objet d'un brevet Mn qui n'utilise pas les hydrocarbures halogénés.

Le but du dosage dans cette étude est pour déterminer :

- le degré de pollution en hydrocarbures totaux dans les échantillons d'eau de mer prélevés des deux ports d'Annaba et d'El-Kala.

1.1.2.2 Technique

Les hydrocarbures sont détectés en 5 étapes :

- Extraction des hydrocarbures dans l'échantillon d'eau avec du pentane dans une ampoule à décanter.
- Elimination des substances polaires par filtration de l'échantillon avec un filtre millipores de 45 µM de diamètre.
- Evaporation du solvant d'extraction (le pentane) dans un bloc chauffant à une température de 70°C pendant 30 minutes.
- Décomposition oxydative de l'échantillon dans un bloc chauffant durant 2 heures à une température de 148°C.
- Dosage des hydrocarbures totaux à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible à une longueur d'onde de 436 nm. Le taux d'hydrocarbures totaux est exprimé en mg par litre.

1.1.3 Le dosage de l'azote total (NT)

1.1.3.1 Principe

Le dosage de l'azote total (NT) consiste en l'estimation de la somme des différentes formes de l'azote : l'azote de Kjeldahl (ammonium, ammoniac et azote organique), les nitrites et les nitrates dans l'eau (**Junqua et al., 2009**).

La somme des différents composés azotés comme l'ammonium, nitrite, nitrate et les composés organiques d'azote est appelée azote total. L'azote total est un indicateur de pollution organique. Le dosage de l'azote total a été réalisé par une réaction chimique conforme aux normes (**Tableau 3**).

Technique

- Minéralisation oxydative de tous les composés azotés organiques et inorganiques en bloc chauffant pendant une heure à 100°C (dans un milieu acide toutes les substances azotées organiques et minérales sont oxydées et donnent des nitrates).
- Laisser réagir les nitrates en milieu acide avec du 2,6-diméthylphénol pour former du 4-nitro-2,6-diméthylphénol.
- Détermination par spectrophotomètre du taux de l'azote total à une longueur d'onde de 365 nm. Le taux de l'azote total est exprimé en mg par litre.

1.1.4 Le dosage du Phosphore total (PT)

1.1.4.1 Principe

Le phosphore total (PT) est la somme des orthophosphates, des polyphosphates et des phosphates organiques (**Junqua et al., 2009**).

Le phosphore présent dans l'eau de mer à l'état soluble ou particulaire existe sous plusieurs formes : phosphore inorganique, composé essentiellement d'orthophosphates et de polyphosphates et phosphore organique présent dans les nucléoprotéines, les phosphoprotéines, les combinaisons sucres phosphates et leurs produits d'oxydation (**Rodier, 2005**).

Les composés phosphorés sont de bons indicateurs de la pollution aussi bien diffuse que ponctuelle, la teneur en orthophosphates, phosphonates et composés organiques du phosphore doivent être déterminés, la somme de ces composés est appelée phosphore total. Cette technique est conforme aux normes (**Tableau 3**).

1.1.4.2 Technique

- Faire réagir les ions orthophosphates avec le molybdate d'ammonium pour donner de l'acide phosphomolybdique.
- Réduire l'acide phosphomolybdique en bleu molybdène.
- Minéralisation oxydative à 100-120°C pour libérer les polyphosphates et le phosphate organique.
- Détermination du taux de phosphore total par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 690 nm. Le taux du phosphore total (PT) est exprimé en mg par litre.

Tableau III. Méthodes de mesure des hydrocarbures totaux, azote total et phosphore total

Paramètres	Méthodes	Norme
Hydrocarbures totaux (mg/l)	Détermination de la DCO après extraction avec le pentane	Spectrophotométrie Article N 931 241
Azote total (mg/l)	Digestion peroxydisulfate et 2,6-diméthylphénol	Digestion : DIN EN ISO 11905-1H36. Détermination : ISO 7890-1. DIN 38405 D9
Phosphore total (mg/l)	Bleu de Molybdenum	EPA 365,2+3 ; APHA 4500-PE ; DIN EN ISO 6878-D11

1.2 Analyses bactériologiques

1.2.1 Isolement bactériologique

L'isolement permet d'obtenir les cultures pures indispensables à toute étude et identification bactériologique (**Marchal et al., 1988**). Le but de l'isolement bactériologique

est d'obtenir des souches pures des bactéries autochtones du littoral Est-algérien, de les identifier et de réaliser des essais de croissance des souches isolées *in vitro* en présence de différentes classes d'hydrocarbures car selon (Atlas, 1981; Leahy et al., 1990; Watanabe, 2001 & Van Hamme et al., 2003) de nombreuses souches bactériennes capables de dégrader les différents hydrocarbures ont été isolés à partir des écosystèmes côtiers et océaniques .

Les échantillons d'eau de mer des deux sites (au nombre de 4 échantillons pour le port de Annaba et 2 échantillons pour le port d'El- Kala) ont été prélevés dans des flacons en verres de capacités de 250 ml préalablement stérilisés, acheminés au laboratoire de microbiologie du département de biochimie de l'université de Badji- Mokhtar de Annaba et conservés à +4°C avant analyse. L'échantillonnage pour analyse bactériologique à été réalisé dans 2 périodes de l'année, une première période comprise entre Mars et Juillet, la seconde entre Septembre et Novembre. L'isolement à été réalisé dans les 24 heures qui ont suivi le prélèvement des échantillons.

1.2.1.1 Technique

- Prélever stérilement à l'aide d'une pipette graduée stérile 1 ml de chaque échantillon et ensemercer à la surface des 3 types de milieux de culture bactériologiques (géloses : Nutritive, Chapman et Mac-Conkey) (Marchal et al., 1982).
- Incuber dans l'étuve bactériologique réglée à la température de 30 °C (Feitkenhauer et al., 2003) pendant 24-72 heures.

1.2.2 Sélection bactérienne

Le but de cet essai est de sélectionner des bactéries qui sont capable d'utiliser le pétrole brut comme seule source de carbone et d'énergie pour réaliser leur croissance parmi les souches bactériennes autochtones isolées.

1.2.2.1 Technique

- On prépare à partir de chaque culture pure de bactérie isolée une suspension bactérienne dans un tube à vis contenant de l'eau physiologique stérile ensemercé par une colonie prélevée stérilement avec l'anse de platine.
- On prélève stérilement à l'aide d'une anse de platine une goutte de la suspension bactérienne.
- On réalise un ensemencement sur la surface de la gélose eau de mer synthétique :
 - seule (sans aucune source de carbone).
 - en présence du pétrole brut.
 - et en présence du glucose comme seule source de carbone et d'énergie.

- On incube les boîtes ensemencées à 30°C dans l'étuve bactériologique pendant une période allant de 24 h à 15 jours.

1.2.2.2 Lecture

- La présence d'une culture dans la boîte contenant le pétrole brut comme unique source de carbone indique que la souche bactérienne isolée utilise le pétrole brut pour effectuer sa croissance.
- La présence d'une culture dans la boîte contenant le glucose comme unique source de carbone indique que la souche bactérienne isolée utilise le glucose pour effectuer sa croissance.
- La présence d'une culture dans la boîte ne contenant aucune source de carbone indique que la souche bactérienne isolée n'utilise ni le glucose ni le pétrole brut pour effectuer sa croissance.

La sélection des bactéries est basée sur l'aspect des cultures obtenues après croissance des bactéries sur gélose eau de mer synthétique - pétrole brut. Ces dernières ont fait l'objet d'un test de croissance sur gélose composée d'eau de mer synthétique et pétrole brut léger avec une bio-stimulation par un rapport de N/P= 1.

Gélose eau de mer-synthétique (Soltani, 2004)

Tris (Hydroxyméthyl- aminméthane).....	2 g.l ⁻¹
Na Cl.....	23 g.l ⁻¹
KCL.....	0,75 g .l ⁻¹
NH ₄ Cl.....	1 g.l ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	6, 16 g.l ⁻¹
Mg.Cl ₂ .6H ₂ O.....	5, 08 g.l ⁻¹
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	1, 98 g.l ⁻¹
H ₂ O distillée.....	11
Agar.....	15 g.l ⁻¹
(+) Pétrole brut	1 ml

Le pétrole brut à été fourni par la raffinerie de Skikda.

1.2.3 Identification bactériologique

L'identification des souches bactériennes isolées obtenues s'est basée sur :

1.2.3.1 Étude des caractères morphologiques :

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

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

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

b) La coloration de Gram :

La coloration de Gram est une coloration différentielle qui permet de (**Singleton, 1999**):

- Classer les bactéries en 2 catégories les bactéries Gram+ et les bactéries Gram- .
- Détecter la morphologie bactérienne.
- Observer le mode de regroupement.

1.2.3.1.1 Technique

Les étapes de coloration de Gram (**Marchal et al., 1988**):

- Confection d'un frottis bactérien.
- Coloration par le violet de gentiane : couvrir totalement le frottis fixé de colorant primaire le violet de gentiane filtré et le laisser agir pendant une minute.
- Le mordantage : éliminer l'excès de violet en l'entraînant avec la solution de lugol (le mordant), le temps de mordantage doit être égale ou légèrement supérieur au temps de violet.
- Décoloration par l'alcool-acétone : décolorer la lame avec le mélange alcool-acétone jusqu'à ce que l'alcool - acétone n'entraîne plus le colorant.
- Lavage à l'eau de robinet
- La contre- coloration : recolorer le frottis avec la fuchsine diluée au 1/10^e pendant 10 à 20 secondes.
- Rincer la lame colorée à l'eau, et sécher.
- Observer à l'objectif à immersion (grossissement × 1000)
- Les bactéries Gram positif (+): apparaissent en violet foncé, ils gardent leur coloration primaire après la décoloration par l'alcool.
- Les bactéries Gram négatif (-): apparaissent en rose rouge, décolorées par l'alcool, sont teintées par le contre- colorant: la fuchsine diluée.

1.2.3.2 Étude des caractères physiologiques

1.2.3.2.1 Le test de la mobilité

La mobilité est le caractère le plus important, mis en évidence par l'examen à l'état frais, ce dernier permet de constater (Marchal et al., 1988) :

- La présence ou l'absence de motilité.

1.2.3.2.2 Technique

- On prélève avec une pipette Pasteur stérile ou une anse de platine une goutte de culture fraîche en milieu liquide.
- On dépose la goutte au milieu d'une lame propre et dégraissée.
- On pose délicatement la lamelle, la goutte doit être suffisante mais proportionnée à la lamelle choisie, le liquide ne doit pas déborder.

On répartit le liquide sous la lamelle en appuyant très légèrement avec l'extrémité d'une pince ou avec l'ongle, jamais avec la pulpe du doigt (les traces grasses rendraient impossible tout examen microscopique).

- On observe au microscope optique à l'objectif $\times 40$, ou $\times 60$ (condenseur baissé et diaphragme légèrement fermé).

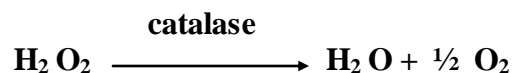
1.2.3.2.3 Lecture

- Les bactéries sont considérées mobiles, lorsque des trajectoires très différents sont observés par des déplacements dans toutes les directions
- Une bactérie immobile est animée de mouvements browniens qu'il ne faut pas confondre avec la mobilité.

1.2.3.3 Le test de la catalase

1.2.3.3.1 Principe

La catalase est une enzyme contenant du fer, qui catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau et en oxygène. Synthétisée par la plupart des bactéries aérobies, elle élimine le peroxyde d'hydrogène produit au cours du métabolisme aérobie. Le test de la catalase sert à détecter la production de cette enzyme par une souche bactérienne donnée (Singleton, 1999).



1.2.3.3.2 Technique

- On dépose à l'aide d'une pipette Pasteur stérile une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes au centre d'une lame propre et dégraissée.

- On prélève avec une pipette Pasteur stérile un fragment d'une colonie bactérienne.
- On transfère la colonie bactérienne et on la répartie dans la goutte d'eau oxygénée.

1.2.3.3.3 Lecture

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

1.2.3.4 *Le test de l'oxydase*

1.2.3.4.1 Principe

Le test de l'oxydase détecte un type particulier de chaîne respiratoire, qui comporte en fin de chaîne un cytochrome c et l'oxydase associée. Les bactéries qui possèdent une telle chaîne peuvent oxyder des composés chimiques comme le réactif d'oxydase de Kovacs (dihydrochlorure de tétrarméthyl paraphénylène diamine 1 %). Les électrons sont transférés de ce réactif au cytochrome c et de là, via l'oxydase, à l'oxygène. Ainsi oxydé, le réactif développe une couleur violette intense (**Singleton, 1999**).

1.2.3.4.2 Technique

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

1.2.3.4.3 Lecture

Les espèces oxydase-positives donnent une coloration violette immédiatement ou dans les 10 secondes (**Singleton, 1999**).

1.2.3.5 *Etude des caractères biochimiques*

1.2.3.5.1 Principe

Le système API est une galerie biochimique miniaturisée. Ce système comprend des micro-tubes qui contiennent chacun un milieu déshydraté différent montés en série avec une surface en aérobiose : cupule et une partie en anaérobiose : tube (**Brossard et al., 1989**). Les profils biochimiques ou numériques sont interprétés à l'aide de tableaux, de catalogues analytiques ou de logiciels (**Guiraud et al., 1998**).

Dans notre étude nous avons utilisés pour l'étude des caractères biochimiques des souches isolées des galeries API 20 E (**Figure 10**) et API 20NE (**Figure 11**).

1.2.3.5.2 Technique

- On prépare une suspension bactérienne en ensemencant dans un tube stérile contenant de l'eau distillée avec une colonie bactérienne issue d'une culture pure prélevée stérilement avec une pipette Pasteur.
- On ensemence avec une pipette Pasteur stérile tout les micro-tubes de la galerie API (cet ensemencement réalise à la fois la réhydratation du milieu et son inoculation).
- On ajoute de l'huile de paraffine (pour éviter tout contact avec l'air) dans les micro-tubes où c'est nécessaire (**Singleton, 1999**).
- On met la plaque à incuber à 35- 37 °C (API 20 E), 30°C (API 20 NE) pendant 18-24 heures.
- On ajoute après incubation des réactifs là où ils sont requis pour détecter les produits métaboliques particuliers.

L'interprétation des résultats est possible grâce à l'utilisation d'un codage, les résultats biochimiques traduits en chiffre permettent d'établir le profil numérique ou code de la souche identifiée, la lecture de ce code dans le catalogue analytique API 20 E et API 20 NE ou sa transposition sur un ordinateur (logiciel API LAB) permet de connaître l'identification la plus probable (**Brossard et al., 1989**).

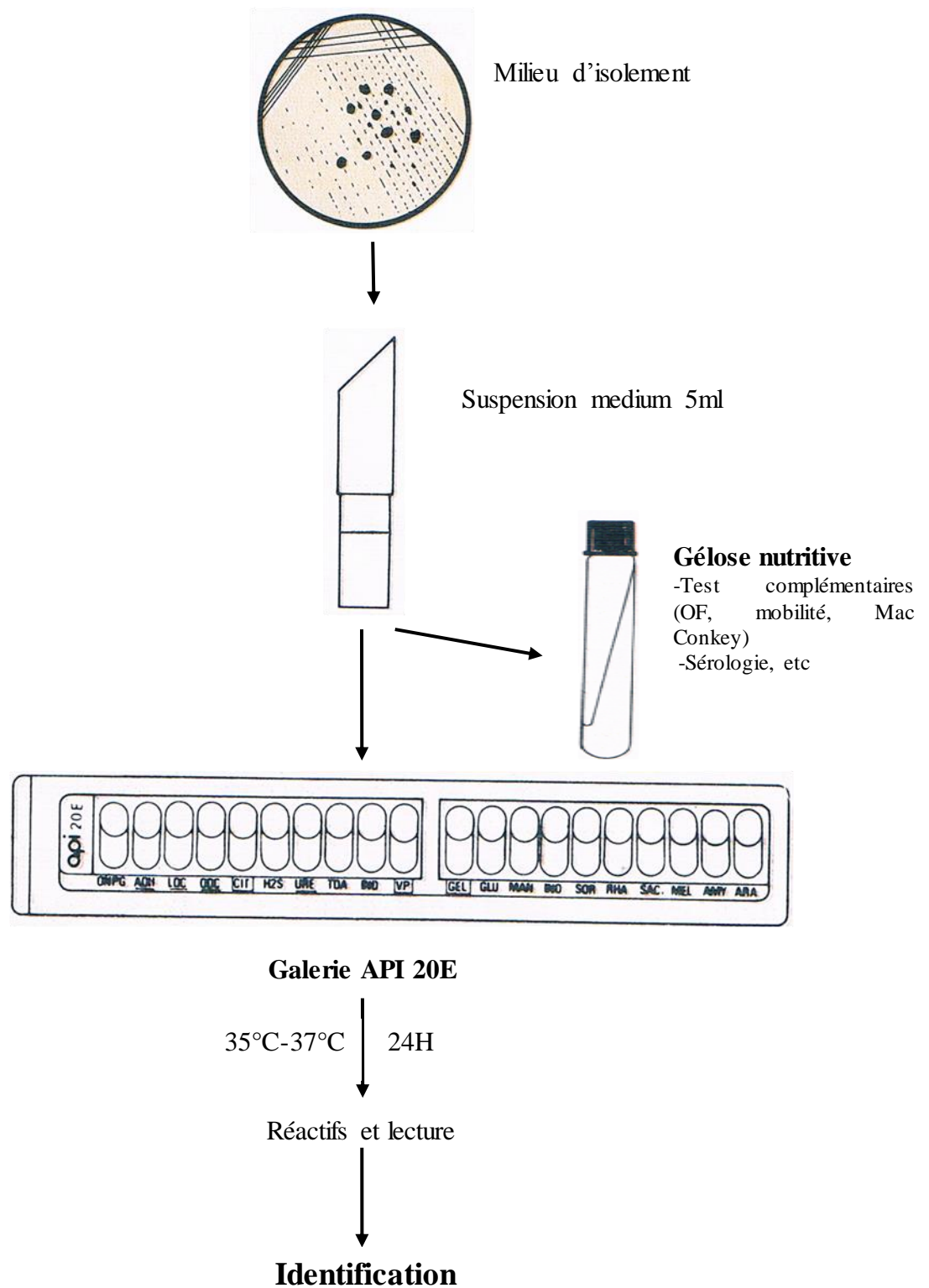


Figure 10. Technique d'identification par une galerie API 20E

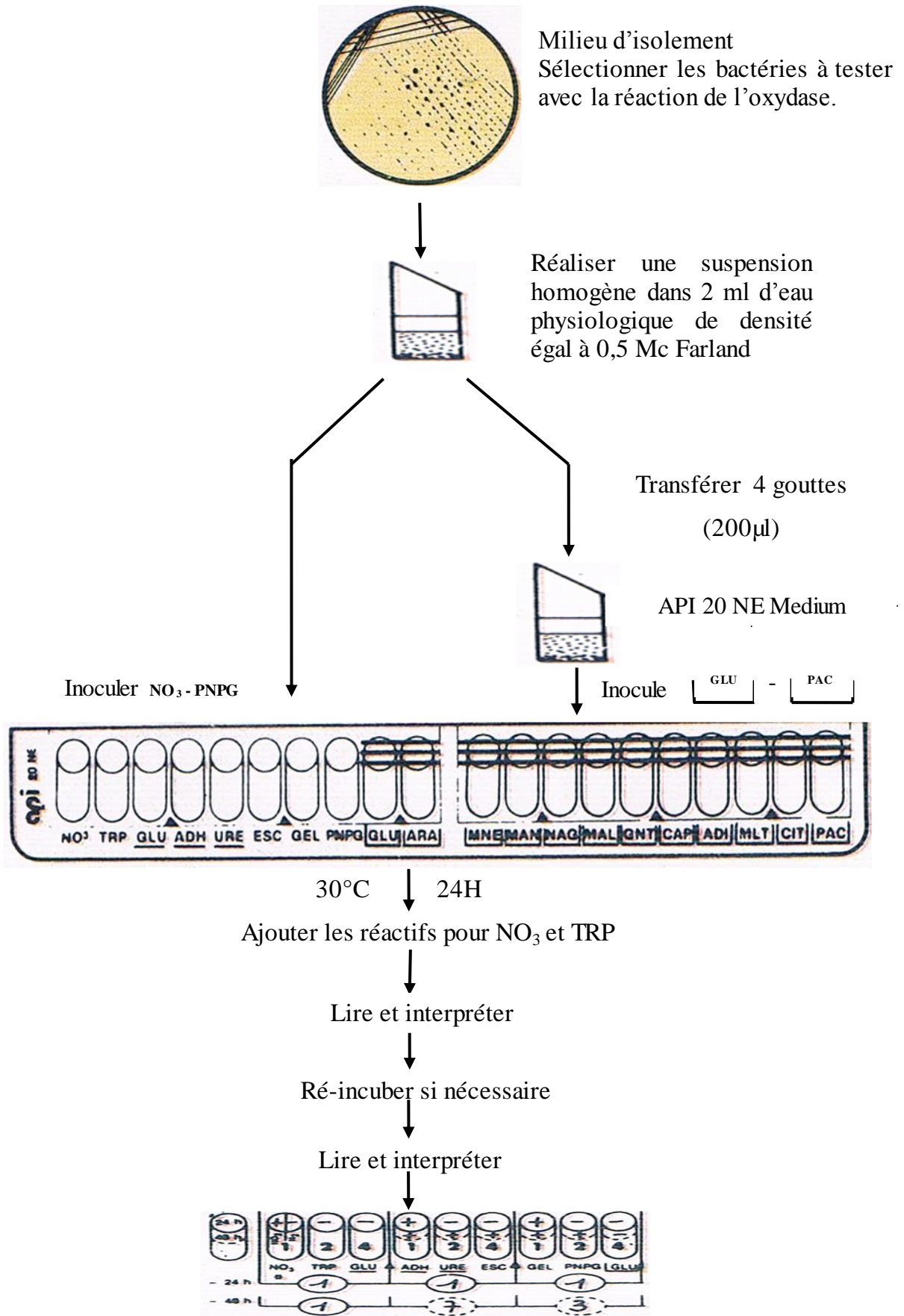


Figure 11. Technique d'identification par une galerie API 20NE

1.3 Analyses moléculaires

L'identification bactérienne se fait traditionnellement à partir des caractères phénotypiques de la bactérie: coloration (Gram), morphologie, aptitude à croître sur certains milieux de culture, caractères biochimiques détectés par diverses techniques commerciales (galeries API, ...). Toutefois certaines bactéries sont mal identifiées phénotypiquement car elles sont difficilement cultivables voir non cultivables du tout. En effet, certaines bactéries expriment peu de caractères phénotypiques. Pour d'autres espèces, une situation de stress peut altérer les caractères phénotypiques. Une identification basée exclusivement sur des caractères phénotypiques peut donc mener à un résultat erroné. Par ailleurs, les bactéries rares ne sont pas répertoriées dans les bases de données des systèmes commercialisés et en conséquence, les études basées sur les caractères phénotypiques ne permettront pas de les identifier. Enfin, pour certaines bactéries à croissance difficile les caractères phénotypiques sont difficiles à déceler ; la biologie moléculaire simplifie dans ce cas l'identification (**Petti et al., 2005**). Dans ces situations, l'amplification et le séquençage du gène ARNr16S suivi de la comparaison de la séquence obtenue à des bases de données ont démontré leur efficacité pour l'identification bactérienne. Il s'agit d'une méthode universelle, précise et objective, dont la variabilité inter opérateur est limitée par rapport aux techniques conventionnelles (**Petti, 2007**). Pour différencier certains genres ou pour décrire une nouvelle espèce, l'amplification « 16S long » reste nécessaire (**Clarridge, 2004**).

L'identification moléculaire des souches bactériennes autochtones isolée à été réalisée au laboratoire Micro-organismes Génome et Environnement «L.M.G.E.» de l'université Blaise Pascal Clermont Ferrand II, France. L'amplification par Polymérase Chain Réaction (PCR) et le séquençage du gène 16S ADNr avec des amorces 27f 1401r comme décrit dans (**Batissou et al., 2009**).

1.3.1 Extraction et purification de l'ADN génomique bactérien

1.3.1.1 Principe

Avant toute chose, l'acide désoxyribonucléique (ADN) bactérien doit être extrait de la matrice de départ. Les méthodes d'extraction les plus utilisées font appel à trois étapes : une lyse par un détergent, une incubation avec une protéase et la précipitation des acides nucléiques (**Meade et al., 1982**).

Les ADN génomiques ont été extraits et purifiés à partir des cultures pures des différentes souches bactériennes isolées autochtones du littoral Est-Algérien à l'aide du kit commercial Ultraclean Microbial DNA Isolation (MoBio Laboratories).

Selon les recommandations du fournisseur. Ce kit combine deux types de lyse cellulaire, une lyse mécanique par broyage et une lyse chimique. L'ADN génomique d'un large spectre de bactéries a pu ainsi être extrait.

1.3.1.2 Technique

- Récupération dans des pilotes d'environ 50ml d'échantillon
 - Soit centrifuger 30min à 4°C 20000 rpm puis récupérer le culot dans 545 µl de Tris EDTA (TE) à pH 8 et conserver à -20°C.
 - Soit conserver directement les 50ml à -20°C, laisser décongeler puis centrifuger 30min à 4°C 20000 rpm et reprendre le culot dans 545 µl de Tris EDTA (TE) à pH 8.
- Ajouter 25µl de lysozyme (50mg/ml) et incubé 30min à 37°C (mélanger avec la pipette).
- Ajouter 30µL SDS 10% et 3µL de protéinase K (20mg/ml), incubé 1h à 37°C
- Faire préchauffer Na Cl 5M et Cétyltriméthylammonium Bromure (CTAB) à 65°C (dans l'ordre).
- Ajouter 100µL de Na Cl préchauffé et 80 µL de CTAB préchauffé (dans l'ordre). Ne pas mélanger à la pipette. Formation d'un précipité blanc. Incuber à 65°C pendant 10 min.
- Ajouter 1volume de chloroforme /alcool isoamylique (24 :1).
- Centrifuger 30min à 14000 rpm à 4°C.
- Récupération de la phase supérieure.
- Ajouter 0.6 volume d'isopropanol froid (-20°C).
- Incuber au minimum 45 min à -20°C.
- Centrifuger 20min à 14000 rpm à 4°C.
- Laver le culot avec 500µL d'éthanol 70% froid (-20°C).
- Sécher sous vide.
- Ajouter 50µL tampon TE à pH 8 et mettre à 4 °C pendant 24 h pour faire dissoudre l'ADN génomique.
- Ajouter 50µL RNase (1ng/ml) incubé 30 min à 37°C.

- Ajouter 445 µL TE pH 8 et 50µL d'acétate de sodium 3M pH 5.2 puis 0.6 (350µL) d'isopropanol froid (-20°C) puis mélanger et incuber à -20°C au moins une heure ;
- Centrifuger 20min à 14000 rpm à 4°C.
- Laver le culot avec 0.5 ml d'éthanol 70%.
- Sécher sous vide et reprendre le culot dans 50µL tampon TE pH 8 puis incuber pendant 24 h à 4°C.
- Une fois extraits, les ADN génomiques sont conservés à - 20°C dans 50 µl d'eau milli-Q (eau ultra pure).

1.3.2 Amplification des gènes d'ADNr 16 S par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

1.3.2.1 Principe

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

Les gènes d'ARNr 16S sont amplifiés à partir de l'ADN génomique extrait des bactéries isolées avec des amorces répertoriées dans le **tableau 4**.

Tableau IV. Les primeurs ARN 16S couples d'amorces utilisées lors des PCR

Oligo	Long	Echelle	Purification	Documentation	Modifications	Taille attendue
27F	20	0.01	HPSF	Standard		
5' -AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'						1500 pb
1492R	19	0.01	HPSF	Standard		
5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'						1500 pb

1.3.2.2 Technique

La réaction de PCR est préparée dans un volume réactionnel final de 50 µl contenant l'ADN matriciel, 0,2 µM de chacune des deux amorces utilisées, 0,2 mM de desoxyribonucleoside triphosphate (dNTPs), 1,5 mM de MgCl₂, 0,5 à 1 U de Taq polymérase (Eurobio) en fonction du gène à amplifier avec son tampon réactionnel 1X final.

Les micro-tubes sont ensuite placés dans un thermocycleur automatisé qui répète 35 cycles les trois étapes suivantes (amplification) :

- 35 cycles
1. la dénaturation de l'ADN (20s à 95°C) ;
 2. l'hybridation des amorces (55s) à la température d'hybridation ;
 3. et la synthèse du brin complémentaire grâce à une ADN polymérase thermostable (105s à 72°C).
 4. Une élongation finale (105s à 72°C)

L'ensemble des cycles de PCR est précédé par une étape primaire de dénaturation de l'ADN (10 min à 95°C).

1.3.3 Séquençage

Les séquences ont dans un premier temps été comparées avec celles présentes dans la banque de données GenBank database du National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) grâce à l'outil d'alignement Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Cette étape permet l'identification de la séquence par homologie avec des séquences connues. Les séquences codant pour l'ARN ribosomique 16S ont en parallèle été vérifiées avec le programme CHECK_CHIMERA du Ribosomal Database Project II (RDP)(<http://35.8.164.52/cgi/chimera.cgi?su=SSU>) pour déterminer d'éventuelles séquences hybrides générées par PCR. Les séquences ont ensuite été alignées à l'aide du logiciel Clustal W, puis ajustées à la taille de la séquence nucléotidique la plus courte (<http://helios.bto.ed.ac.uk/evolgen/filato v/proseq.html>).

1.4 Analyses phylogénétiques des séquences

La PCR universelle ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S à l'aide d'amorces universelles, a d'abord été développée pour des études phylogénétiques. En effet ce gène est universellement retrouvé chez les bactéries et sa fonction est conservée (**Renvoisé, 2012**). Les séquences du gène 16S ont ainsi joué un rôle majeur dans l'étude de la phylogénie et de la taxonomie bactérienne (**Olsen et al., 1993; Janda et al., 2007**).

Après identification moléculaire des souches, Les analyses phylogénétiques ont été élaborées à partir des séquences de base des souches bactériennes identifiées dans Molecular Evolutionary Genetics Analysis «MEGA 5» (**Tamura ; Dudley ; Nei & Kumar, 2007**). la relation évolutive entre les différentes souches a été déduite en utilisant la méthode Neighbors-Joining (**Saitou et al., 1987**).

Une analyse par le logiciel MEGA5.05 (www.megasoftware.net) a permis de générer une matrice de distance élaborée par comparaison des séquences d'ADN selon la méthode de neighbor joining. Cette matrice est ensuite représentée sous forme d'un arbre phylogénétique.

Des analyses de bootstrap avec 1000 itérations ont été effectuées pour vérifier la robustesse des arbres.

1.5 Conservation des souches bactériennes

Plusieurs méthodes sont utilisables en fonction de la souche et du but recherché. La technique courante de conservation des souches est celle des repiquages successifs, mais elle est limitée dans le temps. Selon (Guiraud, 1998) cette méthode utilise des tubes de milieu solides inclinés ou en culot. Une foisensemencés, les tubes sont placés à l'étuve pour que la croissance débute puis, avant qu'elle ne soit trop abondante, les tubes sont placés dans une armoire réfrigérée à 4°C ou parfois laissés à température ambiante. La vitalité de la souche se maintient pendant des durées variables, selon la température et l'espèce microbienne. Au bout de ce délai, un nouveau repiquage est réalisé.

Afin de conserver les souches bactériennes autochtones isolées et identifiées des repiquages systématiques et successifs (chaque 30 jours) pour chaque souche ont été réalisés sur gélose nutritive inclinée en tubes et conservés à + 4 °C.

2 Étude du potentiel de biodégradation des hydrocarbures

2.1 Essais de croissance des bactéries sélectionnées en présence des hydrocarbures saturés (alcanes)

Les alcanes sont des hydrocarbures composants majeurs de pétrole brut (**Van Beilen et al., 2003**). Le but de cette technique est d'apprécier si la bactérie sélectionnée assimile les alcanes testés comme seule source de carbone et d'énergie à travers des cinétiques de croissance réalisées par des mesure quotidiennes de la densité optique (DO) par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm .

Chaque souche sélectionnée à fait l'objet d'une étude de cinétique de croissance en présence de 4 alcanes (hexane C₆H₁₄, heptane C₇H₁₆, décane C₁₀H₂₂ et cyclo- hexane C₆H₁₂).

2.1.1 Technique

- On met dans un Erlen- Meyer stérile, 99 ml d'eau de mer stérile à pH = 8,18, enrichie par azote et phosphore avec un rapport de N/P =1 ; d'après (**Tarayre, 2012**) les hydrocarbures doivent être en solution, disponibles pour les microorganismes .
- On ajoute 1 ml d'alcane (hexane C₆H₁₄, heptanes C₇H₁₆, décane C₁₀H₂₂, cyclo- hexane C₆H₁₂) comme seule source de carbone et d'énergie.

- On ensemence par 1 ml de suspension bactérienne préparée à partir d'une culture pure (18h-24h) de la bactérie sélectionnée.
- On incube à 30°C dans un agitateur réglé à une vitesse de 150 rpm.
- On réalise en parallèle des essais témoins (sans bio-stimulations) (**Figure 12**).

2.1.2 Lecture

Des mesures quotidiennes de densité optique ont été réalisées par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm (**Perry et al., 2004**).

2.2 Essai de croissance des bactéries sélectionnées en présence des hydrocarbures raffinés (carburants)

Le but de cette technique est d'apprécier si la bactérie sélectionnée assimile les hydrocarbures raffinés comme seule source de carbone et d'énergie à travers des cinétiques de croissance par des mesures quotidiennes de la turbidité par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm .

Chaque souche sélectionnée a fait l'objet d'une étude de cinétique de croissance en présence de 2 types de carburants (essence normal, essence sans plomb).

2.2.1 Technique

- On met dans un Erlen- Meyer stérile 99 ml d'eau de mer stérile (pH = 8,18).
- On ajoute 1 ml d'hydrocarbure raffiné (carburants: essence normal, essence sans plomb) comme seule source de carbone et d'énergie.
- On ensemence par 1 ml de suspension bactérienne préparée à partir de la culture pure (18h-24h) de la bactérie sélectionnée.
- On incube à 30°C dans un agitateur réglé à une vitesse de 150 rpm.
- On réalise des cultures témoins (sans carburants) (**Figure 12**).

2.2.2 Lecture

Des mesures quotidiennes de densité optique par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm ont été réalisées (**Perry et al., 2004**).

2.3 Etude comparative de la croissance des bactéries sélectionnées (avec et sans bio-stimulation) en présence d'un hydrocarbure raffiné (Essence normale)

L'addition de l'azote et le phosphore a pour but de stimuler la croissance des micro-organismes qui dégradent les hydrocarbures et, par conséquent, d'augmenter le taux de biodégradation des hydrocarbures polluants (**Shigeaki et al., 2004**) d'où l'ajout d'éléments

nutritifs nécessaires pour améliorer la biodégradation des hydrocarbures polluants (**Choi et al., 2002; Kim et al., 2005**).

L'azote est important pour la synthèse des acides aminés et des enzymes. Les sources naturelles d'azote pour les micro-organismes comprennent l'ammoniac, le nitrate, les nitrites et les composés azotés organiques (**Núñez, 2003**), le phosphore est également nécessaire pour la formation de composés enzymatiques cellulaires utilisés dans les procédés la synthèse et la dégradation. Les sources de phosphore utilisables par les bactéries sont : K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , ou des mélanges de celle-ci (**Robert et al., 1991**).

Le but de cette technique est de comparer la cinétique de croissance de la bactérie sélectionnée en présence de l'hydrocarbure raffiné (carburant : essence normale) comme seule source de carbone et d'énergie avec et sans bio-stimulation par un rapport N/P=1 à travers des cinétiques de croissance par des mesures quotidiennes de la turbidité par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm.

2.3.1 Technique

- On met dans un Erlen- Meyer stérile 99 ml d'eau de mer stérile (pH= 8,18), enrichie par azote et phosphore avec un rapport de N/P =1.
- On ajoute 1 ml d'hydrocarbure raffiné (carburant : essence) comme seule source de carbone et d'énergie.
- On ensemence par 1 ml de suspension bactérienne.
- On incube à 30°C dans un agitateur réglé à une vitesse de 150 rpm.
- On réalise des cultures témoins (sans bio-stimulations).

2.3.2 Lecture

Des mesures quotidiennes de densité optique par spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm ont été réalisées (**Perry et al., 2004**).

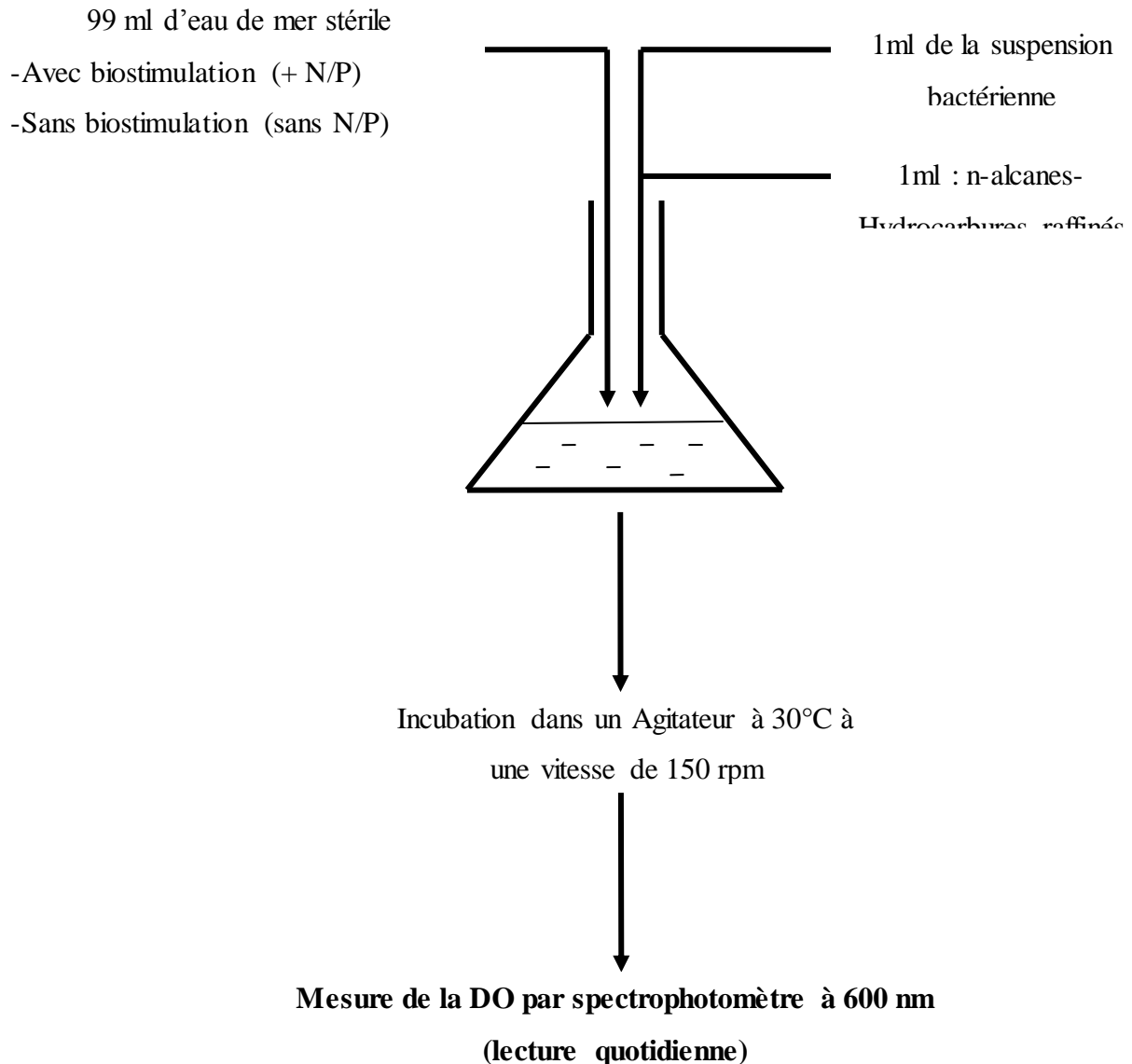


Figure 12. Protocole réalisé pour les essais de croissance des bactéries sélectionnées avec les hydrocarbures

2.4 Dosage des hydrocarbures

Un dosage des hydrocarbures totaux, en triplicats, a été réalisé après la fin de croissance de chaque souche isolée sélectionnée avec les hydrocarbures testés (les alcanes et les carburants raffinés) selon la technique citée au dessus (voir page 30). Les taux des hydrocarbures totaux lors des tests de croissance bactérienne réalisés in vitro avant et après incubation. Une analyse multivariée de la variance (MANOVA) a été réalisée au seuil $\alpha = 0.01$ et $\alpha = 0,05$.

Figure 13. Protocole général réalisé

Partie 3

Résultats

et Discussion

3 Résultats des analyses des échantillons de l'eau de mer

3.1 Les paramètres physico-chimiques

Les résultats des analyses physico-chimiques des échantillons d'eaux de mers prélevés au niveau des 2 sites (port d'Annaba et port El Kala) ainsi que celui de la station témoin Cap de garde obtenus sont résumés dans le **tableau 5** ci-dessous.

Tableau V. Résultats d'analyse physico-chimiques des échantillons d'eau de mer

Paramètres	Echantillon Eau de Cap de Garde	Echantillon Eau de mer d'El-Kala	Echantillon Eau de mer d'Annaba
Hydrocarbures totaux (mg. L ⁻¹)	4,80	11,20	111
Azote total (mg.L ⁻¹)	5,40	1,10	0,60
Phosphore total (mg.L ⁻¹)	0,02	0,20	0,70

Les résultats d'analyses physico-chimiques montrent que le taux le plus élevé en hydrocarbures totaux (THT) est enregistré au niveau de l'eau de mer du port d'Annaba et est de l'ordre de 111 mg.L⁻¹. Il est dix fois supérieur à la norme algérienne qui préconise une valeur limite des hydrocarbures totaux de 10 mg.L⁻¹ (JORA, 2006). Le taux au niveau du port de pêche d'El-Kala est légèrement supérieur à la norme avec une valeur de 11,20 mg.L⁻¹ alors que les THT de l'eau du Cap de garde, station considérée comme témoin sont faibles et sont de l'ordre de 4,80 mg.L⁻¹ par rapport à celui de port de Annaba et d'El-kala (**Tableau 05**). Ces différents taux s'expliquent par le fait que le port de Annaba est un port maritime à activité commerciale et que le port El-Kala est un petit port de pêche avec une infrastructure simple par rapport à celui de Annaba. Les quantités d'azote et de phosphore restent faibles dans les trois stations de prélèvement. La norme algérienne tolère un maximum de 30mg.L⁻¹ pour l'azote et 10mg.L⁻¹ pour le phosphore total (JORA, 2006). Le taux maximum d'azote est

enregistré au niveau de la station Cap de garde soit 5.4 mg.L^{-1} . Quant au phosphore la concentration maximale est observée au niveau du port d'Annaba soit 0.7 mg.L^{-1} (**Tableau 05**).

3.2 Identification bactériologique

3.2.1 Les souches hydrocarbonoclastes

Au total 53 souches et consortiums bactériens entre Gram + et Gram - ainsi que quelques levures ont été isolées et ont fait l'objet d'une étude de croissance par un ensemencement sur gélose eau de mer synthétique (**Soltani, 2004**) seule et en présence de 2 sources différentes de carbone : le glucose et le pétrole brut léger (1ml) comme unique source de carbone et d'énergie pendant une période d'incubation de 24h à 15 jours à une température de 30°C .

Dix sept souches bactériennes ont manifesté des croissances sur gélose eau de mer synthétique avec le pétrole brut léger comme seule source de carbone et d'énergie car selon **Tarayre,(2012)** le carbone des hydrocarbures joue le rôle de substrat pour la croissance des microorganismes .L'utilisation d'hydrocarbures par des micro-organismes a déjà été observée par **ZoBell ,(1946)**, qui a reconnu qu' un grand nombre de micro-organismes sont capables d'utiliser des hydrocarbures comme unique source de carbone et d'énergie, contre 9 souches qui ont préférées le glucose comme unique source de carbone et d'énergie pour croitre sur gélose eau de mer synthétique et n'ont pas poussées en présence des hydrocarbures, ceci s'explique par le fait que le pétrole est très toxique pour la majorité des organismes vivants (**Atlas, 1981**), tandis que 12 souches bactériennes ont montrées des croissances sur les 2 types de milieux en utilisant les sources de carbone disponibles à savoir le glucose et le pétrole brut et 6 souches ont pu croitre sur le milieu sans aucune source de carbone (**Tableau 6**).

Tableau VI. Résultats de test de sélection des bactéries autochtones suite à leur croissance sur gélose eau de mer synthétique –hydrocarbure

Micro-organisme autochtone isolé de l'eau de mer	Croissance sur gélose eau de mer synthétique	Croissance sur gélose eau de mer synthétique + glucose	Croissance sur gélose eau de mer synthétique + pétrole brut
1.1	+ (24h)	+ (24h)	-
1.2	+ (48h)	+ (48h)	-
1.3	+ (24h)	+ (72h)	+ (72h)
1.4	-	+ (72h)	-
2.1	-	+ (48h)	-
2.2	-	-	-
2.3	-	-	-
2.4a	-	-	-
2.4b	-	-	-
2.5	-	+ (24h)	+ (15 jours)
2.6a	+ (72h)	-	-
2.6b	+ (72h)	-	-
2.7	-	-	-
2.9	-	-	-
3	+ (72h)	-	+ (48h)
3.1	+ (24h)	-	+ (48h)
3.2	+ (48h)	-	+ (48h)
5.2	+ (20j)	+ (15j)	+ (5 j)
5.3	+ (24h)	+ (48h)	+ (48h)
5.4	-	+ (24h)	+ (5 j)
5.5	-	+ (72h)	-
5.6	-	+ (15j)	+ (7 j)
5.7	-	-	-
5.8	-	-	-
5.9	+ (20j)	-	+ (5 j)
6	-	-	-
6.1	-	+ (48h)	-

Partie 3 : Résultats et discussion

6.2	+ (24h)	+ (72h)	+ (10 j)
6.4	+ (24h)	+ (72h)	-
6.7	+ (48h)	+ (72h)	+ (5 j)
7.1	-	-	-
7.5	-	-	-
7.6	-	-	-
7.7	-	+ (24h)	-
7.8	+ (15j)	-	-
7.9	+ (48h)	+ (72h)	+ (5 j)
8.1	-	-	-
8.4	+ (24h)	+ (24h)	+ (48h)
8.6	-	+ (14j)	-
8.7	-	-	-
8.8	+ (24h)	+	+ (72h)
8.9	+ (24h)	+	+ (48 h)
9.1	-	-	+ (7 j)
9.3	+ (20j)	+	+ (5 j)
9.4	+ (24h)	+	-
9.5	-	-	-
9.6	+ (48h)	+	-
9.7	-	-	-
9.8	-	-	-
10	-	-	-

Des souches bactériennes (au nombre de 4) autochtones des eaux de mers de Annaba et d'El-Kala ont été choisies et sélectionnées (1.3-9.1-8.8 et 9.1) sur la base de l'aspect des colonies (cultures) après une bonne croissance sur milieu eau de mer synthétiques et pétrole brut léger. Ces dernier ont fait l'objet d'un test de croissance sur gélose composée d'eau de mer synthétique et pétrole brut léger avec une bio-stimulation par un rapport de N/P= 1 (**Tableau 7**).

Tableau VII. Évolution des cultures des espèces sélectionnées sur gélose Eau de mer synthétique-hydrocarbure

Culture sur gélose eau de mer synthétique – hydrocarbure (pétrole brut) + N/P = 1	24h	48h	72h	96h	7 jours
Souche 9.1	-	-	+/-	+	+
Souche 8.8	-	+/-	+	+	+
Souche 1.3	-	+/-	+/-	+	+
Souche 3.1	-	+	+	+	+

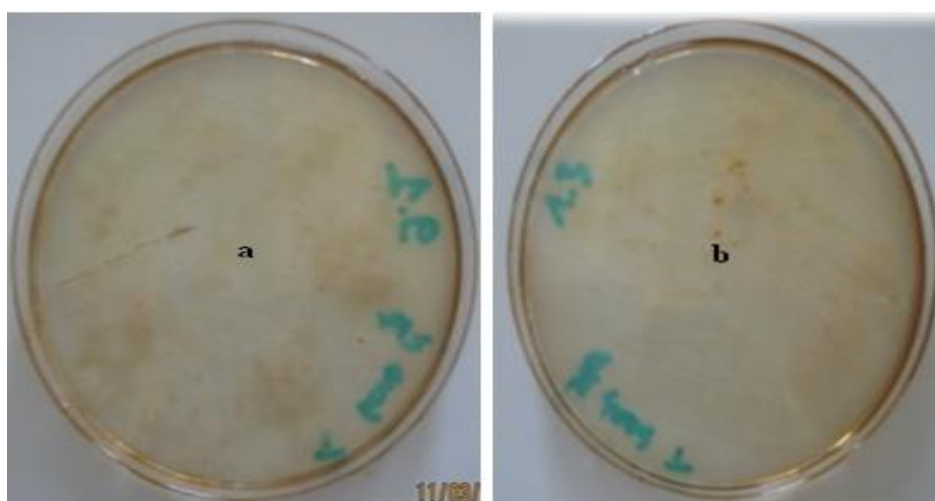


Figure 14. Culture timide des bactéries sélectionnées (a: 9.1, b: 1.3 sur gélose eau de mer synthétique-hydrocarbure (pétrole brut+ N/P=1).

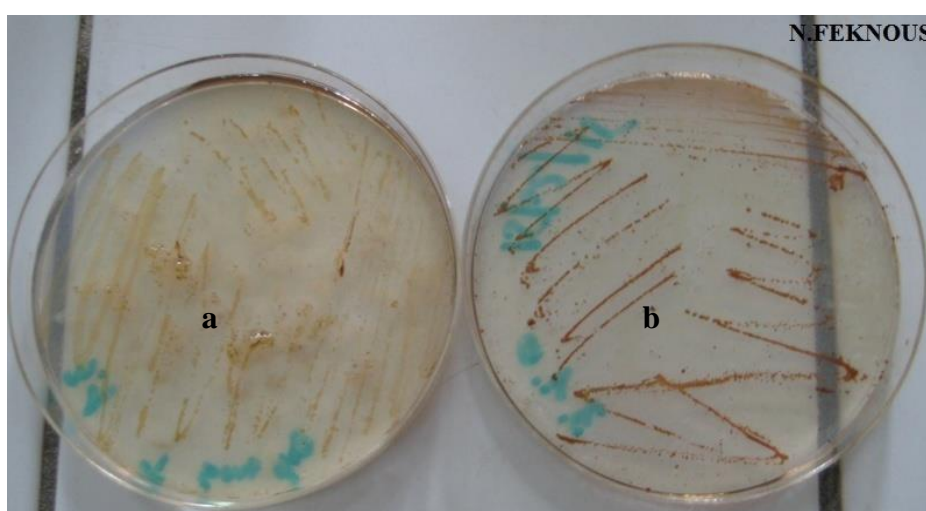


Figure 15. Culture de la souche 3.1 (a : sans biostimulation, b : avec biostimulation N/P=1) sur gélose eau de mer synthétique -pétrole brut).

L'ensemencement des 4 souches bactériennes sur le milieu bio-stimulé a donné après 48 h des cultures timides pour les souches 9.1(a), 1.3 (b) (Figure 14) et avec pigmentation pour la souche 3.1 (Figure 15b).

3.2.2 Identification morphologique

L'identification morphologique microscopique (Figure 16 et 17) et biochimique a permis d'obtenir les caractéristiques des 04 souches tels que mentionnées dans le Tableau 8 ci-dessous.

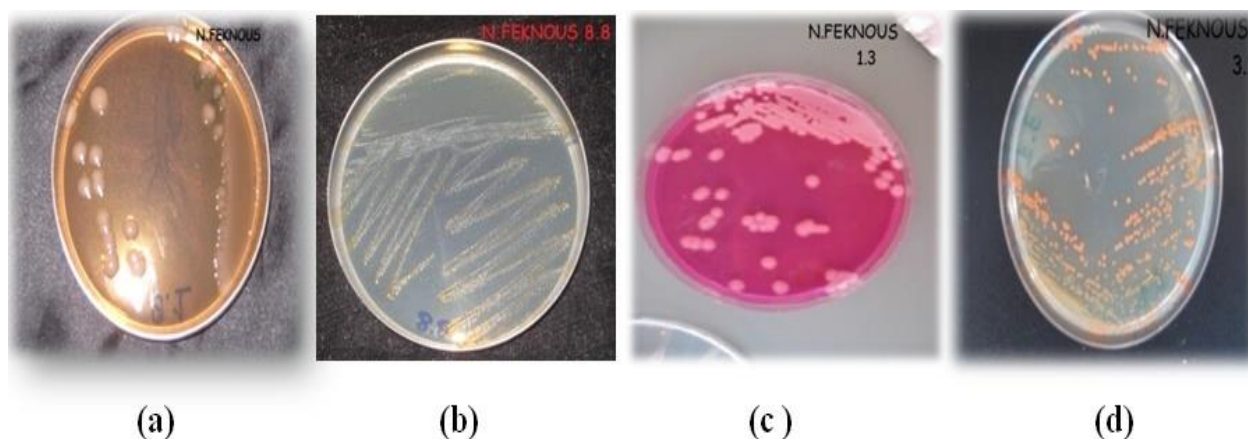


Figure 16. Aspects macroscopiques des cultures de bactéries sélectionnées : (a) : Souche 9.1, (b) : Souche 8.8, (c): Souche 1.3, (d): Souche 3.1

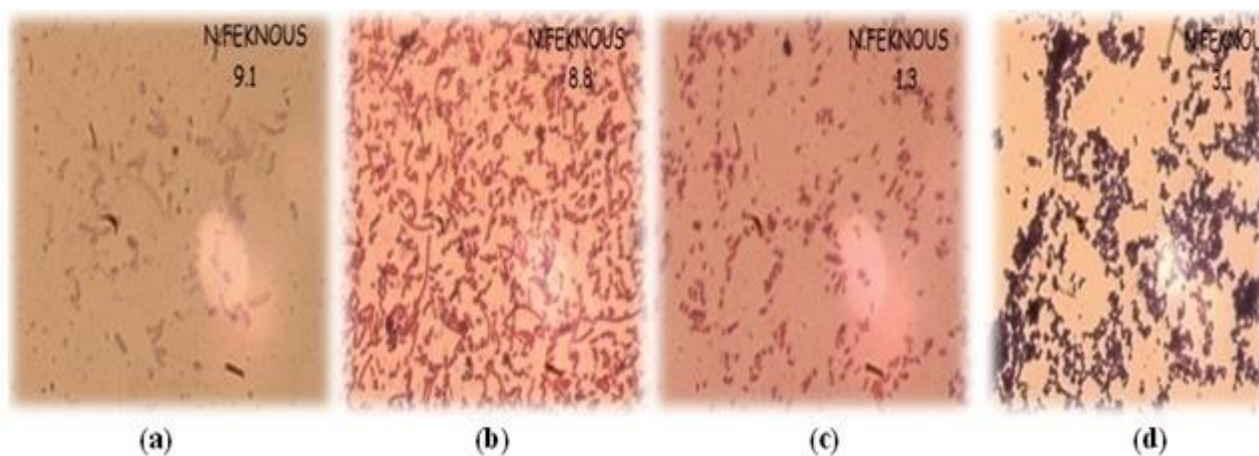


Figure 17. Aspect des cellules après coloration de Gram. (a) : Souche 9.1, (b) : Souche 8.8, (c): Souche 1.3, (d): Souche 3.1

Tableau VIII. Caractères morphologiques et biochimiques des souches sélectionnées

Bactérie	Gram	Forme	Mode de regroupement	Mobilité	Oxydase	Catalase	Aspect des colonies	La taille de la colonie	Couleur de la colonie et relief
9.1	-	Bacilles Incurvés	Isolés	+++++	+	+	Plissées à striations co-centriques, lisses en surface.	06 -08mm de diamètre	Crème, plate étalée, oblique, étalée.
8.8	+	Bacilles à extrémités arrondis	Isolés par 2 ou en courtes chainettes	++	-	-	Circulaires	0,5-01mm de diamètre	Orange, plate, lisse en surface, opaque
1.3	-	Bacilles à extrémités arrondis	Isolés, par 2 ou en courtes chainettes	++	+	+	Rondes à contours réguliers, Muqueuses	01-02 mm de diamètre	Blanche, opaque bombée, lisse en surface
3.1	+	Cocco-bacilles		-	-	+	Punctiformes circulaires à contours réguliers	0,1-0,5mm de diamètre	Rouge-orangée, bombée, opaque

3.2.3 Identification biochimique

L'identification biochimique des bactéries Gram – (les souches : 1.3 et 9.1) isolées par les galeries API 20 E et NE a donné les résultats présentés dans les figures suivantes:

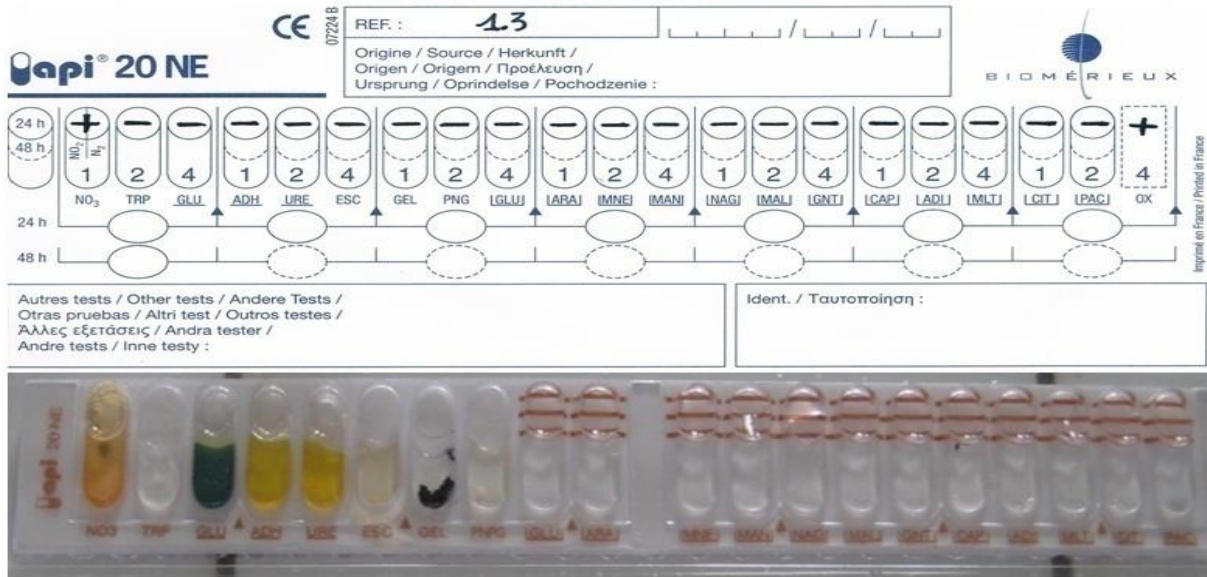


Figure 18. Résultats d'identification biochimique de la souche bactérienne « 1.3 » sélectionnée par la galerie biochimique Api 20 NE

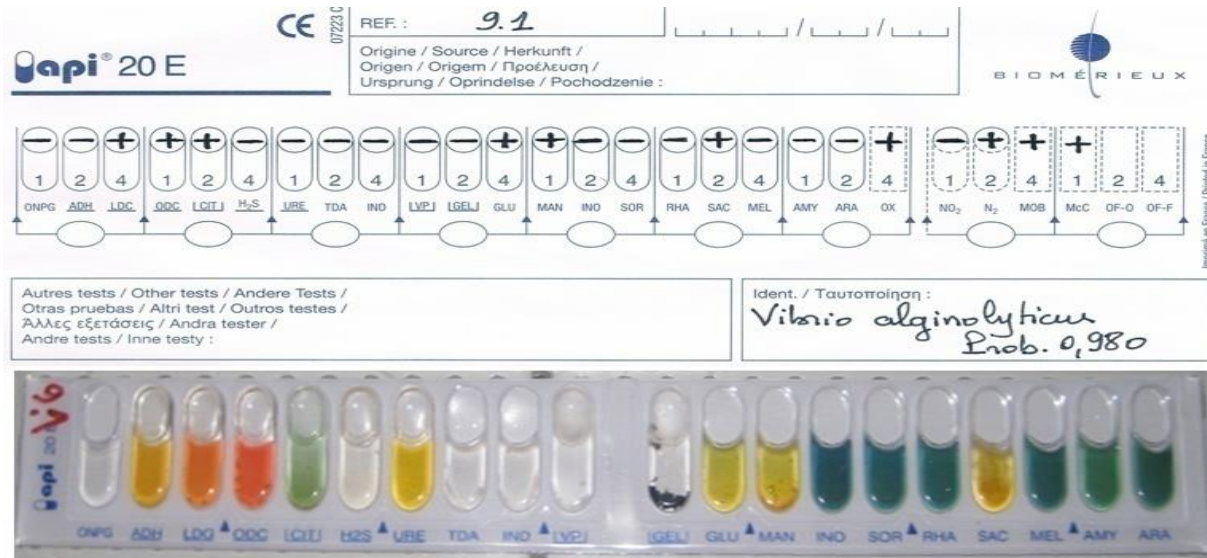


Figure 19. Résultats d'identification biochimique de la souche bactérienne « 9.1 » sélectionnée par la galerie biochimique Api 20 E

3.2.4 Identification moléculaire

L'identification moléculaire des 04 souches bactériennes sélectionnées après séquençage de leurs ADNs a donné les résultats suivants (**Annexe 1**) :

Souche 9.1 : *Vibrio alginolyticus* PB-WC 11099

Souche 8.8 : *Exiguobacterium aurantiacum* strain NB11_3A

Souche 1.3 : *Halomonas venusta* strain NY-8

Souche 3.1 : *Dietzia* sp CNJ898 PLO4

Ainsi que quelques souches (**Annexe 1**) :

Souche 1.1 : *Acinetobacter* sp. CIP 101934

Souche 2.1 : *Pseudomonas* sp. MBEA661

Souche 5.6 : *Macrococcus caseolyticus* JCSC5402 strain

Souche 7.1 : *Bacillus horneckiae* strain DSM 23495T

Souche 7.7 : *Vibrio* sp. Y1-10

Souche 7.9 : *Micrococcus luteus* strain INBI-1

Souche 8.6 : *Vibrio vulnificus* strain MP-4

3.3 Résultats phylogénétiques

L'histoire de l'évolution a été déduite en utilisant la méthode Neighbors-Joining (Saitou et al., 1987). L'arbre optimal avec la somme de la longueur de la branche = 0.63253343 est représenté dans la figure 16 ci-dessus. L'arbre est dessiné avec des longueurs de branche dans les mêmes unités que celles des distances évolutives utilisées pour déduire l'arbre phylogénétique. Les distances évolutives ont été calculées en utilisant la méthode de vraisemblance composite maximum (Tamura et al., 2004) et sont dans les unités du nombre de substitutions de base par site (Figure 20). Les positions des codons étaient incluses du 1er + 2e + 3e + Non codant. Toutes les positions contenant les lacunes et les données manquantes ont été éliminées de l'ensemble de données (en option complète de suppression). Il y avait un total de 426 postes dans l'ensemble de données final. Les analyses phylogénétiques ont été menées dans MEGA 5 (Tamura et al., 2007), séquences voir annexe 1.

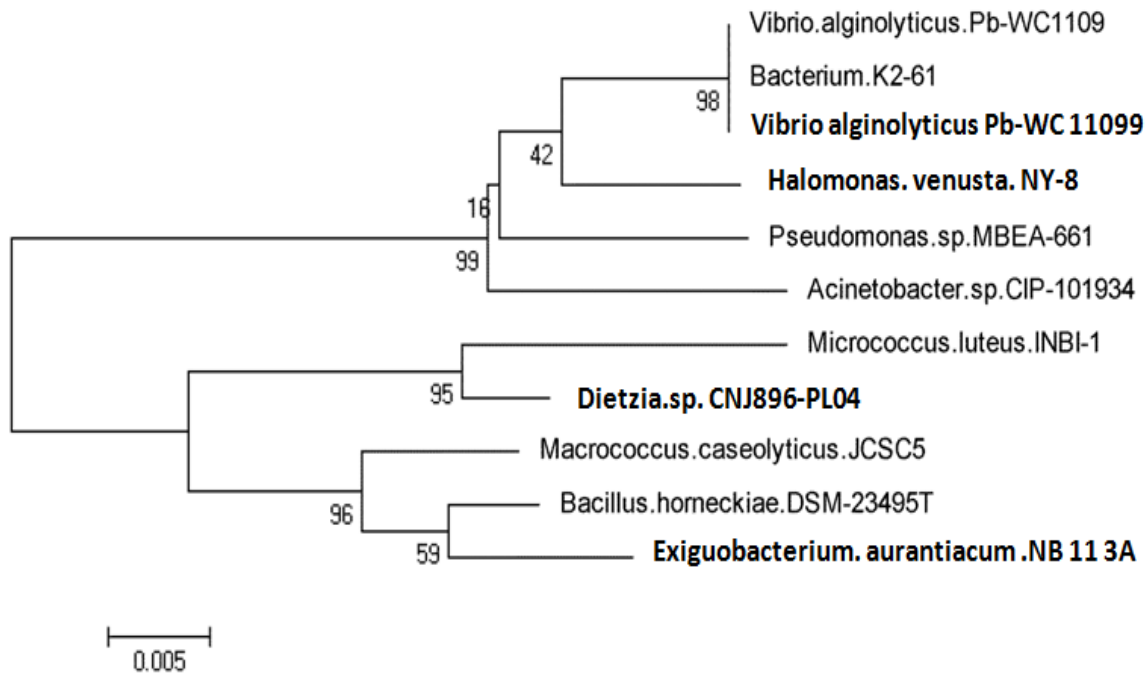


Figure 20. Relations évolutives entre les 4 espèces expérimentées et les 11 taxons identifiés

4 Croissance des bactéries sélectionnées en présence des hydrocarbures saturés (les alcanes)

Selon (Das et al., 2011), dans la nature les hydrocarbures pétroliers sont dégradés par divers groupes de micro-organismes capables d'utiliser les hydrocarbures comme nutriments. La croissance des souches isolées sélectionnées en présence des différents hydrocarbures

alcanes comme unique source de carbone a permis d'obtenir les résultats suivants selon les espèces testées:

4.1 *Vibrio alginolyticus* PB-WC 11099

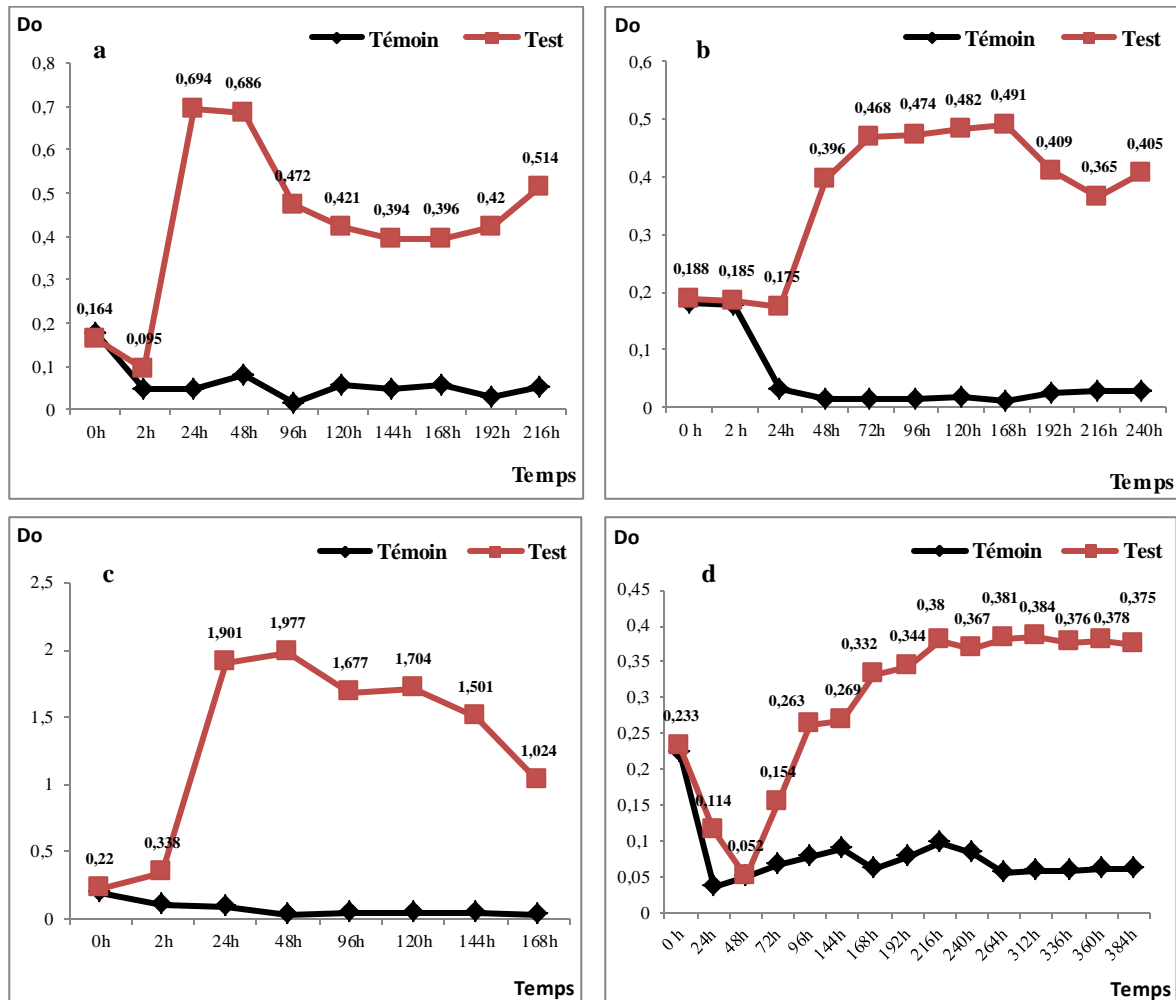


Figure 21. Croissance de *V.alginolyticus* PB-WC 11099 en présence de (a:Hexane, b: Heptane, c: Décane d: Cyclohexane) comme seule source de carbone et d'énergie

Les espèces du genre *Vibrio* font partie de la famille des *Vibrionaceae*, de la classe des Gamma-protéobactéries (Cappello et al., 2012). Elles sont des bactéries hétérotrophes faisant partie des espèces les plus abondantes parmi les bactéries cultivées des environnements marins tels que les eaux côtières, les estuaires, les sédiment et les infrastructures aquacoles (Thompson et al., 2004). Certaines espèces tels que *V. cholerae*, *V.mimicus*, *V.hollisae*, *V.alginolyticus*, *V.fluviales* et *V.damsela* sont pathogènes pour l'homme et les animaux (Tantillo et al., 2004). Écologiquement, d'après Grossart et al., (2005) les vibrions jouent un rôle très important dans la dégradation de la matière organique.

Vibrio alginolyticus est l'espèce la plus répandue du genre *Vibrio* dans le milieu marin et vit habituellement dans des conditions oligotrophes (Dawson et al., 1981, Xie et al., 2005). *Vibrio alginolyticus* est une bactérie halophile Gram-négative qui est communément trouvée comme faisant partie de la flore microbienne normale dans les environnements marins et peut survivre dans l'eau de mer même dans des conditions de stress nutritif tout en maintenant sa virulence (Ben Kahla-Nakbi et al., 2007).

La croissance de l'espèce *Vibrio alginolyticus* PB-WC 11099 en présence d'Hexane C₆ H₁₄ et Heptane C₇ H₁₆ telle que représentée dans la figure 21a, montre une phase de latence très courte, 2heures, en présence d'hexane et de 24heures en présence d'heptane (Figure 21b). Globalement la croissance est plus rapide en présence d'hexane que d'heptane. En effet, la densité optique a évolué rapidement avec l'hexane 0,694 nm en 24h et le maximum de croissance pour l'heptane est atteint en 168h avec 0,49 nm (Figure 21b). Cette croissance confirme l'hypothèse de (Ratledge, 1978) selon laquelle certaines bactéries sont capables de se développer en présence d'alcane de courtes chaînes. En présence de décane la croissance est plus rapide avec une courte phase de latence et l'on atteint une turbidité de 1,97 nm au bout de 48h (Figure 21c). L'espèce montre une facile adaptation avec des chaînes de carbones plus longues supérieures à 9 carbones (Ratledge, 1978). Avec le cyclohexane, la bactérie a éprouvé une difficulté d'adaptation ainsi on observe une diminution du nombre de cellules viable manifesté par une chute de la DO (0,05), y compris avec le témoin et cela au cours des premières 48h. Après 48h, on assiste à une augmentation croissante jusqu'à une DO égale à 0,384 synonyme d'une adaptation des cellules (Figure 21d).

4.2 *Exiguobacterium aurantiacum* strain NB11_3A

Les espèces du genre *Exiguobacterium* sont des bactéries Gram-positives anaérobies facultatives, avec une faible teneur en G+C (Vishnivetskaya et al., 2009). Le genre *Exiguobacterium* est largement distribué dans le monde (Karami et al., 2011). Il a été isolé et identifié à partir des sources chaudes (Vishnivetskaya et al., 2009; Vishnivetskaya et al., 2011), des sédiments marins (Kim et al., 2005), des environnements oligotrophes (Rebollar et al., 2012), et à partir des biofilms (Carneiro et al., 2012). L'étude des espèces d'*Exiguobacterium* est d'une grande importance car la compréhension de leurs stratégies pour s'adapter à des conditions environnementales diverses et extrêmes les placera probablement en tant qu'organismes modèles impliqués dans l'assainissement des polluants organiques et inorganiques (Ordoñez et al., 2009, Belfiore et al., 2013).

Plusieurs souches d'*Exiguobacterium* possèdent des propriétés uniques pour les applications en biotechnologies : bioremédiation, l'industrie et l'agriculture (Kumar et al., 2006) .

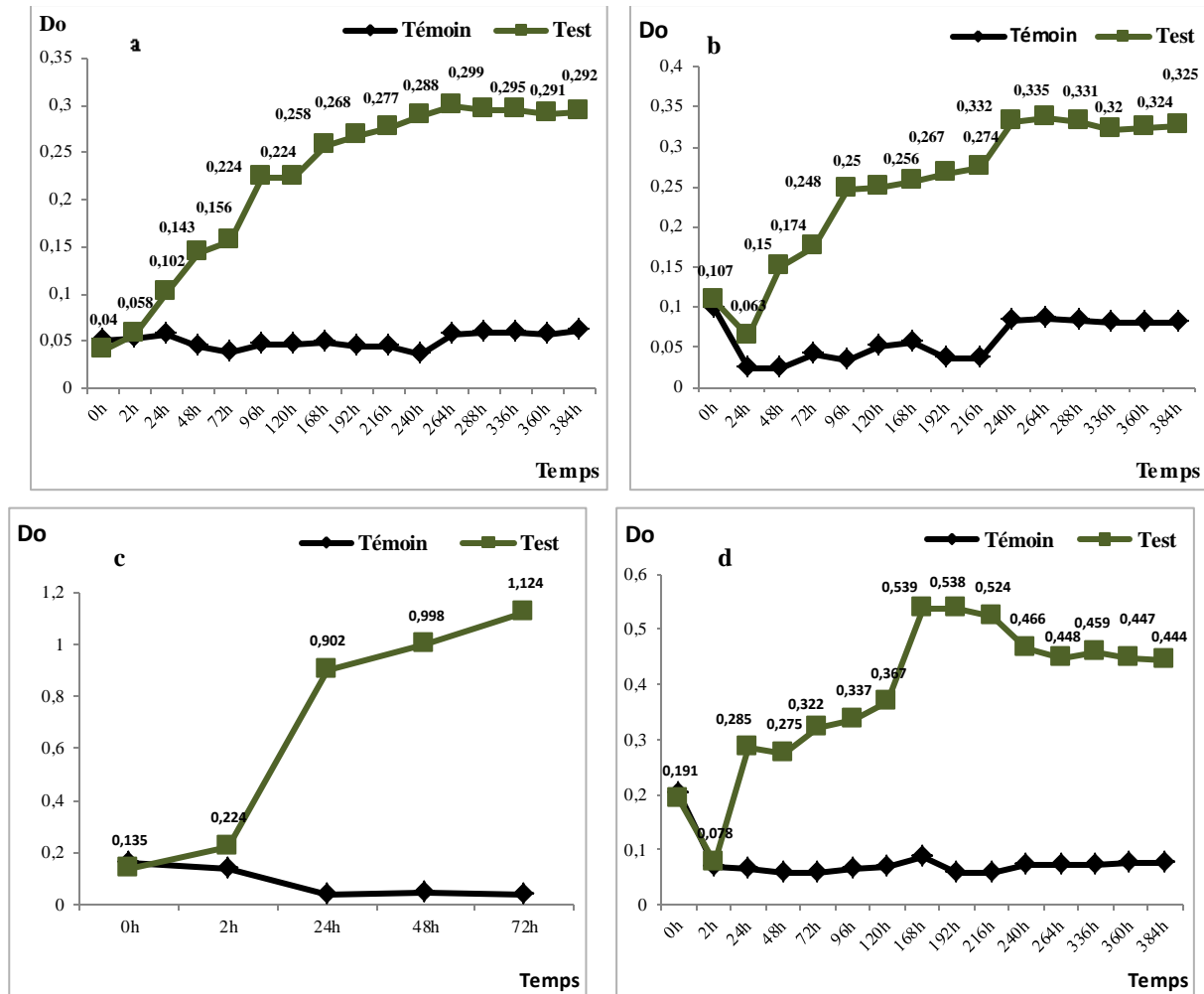


Figure 22. Croissance de *Exiguobacterium aurantiacum* strain NB11_3A en présence de (a:Hexane, b: Heptane, c: Décane d: Cyclo-hexane) comme seule source de carbone et d'énergie.

La croissance d'*Exiguobacterium aurantiacum* strain NB11_3A suit le même cheminement quelque soit l'alcane testé (Figure 22). Le rythme est plus accéléré en présence de décane (Figure 22 c) avec une valeur de DO de 1,12 atteinte au bout de 72h. Cependant, avec le cyclohexane on observe une difficulté quant à l'adaptation de la bactérie avec le substrat en début de croissance et on assiste à une diminution des quantités de cellules en phase de latence (Figure 22d). D'après les travaux de Gita et al., (2008), *Exiguobacterium aurantiacum* NB11_3A et *Burkholderia cepacia* 12614 Te ont une bonne capacité de dégradation pour un large éventail de n-alcanes. Par ailleurs, elles peuvent être utilisées pour la bioremédiation et pour le traitement de déchets de pétrole dans les bioréacteurs.

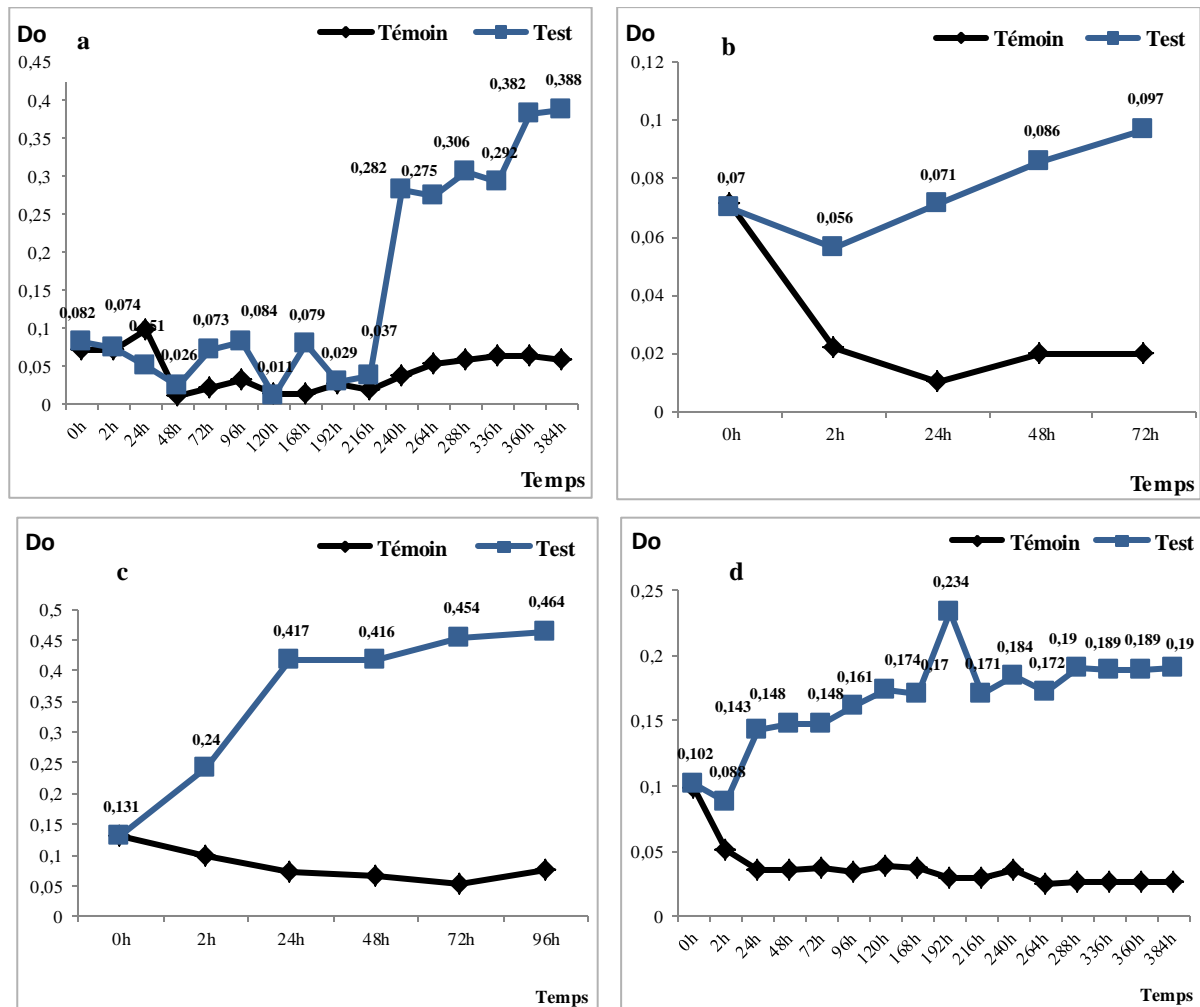
4.3 *Halomonas venusta* strain NY-8

Figure 23. Croissance de *Halomonas venusta* strain NY-8 en présence de (a: Hexane, b: Heptane, c: Décane d: Cyclohexane) comme seule source de carbone et d'énergie

Selon (Rojas et al., 2009) le genre *Halomonas* constitue le groupe bactérien le plus abondant dans les environnements marins. L'espèce la plus représentative du genre *Halomonas* est *Halomonas venusta* (Wang et al., 2009). Il s'agit d'une bactérie halophile de la famille des *Halomonadaceae*, et qui appartient à la classe des Gamma protéobactéries (Franzmann et al., 1988 ;Dobson et al., 1996). De nombreuses études ont rapportés que *Halomonas shengliensis* (Wang et al.,2007) utilise les composés du pétrole brut comme substrat de croissance. Okamoto et al.,(2004); Mnif et al.,(2011) ont isolés *Halomonas sp* strain C2SS100 et *Pseudomonas. sp* strain C450R qui dégradent de 39 à 96 % de la fraction aliphatique C13-C29 du pétrole brut. *Halomonas venusta NY-8* a manifesté une cinétique de croissance similaire aux autres espèces, une très longue phase de latence de 216 h avec l'hexane (Figure 23a), une difficulté d'adaptation en début de croissance (2h) avec l'heptane

(Figure 23b) et le cyclo-hexane (Figure 23d). Le rythme de croissance est long avec de longues phases exponentielles et des densités optiques faibles 0,38-0,097 et 0,234 pour respectivement l'hexane, l'heptane et le cyclohexane (Figure 23 a, b et d). La croissance d'*Halomonas venusta* NY-8 en présence de décane semble plus rapide avec une Do de l'ordre de 0,46 (Figure 19c) au bout de 4 jours.

4.4 *Dietzia* sp CNJ898 PLO4

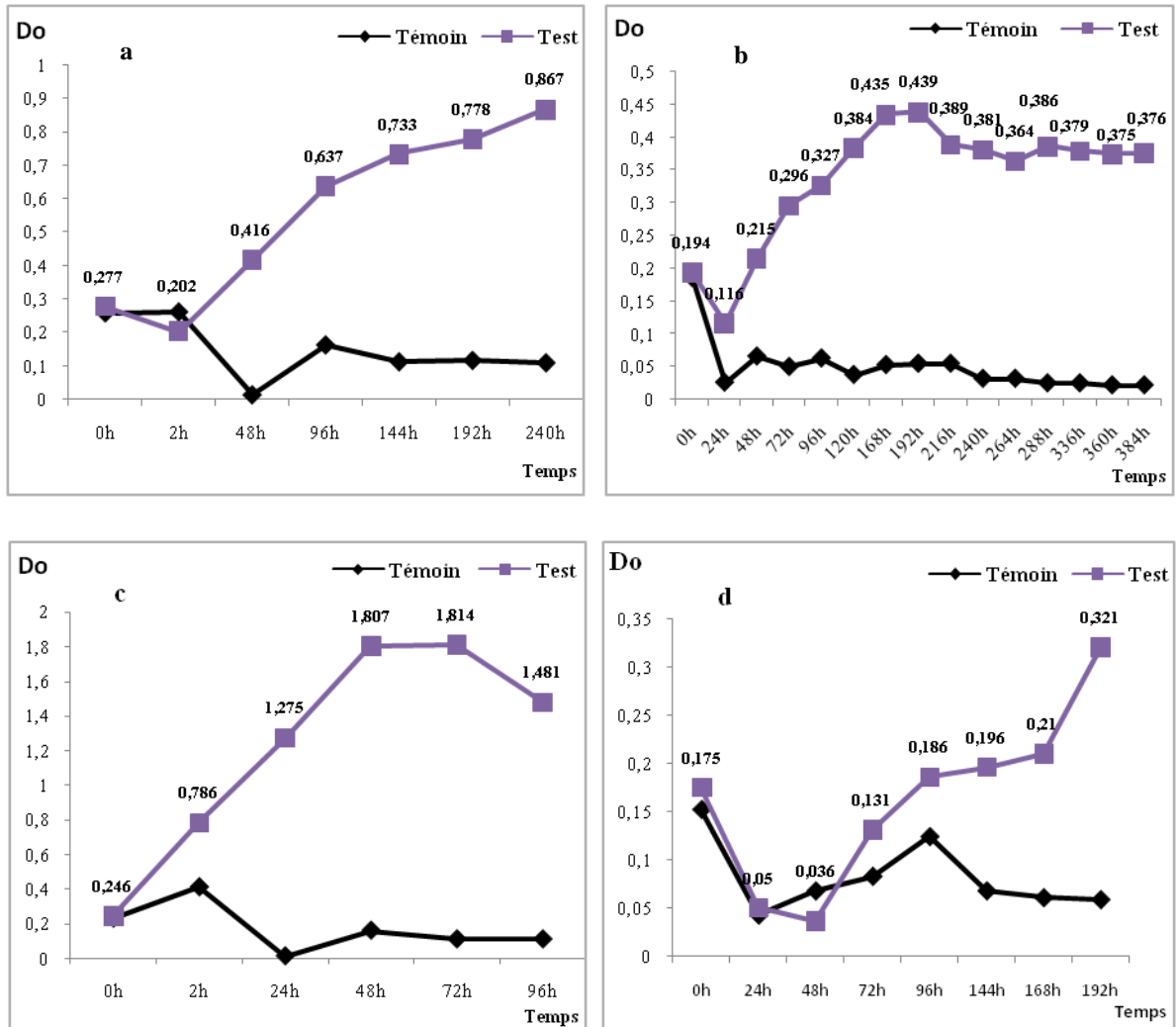


Figure 24. Croissance de *Dietzia* sp CNJ898PLO4 en présence de (a:hexane, b: heptane,

Dietzia spp a été isolée dans différents environnements comme les sols tropicaux (Von der Weid et al., 2007), les lacs alcalins (Duckworth et al., 1998), les terrains de pétrole (Borzenkov et al., 2006), les sédiments marins profonds (Colquhoun et al., 1998), la peau et le tractus intestinal du poisson marin (Yumoto et al., 2002). Jusqu'à ce jour de nombreuses études ont rapportés que des micro-organismes comme *Dietzia* sp (Riis et al., 2003) *Dietzia maris* et *Rhodococcus erythropolis* (Zvyagintseva et al., 2001) sont capables d'utiliser les

composés de pétrole brut comme substrat de croissance. La souche isolée dégrade facilement le décane et à un degré moindre l'hexane. Ainsi, l'adaptation des cellules est courte avec une augmentation rapide de la densité optique qui a atteint 0,86 (**Figure 24a**) avec l'hexane et 1,8 avec le décane en 48 heures (**Figure 24c**). Le rythme de croissance est plus faible avec l'heptane et le cyclohexane avec respectivement des densités optiques de 0,43 (**Figure 24b**) et 0,32 (**Figure 24d**). On note toujours la diminution des densités optiques en début de croissance avec les deux alcanes. On assiste à une reprise de la croissance en présence des hydrocarbures après 24 heures pour l'heptane (**Figure 24b**) et 48 heures pour le cyclohexane (**Figure 24d**) contrairement aux témoins où les DO chuttes d'une manière considérable. Plusieurs espèces de *Dietzia*, décrites à ce jour ont montrés leurs capacités à dégrader les hydrocarbures aliphatiques de différentes tailles (**Yumoto et al., 2002**), *Dietzia maris DSM 43672* (**Rainey et al., 1995**), *Dietzia psychralcaliphila* (**Yumoto et al., 2002**), *Dietzia sp.E1* (**Bihari et al., 2010**), *Dietzia cinnamae p4 strain* (**Von der Weid et al., 2007**) et *Dietzia DQ 12-45-1b* (**Xing-Biao Xang et al., 2011**) sont capables d'utiliser en plus les n-alcanes, des composés aromatiques et le pétrole brut comme substrat de croissance, révélant ainsi que ce micro-organisme peut servir dans la bio-remédiation des hydrocarbures pétroliers.

5 Essai de croissance des bactéries sélectionnées en présence des hydrocarbures raffinés (carburants)

La connaissance de la biodégradabilité des produits pétroliers (essence, kérosène, gazole, etc.) représente un enjeu évident. En effet, en cas de pollution accidentelle, il convient d'être en mesure d'apprécier les capacités d'autoépuration du milieu naturel (atténuation naturelle) pour établir une stratégie et mettre en place, si nécessaire, les opérations de réhabilitation (**Solano-Serena et al., 2001**). La biodégradation des hydrocarbures pétroliers de l'essence et autres non – aqueous phase liquids (NAPLs) par les cultures bactériennes a été déjà rapportée par **Mills et al., 1999** ; **Olson et al., 1999**; **Gogoi et al., 2003** & **De Oteyza et al., 2004** dans les études de culture en batch et sur terrain.

La croissance des souches isolées sélectionnées en présence des différents hydrocarbures raffinés (**essence normale et essence sans plomb**) comme unique source de carbone et sans bio-stimulation a permis d'obtenir les résultats suivants selon les espèces testées:

5.1 *Vibrio alginolyticus* PB-WC 11099

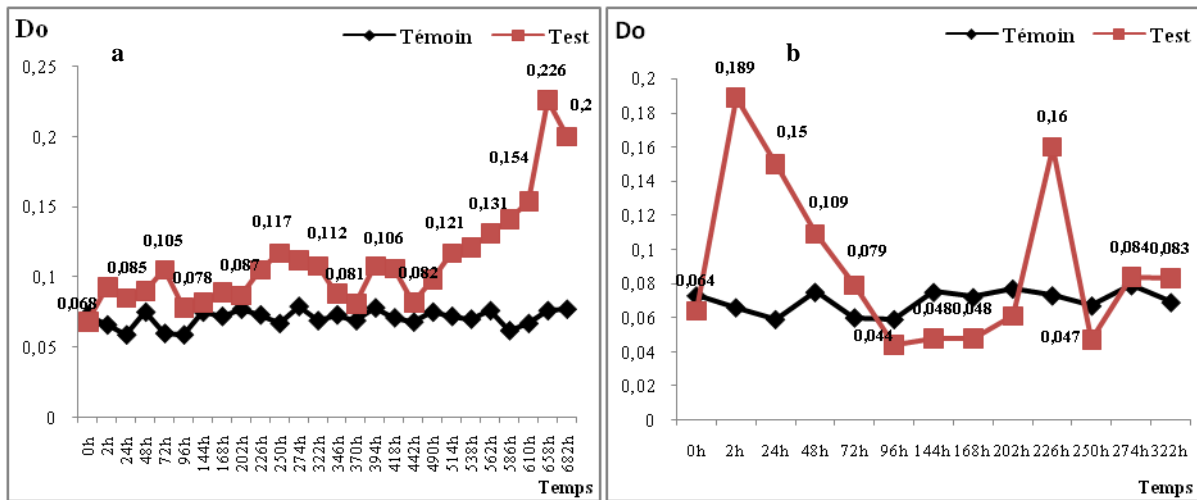


Figure 25. Croissance de *V.alginolyticus* PB-WC 11099 en présence de : (a: essence normale, b : essence sans plombs)

Dans la **figure 25 b** qui représente la croissance de *Vibrio alginolyticus* PB-WC 11099 avec l'essence sans plomb on remarque au début de la culture l'absence de phase de latence et une adaptation rapide qui se manifeste par un dédoublement cellulaire avec une augmentation de la densité optique de 0,064 jusqu'à la valeur maximale de 0,189 avant de diminuer graduellement jusqu'à 0,048 (après 96 heures de culture) bien au dessous de la valeur de la densité de départ et de reprendre une autre fois et augmenter jusqu'à une valeur de 0,16 et de diminuer une deuxième fois, cette courbe de reflète la difficulté de croissance de *Vibrio alginolyticus* PB-WC 11099 avec l'essence sans plomb comme source de carbone et d'énergie, cette difficulté est peut être due à la composition du carburant en substances toxiques comme les additifs ajoutés. (Atlas, 1981) a en outre reconnu que l'utilisation microbienne des hydrocarbures est fortement dépendante de la nature chimique des composants du mélange de pétrole, et les déterminants environnementaux. Les carburants présentent en fraction plus ou moins importante de certains additifs, qui viennent s'ajouter au cortège des hydrocarbures, et peuvent entraîner des problèmes environnementaux spécifiques (Saada et al., 2004). Par ailleurs, la plupart des additifs présents dans les essences, et entre autres dans les essences sans plomb, sont également toxiques (Kremer, 2007) les éthers carburants tels que le Méthyl Tert-Butyl Éther (MTBE), et plus récemment, l'Éthyl Tert-Butyl Éther (ETBE). Par contre dans la courbe de croissance de *Vibrio alginolyticus* PB-WC 11099 avec l'essence normale (**Fig. 25 a**) on note une légère évolution de la densité optique au départ de 0,068 à 0,098 avant d'évoluer progressivement vers une valeur maximale de 0,226.

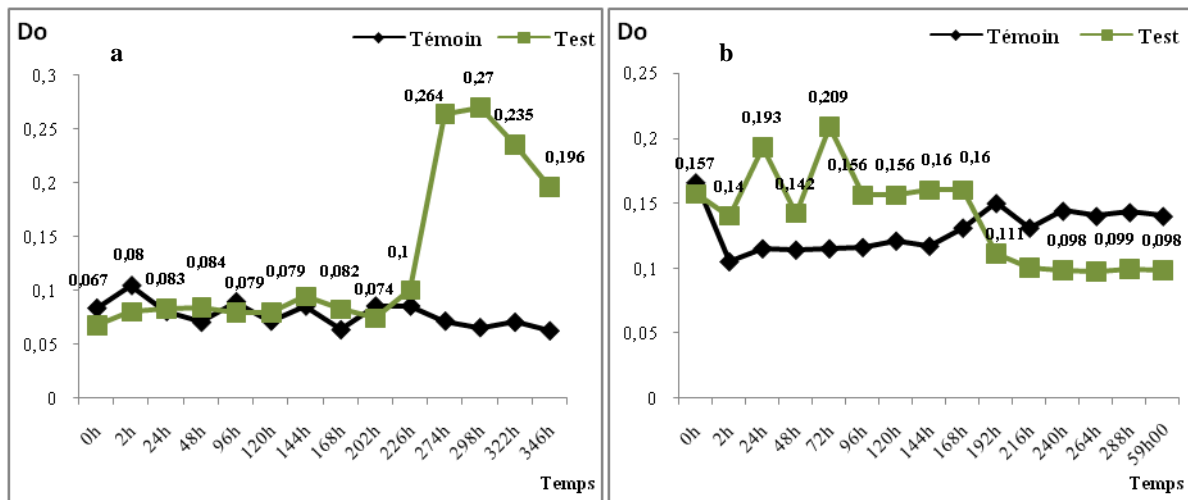
5.2 *Exiguobacterium aurantiacum* strain NB11_3A

Figure 26. Croissance de *Exiguobacterium aurantiacum* strain NB11_3A en présence de : (a : essence normale, b : essence sans plombs)

On remarque des difficultés dans l'évolution de la densité optique dans la courbe de croissance d'*Exiguobacterium aurantiacum* strain NB11_3A avec l'essence sans plomb utilisé dans cet essai comme seule source de carbone et d'énergie (Figure 26 b) avant de diminuer complètement et afficher une valeur de DO bien au dessous (0,099) par rapport à celle de départ et qui était de 0,157. Par contre dans la (Figure 26a) cette bactérie montre une courbe de croissance normale avec le carburant essence normal testé également comme seul source de carbone et d'énergie. Un problème apparaît au niveau des additifs des essences d'après Saada et al., (2004) peu de recherches ont été effectuées quant à la biodégradation de l'additif ETBE, néanmoins une certaine récalcitrance à la biodégradation apparaît pour ces composés ETBE et MTBE. Il ressort toutefois de certaines récentes études une possibilité de biodégradation de ces composés dans certaines conditions. D'une façon générale, on s'attendra à une dégradation lente ou incomplète de ces additifs, donc une atténuation naturelle limitée des essences qui les contiennent. La biodégradation de ces molécules a été étudiée et le rôle de certaines bactéries de l'environnement dans leur biodégradation aérobie a pu être mis en évidence (Le Digabel, 2013). *Rhodococcus ruber* IFP 2001, isolée d'une boue activée de station d'épuration (Fayolle et al., 2001), et faisant partie du phylum *Actinobacteria*, est capable de se développer en utilisant l'ETBE comme seule source de carbone et d'énergie. *Rhodococcus zopfii* IFP 2005 et *Gordonia* sp. 2009 (anciennement *Mycobacterium* sp.), isolées à partir de boues activées de stations d'épuration, possèdent également des capacités de croissance sur ETBE (Malandain et al., 2010).

5.3 *Halomonas venusta* strain NY-8

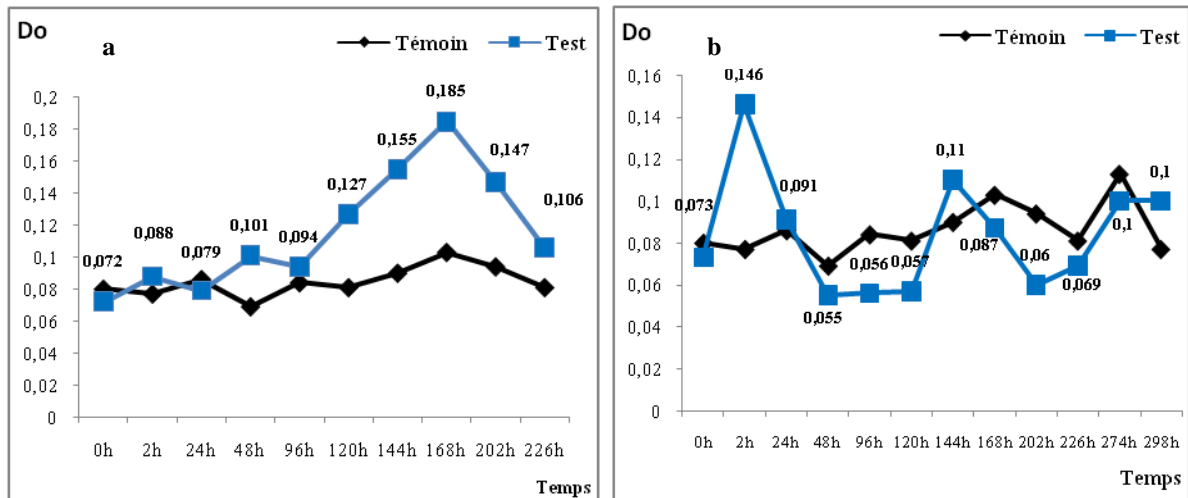
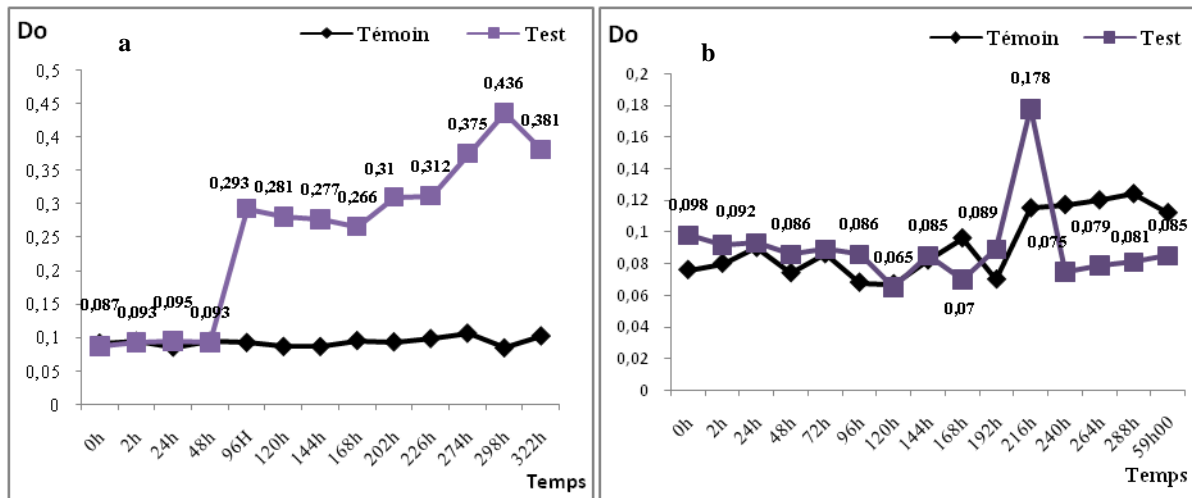


Figure 27. Croissance de *Halomonas venusta* strain NY-8 en présence de l'essence (a : essence normale, b : essence sans plombs)

Les cultures en batch de *Halomonas venusta* strain NY-8 avec les deux carburants ont données deux cinétiques de croissances différentes (Figure 27a et Figure 27b). Un dédoublement cellulaire rapide sans phase d'adaptation avec le milieu dans lequel la DO a évoluée de 0,073 à 0,146 au bout de 24 h de culture pour diminuer après et atteindre une valeur de 0,056 (Figure 27b) cette dernière va reprendre et évoluer jusqu'à 0,11 valeur maximale avant de chuter une deuxième fois vers une valeur de 0,6. Quant à la croissance de cet halophile avec l'essence normale comme unique source de carbone et d'énergie ce dernier a montré une cinétique de croissance avec une légère évolution de la DO de 0,072 à 0,094 au début de la culture pour ensuite augmenter progressivement jusqu'à une valeur maximale de 0,185 (Figure 27a.)

5.4 *Dietzia sp* CNJ898 PLO4Figure 28. Croissance de *Dietzia sp* CNJ898 PLO4 en présence de : (a : essence normale, b : essence sans plombs)

Dietzia sp CNJ898 PLO4 cet autochtone de l'eau de mer d'El-Kala a montré une courbe de croissance normale (Figure 28a) avec une évolution de la DO de 0,087 à 0,436 après une courte phase d'adaptation de 24h lorsqu'elle est cultivée en présence de l'essence normale testé ici comme unique source de carbone et d'énergie mais dans la figure 28b on remarque une courbe dans laquelle il y'a une longue phase d'adaptation de 192 h et dans laquelle y'a une décroissance de la DO de 0,098 à 0,089 avant que la densité progresse de 0,089 à 0,178 valeur après laquelle la DO chute vers une valeur de 0,075 .

En se basant sur les résultats obtenus (courbes de croissances) des cultures des quatre bactéries autochtones sélectionnées avec le carburant essence normale, nous avons décidés de continuer cette étude en apportant des éléments nutritifs (bio-stimulation) par azote et phosphore aux milieux de cultures in vitro.

6 Étude comparative de la croissance des bactéries sélectionnées (avec et sans bio-stimulation) en présence d'un hydrocarbure raffiné (Essence normale)

Le pétrole brut et les produits raffinés sont des hydrocarbures principalement, et la grande majorité d'entre eux sont biodégradables (**Prince, 2002**). Les micro-organismes jouent un rôle crucial dans le devenir des polluants, notamment dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers (**Leahy et al., 1990**).

Le rejet des produits dans les milieux marins ou terrestres entraîne une prolifération des micro-organismes aptes à se développer sur les hydrocarbures et leurs produits de dégradation. Leur nombre est beaucoup plus important dans les zones polluées de façon chronique et s'accroît après un apport d'hydrocarbures dans les sites dépourvues de contamination (**Bartha et al., 1977**). Dans les environnements pollués, les micro-organismes spécialisés sont abondants à cause de l'adaptation des microflore aux polluants (**Marchal et al., 2003**). Les propriétés de dégradation aérobie des 2 types de carburants : essence et le fuel ne sont pas complètement évalués, seuls les composants les plus solubles dans l'eau de l'essence comme le benzène (**Paje et al., 1997**), toluène (**Leahy et al., 1997**), éthyl benzène et isomères de xylène (**Dilecce et al., 1997**), ces hydrocarbures habituellement appelés BTEX ont été clairement évalués en utilisant des souches pures avec les microflore complexes. La biodégradabilité de BTEX été aussi confirmée par **Mallakin et al., (1996)**; **Matteau et al., (1997)**, peu d'informations sont disponibles concernant les propriétés de dégradation des autres composants de l'essence excepté pour quelques poly-alkylès de benzène (**Lang, 1996 ; Rozkov et al., 1998**) et quelques alcanes linéaires branchés (**Schaeffer et al., 1979**). Aucun microorganisme ne peut à lui seul dégrader tous les composants des carburants raffinés, qui sont déversés dans l'environnement. Les essences contiennent généralement environ 230 hydrocarbures différents. Les essences sont composées de 5 classes principales d'hydrocarbures : les n-alcanes, les isoalcanes, les cycloalcanes, les alcènes, et les aromatiques. De manière générale, la biostimulation accélère la croissance et l'activité bactérienne, permettant ainsi une meilleure biodégradation des hydrocarbures (**Prince, 1993 ; Coulon et al., 2003**). En s'appuyant sur les résultats précédents, la croissance des souches isolées sélectionnées en présence de l'hydrocarbure raffinée (essence) comme unique source de carbone a permis d'obtenir les résultats suivants selon les espèces testées:

6.1 *Vibrio alginolyticus* PB-WC 11099

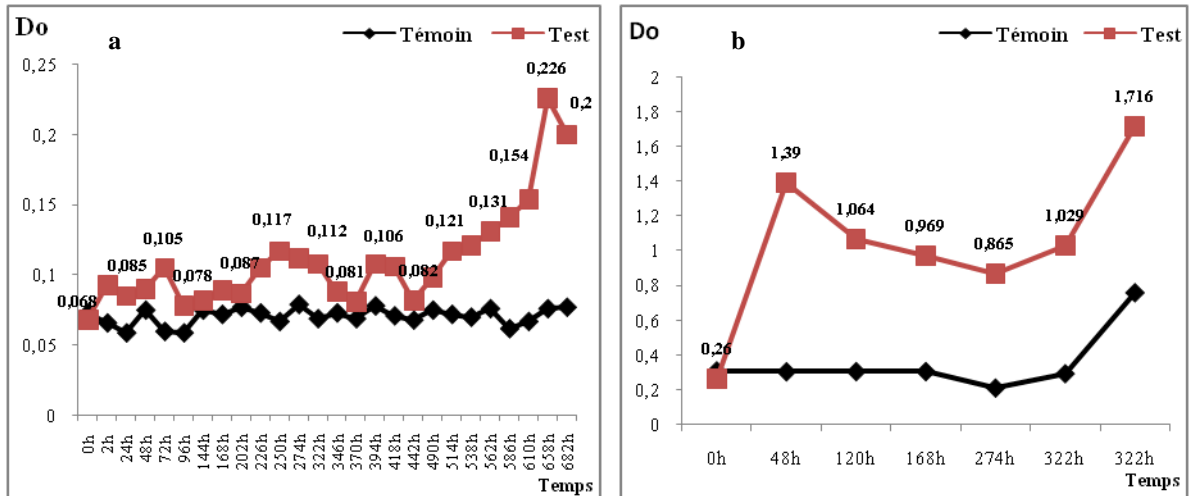


Figure 29. Croissance de *V.alginolyticus* PB-WC 11099 en présence de l'essence a : sans bio-stimulation, b : avec bio-stimulation (N/P=1/1).

La phase de latence avec l'espèce *Vibrio alginolyticus* PB-WC 11099 en présence de l'essence comme seule source de carbone et d'énergie et sans apport d'azote ni de phosphore (sans bio-stimulation) représenté dans la (Figure 29a) a été très longue de 442h (16 jours) avant d'arriver à la phase exponentielle de croissance qui a affichée une turbidité de 0,226 alors que celle de départ été de 0,068. Par contre, lorsque *Vibrio alginolyticus* PB-WC 11099 est cultivée dans un milieu supplémenté avec un rapport N/P (après bio-stimulation N/P=1/1, figure 29b) la courbe de croissance montre une phase de latence plus courte et qui dure 24 heures, on constate aussi que la densité optique n'a pas cessée d'évoluer de 0,26 (densité de départ) pour atteindre 1,716.

Vibrio alginolyticus PB-WC 11099 assimile rapidement l'essence comme seule source de carbone et d'énergie pour sa croissance lorsqu'un apport N/P est ajouté au milieu (après bio-stimulation N/P=1/1). D'une manière générale, on considère que l'addition d'azote et le phosphore a un résultat positif, l'augmentation des populations microbiennes et le taux de dégradation des polluants (Nápoles et al., 2008).

6.2 *Exiguobacterium aurantiacum* strain NB11_3A

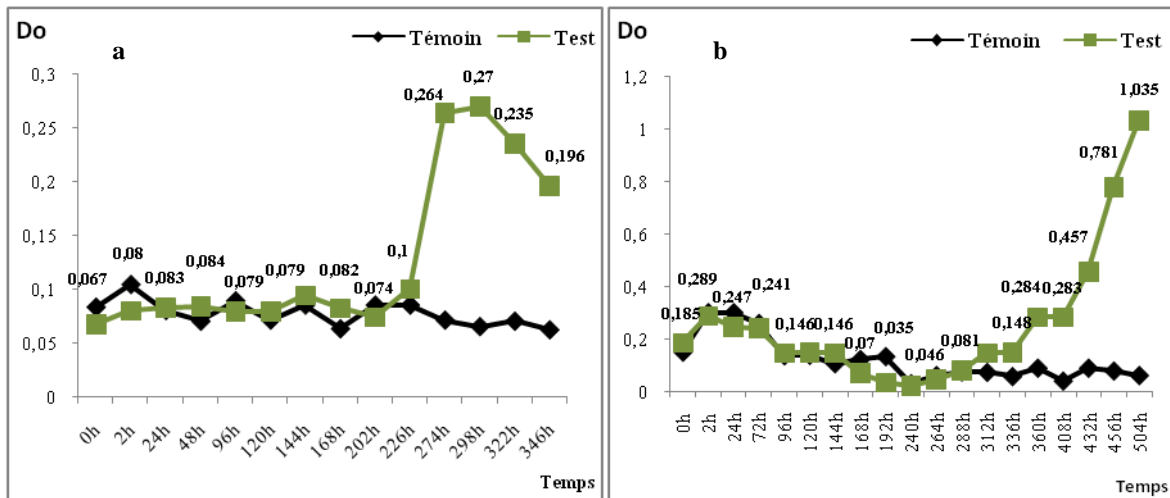


Figure 30. Croissance de *Exiguobacterium aurantiacum* strain NB11_3A en présence de l'essence a : sans bio-stimulation ,b : avec bio-stimulation (N/P=1/1)

La croissance d'*Exiguobacterium aurantiacum* strain NB11_3A avec l'essence comme seul source de carbone et d'énergie dans un milieu sans bio-stimulation (Figure 30a) a montrée une progression lente de densité optique pendant 226h (09 jours) dans laquelle la DO a évoluée de 0,067 à 0,074 avant d'évoluer rapidement à 0,270 valeur maximale affichée, alors qu'avec l'apport d'azote et de phosphore au milieu de culture (bio-stimulation par N/P =1/1) (Figure 30b) y'a eu une phase de latence qui a durée 240 h (10jours) et la densité optique a atteint 1,035 par rapport à la densité de départ qui été de valeur de 0,185. Si la majorité des composés synthésisés chimiquement sont biodégradables, certains sont biodégradables sur un temps relativement long (Perry et al., 2004).

Selon les études de Mohanty et al., (2008) la biodégradation des NAPLS est souvent un processus lent dû à la nature hydrophobe des contaminants et par conséquent aux limitations des substrats. Les micro-organismes demandent un long temps d'adaptation pour pouvoir dégrader hydrocarbures complexes où il y'a l'effet de l'interaction de différents substrats et interaction entre les cultures qui dégradent de différentes fractions. La culture d'*Exiguobacterium aurantiacum* strain NB11_3A avec essence a montré que cette bactérie utilise ce substrat comme seule source de carbone et d'énergie pour sa croissance .

6.3 *Halomonas venusta* strain NY-8

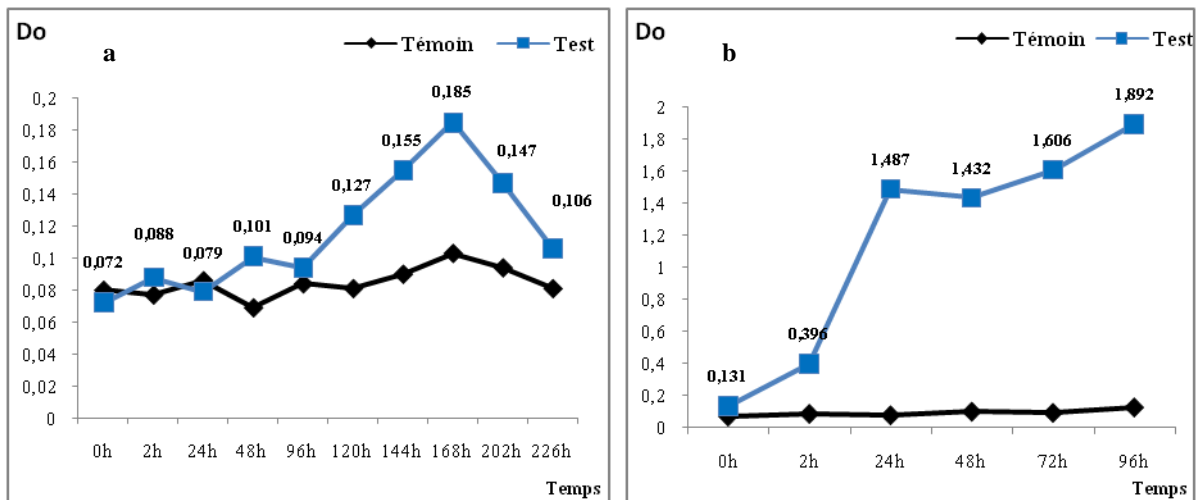


Figure 31. Croissance de *Halomonas venusta* strain NY-8 en présence de l'essence a : sans bio-stimulation, b : avec bio-stimulation (N/P=1/1)

La figure 31a montre une courbe de croissance avec un rythme faible lorsqu' *Halomonas venusta* strain NY-8 croît sans bio-stimulation dans un milieu contenant l'essence comme seule source de carbone et d'énergie car on remarque dans cette figure une évolution lente de la densité optique pendant les premières 96h de culture de 0,072 jusqu'à 0,094 avant d'afficher une valeur maximale de 0,185 en fin de croissance, mais lorsque le milieu contient en plus l'azote et le phosphore (N/P=1/1) cet autochtone de la mer d'El-kala s'adapte et croît rapidement (sans phase de latence) (Figure 31b) la densité optique n'a pas cessée d'augmenter, elle a évolué de 0,131 à 1,892 en seulement 96 h de culture contrairement à la précédente culture sans biostimulation. Aldrett et al., (1997); Ward et al., (2003) rapportent que l'âge et l'état des micro-organismes inoculée a un impact significatif sur la dégradation des NAPLs car pour favoriser la croissance et l'activité microbienne il est essentiel que des micro-organismes adaptés soient disponibles, ainsi que des nutriments nécessaires (azote et phosphore) et les conditions de pH et d'O₂. Il faut noter que les nutriments stimulent la croissance des micro-organismes indigènes qui peuvent cataboliser les polluants ciblés (Perry et al., 2004).

6.4 *Dietzia sp* CNJ898 PLO4

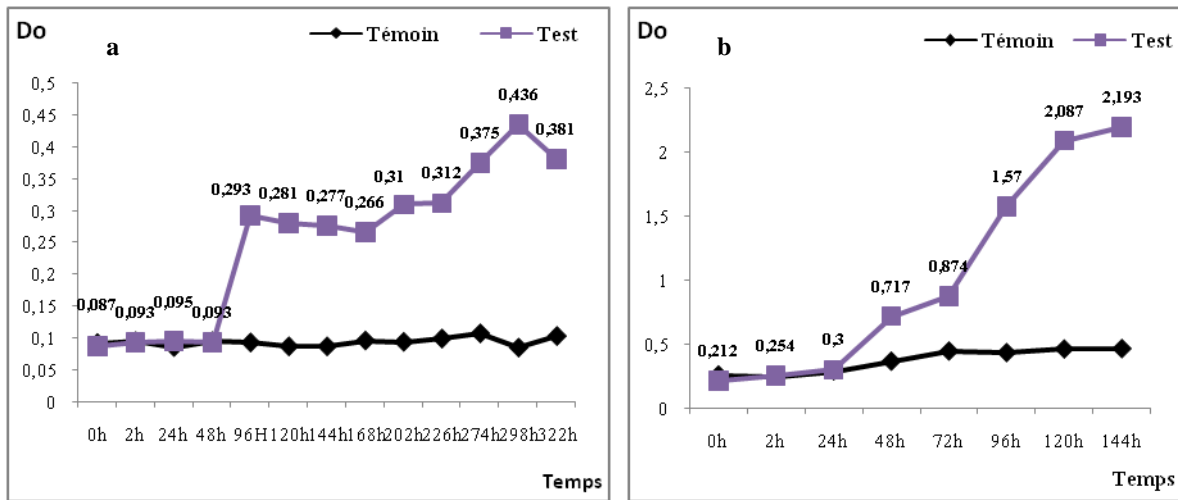


Figure 32. Croissance de *Dietzia sp* CNJ898 PLO4 en présence de l'essence a : sans bio-stimulation, b : avec bio-stimulation (N/P=1/1)

Le dédoublement cellulaire de *Dietzia sp* CNJ898 PLO4 vient après 24 h d'incubation dans un milieu bio-stimulé (Figure 32b) en absence de biostimulation (Figure 32a) avec un rapport (N/P =1/1) avec respectivement des densités optiques de 2,193 et 0,436. Globalement les bactéries autochtones sélectionnées du littoral Est-Algérien ont utilisées les hydrocarbures suivants comme seules sources de carbone et d'énergie pour effectuer leur croissance **Tableau 9** ci-dessous.

Tableau IX. Résultats global de la croissance des bactéries sélectionnées avec les hydrocarbures testés

Hydrocarbures utilisé :	<i>V.alginolyticus</i> PB-WC 11099	<i>E. aurantiacum</i> strain NB11_3A	<i>H. venusta</i> strain NY-8	<i>Dietzia sp</i> CNJ898 PLO4
n-alcane :				
Hexane	+	+	+	+
Heptane	+	+	+	+
Décane	+	+	+	+
Cyclo-hexane	+	+	+	+
Carburant raffinés :				
Essence normale	+	+	+	+
Pétrole brut	+	+	+	+

7 Dosage des hydrocarbures totaux après croissance *in vitro*

Les résultats obtenus des taux des hydrocarbures totaux réalisés après croissances des quatre bactéries autochtones sélectionnées du littoral est- algérien : *V.alginolyticus* PB-WC 11099 , *Exiguobacterium aurantiacum* strain NB11_3A , *Halomonas venusta* strain NY-8 et *Dietzia sp* CNJ898 PLO4 sont représentés dans le **tableau 10** suivant :

Tableau X. Quantités des hydrocarbures totaux après croissance des souches bactériennes sélectionnées

Hydrocarbure	Témoin	<i>Vibrio alginolyticus</i> PB-WC 11099	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> strain NB11_3A	<i>Halomonas venusta</i> strain NY-8	<i>Dietzia sp</i> CNJ898 PLO4
Hexane	27	05,13 ± 0,23	03,48 ± 0,84	07,25 ± 00,20	05,93 ± 00,53
Heptane	27	03,76 ± 0,08	09,53 ± 0,73	03,12 ± 00,48	05,60 ± 00,80
Décane	27	04,43 ± 0,23	06,53 ± 1,27	11,35 ± 01,65	05,20 ± 00,40
Cyclo-hexane	27	07,07± 0,33	21,23 ± 1,07	08,60 ± 00,20	11,47 ± 00,27
Esence	27	13,66± 0,3	9 ± 0,2	10 ± 0,16	07,93 ± 0,09

Toutes les souches semblent dégrader les hydrocarbures avec des taux différents. Ainsi, la dégradation maximale est obtenue avec *Halomonas venusta* strain NY-8 en présence de heptane 03,12 mg/l, suivi par la dégradation d'hexane avec *Exiguobacterium aurantiacum* strain NB11_3A avec un taux de 3,48 mg / l et de *Vibrio alginolyticus* PB-WC 11099 avec heptane avec une valeur de 3,76 mg / l. Selon **Head et al., (2006); Coulon et al., (2007); Dubinsky et al.,(2013)** toutes les espèces bactériennes ne présentent pas un taux similaire de dégradation des hydrocarbures, la biodégradation des différents composés entraîne une variation des sources de carbone disponibles dans le milieu au fur et à mesure du processus de biodégradation. Avec *Exiguobacterium aurantiacum* strain NB11_3A nous avons le plus faible taux de dégradation en présence de cyclohexane à savoir 21,23 mg/l. Le *Vibrio alginolyticus* PB- WC 11099 a donné les meilleurs résultats avec tous les hydrocarbures testés (alcanes) (**Tableau 10**).

La dégradation de l'hydrocarbure raffiné essence a été observée avec toutes les espèces bactériennes sélectionnées avec des taux différents aussi il faut dire que toutes les conditions nécessaire à la croissance et à la biodégradation *in vitro* ont été respectées comme le pH de l'eau de mer synthétique (8,18) qui semble tout à fait favorable pour la dégradation des

hydrocarbures pétroliers (Swanell et al., 1996), ainsi que la température 30°C . Pour les buts de biodégradation l'optimum de température est entre 30 et 40°C (Feitkenhauer et al., 2003) sans oublier l'addition de l'azote et du phosphore car selon Hassanshahian et al., (2010) ; Das et al., (2006) les éléments nutritifs comme l'azote et le phosphore quand ils sont ajoutés à un milieu contaminé pour stimuler la croissance micro-organismes qui dégradent les hydrocarbures à comme conséquence l'augmentation du taux de biodégradation de polluants , les travaux concernant la biodégradation de l'essence mentionnaient un taux global de dégradation important (Yerushalmi et al., 1998; Zhou et al., 1995), la biodégradation de l'hydrocarbure raffiné le carburant «essence» par *Dietzia sp CNJ898 PLO4* semble donner un taux plus bas d'hydrocarbure résiduel après croissance et qui est de 7,93 mg par 1 ml d'eau de mer analysé par rapport aux autre souches sélectionnées testées (Tableau 10) ceci peut s'explique par le fait que *Dietzia sp CNJ898 PLO4* a auparavant montrée une croissance en présence des alcanes qui sont des composant majeurs de l'essence. Cette espèce utilise aussi un large spectre d'hydrocarbure comme seule source de carbone et d'énergie.

8 Analyse statistique

L'analyse MANOVA avec le seuil $\alpha = 0,05$ montre que les valeurs de p sont généralement inférieures à α ainsi on rejette l'hypothèse nulle. Ainsi, en utilisant le test de Scheffé avec des souches *Exiguobacterium aurantiacum strain NB11_3A* et *Vibrio alginolyticus PB- WC 11099*, Il n'y a pas de différence significative par rapport à l'heptane, la même chose pour *Halomonas venusta strain NY- 8* avec l'hexane.

Pour un seuil de $\alpha = 0,01$, comme la majorité des valeurs de p sont inférieures à 0,01, nous avons la preuve suffisante qu'à $\alpha = 0,01$, la corrélation n'est pas nulle, Il existe des différences très importantes dans la dégradation des hydrocarbures avec le *Exiguobacterium aurantiacum strain NB11_3A* (en utilisant le test de Fisher).

Les résultats ont été confirmés par des corrélations partielles pour chaque variable (*Exiguobacterium aurantiacum strain NB11_3A*, $r = 0,971$, *Vibrio alginolyticus PB- WC 11099*, $r = 0,968$, *Halomonas venusta strain NY- 8*, $r = 0,971$ et *Dietzia sp CNJ898 PLO4*, $r = 0,922$ (Annexe 2).

Conclusion

Conclusion

Le littoral Est- algérien est exposé à plusieurs types de pollutions dont la plus importante est celle due aux hydrocarbures. La pollution par les hydrocarbures et leurs dérivés constitue une menace sérieuse pour les écosystèmes marins. Notre objectif consiste à isoler et identifier des bactéries autochtones, à partir du littoral Est-algérien, ayant un pouvoir auto-épurateur vis-à-vis des différents types d'hydrocarbures.

Dans notre étude des échantillons d'eau de mer ont été prélevés des deux ports situés dans les villes côtières d'Annaba et El-Kala. Le port d'Annaba fait partie des dix principaux ports de commerce d'Algérie, Le port d'El-Kala est un petit port avec une infrastructure simple caractérisé par une très forte activité de pêche.

Les échantillons d'eau de mer ont été prélevés au niveau des ports dans des stations polluées par des huiles de moteurs et d'hydrocarbures. Les résultats des analyses physico-chimiques ont montrés que le taux le plus élevé en hydrocarbures totaux (THT) a été enregistré au niveau de l'eau de mer du port d'Annaba et est de l'ordre de 111 mg.L^{-1} . Il est dix fois supérieur à la norme algérienne qui préconise une valeur limite des hydrocarbures totaux de 10 mg.L^{-1} . Le taux au niveau du port de pêche d'El-Kala est légèrement supérieur à la norme avec une valeur de $11,20 \text{ mg.L}^{-1}$.

Au total 53 souches et consortiums microbiens entre bactéries (Gram + et Gram -) et quelques espèces fongiques (levures) ont été isolées à partir des échantillons d'eau de mer pollués par les hydrocarbures au niveau des deux ports précités. Afin de sélectionner des souches hydrocarbonoclastes, les espèces isolées ont été mis en culture dans un milieu gélosé eau de mer synthétique seule et en présence de deux sources différentes de carbone comme le glucose et le pétrole brut comme unique source de carbone et d'énergie. En se basant sur l'aspect des cultures obtenus sur gélose eau de mer synthétique supplémenté par le pétrole brut et la rapidité de croissance des souchesensemencées, Quatre espèces bactériennes ont été choisies et sélectionnées. Une étude morphologique et une identification biochimique, moléculaire ainsi que des analyses phylogénétiques ont été réalisés pour les 4 souches bactériennes.

L'étude du potentiel de biodégradation des souches bactériennes isolées, *Vibrio alginolyticus* PB-WC 11099, *Exiguobacterium aurantiacum* strain NB11_3A, *Halomonas venusta* strain NY-8 et *Dietzia* sp CNJ898 PLO4 a été réalisée par un suivi de la cinétique de

croissance avec différentes classes d'hydrocarbures: les alcanes (Hexane, Heptane, Décane, Cyclo-hexane) et les hydrocarbures raffinés (essence) comme seule source de carbone et d'énergie,

Globalement les courbes de croissance obtenues ont montré que les bactéries autochtones sélectionnées du littoral Est-algérien ont utilisées les différents hydrocarbures testés comme unique source de carbone et d'énergie pour effectuer avec différents rythmes leur croissance.

Les résultats des dosages des hydrocarbures totaux réalisés après croissances des quatre bactéries autochtones sélectionnées avec les différents hydrocarbures testés montrent que les souches dégradent les hydrocarbures avec des taux différents. Ainsi, la dégradation maximale est obtenue avec *Halomonas venusta strain NY-8* en présence de heptane 03,12 mg/l, suivi par la dégradation d'hexane avec *Exiguobacterium aurantiacum strain NB11_3A* avec un taux de 3,48 mg / l et de *Vibrio alginolyticus PB- WC 11099* avec heptane avec une valeur de 3,76 mg / l. Toutes les espèces bactériennes ne présentant pas un taux similaire de dégradation des hydrocarbures, la biodégradation des différents composés entraîne une variation des sources de carbone disponibles dans le milieu au fur et à mesure du processus de biodégradation. Avec *Exiguobacterium aurantiacum strain NB11_3A* nous avons le plus faible taux de dégradation en présence de cyclohexane à savoir 21,23 mg/l. Le *Vibrio alginolyticus PB- WC 11099* a donné les meilleurs résultats avec tous les hydrocarbures testés (alcanes). La dégradation de l'hydrocarbure raffiné essence a été aussi observée avec toutes les espèces bactériennes sélectionnées avec des taux différents.

Dietzia sp CNJ898 PLO4 et *Vibrio alginolyticus PB-WC 11099* semblent utiliser une large gamme d'hydrocarbure comme seule source de carbone et d'énergie.

De tous les résultats obtenus nous pouvons conclure que les quatre souches bactériennes autochtones isolées et sélectionnées du littoral Est-algérien *V.alginolyticus PB-WC 11099*, *Exiguobacterium aurantiacum strain NB11_3A*, *Halomonas venusta strain NY-8* et *Dietzia sp CNJ898 PLO4* possèdent un potentiel pour la dégradation des hydrocarbures et présentent de réelles possibilités d'utilisation pour une bio-rémediation voire de lutte contre la pollution par les hydrocarbures dont souffre le littoral.

En perspective il serait intéressant de rechercher et d'étudier chez les souches bactériennes isolées :

- [01]. Les gènes responsables de la dégradation des alcanes.
- [02]. Les gènes responsables de la dégradation des mono-aromatiques.
- [03]. Les gènes responsables de la dégradation des hydrocarbures raffinés (carburants).

- [04]. La nature biochimique des biosurfactants libérés et leur action sur l'adsorption des différents hydrocarbures pour chaque souche.
- [05]. La biodégradation intrinsèque des différents hydrocarbures constituant les carburants.
- [06]. La biodégradation intrinsèque des différents hydrocarbures constituant le pétrole brut.
- [07]. Le potentiel de biodégradation des hydrocarbures poly-aromatiques (HAP).
- [08]. Le potentiel de biodégradation des hydrocarbures mono-aromatiques (BTEX).

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

- [01]. **Abalos, A., Viñas, M., Sabaté, J., Manresa, MA. & Solanas, AM. (2004).** Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodégradation*. 15: (4):249-60.
- [02]. **Agteren, M. H. V., Janssen, D. B. & Keuning, S. (1998).** Handbook on biodegradation and biological treatment of hazardous organic compounds, Kluwer Academic Publishers.
- [03]. **Albro, P.W., (1976).** In: Chemistry and biochemistry of natural walls (Colattukudy, P.E., Eds). Elsevier, Amsterdam.
- [04]. **Albakjaji, M. (2011).** La pollution de la mer méditerranée par les hydrocarbures liée au trafic maritime. Thèse de Doctorat, Université de Paris- Est. 298 p.
- [05]. **Aldrett, S., Bonner, J.S., Mills, M.A., Autentrieth, R.L. & Stephens, F.L.(1997).** Microbial degradation of crude oil in marine environments tested in a flask experiment. *Water Research* 31, 2840-2848.
- [06]. **Alexander, M. (1994).** Biodegradation and bioremediation. San Diego: Academic Press.
- [07]. **Al-Awadhi, H., Sulaiman, R.H.D., Mahmoud, H.M. & Radwan, S.S. (2007).** Alkaliphilic and halophilic hydrocarbon- utilizing bacteria from Kuwaiti coasts of the Arabian Gulf. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77, 183-186.
- [08]. **Alisi, C., Musella, R. Tasso, F. Ubaldi, C., Manzo, S., Cremisini, C. & Sprocati, AR. (2009).** Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Sci Total Environ.* 407: 3024-3032.
- [09]. **Andreoni, V. & Gianfreda, L. (2007).** Bioremediation and monitoring of aromatic polluted habitats. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76(2): 287-308.
- [10]. **Arahal, D.R. & Ventosa, A. (2006).** The family Halomonadaceae. In: Dworkin M, Schleifer KH, Stackebrandt (eds) *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria*, 3 rd edn. Springer-Verlag, New York.
- [11]. **Arvin, E., Jensen, B.K. & Gundersen, A.T. (1989).** Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55,3221-3225.
- [12]. **Atlas, R.M. (1975).** Effect of the temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation *Applied Microbiology* 30,396-403.
- [13]. **Atlas, RM. (1981).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45:180-209.
- [14]. **Atlas, R.M. (1984).** Petroleum microbiology. McGraw-Hill, New York.
- [15]. **Atlas, R.M. (1995).** Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Mar. Pollut. Bull.*, 31: 178-182.

- [16]. **Atlas, R.M. & Atlas, M.C.(1991)**. Biodegradation of oil and bioremediation of oil spills. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2: 440-443.
- [17]. **Atlas, R.M. & Bartha, R. (1972)**. Degradation and mineralization of petroleum in seawater: limitation by nitrogen and phosphorus. *Biotechnology and Bioengineering* 14: 309-317.
- [18]. **Atlas, R. M. & Bartha, R. (1998)**. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*, 4/E. Pearson Education India.
- [19]. **Bachofen, R., (1982)**. Production of hydrocarbons by *Botryococcus braunii*. *Experientia* 38,47-49.
- [20]. **Badjagbo, K. (2009)**. Développement de méthodes d'analyse directe de polluants organiques volatils à l'état de traces dans l'air et les biogaz. Thèse de Doctorat (Ph.D)., Université de Montréal. p.8.
- [21]. **Baillache. J. & Duclaux. X. (1974)**. Les pétroliers à ballast séparés Editions nouveautés techniques maritimes. 92 p.
- [22]. **Ballerini, D. & Vandecasteele, J-P. (1999)**. La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques in Scriban R. *Biotechnologie ,Londres- New York-Paris Technique et Documentation*, 849.
- [23]. **Barth, H. J.(2003)** . The influence of *Cyanobacteria* on oil polluted intertidal soils at the Saudi Persian Gulf shores. *Marine Pollution Bulletin* 46, 1245-52.
- [24]. **Bartha R.(1986)**. *Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation*. *Microbial. Ecol.* **12**, 155.
- [25]. **Bartha, R. & Atlas, R.M. (1977)**. The microbiology of aquatic oil spills. *Advances in Applied Microbiology*, 22, 225-266.
- [26]. **Batissou, I., Crouzet, O., Hoggan, P.B., Sancelme, M., Mangot, J.F., Mallet,C. & Bohatier, J.(2009)**. Isolation and characterization of mesotriene-degrading *Bacillus* sp. from soil, *Environmental Pollution*, 157, 1195–1201.
- [27]. **Belfiore, C., Ordoñez, OF. & Farías, ME. (2013)**. Proteomic approach of adaptive response to arsenic stress in *Exiguobacterium* sp. S17, an extremophile strain isolated from a high-altitude Andean Lake stromatolite. *Extremophiles : life under extreme conditions* 17:421–31.
- [28]. **Ben Kahla-Nakbi, A., Besbes, A., Chaieba, K., Rouabhiab, M. & Bakhroufa, A.(2007)**. Survival of *Vibrio alginolyticus* in seawater and retention of virulence of its starved cells. *Marine Environmental Research*, 46: 469-478.
- [29]. **Bertin, L. Di Gioia, D. Barberio, C. Salvadori, L. Marchetti, L. & Fava, F. (2007)**. Biodegradation of polyethoxylated nonylphenols in packed-bed biofilm reactors. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46:6681–7.
- [30]. **Bertrand, J.C. & Mille, G. (1989)**. Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les Hydrocarbures. *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Bianchi M., Marty D., Bertrand J.C., Caumette P., Gauthier M.J. et al.éds. Masson publ., Paris: 343-385.

- [31]. **Bertrand, J.C., Esteves, J.L., Mulyono, M. & Mille, G. (1986).** Use of continuous flow through systems to determine petroleum hydrocarbon evolution in superficial marine sediments. *Chemosphre* 15,205-210.
- [32]. **Batista, S.B., Mounteer, A., Amorim, F.R. & Totola, M.R. (2006).** Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. *Bioresour. Technol.*, 97: 868-75.
- [33]. **Bazylnski, D. A., Wirsén, C.O. & Jannasch, H.W. (1989)** Microbial Utilization of Naturally-Occurring Hydrocarbons at the Guaymas Basin Hydrothermal Vent Site. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (11), 2832–2836.
- [34]. **Bianchi, M. & Martyet, D. et al. (1988).** Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques. Paris.
- [35]. **Bihari,Z.,Szabo,Z.,Szvetnika.,Balazs,M.,Bartos,P.,Tolmacsov,P.,Zambou,Z. & Kiss,T. (2010).** Characterization of a novel log chain n-alkane degrading strain, *Dietzia* sp.E₁, *Zeitschrift fur Naturforschung C. Journal* 65,693-700.
- [36]. **Bjørseth, A., Lunde, G. & Lindskog, A. (1979).** Long-range transport of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Atmospheric Environment*, **13**(1), 45-53.
- [37]. **Blumer, M., Guillard, R.R.L. & Chase,T. (1971).** Hydrocarbons of Marine Phytoplankton. *Marine Biology* 8, 183- 189.
- [38]. **Blumer, M. (1976).** Polycyclic aromatic compounds in nature. *Scientific America*, 234(3), 35-45.
- [39]. **Blumer, M. & Youngblood, W. W. (1975).** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils and Recent Sediments. *Science*, 188(4183), 53-55.
- [40]. **Bogan, B.W., Lahner, L.M., Sullivan, W.R. & Paterek, J.R. (2003)** Degradation of straight-chain aliphatic and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by a strain of *Mycobacterium austroafricanum*. *Journal of Applied Microbiology*. 94(2):230–239.
- [41]. **Bohatier, J. (2009).** Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil, *Environmental Pollution*, 157, 1195–1201.
- [42]. **Borloo, J.L. (2009).** Le livre bleu des engagements du Grenelle de la mer. Ed. Meeddm Paris .P.21.
- [43]. **Bordenave, S., Goñi-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, 6089-6097.
- [44]. **Borzenkov, I.A., Milekhina, E. I., Gotoeva, M. T., Rozanova, E. P. & Belyaev, S.S.(2006).**The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tatarstan, Western Siberia, and Vietnam, *Microbiology journal* 75,66-72.
- [45]. **Bouchez-naitalim, Rakatozafyh, Marchal,R., Leveauj,Y. & Vandecasteele, J.P.(1999).** Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J. App. Microbiol.* 86, 421.

- [46]. **Boukir, A., Guillano, M., Doumenq, P., El hallaoui, A. & Mille, G. (1998).** Caractérisation structurale d'asphaltènes pétroliers par spectroscopie infrarouge (IRTF). Application à la photo-oxydation. *Electrochimie et Photochimie. C. R. Acad. Sci. Paris*, t. 1, Série II c, p. 597-602.
- [47]. **Brossard, H. & Terry, O., (1989).** Bactériologie systématique I. Centre de documentation pédagogique. p. 94.
- [48]. **Brito, E.M.S., Guyoneaud, R. Goñi-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., Crapez, M.A.C., Wasserman, J.C.A. & Duran, R. (2006).** Characterization of
- [49]. hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in Microbiology*. In press.
- [50]. **Boukir, A., Guillano, M., Doumenq, P., El hallaoui, A. & Mille, G. (1998).** Caractérisation structurale d'asphaltènes pétroliers par spectroscopie infrarouge (IRTF). Application à la photo-oxydation. *Electrochimie et Photochimie. C. R. Acad. Sci. Paris*, t. 1, Série II c, p. 597-602.
- [51]. **Cappello, S., Genovese, M., Della Torre, C., Crisari, A., Hassanshahian, M., Santisi, S., Calogero, R. & Yakimov, M.M. (2012).** Effect of bioemulsificant exopolysaccharide EPS 2003 on microbial community dynamics during assays of oil spill bioremediation: a microcosm study, *Marine Pollution Bulletin* ;64 (12),2820–2828.
- [52]. **Cao, B., Nagarajan, K. & Loh, K.C. (2009).** Biodegradation of aromatic compounds: current status and opportunities for biomolecular approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*85:207–2282.
- [53]. **Cao, J., Lai, Q. & Yuan, J.(2015).** Genomic and metabolic analysis of fluoranthene degradation pathway in *Celeribacter indicus* P73T. *Sci Rep.*13 (5):77417753.
- [54]. **Cappello, S., Denaro, R., Genovese, M., Giuliano, L., Yakimov, M.M. (2007b).** Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on oil spill bioremediation in mesocosms. *Microbiol. Res*, 162(2): 185-190.
- [55]. **Carmichael, L.M., Pfaender, F.K. (1997).** The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. *Biodegradation* 8, 1-13.
- [56]. **Carneiro, AR., Ramos, RTJ., Dall’Agnol, H., Pinto, AC., Soares, SDC., Santos, AR., Guimarães, LC., Almeida, SS., Baraúna, RA., das Graças, DA., Franco, LC., Ali, A., Hassan, SS., Nunes CIP., Barbosa, MS., Fiaux, KK., Aburjaile, FF., Barbosa, EGV., Bakhtiar, SM., Vilela, D., Nóbrega, F., dos Santos, AL., Carepo, MSP., Azevedo, V., Schneider, MPC., Pellizari, VH., Silva, A., de Castro Soares, S., Santos, AR., Guimarães, LC., Almeida, SS., Baraúna, RA., das Graças DA., Franco LC., Ali A., Hassan, SS., Nunes, CIP., Barbosa MS., Fiaux, KK., Aburjaile, FF., Barbosa, EGV., Bakhtiar, SM., Vilela, D., Nóbrega, F., dos Santos, AL., Carepo, MSP., Azevedo, V., Schneider, MPC., Pellizari, VH., Silva, A. (2012).** Genome sequence of *Exiguobacterium antarcticum* B7, isolated from a biofilm in Ginger Lake, King George Island, Antarctica. *Journal of Bacteriology* 194:6689–90.

- [57]. **Caruso, G., Denaro, R., Genovese, M., Giuliano, L., Mancuso, M. & Yakimov M. (2004).** New methodological strategies for detecting bacterial indicators. *Chemistry and Ecology* ; 20 (3) 167–181.
- [58]. **Cerniglia, C. E. (1992).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3(2): 351-368.
- [59]. **Chaillan, F., Chaineau, C.H., Point, V., Saliot, A. & Oudot, J. (2006).** Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings. *Environmental Pollution*. In Press.
- [60]. **Chaineau, C.H., Rougeux G., Yepremian, C. & Oudot, J. (2005).** Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil. Biol. Biochem.*37:1490-1497.
- [61]. **Choi, S-C., Kwon, K.K., Sohn, J.H. & Kim, S-J. (2002).** Evaluation of fertilizer additions to stimulate oil biodegradation in sand seashore mesocosms. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12:431-436.
- [62]. **Clark, R.C.JR. & Blumer, M. (1967).** Distribution of n-parafins in marine organisms and sediment. *Limnol. Oceanogr.*12, 79-87.
- [63]. **Clarridge, J.E., III (2004).** Impact of 16S r RNA Gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin microbial Rev* 17,840-862.
- [64]. **Coates, J.D. & Woodward, J. et al. (1997).** Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum- contaminated marine harbor sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (9):3589-3597.
- [65]. **Colquhoun, J. A., Mexson, J., Goodfellow, M., Ward, A.C., Horikoshi, K. & Bull, A.T. (1998)** Novel *Rhodococci* and other mycolate actinomycetes from the deep sea, *Antonie van Leeuwenhoek* 74,27-40.
- [66]. **Colombano, S., Guerin, V., Saada, A., Hiez, D. & Bomer, H. (2008).** Journée Technique d'information et de retour d'expérience de la gestion des sols pollués. Les Diagnostiques - Objectifs, enjeux & moyens. In Gouvernement de France. Ministère
- [67]. De l'écologie, du développement durable et de l'énergie.
- [68]. **Commendatore, M.G. & Esteves, J.L. (2004).** Natural and anthropogenic hydrocarbons in sediments from the Chubut River (Patagonia, Argentina). *Marine Pollution Bulletin* 48: 910-918.
- [69]. **Cooney, J.J. (1984).** The fate of petroleum pollutants in freshwater ecosystems. In *Petroleum Microbiology*, R.M. Atlas, Ed. (New York: Mac Millan Publishing Co., Inc.) pp.399-433.
- [70]. **Coulon, F. & Delille, D. (2003).** Effects of biostimulation on growth of indigenous bacteria in sub-antarctic soil contaminated with oil hydrocarbons. *Oil & Gas Science and Technology* 58 (4): 469- 479.
- [71]. **Coulon, F., McKew, B.A., Osborn, A.M., McGenity, T.J. & Timmis, K.N. (2007).** Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environmental Microbiology* 9:177-186.

- [72]. **Cunha, C.D. & Leite, S.G.F. (2000).** Gasoline biodegradation in different soil microsoms. *Braz. J. Microbiol.*, 31, 45-49.
- [73]. **Das, K., Ashis, K. & Mukherjee, F. (2006).** Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*; 98 1339-1345.
- [74]. **Das, N. & Chandran, P.(2011).**Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants : An overview, *Biotechnology Research International* ,1-13.
- [75]. **Dash, H.R., Mangwani, N. Chakraborty, J., Kumari, S. & Das, S. (2013).** Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:561-571.
- [76]. **Datsghreib, S.M.M., Ammozegar, M.A., Khajeh, K., Shavandi, M. & Ventosa, A. (2012).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95: 789-798.
- [77]. **Dawson, M. P., Humphrey, B. A. & Marshall, K. C. (1981).** Adhesion: a tactic in the survival strategy of a marine vibrio during starvation. *Curr Microbiol* 6, 195–199.
- [78]. **Delille, D., Basseres, A. & Dessommès, A. (1998).** Effectiveness of bioremediation for oil-polluted Antarctic seawater. *Polar Biol.* 19(4), 237–241.
- [79]. **Dellile, D. (2000).** Response of Antarctic soil bacterial assemblages to contamination by diesel fuel and crude oil. *Microbial Ecology* 40(2): 159-168.
- [80]. **Denier van der Gon, H., Van het Bolscher, M., Visschedijk, A. & Zandveld, P. (2007).** Emissions of persistent organic pollutants and eight candidate POPs from UNECE-Europe in 2000, 2010 and 2020 and the emission reduction resulting from the implementation of the UNECE POP protocol. *Atmospheric Environment*, 41(40), 9245-9261.
- [81]. **De la Habba, RR., Arahall, DR, Ma´rquez, MC. & Ventosa, A. (2010).** Phylogenetic relationships within the family Halomonadaceae based on comparative 23S and 16S rRNA gene sequence analysis. *Int J Syst Evol Microbiol* 60:737–748.
- [82]. **De Oteyza, T.G., Grimalt, J.O., Diestra, E., Sole, A. & Esteve, I., (2004).** Changes in the composition of polar and apolar crude oil fractions under the action of *Microcoleus* consortia. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 226-232.
- [83]. **Dobson, S.J. & Franzmann, P.D.(1996).** Unification of the genera *Deleya*, *Halomonas*, and *Halovibrio* and the species *Paracoccus halodenitrificus* into a single genus *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 550-558.
- [84]. **Di Lecce, C., Accarino, M., Bolognese, F., Galli, E. & Barbieri, P. (1997).** Isolation and metabolic characterization of a *Pseudomonas stutzeri* mutant able to grow on the three isomers of xylene. *Microbiol.*, 63, 3279-3281.
- [85]. **Dibble, J.T. & Bartha, R. (1979).** Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and environmental Microbiology* 37,729-739.

- [86]. **Dubinsky, E.A., Conrad, M.E., Chakraborty, R., Bill, M., Borglin, S.E., Hollibaugh, J.T., Mason, O.U.M. Piceno, Y. Reid, F.C., Stringfellow, W.T., Tom, L.M., Hazen, T.C. & Andersen, G.L. (2013).** Succession of Hydrocarbon-Degrading Bacteria in the Aftermath of the Deepwater Horizon Oil Spill in the Gulf of Mexico. *Environmental Science & Technology* 47:10860-10867.
- [87]. **Duckworth, A.W., Grant, S., Grant, W.D., Jones, B.E. & Meijer, D. (1998).** *Dietzia natronolimnaios* sp.nov., a new member of the genus *Dietzia* isolated from an east African soda lake, *Extremophile* 2,359-366.
- [88]. **Dupuis, A. & Ucan-Marin, F. (2015).** A literature review on the aquatic toxicology of petroleum oil: An overview of oil properties and effects to aquatic biota. *DFO Can. Sci.*
- [89]. **Dyksterhouse, S.E., Gray, J.P., Herwig, R.P., Lara, J.C. & Staley, J.T.(1995)** *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *International Journal Systematic Bacteriology* 1995; 45 116-123.
- [90]. **Edwards, N. T. (1983).** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH's) in the Terrestrial Environment A Review. *Journal of Environmental Quality*, **12**(4), 427-441.
- [91]. **Gong Y, Zhao X, Cai Z, O'Riely S, Hao X, Zhao D. (2013).** 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*.
- [92]. **Koller, E.(2004),** Traitements des pollutions industrielles ,Eau, Air, Déchets, Sols, Boues, édition Dunod, Paris ,2004 , page 8.
- [93]. **Engelhardt, M.A., Daly, K., Swannell, R.P.& Head, I.M.(2001).** Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading, Gram positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. nov. *Journal Applied Microbiology* 2001; 90 237-247.
- [94]. **Ennadir, J., Hassiko, R., Al askari, G., Arahou, M., Bouazza, F., Amallah, L., Amine, S.A. & Khedid, K. (2014).** Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées des farines de blé d'origine marocaine. *5 (4) : 1125-1132.*
- [95]. **Escobar, M., Márquez, G., Azuaje, V., Da silva, A. & Tocco, R., (2012).** Use of biomarkers, porphyrins, and trace elements to assess the origin, maturity, biodegradation, and migration of Alturitas oils in Venezuela. *Fuel* 97: 186-196.
- [96]. **Fayolle, F., Vandecasteele, J-P. & Monot, F. (2001)** .Microbial degradation and fate in the environment of methyl *tert*-butyl ether and related fuel oxygenates. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 56:339–349.
- [97]. **Franzmann, P.D., Wehmeyer, U. & Stackebrandt, E.(1988).**:*Halomonadaceae* fam.nov .,a new family of the class *Proteobacteria* to accomodate the genera *Halomonas* and *Deleya*, *Systematic and Applied and Microbiology*, 11, 16-19 .
- [98]. **Feitkenhauer, H., Müller, R. & Märkl, H. (2003).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 60-70 degrees C by *Thermus* and *Bacillus* spp. *Biodegradation.* 14:367-72.51. Pollard SJT, Heneday SE, Fedorak.

- [99]. **Forget, D. (1997)**. Caractérisation d'un nouveau milieu filtrant pour la biofiltration in situ des BTEX dans les eaux souterraines. Mémoire 0-612-26469-6. Université de Montréal : Montréal. 167 p.
- [100]. **Gubiac, F., Naboulet Saint- Pée, N. (1992)**. Travaux dirigés et exercices de microbiologie. p.18.
- [101]. **Garcia, M.T., Mellado, E., Ostos, J.C. & Ventosa, A. (2004)**. *Halomonas organivorans* sp.nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. Int. J. Syst .Evol.Microbiol.54:1723-1728.
- [102]. **Ghanavati, H., Emtiazi, G. & Hassanshahian, M. (2008)**. Synergism effects of phenol degrading yeast and Ammonia Oxidizing Bacteria for nitrification in coke wastewater of Esfahan Steel Company. Waste Management & Research 2008; 26(2) 203-208.
- [103]. **Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P. & Bertrand, J.C. (1992)**. *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new extremely halotolerant, hydrocarbonodegrading marine bacterium. Int J Syst Bacteriol 1992, 42:568-576.
- [104]. **Gelpi, E., Schneider, H.J., Mann, J. & Oro, J. (1970)**. Hydrocarbons of geochemical significance in microscopic algae. Phytochemistry 9, 603-612.
- [105]. **Gilewicz, M., Nimatuzahroh, T., Nadalig, H., Budzinski, P., Doumenq, V., Michotey, J.C. & Bertrand J.C. (1997)**. Isolation and characterization of a marine bacterium capable of utilizing 2-methylphenanthrene. Applied Microbiology Biotechnology 1997; 48 528-533.
- [106]. **Gita M. & Suparna M. (2008)**.Taux de biodégradation de diesel n-alkane par les cultures bactériennes *Exiguobacterium aurantiacum* et *Burkholderia cepacia*, Indian Journal of Biotechnology Vol 7,pp 295-306.
- [107]. **Gogoi, B.K., Dutta, N.N., Goswami, P. & Krishna, T.R.M. (2003)**. A case study of bioremediation of petroleum- hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. Advances in Environmental Research 7,767-782.
- [108]. **Golyshin, P.N., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Lunsdorf, H., Timmis, K.N., Yakimov, M.M.(2002)**. *Oleiphilaceae* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a Crude Oil Biodegradation in the Marine Environments <http://dx.doi.org/10.5772/55554> 129 novel marine bacterium that obligatory utilizes hydrocarbons. International Journal Systematic Bacteriology. 52 (Pt 3): 901-11.
- [109]. **Guiraud, J. (1998)**. Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris. p.224-232
- [110]. **Grossart, H. P., Levold, F., Allgaier, M., Simon, M. & Brinkhoff, T. (2005)**. Marine diatom species harbour distinct bacterial communities, Environmental Microbiology, 7, 860-873.
- [111]. **Hada, H.S. & Sizemore, R.K. (1981)**. Incidence of plasmids in marine *Vibrio* spp.isolated from an oil field in the northwestern Gulf of Mexico. Applied and environmental microbiology 41(1):199-209.

- [112]. **Hambrick, G.A., Delaune, R.D. & Patrick, W.H.Jr. (1980).** Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potential on microbial hydrocarbon degradation. *Applied Environmental Microbiology* 40,365-369.
- [113]. **Happold, F.C. & Key, A. (1932).** The bacterial purification of gasworks' liquors: the action of the liquors on the bacterial flora of sewage. *Hygiene*.32:573.
- [114]. **Hassanshahian, M., Emtiazi, G., Kermanshahi, R. & Cappello, S. (2010).** Comparison of oil degrading microbial communities in sediments from the Persian Gulf and Caspi Caspian Sea. *Soil and Sediment Contamination*. 19 (3), 277-291.
- [115]. **Haslay, C. & Leclerc, H. (1993).** *Microbiologie des eaux d'alimentation*. Ed. Technique & Documentation- Lavoisier. p.40
- [116]. **Head, I. M., Gray, N. D., Larter, S. R. (2014).** Life in the slow lane; biogeochemistry of biodegraded petroleum containing eservoirs and implications for energy recovery and carbon management. *Front. Microbiol.* 5.10.3389.
- [117]. **Head, IM., Jones, DM. & Ro" ling, WFM. (2006).** Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:163–182.
- [118]. **Head, I.M. & Swannell, R.P.J. (1999).** Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Current Opinion in Biotechnology* 10(3):234-239.
- [119]. **Head, I.M., Jones, D.M. & Röling, W.F.M. (2006).** Marine micro-organisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:173–182.
- [120]. **Heldund, B.P., Staley, J.T. (2001).** *Vibrio cyclotriphycus* sp.nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 61-66.
- [121]. **Houma, F. (2005(a)).** The development of a methodology to characterise and determine the sea water pollution by hydrocarbons using satellite images. 3red International Conference on Marine Waste Discharges and Marine Environment CIESM Espagne 2004; INOC Izmir Turkey 12- 14.
- [122]. **Iqbal, S., Khalid, Z.M. & Malik, K.A.(1995).** Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma ray-induced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*, *Letters in Applied Microbiology*, 21: 176- 179.
- [123]. **Janda, J.M. & Abott, S.L. (2007).** 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2761- 2764.
- [124]. **JORA N°63 du 08 Octobre 2006**
- [125]. **Johnsen, A. R. & Karlson, U. (2007).** Diffuse PAH contamination of surface soils: environmental occurrence, bioavailability, and microbial degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76 (3), 533-43.
- [126]. **Juhasz, A.L. & Naidu, R. (2000).** Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [a] pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation* 45:57-88.

- [127]. **Junqua, G., Gonzalez, C. & Touraud, (2009)**. Main existing methods for chemical monitoring, in: Gonzalez, C., Greenwood, R., Quevauviller, P., *Rapid Chemical and Biological Techniques for Water Monitoring*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp 79-90.
- [128]. **Karami, K., Zolgharnei, H., Assadi, MM., Savari, a., Dadollahi, S. (2011)**. New Report on the Occurrence of *Exiguobacterium* sp. AT1b in the Persian Gulf and its Resistance to Mercury Pollution. *Current Research in Bacteriology* 4:23–27.
- [129]. **Moxlery, K. & Schmidt, S.(2010)**, preliminary characterisation of an estuarine, benzoate- utilizing *Vibrio* sp.isolated from Durban Harbour, South Africa, Kiyohara et Nagao .
- [130]. **Keith, L. & Telliard, W. (1979)**. ES&T Special Report: Priority pollutants: I-a perspective view. *Environmental Science & Technology*, **13**(4), 416-423.
- [131]. **Kelly, K. & Harder, B. (2005)**. BTEX: Complete Resolution in Under 6.5 Minutes. In *The Application Notebook, LC GC Europe*; Matheson, A., Ed. Advanstar Communications: Chester. pp. 1-2.
- [132]. **Kim, S., Choi, D.H., Sim, D.S. & Oh, Y. (2005)**. Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand. *Chemosph.* 59: 845-852.
- [133]. **Kim, IG., Lee, MH., Jung, SY., Song, JJ., Oh, TK., Yoon, JH. (2005)**. *Exiguobacterium aestuarii* sp. nov. and *Exiguobacterium marinum* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:885–889.
- [134]. **Kim, Y. H., Engesser, K. H. & Cerniglia, C. E. (2003)**. .Two polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone reductases from a pyrene-degrading *Mycobacterium*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **416**(2), 209-17.
- [135]. **Kiss,T.(2010)**.Characterization of a novel log chain n-alkane degrading strain, *Dietzia* sp.E₁, *Zeitschrift fur Naturforschung C. Journal* 65,693-700.
- [136]. **Kiyohara, H. & Nagao, K. (1978)**. The catabolism of phenanthrene and naphtalene by bacteria. *Journal of General Microbiology*.105: 69-75.
- [137]. **Klein, B., Grossi, V., Bouriat, P., Goulas, P., Grimaud, R. (2008)**. Cytoplasmic wax ester accumulation during biofilm-driven substrate assimilation at the alkane-water interface by *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SP17. *Res. Microbiol.* 159:137–144.
- [138]. **Kohno, T., Sugimoto, Y., Sei, K. & Mori, K. (2002)**. Design of PCR Primers and gene probes for general detection alkane-degrading bacteria. *Microbes and Environment*. 17 (3) 114-212.
- [139]. **Kremer, X.(2007)**. Lutte contre les pollutions portuaires de faible ampleur..Guide opérationnel.p.13-20.
- [140]. **Kumar, A., Singh, V. & Kumar, R. (2006)**.Characterisation of an alkaliphile, *Exiguobacterium* sp and it's application in bioremediation .In :International conference on extremophiles, Brest, France ,p L 89 Liu SL, Schryvers AB,Sa.

- [141]. **Kumar, S., Upadhyay, S.K., Kumari, B., Tiwari, S., Singh, S.N. & Singh, P.K. (2011)**. In vitro degradation of fluoranthene by bacteria isolated from petroleum sludge. *Bioresour. Technol.* 101, 310-316.
- [142]. **Lambert Castel, F., & Penot, M. (1981)**. Actions des pétroles de l'Amoco Cadiz sur la croissance et certains aspects du métabolisme d'une algue phytoplanctonique *Pavlova lutheri* (DROPP) Green. *In Indices Biochimiques et milieux marins*. Actes du colloque des journées du GABIM, 14, CNEXO, Brest, pp.411-422.
- [143]. **Lang, E. (1996)**. Diversity of bacterial capabilities in utilizing alkylated benzenes and other aromatics compounds. *Lett. Appl. Microbiol.*, 23, 257-260.
- [144]. **Leahy, J.G. & Colwell, R. (1990)**. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment, *Microbial reviews*, 54, 305-315. 68.
- [145]. **Leahy, J.G. & Olsen, R.H. (1997)**. Kinetics of toluene degradation by toluene-oxidizing bacteria as a function of oxygen concentration, and the effect of nitrate. *FEMS Microbiol Ecol.*, 23, 23-30.
- [146]. **Le Digabel, y. (2013)**. Étude de la diversité bactérienne et génétique dans des cultures dégradant l'ETBE ou le MTBE. Thèse de Doctorat, Université de Lyon. 149 p.
- [147]. **Lefebvre, G. (1978)**. Chimie des hydrocarbures. Publication de l'Institut Français du Pétrole. 284 p.
- [148]. **Liu, Y., Li, I., Wu, Y., Tian, W., Zhang, L., Xu, I., Shen, Q. & Shen, B. (2010)**. Isolation of an alkane- degrading *Alcanivorax* sp. Strain 2B5 and cloning of the *alkB* gene *Bioresour. Technol.* 101, 310-316.
- [149]. **Maeda, M., Roberts, M.S., Ohta, Y., Fuji, F., Travisano, M. & Kudo, T. (1998)**. Isolation and characterization of a new aromatic compound- degrading alkalitrophic bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44, 101-106.
- [150]. **Mallakin, A. & Ward, O.P. (1996)**. Degradation of BTEX compounds in liquid media and in peat biofilters. *J. Ind. Microbiol.*, 16, 309-318.
- [151]. **Malandain, C., Fayolle-Guichard, F. & Vogel, T.M. (2010)**. Cytochromes P450-mediated Degradation of Fuel Oxygenates by Environmental Isolates. *FEMS Microbiology Ecology*. 72 (2): 289–296.
- [152]. **Marchal, N. Bourdon, J.L & Richard, C. I. (Eds.). (1982)**. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin . 482pp.
- [153]. **Marchal, N., Bourdon, J.L. & Bimet, F. (1988)**. Le laboratoire de bactériologie médicale. Equipement techniques de base sécurité. Eds.Doin. p. 255-289-296-312.
- [154]. **Marchal, R., Penet, S., Solano-Serena, F. & Vandecasteele, J.P. (2003)**. Gasoline and Diesel Oil Biodegradation, *Oil & Gas Science and Technology-Review*, 4(58), 441-448.
- [155]. **Margesin, R. & Schinner, F. (2001)**. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5:73–83
- [156]. **Mascarelli, A. (2010)**. Deepwater Horizon: After the oil. *Nature* 467(7311):22.

- [157]. **Massalha, N., Basherr, S. & Sabbah, I. (2007)**. Effect of adsorption and bead size of immobilized biomass on the rate of biodegradation of phenol at high concentration levels. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46:6820–4.
- [158]. **Matteau, Y. & Ramsay B. (1997)**. Active biofiltration of toluene. *Biodegradation*, 8, 135-141.
- [159]. **Mateles, R. & Baruah, J. (1967)**. Growth of a thermophilic bacterium on hydrocarbons: a new source of single-cell protein. *Science* 157 (3794):1322-1329.
- [160]. **Mc Genity, T.J., Folwell, B.D., Mc Kew, B. A. & G.O. Sanni, G.O. (2012)**. Marine Crude-oil Biodegradation: a Central Role for Interspecies Interactions. *Aquatic Biosystems* 8(1):10.
- [161]. **McFarlin, K. M., Prince, R. C. Perkins, R. & Leigh, M. B. (2014)**. Biodegradation of Dispersed Oil in Arctic Seawater at -1 degrees C. *PLoS One* 2014, 9, 1.
- [162]. **Meade H.M., Long S.R., Ruvkun G.B., Brown S.E. & Ausubel F.M. (1982)**. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.*, 149, 114-122.
- [163]. **Melcher, R. J., Apitz, S. E., & Hemmingsen, B. B. (2002)**. Impact of irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking on microbial populations in marine sediment for future aging and biodegradability studies, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 2858–2868.
- [164]. **Megharaj, M., B. Ramakrishnan, et al. (2011)**. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ Int.* In press.
- [165]. **Meinschein, W. G. (1961)**. Significance of hydrocarbons in sediments and petroleum. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 22(1), 58-64.
- [166]. **Melcher, R.J., Apitz, S.E., Hemmingsen, B.B. (2002)** Impact of irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking on microbial populations in marine sediment for future aging and biodegradability studies. *Applied Environment Microbiologie*. 68 2858-2868.
- [167]. **Mirales, G., (2007)**. Devenir d'une contamination pétrolière dans des sédiments côtiers infralittoraux et son impact sur les communautés bactériennes. Thèse de Doctorat, Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II), Marseille, France. 231p.
- [168]. **Mills, A.M., McDonald, J.T., Bonner, S.J., Simon, A.M. & Autenrieth, L.R. (1999)**. Method for quantifying the fate of petroleum in the environment. *Chemosphere* 39, 2563-2582.
- [169]. **Mnif, S., Rojas, R., Miranda, C.D. & Amaro, A.M. (2009)**. Pathogenicity of a highly exopolysaccharide-producing *Halomonas* strain causing epizootics in larval cultures of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Microb. Ecol.* 57: 129-139.
- [170]. **Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M. & Sayadi, S. (2011)**. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oil field-selected bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 111/ 525-536.

- [171]. **M.O., Amobic.J., Odocha A.C. (2005).** Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas spp.* isolated from a tropical environment. *Chemosphere* **61**, 985.
- [172]. **Mohanty, G., Mukherji, S. (2008).** Biodegradation rate of diesel range n-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *International Biodeterioration & Biodegradation*.61 (3):240–250.
- [173]. **Molina , M., Gonzalez, N., Bautista, L., Sanz, R., Simarro, R., Sanchez, I. & Sanz, J.(2009).** Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from microbial consortium, *Biodegradation*, 20 (6): 789-800.
- [174]. **Moxley, K. & Schmidt, S. (2010).** Preliminary characterization of an estuarine, benzoate- utilizing *Vibrio* sp. Isolated from Durban Harbour, South Africa. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. A. Mendez-Vilas (Ed.).2: 1249-1254.
- [175]. **Nápoles, J. & Ávalos, A. (2008).** Biorremediación de ecosistemas contaminados con xenobióticos. *Monografías de la Universidad de Oriente*.
- [176]. **Naughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y-J., White, D.C.(1999)** Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied Environmental Microbiology* 1999, 65 3566-3574.
- [177]. **Nievas, M. L., Commendatore, M. G., Olivera, N. L., Esteves, J. L. & Bucala, V. (2006).** Biodegradation of bilge waste from Patagonia with an indigenous microbial Community. *Bioresour. Tech.*, 97 (18), 2280–2290 (11 pages).
- [178]. **Neff, J.M. (1979).** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the aquatic Environment: Sources, Fates and Biological Effects. London, Applied Science Publishers Ltd. 262 P.
- [179]. **Negraia, G. (2010).** Impact écotoxicologique des hydrocarbures mono aromatiques dans l’environnement au Canada. Université de Sherbrooke. 99p.
- [180]. **Noémie Laurent, E., Castellanet, F. & al. (2003).** Rapport sur la pollution marine par hydrocarbures et les dégazages sauvages en méditerranée. P.5.
- [181]. **Núñez, R. (2003).** Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis Doctoral. Universidad de La Habana, Cuba.
- [182]. **Neilson, A.H. & Allard, A. (2008).** Environmental degradation and transformation of organic chemicals. United States of America: CRC Press: Taylor and Francis Group.
- [183]. **Okamoto, T., Maruyama, A., Imura, S., Takeyama, H. & Naganuma, T.(2004).** Comparative phylogenetic analyses of *Halomonas variabilis* and related organisms based on 16 r RNA , gyrB and ectBC .gene sequences. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:323-333.
- [184]. **Olajire, AA. & Essien, J.P. (2014).** Aerobic Degradation of Petroleum Components by Microbial Consortia. *Petroleum & Environmental Biotechnology*.5:195.
- [185]. **Oliveira, V., Gomes, N.C., Almeida, A. Silva, A.M., Silva, H. & Cunha, A. (2015).** Microbe-assisted phytoremediation of hydrocarbons in estuarine environments. *Microb. Ecol* 69:1-12.

- [186]. **Olsen, G.J. & Woese, C.R. (1993).** Ribosomal RNA: a key to phylogeny. *FASEB J* 7, 113-123.
- [187]. **Olson, J.J., Mills, G.L., Herbert, B.E. & Morris, P.J. (1999).** Biodegradation rates of separated diesel components. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2448-2453.
- [188]. **Ordoñez, OF., Flores, MR., Dib, JR., Paz, A. & Farías, ME. (2009).** Extremophile culture collection from Andean lakes: extreme pristine environments that host a wide diversity of microorganisms with tolerance to UV radiation. *Microbial Ecology* 58:461–473.
- [189]. **Oren, A. (2010).** Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ. Technol.* 31:825–834.
- [190]. **O'Rourke, D., & Connolly, S. (2003).** Just oil? The distribution of environmental and social impacts of oil production and consumption. In *Annual Review of Environment and Resources*, pp. 587-617.
- [191]. **Oudot, J., Merlin, F.X. & Pinvidic, P. (1998).** Weathering rates of oil components in a bioremediation experiment in estuarine sediments. *Mar. Environ. Res.* 45: 113-125.
- [192]. **Paje, M.L.F., Neilan, B.A. & Couperwhite, I. (1997).** *Arhodococcus* species that thrives on medium saturated with liquid benzene. *Microbiology*, 143, 2975-2981.
- [193]. **Pelmont, J. (2005).** Biodégradations et métabolismes les bactéries pour les technologies de l'environnement, Jean PELMONT Collection Grenoble sciences.
- [194]. **Perry, J.J., Staley, T.J., & Lory, S. (2004).** Croissance des micro-organismes, in: *Microbiologie*, Sinauer, A.(Eds.) Inc, sous le titre *Microbial. Life* ©2002, USA. p.108, 136, 852.
- [195]. **Peterson, C.H., S.D. Rice, S.D., Short, J. W., Esler, D., Bodkin, J.L., Ballachey, B.E., & Irons, D.B.(2003).** Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. *Science* 302 (5653):2082-2094.
- [196]. **Petti, C. A., Polage, C. R. & Schreckenberger, P. (2005).** The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J. Clin. Microbiol.* 43, 6123-6125.
- [197]. **Petti, C. A. (2007).** Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clinical Infectious Diseases* 44, 1108- 1114.
- [198]. **Plociniczak, T., Kukla, M. & Watroba, R. (2013).** The effect of soil bioaugmentation with strains of *Pseudomonas* on Cd, Zn and Cu uptake by *Sinapis alba* L. *Chemosphere.* 91:1332-1337.
- [199]. **Priefert, H., X.M. & O'Brien, X.M.(2004).** Indene bioconversion by a toluene inducible dioxygénase of *Rhodococcus* sp.124. *Applied microbiology and biotechnology* 65 (2):168-176.
- [200]. **Prince, R.C. (1993).** Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Critical Reviews in Microbiology* 19(4): 217-240.
- [201]. **Prince, R.C. (2002).** Petroleum and other hydrocarbons biodegradation. In *Encyclopedia of Environ. Microbiol.*, pp .66-74.

- [202]. **Prince, R.C. (2005).**The microbiology of marine oil spill bioremediation. *Petroleum microbiology*: 317-336.
- [203]. **Prince, R.C. (2005).** *Petroleum Microbiology*. American Society for Microbiology Press Wash Washington DC.
- [204]. **Prince, R. C., McFarlin, K. M., Butler, J. D., Febbo, E. J. & Wang, F. C. Y. (2013)** .Nedwed, T. J. The primary biodegradation of dispersed crude oil in the sea. *Chemosphere*, 90 (2), 521–526.
- [205]. **Prince, R. C., Walters, C. C., Wang, Z. & Stout, S. A. (2007).** *Biodegradation of Oil Hydrocarbons and Its Implications for Source Identification*; Elsevier Academic Press Inc: San Diego, p 349–379.
- [206]. **Pulgarin, A. (2012).** Méthodes pour la datation des hydrocarbures déversés dans l’environnement. Université de Sherbrooke, Québec, Canada. PP.12-16.
- [207]. **Raeiney, F.A., Klatte, S., Kroppenstedt, R.M. & Stackebrandt, E. (1995).** *Dietzia*, new genus including *Dietzia maris* comb.nov., formerly *Rhodococcus mari*, *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology* 45, 32-36.
- [208]. **Ramade, F. (1982).** *Elément d’écologie appliquée*. Editions Mc Graw- Hill: 452 p.
- [209]. **Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W.& Lieng, P. W. S. (2013).** Microencapsulation of microbial cells. *J. Food Eng.* 116, 369–381.
- [210]. **Ratlege,C.(1978).**Degradation of aliphatic hydrocarbons, in: atkinson, R.J.(ED.),*Development in biodegradation of hydrocarbons*, Applied Sciences Publishers.Vol.1., pp 1-46.London.
- [211]. **Rebollar, E a., Avitia, M., Eguiarte, LE., González-González, A., Mora, L., Bonilla-Rosso, G., Souza, V. (2012).** Water-sediment niche differentiation in ancient marine lineages of *Exiguobacterium* endemic to the Cuatro Ciénegas Basin. *Environmental Microbiology* 14:2323–33.
- [212]. **Renvoisé, A. (2012).** Applicabilité de la PCR « universelle » 16S comme outil d’identification et de détection bactérienne en laboratoire hospitalier de bactériologie. Thèse de Doctorat, Université Aix-Marseille Paris 109 p.
- [213]. **Riis, V ., Kleinstuber, S. & Babel ,W. (2003).** influence of high salinities on the degradation of diesel fuel by bacteria consortia ,*Canadian Journal of Microbiolog.*,49 ,713-721.
- [214]. **Robert, M. Mercadé, E., Andrés, C., Espuny, MJ., Manresa, MA. & Guinea J. (1991).** Optimización de la producción de biotensoactivos por *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. *Grasas aceites*. 1991; 42:1-7.
- [215]. **Rodier, J. Bazin, C., Broutin, J-P., Chambon, P., Champsaur, H. & Rodi , L.(2005).** L’analyse de l’eau eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. Ed. DUNOD. p.688.
- [216]. **Rojas, R , Miranda, C.D. & Amaro, A.M.(2009).** Pathogenicity of a highly exopolysaccharide-producing *Halomonas* strain causing epizootics in larval cultures of the chilian scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck,1819).*Microb. Ecol.* 57:129-139.

- [217]. **Röling , W.F., Milner, M.G., Jones, D.M., K, L., Daniel, F., Swanell , R.J.& Head, I.M. (2002).** Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil-spill bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 5537-5548.
- [218]. **Rosenberg E. (1986).** Microbial biosurfactants. *Critical Reviews in Biotechnology*. 3:109-132.
- [219]. **Rozkov, A., Käär, A. & Vilu, R.(1998).** Biodegradation of dissolved jet fuel in chemostat by a mixed bacterial culture isolated from heavy polluted site. *Biodegradation*, 8, 363-369.
- [220]. **Saada, A., Nowak, C. & Coquereau, N.(2004)** .Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle des hydrocarbures-Rapport intermédiaire : résultat de la phase1. Rapport BRGM/RP-53739-FR, PP.107.
- [221]. **Saada, A., Nowak, C. & Coquereau, N. (2005).** État des connaissances sur l'atténuation naturelle des hydrocarbures – Rapport intermédiaire, Résultat de la phase 1. Étude réalisée dans le cadre des opérations de Service public du Bureau de recherches géologiques et minières (BRGM) 2004 POL A16., 110p.
- [222]. **Saitou, N. & Nei, M.(1987).** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution* ,4, 406-425.
- [223]. **Saliot, A. (1981).** Natural hydrocarbons in sea water. In: Duursma, E.K. and Dawson, R. (Eds.), *Marine organic chemistry*. Elsevier, Amsterdam, pp. 327-374.
- [224]. **Salomon, J.N. (2003).** Danger pollutions ! Collection « Scieteren », Presse Universitaire de Bordeaux, France, 170 P.
- [225]. **Samiullah, Y. (1985).** Biological effects of marine oil pollution. *Oil Petrochem Pollut.* 2:235–264.
- [226]. **Sandvik, S., Lode, A. & Pederson, T.A.(1986).** Biodegradation of oily sludge in Norwegian soils. *Applied Microbiology Biotechnology* 23,297-301.
- [227]. **Sa'nchez-Porro, C., Martín, S., Mellado, E. & Ventosa, A. (2003).** Diversity of moderately halophilic bacteria producing extracellular hydrolytic enzymes. *J. Appl. Microbiol* 94:295–300.
- [228]. **Sauret, C. (2011).** Ecologie des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière. Influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie Paris. 287 p.
- [229]. **Schaeffer, T.L., Cantwell, S.G., Brown, J.L., Watt, D.S. & Fall, R.R.(1979).** Microbial growth on hydrocarbons; terminal branching inhibits biodegradation. *Biodegradation*, 9,319-326.
- [230]. **Schwarz, J. R., Walker, J. D., Colwell, R. R. (1974).** Deep-sea bacteria: growth and utilization of hydrocarbons at ambient and in situ pressure. *Can. J. Microbiol.* 28 (6), 982-986.
- [231]. **Sei, K., Y. Sugimoto, Y. Mori , K., Maki , H. & Kohno, T. (2003).** Monitoring of alkane degrading bacteria in a sea water microcosm during crude oil degradation by

- polymerase chain reaction based on a alkane catabolic genes . Environmental Microbiology 5(6)/517-522.
- [232]. **Harayama, S., Kasay, Y. & Hara, A. (2004)**. Microbial communities in oil-contaminated sea water Current Opinion in Biotechnology, 15:205–214.
- [233]. **Shuttleworth, K. L. & Cerniglia, C. E. (1995)**. Environmental aspects of PAH biodegradation. Applied Biochemistry and Biotechnology, **54**(1-3), 291-302.
- [234]. **Sikkema, J., De Bont. J.A.M. & Poolman, B. (1994)**. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. Journal of Bacteriology 269, 8022-8028.
- [235]. **Sikkema, J., De Bont. J.A.M. & Poolman, B. (1995)**. Metabolism of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbial Reviews 59,201-222.
- [236]. **Simmon - Colin, C. Raguénès, G.Cozien, J. Guezennec, JG. (2008)**. *Halomonas profundus* sp. Nov, a new PHA – producing bacterium isolated from deep-sea hydrothermal vent shrimp.J. Appl. Microbiol. 104:1425-1432.
- [237]. **Sinke, A., Le Hecho, I. (1999)**. Monitored Natural Attenuation: review of existing guidelines and protocols. TNO- Nicole report- TNO- MEP-R 99/313.
- [238]. **Singleton, P. (1999)**. Bactériologie. Dunod, Paris.p.356.
- [239]. **Sivaraman, C., Ganguly, IA., Nikolausz, 2M. & Mutnuri, 1*S. (2011)**. Isolation of hydrocarbonoclastic bacteria from bilge oil contaminated water. Int. J. Environ. Sci. Tech., 8 (3), 461-470.
- [240]. **Söhngen, N.L. Benzin. (1913)**. Petroleum, Paraffinöl und Paraffin als Kohlenstoff- und Energiequelle für Mikroben. Zentralbl. Bakteriologie. 2 37 595–609 (in German).
- [241]. **Solano-Serena, F., Marchal, R.& Vandecasteele, J.P.(2001)**. Biodégradabilité de l'essence dans l'environnement : de l'évaluation globale au cas des hydrocarbures récalcitrants. Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP, Vol. 56 , No. 5. pp. 479-498.
- [242]. **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, Université de Pierre et Marie curie Paris 6. 284 p.
- [243]. **Song, H.G., Wang, X. & Bartha, R. (1990)**. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. Applied and Environmental Microbiology 56, 652-656.
- [244]. **Suzuki, K., N. Ogawa, N. & Miyashita K .(2001)**. Expression of 2- halobenzoate dioxygenase genes (cbdSABC) involved in the degradation of benzoate and 2-halobenzoate in *Burkholderia* sp. TH2. Gene 262 (1-2):137-145.
- [245]. **Swanell, R.P.J., Lee, K. McDonagh, M. (1996)**. Field evaluation of marine oil spill bioremediation. Microb. Rev. (June): 342-365.
- [246]. **Taketani, R.G., Franco, N.O., Rosado, A.S., and van Elsas, J.D. (2010)**.Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. Journal of Microbiology **48**: 7-15.

- [247]. **Tamura, K., Nei, M. & Kumar, S.(2004)**. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method, *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, **101**:11030-11035.
- [248]. **Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S.(2007)**. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 1596-1599.
- [249]. **Tantillo, G.M., Fontanarosa, M., Di Pinto, A. & Musti, M.(2004)**. Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections, *Letters in Applied Microbiology*, **39**, 117-126.
- [250]. **Tarayre, C. (2012)**. Bioremédiation de sols pollués aux hydrocarbures. Editions Universitaires Européennes. 116p.
- [251]. **Taso, C.W., Song, H.G. & Bartha R. (1998)**. Metabolism of Benzene, Toluene and Xylene Hydrocarbon in Soil, *Applied Environmental Microbiology*, **64**:4924-4929
Low concentration of toluene causes tiredness, confusion, weakness, drunken actions, memory loss, nausea, loss of appetite, hearing loss and loss of vision (Stdeicher, 1981; Stdeicher H.Z., Gabow P.A., Moss A.H., Kono D. and Kahny W.D. (1981); Syndromes of Toluene Sniffing in Adults, *Annual International Journal of Medicine*, **94**:758-762.
- [252]. **Thompson, FL., Lida, T. & Swings, J.(2004)**. Biodiversity of *Vibrios*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **68**,403-431.
- [253]. **Tissot, B. P. & Welte, D.H.(1984)**. Petroleum formation and occurrence. Springer, Berlin.
- [254]. **Van Beilen, J., Li, Z., Duetz, W.A., Smits, T. H.M. & Witholt, B. (2003)**. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil Gas Sci. Technol*, **58**: 427-440.
- [255]. **Van Hamme, J.D. & Ward, O.P.(2001)**. Physical and metabolic interactions of pseudomonas sp. Strain ja 5-b45 and rhodococcus sp. Strain f9-79 during growth on crude oil and effect of chemical surfactant on them. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** (10):4874-4879.
- [256]. **Vandecasteele, J-P. (2005)**. Microbiologie pétrolière– concepts, implications environnementales, Applications industrielles. Volume 1. Publications de l'institut français du pétrole, Paris, 412p.
- [257]. **Van Der Meer, J.R., DE Vos, W.M., S Harayama, S. & Zehnder, A.J. (1992)**. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiological Reviews* **56**,677-694.
- [258]. **Vandecasteele J.P. (2005)**. Microbiologie pétrolière (2vol.). Concepts, implications environnementales, applications industrielles. Edition Technip., Paris. 796 p.
- [259]. **Van Hamme, JD. Singh, A. & Ward, OP. (2003)**. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* **67**(4):503-49.
- [260]. **Venosa, A.D. & Zhu, X. (2003)**. Biodegradation of Crude Oil Contaminating Marine Shorelines and Freshwater Wetlands. *Spill Sci. Tech. Bull.* **8**(2):163-178.

- [261]. **Ventikos, N.P., Vergetis, E.O., Psaraftis, H.N.& Triantafyllou, G. (2004).** A high-level synthesis of oil spill response equipment and countermeasures. *Journal of Hazardous Materials* 107:51-58.
- [262]. **Ventosa, A & Nieto, JJ. (1995).** Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol* 11:85–94.
- [263]. **Vishnivetskaya, Ta., Kathariou, S. & Tiedje, JM. (2009).** The Exiguobacterium genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles* 13:541–55.
- [264]. **Vishnivetskaya, T a., Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A., del Rio, TG., Dalin, E., Tice, H., Bruce, DC., Goodwin, L a., Pitluck, S., Saunders, E., Brettin, T., Detter, C., Han, C., Larimer, F., Land ML., Hauser, LJ., Kyrpides, NC., Ovchinnikova, G., Kathariou, S., Ramaley, RF., Rodrigues, DF., Hendrix, C., Richardson, P.& Tiedje, JM. (2011).** Complete genome sequence of the 688 thermophilic bacterium Exiguobacterium sp. AT1b. *Journal of Bacteriology* 193:2880– 2881.
- [265]. **Volkman, J., Holdsworth, D., Neill, G. & Bavor, H. (1992).** Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *The Science of the Total Environments* 112: 203-219.
- [266]. **Von der Weid, I., Marques ,JM., Cunha, C D., Lippi, RK., Dos Santos, SC., Rosado, AS., Lins, U. & Seldin, L.(2007).** Identification and biodegradation potential of a novel strain of *Dietzia cinnamea* isolated from a petroleum – contaminated tropical soil, *Systematic and Applied Microbiology*, 30,331-339.
- [267]. **Walworth, J., Braddock, J. & Woolard. (2001).** Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soil. *Cold Region Science and Technology* 32, 85-91.
- [268]. **Wang, YN., Cai, H., Chi, CQ. , Lu, AH., Lin, XG. And Jian, ZF. et al.(2007).** *Halomonas shengliensis* sp.nov., a moderately halophilic, denitrifying, crude-oil-utilizing bacterium, , *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology*,57,1222-1226.
- [269]. **Ward, D.M. & Brock, T. (1978).**Hydrocarbons biodegradation in hypersaline environments .*Applied and environmental microbiology* 35(2):353-367.
- [270]. **Ward, O., Singh, A.& Van Hamme, J.(2003).** Accelerated biodgradation of petroleum hydrocarbon waste. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30,260-270.
- [271]. **Wang, W. Zhong, R. & Shan, D. (2014).** Indigenous oil-degrading bacteria in crude oil-contaminated seawater of the Yellow Sea, China. *Appl Microbiol Biotechnol.* 98:72537269.
- [272]. **Wang, Z. & Fingas, M. F. (2003).** Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine Pollution Bulletin*, vol. 47, n° 1, p. 423-452.
- [273]. **Wang, Z.F., Xiao, T.Pang, S. Liu M. &Yue H .(2009).** Isolation and identification of bacteria associated with the surfaces of several algal spices. *Chinese J. Ocean Limnol.* 27: 487-492.

- [274]. **Watanabe, K. (2001).** Microorganisms relevant to bioremediation. *Curr Opin Biotechnol.* 12 (3):237-41.
- [275]. **Westlake, D.W.S. (1982).** Microorganisms and the degradation of oil under northern marine conditions. In: Oils and dispersants in Canadian seas – research appraisal and recommendations. Publication EPS-3-EC-82-2. Environmental Protection Service Canada, Sprague JB, Vandermeulen JH, Wells PG (editors), Ottawa, Canada, pp. 47-50.
- [276]. **Whitacre, D. M., Liu, G., Niu, Z., Niekerk, D., Xue, J. & Zheng, L. (2008).** Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) from Coal Combustion: Emissions, Analysis, and Toxicology. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **192**, 1-28.
- [277]. **Whyte, L.G., Hawari, J., Zhou, E., Bourbonnière, L., Inniss, W.E. & Greer, C.W. (1998).** Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Appl Environ Microbiol.* 64 (7):2578-84.43. Siron R, Pelletier E, Brochu C. Environmental.
- [278]. **Widdel, F. & Rabus, R. (2001).** Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 12:259-276.
- [279]. **Wilcke, W. (2007).** Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. *Geoderma*, **141**(3-4), 157-166.
- [280]. **Xie, Z. Y., Hu, C. Q., Chen, C., Zhang, L. P. & Ren, C. H. (2005).** Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from the coastal mariculture systems in Guangdong, China. *Lett Appl Microbiol* 41, 202–207.
- [281]. **Xing Xang-Biao, W., Chang-Qiao C., Yong, N., Yue-Qin, T., Yan, T., Gang, W. & Xiao-Lei, W. (2011).** Degradation of petroleum hydrocarbons (C₆-C₄₀) and crude oil by a novel *Dietzia* strain, *Bioresource Technology*, 102,7755-7761.
- [282]. **Yakimov, M.M., Denaro, R., Genovese, M., Cappello, S., D’Auria, G., Chernikova, T.N., Timmis, K.N., Golyshin, P.N. & Giuliano, L. (2005).** Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environmental Microbiology* 7, 1426-1441.
- [283]. **Yakimov, M.M., Gentile, G., Bruni, V., Capello, S., D’Auria, G., Golyshin, P.N. & Giuliano, L. (2004).** Crude oil- induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold- adapted hydrocarbonoclastic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 49, 419-432.
- [284]. **Yakimov, M.M., Giuliano, L., Gentile, G., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Lunsdorf, H., Timmis, K.N. & Golyshin, P.N. (2003).** *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. *International Journal Systematic Evolutionary Microbiology* 2003; 53 779-785.
- [285]. **Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R., Abraham, W.R., Lunsdorf, H. & Timmis, K.N. (1998).** *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new

- hydrocarbon-degrading and surfactant producing marine bacterium. International Journal Systematic Bacteriology 1998; 48 339-348.
- [286]. **Yerushalmi, L. & Guiot, S.R. (1998)**. Kinetics of Biodegradation of Gasoline and its Hydrocarbon Constituents. Appl. Microbiol. Biotechnol., **49**, 475-481.
- [287]. **Youngblood, W. W., Blumer, M., Guillard, R.L. & Fiore, F. (1971)**. Saturated and unsaturated hydrocarbons in marine benthic algae. Marine Biology 8,190-201.
- [288]. **Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F., Xu, P., (2011)**. Degradation of n- alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated Pseudomonas aeruginosa DQ8. Bioresource. Technol.102.4111-4116.
- [289]. **Zhou, E. & Crawford, R.L. (1995)**. Effects of Oxygen, Nitrogen and Temperature on Gasoline Biodegradation in Soil. Biodegradation, **6**, 127-140.
- [290]. **Zhuang, W.Q., Tay, J.H., Maszenan, A.M. & Tay, S.T. (2003)**. Isolation of naphthalene-degrading bacteria from tropical marine sediments. Water Science Technology. 47: 303-308.
- [291]. **ZoBell, C.E. (1946)**. Action of microorganisms on hydrocarbons. Bacteriol. Rev, 10: 1-49.
- [292]. **Zvyagintseva, I.S. , Poglasova, M.N.,Gotoeva, M.T., Belyaev, S.S. (2001)**. Effect of the medium salinity on oil degradation by Nocardioform bacteria. Microbiology 70:652-656.

Webographie

[\(www.eea.europa.eu\)](http://www.eea.europa.eu). Rapport AAE, Problèmes prioritaires pour l'environnement méditerranéen n°4.

Annexe

Annexe 1. Formes Fasta des sequences des souches isolées identifiées

Halomonas venusta strain NY-8

CCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGGG
CCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGGG
GTAGCTTGCTACCCGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTGCCCGA
GTAGCTTGCTACCCGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTGCCCGA
TAGTGGGGGATAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAAGG
TAGTGGGGGATAACCTGGGGAAACCCAGGCTAATACCGCATACTCCTACGGGAGAAAAGG
GGGCTCCGGCTCCCGCTATTGGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAG
GGGCTCCGGCTCCCGCTATTGGATGAGCCTATGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAG
GCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGACTGA
GCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGACTGA
GACACGGCCCCGAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAAGC
GACACGGCCCCGAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGATATTGGACAATGGGCGAAAAGC
CTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGA
CTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGA
GGAAGAACGCCTAGTGGTTAATACCCATTAGGAAAGACATCACTCGCAGAAGAAGCACCG
GGAAGAACGCCTAGTGGTTAATACCCATTAGGAAAGACATCACTCGCAGAAGAAGCACCG
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACT
GGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGCTTGATAAGCCGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCT
GGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGCTTGATAAGCCGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCT
GGGAACGGCATCCGGAACGTCAAGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATTCCCGGTG
GGGAACGGCATCCGGAACGTCAAGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAATTCCCGGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGACT
TAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGACT
GACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
GACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC
CACGCCGTAAACGATGTCGACCAGCCGTTGGGTGCCTAGCGCACTTTGTGGCGAAGTTAA

CACGCCGTAAACGATGTCGACCAGCCGTTGGGTGCCTAGCGCACTTTGTGGCGAAGTTAA
CGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACG
CGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACG
GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACC
GGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACC
TACTCTTGACATCCTGCGAACTTGTGAGAGATCACTTGGTGCCTTCGGGAACGCAGAGAC
TACTCTTGACATCCTGCGAACTTGTGAGAGATCACTTGGTGCCTTCGGGAACGCAGAGAC
AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGA
AGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGTAACGA
GCGCAACCCTTGTCTTATTTGCCAGCGCGTAATGGCGGGAACCTCTAAGGAGACTGCCGG
GCGCAACCCTTGTCTTATTTGCCAGCGCGTAATGGCGGGAACCTCTAAGGAGACTGCCGG
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCT
TGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCT
ACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGAGCTCGCGAGAGTCAGCTAATCCC
ACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGAGCTCGCGAGAGTCAGCTAATCCC
GAAAAGCCGGTCTCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGC
GAAAAGCCGGTCTCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATCGC
TAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
TAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC
GTCACACCATGGGAGTGGACTGCACCAGAAGTGGTTAGCTTAACCTTCGGGAAAAGCGATC
GTCACACCATGGGAGTGGACTGCACCAGAAGTGGTTAGCTTAACCTTCGGGAAAAGCGATC
ACCACGGTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAAAAGGTAACCACGGTGTGGTTCAT
GACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA

Macrococcus caseolyticus JCSC5402

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGC
AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGC
GAACGGACGAGAGTGCTTGCCTCTCTGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GAACGGACGAGAGTGCTTGCCTCTCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG

GTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATT
GTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATATT
TAGCTTCGCATGAAGCAATAGTGAAAGACGGTTCTGCTGTCACTTATAGATGGACCCGCG
TAGCTTCGCATGAAGCAATAGTGAAAGACGGTTCTGCTGTCACTTATAGATGGACCCGCG
GTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATACATAGCCGACCTGA
GTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATACATAGCCGACCTGA
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGT
TTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACGTTAGTAACTGAACGTACC
TTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACGTTAGTAACTGAACGTACC
TTGACGGTACCTTACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
TTGACGGTACCTTACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGT
AGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGTCTCTTAAGT
AGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGGTAGGCGGTCTCTTAAGT
CTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTG
CTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTG
CAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACA
CAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAT
CCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAT
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGG
CAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGGG
GGTTTCCGCCCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTC
GGTTTCCGCCCTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTC
GCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
GCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAACCTCTAGAGAT
AATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGACAACCTCTAGAGAT
AGAGCTTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT

AGAGCTTTCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCATCATT
CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCATCATT
AGGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AGGTTGGGCACTCTAGAGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGC
AATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGC
AGCAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCCATAAA-CCATTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTG
AGCAAACCGCGAGGTCAAGCAAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTG
CA-CTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAAT
CAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGTGAAT
ACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGC
ACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGC
CGGTGGAGTAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGT
CGGTGGAGTAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGT
CGTAACAAGGTACGTAACAAGGTA

Bacillus horneckiae

CCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATTTGAGG
CCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATCTGAGG
GAGCTTGCTCCCAAAGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTA
GAGCTTGCTCCCAAAGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTA
AGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCCTTTCCTCACATGAG
AGACTGGGATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCCTTTCCTCACATGAG
GAAAGGCTGAAAGACGGCGTTTAGCTGTCACTTACAGATGGGCCCCGGCGCATTAGCTA
GAAAGGCTGAAAGACGGCGTCTAGCTGTCACTTACAGATGGGCCCCGGCGCATTAGCTA
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
GTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
CCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC
CCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCC

GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTA
GCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTA
AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTATCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCT
AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTATCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCT
ACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCG
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCG
TTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAAG
TTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTCCCTTAAGTCTGATGTGAAAAG
CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAAA
CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGCAGAAGAGGAAA
GTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
GTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACACCAGTGGCGAAG
GCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTA
GCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCT
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTTCCGCCCT
TTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAA
TTAGTGCTGCAGCAAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTTAATTCGAAGCAA
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTTCCCC
CGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTTCCCC
TTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTG
TTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTTCGTCAGCTCGTGTTCGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACT
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACT
CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCG
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCTGCAAGACCGCG
AGGTTTTAGCCAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGC

AGGTTTAGCCAATCCCATAAAACCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGC
ATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
ATGAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
CTTGTACACACCGCCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAAC
CTTGTACACACCGCCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGTCGGTGGGGTAAC
CTTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAAAAAGGTAC
TTTTGGAGCCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAAACAAGGTA

Micrococcus luteus strain INBI-1

GTTTGA-CCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAT
GTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAT
GAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGC
GAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGC
CCTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCGC
CCTTAACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCGC
ATGGTGGGTGTTGGAAAGATTTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGCCTATCAGCTTGTTG
ATGGTGGGTGTTGGAAAGATTTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGCCTATCAGCTTGTTG
GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCAC
GTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA
TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACC
TGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACC
TCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTAC
TCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GAGCTCGTAGGCGGTTTTGTCACGTCTGTCTGTGAAAGTCCGGGGCTTAACCCCGGATCTGC
GAGCTCGTAGGCGGTTTTGTCACGTCTGTCTGTGAAAGTCCGGGGCTTAACCCCGGATCTGC
GGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGG
GGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGG

AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAAGTAC
AATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAAGTAC
GCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
GCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
AACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCCACGGTTTCCGCGCCGCAGCTAACGCATTA
AACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCCACGGTTTCCGCGCCGCAGCTAACGCATTA
AGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
AGTGCCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTT
GCACAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTT
GACATGTTCTCGATCGCCGTAGAGATACGGTTTCCCCTTTGGGGCGGGTTCACAGGTGGT
GACATGTTCTCGATCGCCGTAGAGATACGGTTTCCCCTTTGGGGCGGGTTCACAGGTGGT
GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAAC
GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAAC
CCTCGTTCCATGTTGCCAGCACGTGTCGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAAC
CCTCGTTCCATGTTGCCAGCACGTGTCGTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGCCGGGGTCAAC
TCGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCA
TCGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTTGGGCTTCACGCA
TGCTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGGTG-AGCTAATCCCCAAAAGC
TGCTACAATGGCCGGTACAATGGGTTGCGATACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCCAAAAGC
CGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAAT
CGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAAT
CGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCAGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAG
CGCAGATCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCAGGCCTTGTACACACCGCCCGTCAAG
TCACGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTGGGGGAGCCGTCGAA
TCACGAAAGTTGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTGGGGGAGCCGTCGAA
GGTGGGACCAGCGATTGGGACTAAGTCGTAAAAAGGTAGGTGGGACCAGCGATTGGGACT
AAGTCGTAACAAGGTA

Bacterium K2-61

TGAACCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGC
TGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGC
GACAACATTGAACCTTCGGGGGATTTGTTGGGCGGCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGC
GACAACATTGAACCTTCGGGGGATTTGTTGGGCGGCAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGC
CTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGAT
CTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGAT
AGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGA
AGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGA
TTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGA
TTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGA
TGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
TGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG
ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG
GGTTGTAAAGTACTTTTCAGCAGTGAGGAAGGGGTATCGTTAATAGCGGTATCCTTTGAC
GGTTGTAAAGTACTTTTCAGCAGTGAGGAAGGAGGTATCGTTAATAGCGGTATCCTTTGAC
GTTAGCTGCAGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT
GTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT
GCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGAT
GCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGAT
GTGAAAGCCCAGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGGCTAGAGTACTGTA
GTGAAAGCCCAGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGGCTAGAGTACTGTA
GAGGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAGATCTGAAGGAATACCGGT
GAGGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGT
GGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
GGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTT
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTT
GAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
GAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
TTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCG

TTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCG
ATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTG
ATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTG
GTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTGTGAAAT
GTGCCTTCGGGAACCTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTTCGTCAGCTCGTGTGTGAAAT
GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGTTGCCAGCGAGTAATGTTCG
GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTGTTGCCAGCGAGTAATGTTCG
GGAACCTCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCAT
GGAACCTCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCAT
CATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCGGCCAA
CATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCGGCCAA
CTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTTCGTCGTAGTCCGGGATTG-AGTCTGCAACT
CTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTTCGTCGTAGTCCGG-ATTGGAGTCTGCAACT
CGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTT
CGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTT
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGCAGGTA
CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGCAGGTA
GTTTAACTTCGGGAGGACGCTTGCCACTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAA
GTTTAACTTCGGGAGGACGCTTGCCACTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAAC
AAGGAAGG

Vibrio vulnificus strain MP-4

TGAACCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGC
TGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGC
GACAACATTGAACCTTCGGGGGATTTGTTGGGCGGCAGCGGCAGCGGGTGAAGTAATGC
GACAACATTGAACCTTCGGGGGATTTGTTGGGCGGCAGCGGCAGCGGGTGAAGTAATGC
CTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGAT
CTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATGAT
AGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGA
AGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGA
TTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGA

TTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGA
TGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
TGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG
ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCG
GGTTGTAAAGTACTTTTCAGCAGTGAGGAAGGGGTATCGTTAATAGCGGTATCCTTTGAC
GGTTGTAAAGTACTTTTCAGCAGTGAGGAAGGAGGTATCGTTAATAGCGGTATCCTTTGAC
GTTAGCTGCAGAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT
GTTAGCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGT
GCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGAT
GCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGAT
GTGAAAGCCCAGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGGCTAGAGTACTGTA
GTGAAAGCCCAGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGGCTAGAGTACTGTA
GAGGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAAAGATCTGAAGGAATACCGGT
GAGGGGGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCGGT
GGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
GGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTT
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTTGTGGCCTT
GAGCCGTGGCTTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
GAGCCGTGGCTTTTCGGAGCTAACGCGTTAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGA
TTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
TTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCG
ATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTG
ATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTAGCAGAGATGCTTTG
GTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAAT
GTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAAT
GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTAATGTTCG
GTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCCAGCGAGTAATGTTCG
GGAACCTCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCAT

GGA ACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCAT
 CATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCGGCCAA
 CATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCGGCCAA
 CTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGGGATTG-AGTCTGCAACT
 CTCGCGAGAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCCTCGTAGTCCGG-ATTGGAGTCTGCAACT
 CGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTT
 CGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTT
 CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGCAGGTA
 CCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCAAAAAGAAGCAGGTA
 GTTTAACCTTCGGGAGGACGCTTGCCACTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAA
 GTTTAACCTTCGGGAGGACGCTTGCCACTTTGTGGTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAAAC
 AAGGAAGG

Pseudomonas sp. MBEA661

GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAG
 GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAG
 CACGTTATGGTGGGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
 CACGTTATGGTGGGAACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAAGGTGGGGATG
 ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACA
 ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTCGGTACA
 AAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGC
 AAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGC
 AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACG
 AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACG
 GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTCACC
 GTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTCACC
 AGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGT
 AGAAGTAGCTAGTCTAACCGCAAGGGGGACGGTTACCACGGTGTGATTCATGACTGGGGT
 GAAGTCGTAGAAGTCGTA

Exiguobacterium aurantiacum strain NB11_3A

CCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAGTC
CCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCAGGAAGTC
ATCCGAACCCCTTCGGGGGGACGTTGACGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAA
ATCCGAACCCCTTCGGGGGGACGTTGACGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAA
AGAACCTGCCCTCAGGTCTGGGATAACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGATGGGTCA
AGAACCTGCCCTCAGGTCTGGGATAACCACGAGAAATCGGGGCTAATACCGGATGGGTCA
TCGGACCGCATGGTCCGAGGATGAAAGGCGCTCCGGCGTCGCCTGGGGATGGCTTTGCGG
TCGGACCGCATGGTCCGAGGATGAAAGGCGCTTCGGCGTCGCCTGGGGATGGCTTTGCGG
TGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAG
TGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCACCAAGGCGACGATGCATAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGCC
GGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGCC
CTCGGGTCGTAAAGTTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTGCCGCAGGCAATGGCGGCACCT
CTCGGGTCGTAAAGTTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTGCCGCAGGCAATGGCGGCACCT
-GACGGTACC-TGCGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
TGACGGTACCTTGCGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCCTCTTAAGTC
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCCTCTTAAGTC
TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGCCATTGGAAACTGGGAGGCTTGAGTAT
TGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGCCATTGGAAACTGGGAGGCTTGAGTAT
AGGAGAGAAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC
AGGAGAGAAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC
CAGTGGCGAAGGCGACTCTTTGGCCTATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGG
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGG
GTTTCCGCCCTTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCG
GTTTCCGCCCTTCAGTGCTGAAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTTCG

CAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
CAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTA
ATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAACTCTTGACATCCCCCTGACCGGTACAGAGAT
ATTGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAACTCTTGACATCCCCCTGACCGGCACAGAGAT
GTGCCTTCCCCTTCGGGGGCAGGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
GTGCCTTCCCCTTCGGGGGCAGGGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTC
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCACCATTC
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCACCATTC
AGTTGGGCACTCTAAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AGTTGGGCACTCT-AAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AATCATCATGCCCCCTTATGAGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGC
AATCATCATGCCCCCTTATGAGTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAAGGGC
AGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTG
AGCGAAGCCGCGAGGTGGAGCCAATCCCAGAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTG
CAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAAT
CAACTCGCCTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTCAGCATACTGCGGTGAAT
ACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGT
ACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGT
CGGTGAGGTAACCTTAGGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTC
CGGTGAGGTAACCTTAGGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTC
GTAA-AAGGGTAACAAGG

Vibrio alginolyticus strain Pb-WC11099

GTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGT
GTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGT
TTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTTGAAACTGGCAG
TTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTTGAAACTGGCAG
ACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT
ACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCT
GAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAG
GAAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAG

CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTG
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTACTTG
GAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCCTGGGGA
GAGGTTGTGGCCTTGAGCCGTGGCTTTCGGAGCTAACCGGTTAAGTAGACCGCCTGGGGA
GTACGGTCGCAAGATTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA
GTACGGTCGCAAGATTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTT
TGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTT
CCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGC
CCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGC
TCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCC
TCGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTGTTTGCC
AGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAAACCGGAGGAAGGTGGGGA
AGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGACTGCCGGTGATAAAACCGGAGGAAGGTGGGGA
CGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATA
CGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATA
CAGAGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATT
CAGAGGGCGGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAATCCCAAAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATT
GGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCA
GGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCA
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCA
CGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGCTGCA
AAAGAAGTAGGTAGTTAACCTTCGGGGGGACGCTTACCACCTTGTGGTTCATGACTGGG
AAAGAAGTAGGTAGTTAACCTTCGGGGGGACGCTTACCACCTTGTGGTTCATGACTGGG
GTGAAGTCGTAACAAGGTAACGTGAAGTCGTAACAAGGTAAC

Acinetobacter sp. CIP 101934

GGTACCTGACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGG
GGTAACTGACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGG
ACAACGTTCCGAAAGGAACGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGATCT

ACAACGTTCCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGATCT
TCGGACCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC
TCGGACCTTGCCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCC
TACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGAC
TACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGGAAGCCTG
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTG
ATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGA
ATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGA
GGAGGCTCCTTTAGTTAATACCTAAAGAGAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGC
GGAGGCTCCTTTAGTTAATACCTAAAGTGAAGTGGACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGC
TAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGATTTACTGG
TAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCAGCGTTAATCGGATTTACTGG
GCGTAAAGCGTGCCTAGGCGGCTTTTTAAGTCGGATGTGAAATCCCTGAGCTTAACTTAG
GCGTAAAGCGTGCCTAGGCGGCTTTTTAAGTCGGATGTGAAATCCCTGAGCTTAACTTAG
GAATTGCATTCGATACTGGAAAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCAGGTGTA
GAATTGCATTCGATACTGGAAAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCAGGTGTA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAA
GCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAA
TACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
TACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
TGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACG
TGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGGGCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACG
CGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGG
CGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG
GGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTG
GCCTTGACATACTAAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTTAGATACAG
GCCTTGACATACTAAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTTAGATACAG
GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC
GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGC

GCAACCCTTTTCCTTATTTGCCAGCGGGTAATGCCGGGAACCTTAAGGATACTGCCAGTG
GCAACCCTTTTCCTTATTTGCCAGCGGGTAATGCCGGGAACCTTAAGGATACTGCCAGTG
ACAAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTAC
ACAAACTGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTCGCGAGAGGATGCTAATCTCAA
ACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCTACCTCGCGAGAGGATGCTAATCTCAA
AAAGCCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTA
AAAGCCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTA
GTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
GTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGT
CACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTAGGTAGTCTAACC GCAAGGAGGACGCTTAC
CACACCATGGGAGTTTGTGTCACCAGAAGTAGGTAGTCTAACC GCAAGGAGGACGCTTAC
CACGGTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAA – AAGGTACACGGTGTGGCCGATGACT
GGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA

Dietzia sp. CNJ898 PL04

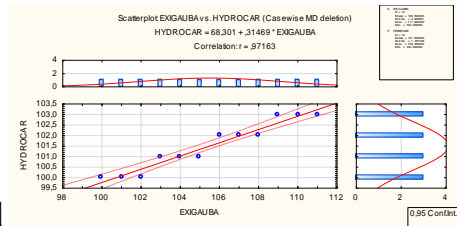
GTTGGA – CCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGGCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGT
GTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGGCTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGT
AAGGCCCTTCGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTGCCC
AAGGCCCTTCGGGGGTACACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAATCTGCCC
TGCACCTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAACTCCTGCCGCAT
TGCACCTTCGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGAACTCCTGCCGCAT
GGTGGGGGTTGGAAAGTTTTTTCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTG
GGTGGGGGTTGGAAAGTTTTTTCGGTGCAGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTG
GGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGG
GCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGTCTTCGGATTGTAAACCCCT
GCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGGGGGATGACGGTCTTCGGATTGTAAACCCCT
TTCAGTAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTG

TTCAGTAGGGACGAAGCGCAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAG
CTCGTAGGCGGTTTTGTCACGTCGTCTGTGAAATCCCTCGGCTTAACCGGGGGCGTGCAGG
CTCGTAGGCGGTTTTGTCACGTCGTCTGTGAAATCCCTCGGCTTAACCGGGGGCGTGCAGG
CGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT
CGATACGGGCAGACTTGAGTACTACAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAAT
GCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGTAGTAACTGACGCT
GCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGGTCTCTGGGTAGTAACTGACGCT
GAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAAC
GAGGAGCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAAC
GGTGGGCGCTAGGTGTGGGGTCCTTCCACGGACTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCG
GGTGGGCGCTAGGTGTGGGGTCCTTCCACGGACTCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGCG
CCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCAC
CCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCGCAC
AAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTTGACA
AAGCGGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGCTTGACA
TATACAGGACGACGGCAGAGATGTCGTTTTCCCTTGTGGCTTGTATACAGGTGGTGCATGG
TATACAGGACGACGGCAGAGATGTCGTTTTCCCTTGTGGCTTGTATACAGGTGGTGCATGG
TTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGT
TTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGT
CTCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAG
CTCATGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTAGGGCTTCACACATGCTAC
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTCTAGGGCTTCACACATGCTAC
AATGGCTAGTACAGAGGGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCT
AATGGCTAGTACAGAGGGCTGCGATACCGCGAGGTGGAGCGAATCCCTTAAAGCTGGTCT
CAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGA
CAGTTCGGATTGGGGTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGA
TCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGA

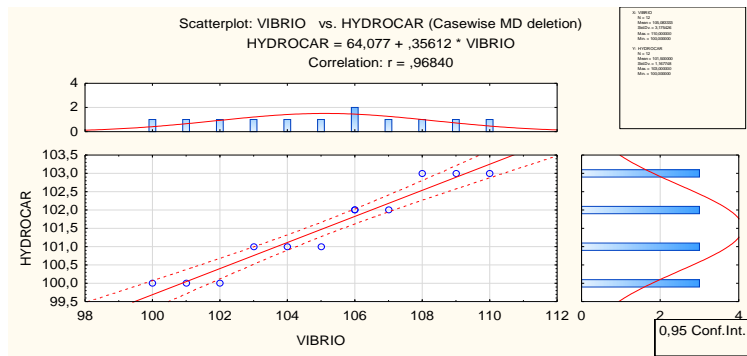
TCAGCAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACGTCATGA
AAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGG
AAGTCGGTAACACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCTTGTGGAGGGAGCCGTCGAAGGTGGG
ATCGGCGATTGGGACGAAGTCGTAA-AAGG ATCGGCGATTGGGACGAAGTCGTAAACAAGG

Annexe 2. Analyse statistique par MANOVA

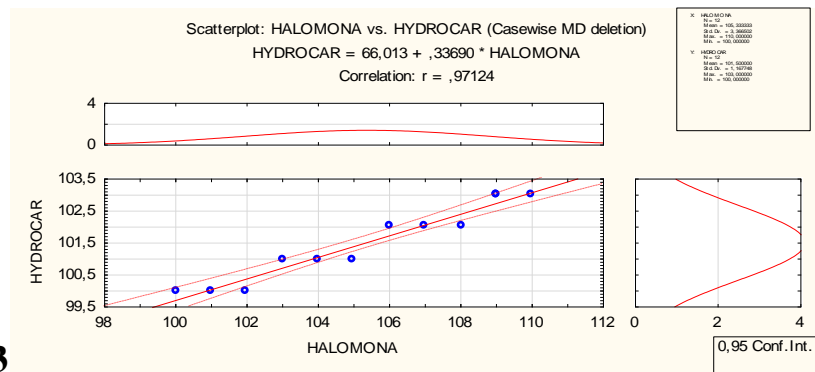
Graphe1

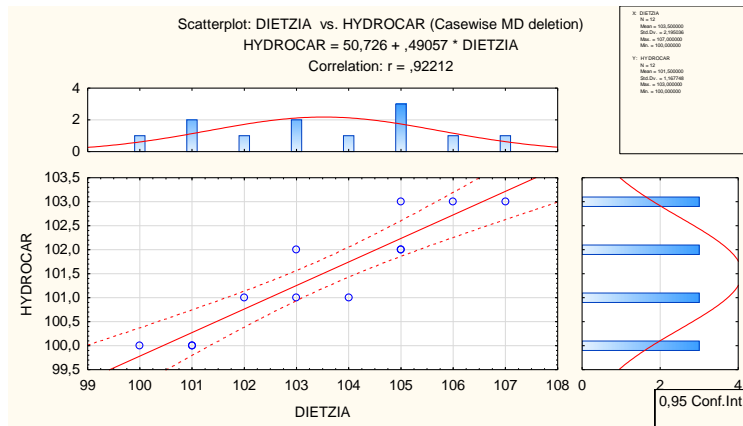


Graphe2

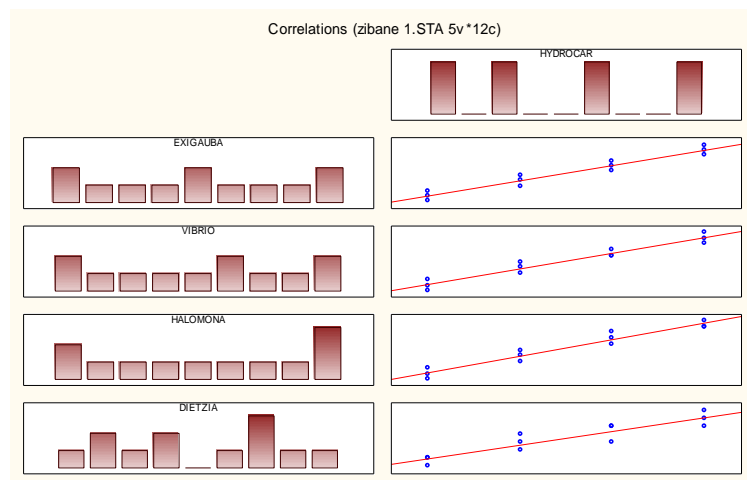


Graphe3





Graphe4



Breakdown Table of Descriptive Statistics (zibane 1.STA)

N=12 (No missing data in dep. var. list)

	EXIGAUBA Means	EXIGAUBA N	EXIGAUBA Std.Dev.	VIBRIO Means	VIBRIO N	VIBRIO Std.Dev.	HALOMONA Means	HALOMON N	HALOMONA Std.Dev.	DIETZIA Means	DIETZIA N	DIETZIA Std.Dev.
Cyclo-He	101,000	3	1,00000	101,000	3	1,00000	101,000	3	1,00000	100,666	3	0,57735
Dekane	104,000	3	1,00000	104,000	3	1,00000	104,000	3	1,00000	103,000	3	1,00000
Heptane	107,000	3	1,00000	106,333	3	0,57735	107,000	3	1,00000	104,333	3	1,15470
Hexane	110,000	3	1,00000	109,000	3	1,00000	109,333	3	0,57735	106,000	3	1,00000
All Grps	105,500	12	3,60555	105,083	12	3,17542	105,333	12	3,36650	103,500	12	2,19503

Analyse of variance

Analysis of Variance (zibane 1.STA)												
Marked effects are significant at $p < ,05000$												
Variable	SS Effect	df Effect	MS Effect	SS Error	df Error	MS Error	F	p	Welch df Effect	Welch df Error	Welch F	Welch p
EXIGAUBA	135,0000	3	45,0000	8,00000	8	1,00000	45,0000	0,00002	3	4,44444	34,8153	0,00159
VIBRIO	104,2500	3	34,7500	6,66666	8	0,83333	41,7000	0,00003	3	4,28571	28,0932	0,00287
HALOMONA	118,0000	3	39,3333	6,66666	8	0,83333	47,2000	0,00002	3	4,28571	46,2711	0,00103
DIETZIA	45,6667	3	15,2222	7,33333	8	0,91666	16,6666	0,00085	3	4,25583	19,1133	0,00835

Tests

Variable *Exigaubacterium*

LSD Test; Variable: EXIGAUBA (zibane 1.ST)				
Marked differences are significant at $p < ,050$				
	{1}	{2}	{3}	{4}
HYDROCAR	M=101,00	M=104,00	M=107,00	M=110,00
Cyclo-He {1}		0,006271	0,000080	0,000004
Dekane {2}	0,006271		0,006271	0,000080
Heptane {3}	0,000080	0,006271		0,006271
Hexane {4}	0,000004	0,000080	0,006271	

Scheffe Test; Variable: EXIGAUBA (zibane 1.S)				
Marked differences are significant at $p < ,05000$				
	{1}	{2}	{3}	{4}
HYDROCAR	M=101,00	M=104,00	M=107,00	M=110,00
Cyclo-He {1}		0,039499	0,000646	0,000035
Dekane {2}	0,039499		0,039499	0,000646
Heptane {3}	0,000646	0,039499		0,039499
Hexane {4}	0,000035	0,000646	0,039499	

Variable *Vibrio*

LSD Test; Variable: VIBRIO (zibane 1.STA)				
Marked differences are significant at $p < ,050$				
	{1}	{2}	{3}	{4}
HYDROCAR	M=101,00	M=104,00	M=106,33	M=109,00
Cyclo-He {1}		0,003815	0,000097	0,000005
Dekane {2}	0,003815		0,014005	0,000151
Heptane {3}	0,000097	0,014005		0,007212
Hexane {4}	0,000005	0,000151	0,007212	

Scheffe Test; Variable: VIBRIO (zibane 1.ST) Marked differences are significant at $p < ,050$				
	{1}	{2}	{3}	{4}
HYDROCAR	M=101,00	M=104,00	M=106,33	M=109,00
Cyclo-He {1}		0,025189	0,000775	0,000043
Dekane {2}	0,025189		0,080231	0,001198
Heptane {3}	0,000775	0,080231		0,044764
Hexane {4}	0,000043	0,001198	0,044764	

Variable *Halomonas*

LSD Test; Variable: HALOMONA (zibane 1.S) Marked differences are significant at $p < ,050$				
	{1}	{2}	{3}	{4}
HYDROCAR	M=101,00	M=104,00	M=107,00	M=109,33
Cyclo-He {1}		0,003815	0,000042	0,000004
Dekane {2}	0,003815		0,003815	0,000097
Heptane {3}	0,000042	0,003815		0,014005
Hexane {4}	0,000004	0,000097	0,014005	

Scheffe Test; Variable: HALOMONA (zibane 1.S) Marked differences are significant at $p < ,05000$				
	{1}	{2}	{3}	{4}
HYDROCAR	M=101,00	M=104,00	M=107,00	M=109,33
Cyclo-He {1}		0,025189	0,000343	0,000031
Dekane {2}	0,025189		0,025189	0,000775
Heptane {3}	0,000343	0,025189		0,080231
Hexane {4}	0,000031	0,000775	0,080231	

Variable *Dietzia*

Scheffe Test; Variable: DIETZIA (zibane 1.S) Marked differences are significant at $p < ,050$				
	{1}	{2}	{3}	{4}
HYDROCAR	M=100,67	M=103,00	M=104,33	M=106,00
Cyclo-He {1}		0,097030	0,011033	0,001070
Dekane {2}	0,097030		0,453167	0,031998
Heptane {3}	0,011033	0,453167		0,283312
Hexane {4}	0,001070	0,031998	0,283312	

Productions scientifiques

Articles internationaux

- [01]. **FEKNOUS,N.,Z.BRANES,K.,ROUABHIA,I.BATISSON & C.AMBLARD.(2017).** Isolation characterization and growth of locally isolated hydrocarbonoclastic marine bacteria (eastern Algerian coast). *Eviron.Monit Assess* 189:49 , DOI: 10.1007/s10661-016-5758-5.

Communications nationales

- [1]. **FEKNOUS N. ROUABHIA K, BRANES Z & BATISSON I.:** Effet de la bio-stimulation par l'azote et le phosphore sur la croissance des micro-organismes autochtones hydrocarbonoclastes isolées du littoral est algérien : séminaire national sur la bio-rmédiation et bio-indication tenu les 07 et 08 Décembre **2015** à l'université 8 mai 1945, Guelma (**Affichée**).
- [2]. **FEKNOUS N. ROUABHIA K ,BRANES Z & BATISSON I.:**Essai d'isolement et de culture des bactéries hydrocarbonoclastes, Journé mondiale de l'eau : Eau, menace des ressources et biotechnologies : constats et perspectives tenue le 18 mars **2015** à l'université 20 août 1955, Skikda (**Affichée**)

Communications internationales

- [1]. **FEKNOUS N. ROUABHIA K ,BRANES Z & BATISSON I.:** Potential hydrocarbon biodegradation by hydrocarbonoclastic bacteria isolated from eastern algerian coast, 28^{ième} forum international des sciences biologiques et de biotechnologie de l'ATSB, Hammamet, Tunisie, du 21 au 24 mars **2017**. (**Affichée**)
- [2]. **FEKNOUS N. ROUABHIA K, BRANES Z & BATISSON I.:** Essais de croissance de *Dietzia* sp et *Halomonas venusta* isolées du littoral est algérien en présence d'hydrocarbures mono-aromatiques, IV^{ème} congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-ressources (AT-BVBR), Hammamet, Tunisie, du 24 au 27 mars **2016**. (**Orale**)
- [3]. **FEKNOUS N. ROUABHIA K, BRANES Z & BATISSON I.:**Biodégradabilité des hydrocarbures par des souches bactériennes autochtones isolées du littoral est-algérien, III^{ème} congrès international de Biotechnologie et Valorisation des Bio-ressources (AT-BVBR), Tabarka, Tunisie, du 20 au 23 mars **2015**. (**Affichée**)
- [4]. **FEKNOUS N. ROUABHIA K, BRANES Z & BATISSON I. :** Essai d'isolement, identification et de culture des bactéries hydrocarbonoclastes isolées du littoral est algérien ,IX^{ème} Congrès Maghrébin des Sciences de la mer organisées à Sousse (Tunisie) du 21-24 décembre **2014**. (**Affichée**)



Isolation characterization and growth of locally isolated hydrocarbonoclastic marine bacteria (eastern Algerian coast)

N. Feknous · Z. Branes · K. Rouabhia · I. Batisson · C. Amblard

Received: 5 July 2016 / Accepted: 19 December 2016
© Springer International Publishing Switzerland 2017

Abstract The Algerian coastline is being exposed to several types of pollution, including that of hydrocarbons. This environment rich in oil could be the source of proliferation of hydrocarbonoclastic bacteria. The objective of the study is to isolate and identify indigenous bacterial strains from marine waters of two ports in the eastern Algerian coast and to test their growth in the presence of hydrocarbons with and without biostimulation throughout the intake of nitrogen and phosphate. Results recorded the highest level of both total hydrocarbons and phosphates in the port of Annaba, followed by El-Kala station and then the control station, while that of total nitrogen was vice versa. Fifty-three bacterial strains were identified from which four were selected to perform the growth tests. Results showed that the growth and the biodegradation differ from one species

to another. Thus, the strains tested (*Halomonas venusta* NY-8, *Exiguobacterium aurantiacum* NB11-3A, *Vibrio alginolyticus* Pb-WC11099, and *Dietzia* sp. CNJ898 PL04) seem very active, in which better growth was obtained with the last two strains during nitrogen and phosphate supplementation. Such strains are suggested to participate a lot in the biodegradation of oil at polluted sites.

Keywords Hydrocarbons · Hydrocarbonoclastic bacteria · Growth · Biodegradation · Eastern Algerian coast

Introduction

Petroleum hydrocarbons are major pollutants of marine environments as a result of terrestrial and freshwater runoff, refuse from coastal oil refineries, offshore oil production, shipping activities, and accidental spills (Arulazhagan et al. 2010). The contamination of marine environments by hydrocarbons represents a global concern with potential consequences on ecosystems and human health (Gong et al. 2013). Marine pollution by hydrocarbons, whether chronic or accidental, raises significant problems to the environment. Indeed, the removal of hydrocarbons by physical and/or chemical methods is often very expensive. Using microorganisms would constitute an alternative for bioremediation and cleaning up hydrocarbons contaminated areas. According to Molina et al. (2009), some microorganisms show a high potential for adaptation to oil pollution in the

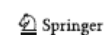
Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10661-016-5758-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

N. Feknous · Z. Branes (✉) · K. Rouabhia
Laboratory of Microbiology, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Badji Mokhtar University, BP 12, 23000 Annaba, Algeria
e-mail: djbranes@yahoo.fr

I. Batisson · C. Amblard
Clermont Université, Université Blaise Pascal,
F-63000 Clermont-Ferrand, France

I. Batisson · C. Amblard
CNRS, UMR 6023, Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement, TSA 60026, CS 60026, 63178 Aubière Cedex, France

Published online: 05 January 2017



treatment plants and in the polluted sites as well. Biodegradation by natural populations of microorganisms is the most reliable mechanism by which thousands of pollutants, including crude oil, are removed from the environment (Cappello et al. 2007). In many ecosystems, there is already an adequate indigenous microbial community capable of extensive oil biodegradation (Olajire and Essien 2014). It is necessary to study the indigenous microorganisms capable of degrading pollutants because of their varied effects on the environment (Jain et al. 2005). Numerous microorganisms have been isolated, and their phylogeny and metabolic capacity to degrade a variety of aliphatic and aromatic hydrocarbons have been demonstrated (Olajire and Essien 2014). Microorganisms able to utilize saturated hydrocarbons (*n*-alkanes) are widely distributed in nature (Atlas and Atlas 1991; Zhang et al. 2011) such as *Rhodococcus* (Van Hamme and Ward 2001), *Alcanivorax* (Liu et al. 2010), *Pseudomonas* (Zhang et al. 2011), *Dietzia* DQ12–45-1b (Xing Xang-Biao et al. 2011), *Acinetobacter lwoffii* (Marchal et al. 2003), *Exiguobacterium aurantiacum*, and *Burkholderia capacia* (Gita and Suparna 2008a) for the biodegradation of aromatic hydrocarbons. The study of Moxley and Schmidt (2010) reported the ability of *Vibrio* sp. KM1 to grow with benzoic acid as the sole source of energy and carbon; the metabolic versatility of *Halomonas* has also been associated with a great biotechnological potential (Simon-Colin et al. 2008); and *Halomonas* sp. and *Marinobacter* sp. (Gabet 2004) degrade several polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) including naphthalene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, fluorine, pyrene, benz[a]anthracene, and benzo [a] pyrene as the sole carbon sources (Dastgheib et al. 2012).

Hydrocarbon molecules are relatively unreactive due to the lack of functional groups and low solubility in water (Hassanshahian et al. 2012). The study of the effects of environmental conditions on microbial degradation of hydrocarbons and the effects of oil contamination on microbial communities are therefore of great interest (Rahman et al. 2004; Cappello et al. 2012). Eliminating environmental oil requires the intervention of various biotic and abiotic factors. Thus, biodegradation by microorganisms, particularly bacteria, is the most important natural process in cleaning up the environment (Soltani 2004). While it is relatively slow, this process allows almost a complete degradation (CO_2 conversion) of oil (Sauret 2011). Hydrocarbon-degrading microorganisms usually exist in very low

abundance in marine environments. Identification of the key organisms that play roles in pollutant biodegradation is important for understanding, evaluating, and developing in situ bioremediation strategies. Thus, it is highly essential to characterize bacterial communities, to identify responsible degraders, and to elucidate the catalytic potential of these degraders (Sivaraman et al. 2011).

Hydrocarbons constitute the most type of chronic Algerian coastal pollution during the last decades. Such pollution is related to the degree of proliferation of natural bacterial strains, which are able to degrade these organic molecules. The objective of this work is to isolate and identify the indigenous hydrocarbonoclastic bacteria from two sites of the coastline through the growth kinetics in the presence of known concentrations of different types of hydrocarbons, with or without nitrogen and phosphate.

Materials and methods

Sampling stations

Sampling was carried out in the Algerian eastern coast from the two ports of Annaba and El-Kala (Fig. 1). Annaba City has one of the major industrial ports in Algeria, with a high shipping activity where it is exposed to chronic hydrocarbon pollution. The port of El-Kala is rather characterized by the presence of small fishing boats throughout the year, which use hydrocarbons as a fuel.

About 1 l of surface seawater sample was collected in sterilized containers from sites containing spots of oil at each port. Samples were taken during the period of March–July and September–November. The samples have been stored at 4 °C during the transport.

Physical and chemical analyses

The physico-chemical analyses were performed to determine the total hydrocarbon levels and the concentrations of total nitrogen and phosphates by the methods described in Table 1.

Isolation, identification, and selection of strains

Isolations were carried out on several types of agar culture media, nutrient agar, Chapman, and Mac-

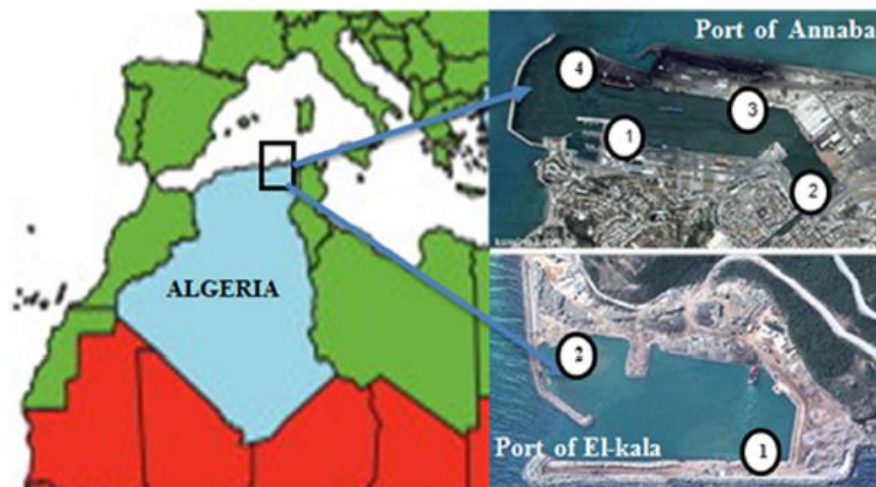


Fig. 1 Study sites and location of sampling stations

Conkey (Marchal et al. 1982). The identification was based on morphological and biochemical analyses (Api 20E and 20NE strips, Biomerieux) and on molecular PCR amplification and sequencing of 16S rDNA gene with primers 27f and 1401r as described in Batisson et al. (2009). Phylogenetic analysis of the strains was also performed (Wang et al. 2007). The evolutionary relationship between different strains was deduced using the neighbor-joining method (Saitou and Nei 1987).

In order to see their growth and development, the isolated indigenous bacterial strains were then grown on synthetic seawater agar consisting of Tris (2 g L^{-1}), NaCl (23 g L^{-1}), NH_4Cl (1 g L^{-1}), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

(6 g L^{-1}), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5 g L^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1 g L^{-1}), and agar (15 g L^{-1}) (Soltani 2004) supplemented with 1 ml of hydrocarbon (crude oil supplied by the Skikda Oil Refinery). The selection of strains was obtained after incubating on the Petri dishes at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ for a period ranging from 24 h to 7 days (Leahy and Colwell 1990).

Tests of bacteria growth in the presence of alkanes and refined hydrocarbons

Among the isolated and identified strains, four were subjected to growth tests in the presence of hydrocarbons and biostimulation with nitrogen and phosphates, respectively, equal to 1.5 g KNO_3 and $45 \text{ mg NaH}_2\text{PO}_4$ in a final volume of 300 ml, respectively. The cultures were carried out in sterile synthetic seawater with added 1 ml alkanes, hexane C_6H_{14} , heptanes C_7H_{16} , decane $\text{C}_{10}\text{H}_{22}$, cyclohexane C_6H_{12} , or refined hydrocarbon (gasoline) as the sole carbon and energy source. The media were incubated in a bacteriological incubator at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ with stirring at 150 rpm in aerobic condition. Control cultures were performed without biostimulation. The growth kinetics was estimated through the turbidity media by measuring optical densities at 600 nm (Perry et al. 2004). Finally, the hydrocarbon concentrations were determined (Table 1) before and after bacterial growth. A multivariate analysis of

Table 1 Measurement methods of hydrocarbons, total nitrogen, and total phosphates

Parameters	Methods	Standard
Total hydrocarbons (mg L^{-1})	Chemical oxygen demand (COD) determination after extraction with pentane	Spectrophotometry N931241
Total nitrogen (mg L^{-1})	Digestion peroxodisulfate 2,6-dimethylphenol	Digestion DIN EN ISO 11905-1H36 Determination ISO 38405 7890-1.DIN
Total phosphate (mg L^{-1})	Molybdenum blue	EPA 365.2 + 3, APHA 4500-PE; DIN EN ISO 6878-D11

variance (MANOVA) has been performed at $\alpha = 0.05$ (Hand and Taylor 1987; Kutner et al. 2005).

Results and discussion

Physico-chemical parameters

Results of physicochemical analysis showed that the highest rate of total hydrocarbons (THCs) was registered in the seawater of Annaba port with 111 mg L^{-1} . It is ten times higher than the Algerian standard, which recommends a limit of total hydrocarbons of 10 mg L^{-1} , while the THC of Cape Guard, station considered as a control, is low with only 4.80 mg L^{-1} . This station is situated north-west of the port with a distance of about 10 km. The rate of THC at the fishing port of El-Kala was 11.20 mg L^{-1} (Table 2). The amounts of nitrogen and phosphates remain low in the three stations. Thus, Algerian standard for water allows a maximum of 30 mg L^{-1} for total nitrogen and 10 mg L^{-1} for total phosphates (J.O.R.A 2006). The maximum rate of nitrogen was recorded at the Cape Guard station with 5.4 mg L^{-1} . For phosphates, the maximum concentration was observed at the Port of Annaba with 0.7 mg L^{-1} (Table 2).

Identification and selection of strains

A total of 53 bacterial strains and consortia (Gram+ and Gram-) as well as some yeasts were isolated and cultured on synthetic seawater agar in the presence of 1 ml crude oil as the unique source of carbon and energy. After incubation at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ for a period of 7 days, 17 strains have been developed on the agar. Four of them were chosen based on the morphological analysis of the colonies and the growth speed on synthetic seawater agar containing hydrocarbons (Table 3).

Table 2 Results of chemical analysis (mg L^{-1}) of seawater samples

Stations/parameters	Total hydrocarbons	Total nitrogen	Total phosphate
Seawater of Cap Guarde	4.80	5.40	0.02
Seawater of El-Kala	11.20	1.10	0.20
Seawater of Annaba	111.00	0.60	0.70

Table 3 Culture evolution of selected strains in the synthetic seawater-hydrocarbon agar medium

Culture on synthetic seawater-hydrocarbon agar (crude oil)	24 h	48 h	72 h	96 h	7 days
<i>Vibrio alginolyticus</i> PB-WC 11099	-	-	+/-	+	+
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> strain NB11_3A	-	+/-	+	+	+
<i>Halomonas venusta</i> strain NY-8	-	+/-	+/-	+	+
<i>Dietzia</i> sp. CNJ898 PLO4	-	+	+	+	+

The morphological, microscopic, and biochemical characteristics of these strains are mentioned in the Table 4.

The molecular identification allowed assessing the phylogenetic relationship between the different strains. The optimal tree with the sum of branch length was 0.63253343 (Fig. 2). The shaft is drawn with branch lengths at the same units as those of evolutionary distances used to infer a phylogenetic tree. The evolutionary distances were calculated using the maximum composite likelihood method (Tamura et al. 2004) and are in units of the number of base substitutions per site. The positions of codons were included first + second + third + no coding. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the data set (full option to delete). There were a total of 426 positions in the final data set. Phylogenetic analyses were conducted in 5 MEGA (Tamura et al. 2007).

Growth species in the presence of alkanes

According to Das and Chandran (2011), petroleum hydrocarbons in nature are degraded by various groups of microorganisms capable of using hydrocarbons as nutrients. The growth of the strains isolated in the presence of different hydrocarbons as unique carbon source yielded the following results depending on the species tested.

Vibrio alginolyticus PB-11099 WC

The *Vibrio* species are part of the family *Vibrionaceae*, class of γ -*Proteobacteria* (Cappello et al. 2012). They are heterotrophic bacteria part of the most abundant species among the cultivated bacteria in marine

Table 4 Morphological, microscopic, and biochemical characteristics of selected strains

Bacterium	<i>Vibrio alginolyticus</i> PB-WC 11099	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> strain NB11_3A	<i>Halomonas venusta</i> strain NY-8	<i>Dietzia</i> sp. CNJ898 PLO4
Gram	–	+	–	+
Bacillus form	Curved bacilli	Curved bacilli with rounded ends	Bacilli with rounded ends	<i>Cocco bacilli</i>
Aggregation	Isolated	Isolated by teaming mode 2 or short silver chain	Isolated, two, or short chainlets	
Mobility	+++++	++	++	–
Oxidase	+	–	+	–
Catalase	+	–	+	+
Appearance of colonies	Pleated concentric striation smooth surface	Circulars	Round with regular contours, mucous	Punctiform, circular with regular contours
Colony size	6–8 mm in diameter	0.5–1 mm in diameter	1–2 mm in diameter	0.1–0.5 mm in diameter
Color of the colony and relief	Cream, plate spread oblique	Range, plate, smooth surface, opaque	White opaque curved, smooth surface	Orange-red, curved, opaque

environments such as coastal waters, estuaries, sediment, and aquaculture infrastructure (Thompson et al. 2004). Some species such as *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. hollisae*, *V. alginolyticus*, *V. fluviales*, and *V. damsela* are pathogenic to humans and animals (Tantillo et al. 2004).

Environmentally, and according to Grossart et al. (2005), *Vibrio* plays a very important role in the degradation of organic matter. The growth of *V. alginolyticus* WC PB-11099 shows a very short-latency phase, 2 h in the presence of hexane C₆H₁₄ (Fig. 3a) and 24 h with heptane C₇H₁₆ (Fig. 3b). Overall, the growth was greater in the presence of hexane than heptane. Indeed, the optical density (OD) increased rapidly with hexane from 0.164 to 0.694 within 24 h and the maximum growth heptane was achieved after 72 h with an OD of about 0.49 (Fig. 3b). This growth proves the hypothesis of Ratledge (1978) that some bacteria are able to grow in

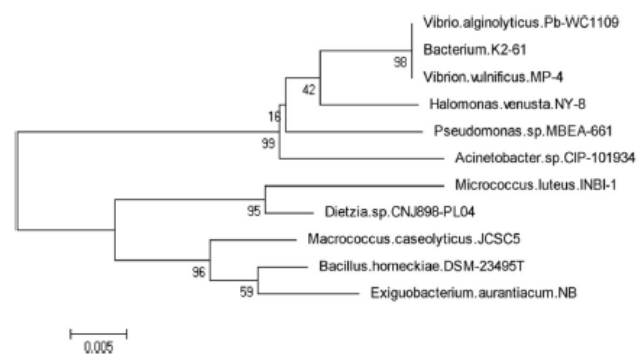
the presence of short chain of alkanes. However, in the presence of decane, growth was faster with a short-latency phase and it reached an OD of 1.97 after 48 h (Fig. 3c).

The species shows an easy adaptation with longer carbon chains greater than nine carbons (Ratledge 1978). With cyclohexane, bacteria showed an adaptive difficulty which was reflected in a reduction of the number of viable cells and a drop in OD during the first 48 h. Indeed, after 48 h, there was an increase in the OD until 0.36 synonymous of cell growth (Fig. 3d).

E. aurantiacum strain NB11_3A

According to the work of Gita and Suparna (2008b), the species *E. aurantiacum* NCDO 2321 has a capacity of degrading a wide range of *n*-alkanes. Furthermore, it can

Fig. 2 Evolutionary relationships between the 4 species tested and 11 taxa identified



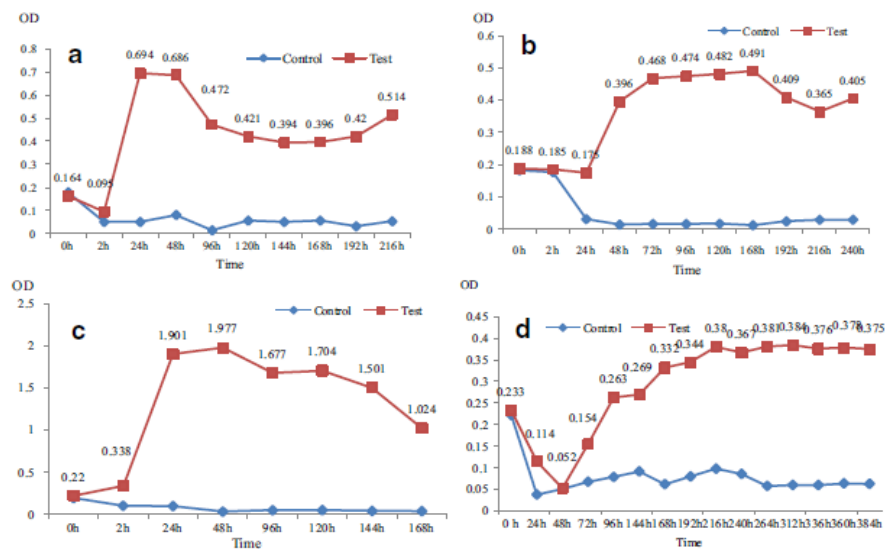


Fig. 3 Growth *Vibrio alginolyticus* WC PB-11099 (in the presence of a hexane, b heptane, c decane, and d cyclohexane as the only source of carbon and energy)

be used for bioremediation and for the treatment of waste oil in the bioreactors.

Generally, *E. aurantiacum* NB11_3A strain has similar growth whatever the alkane tested (Fig. 4), although the strain reaches a higher OD value (1.12) in the presence of decane after 72 h (Fig. 4a). Despite maladjustments with cyclohexane during the first 2 h of growth, the strain has an exponential phase growth where it reaches a plateau phase after 168 h (Fig. 4d).

Halomonas venusta strain NY-8

According to Rojas et al. (2009), the genus *Halomonas* is the most abundant bacterial group in marine environments. The species most representative of the genus *Halomonas* is *H. venusta* (Wang et al. 2009). *H. venusta* is a halophilic bacterium of the family *Halomonadaceae*, belongs to the class of *Gammaproteobacteria* (Franzmann et al. 1988; Dobson and Franzmann 1996). Many studies have reported that *Halomonas shengliensis* (Wang et al. 2007), *Halomonas* sp. C2SS100, and *Pseudomonas* sp. C450 R (Mnif et al. 2009; Mnif et al. 2011) use crude oil compounds as substrate for growth.

The genus *Halomonas* was able to assimilate a wide variety of carbon source. Several studies (Okamoto et al. 2004; Mnif et al. 2011) have isolated *Halomonas* sp. C2SS100 and *Pseudomonas* sp. C450R, which degrade from 39 to 96% of the aliphatic fraction C13–C29 of crude oil. *H. venusta* NY-8 showed similar growth kinetics to other strains, with a very long-latency period of 216 h with hexane (Fig. 5a) and an adaptive difficulty in the early stage (2 h) with heptane (Fig. 5b) and cyclohexane (Fig. 5d). The growth rate was with slow exponential phases and low OD of 0.38, 0.097, and 0.189, respectively for hexane, heptanes, and cyclohexane (Fig. 5a, b, d). The growth of *H. venusta* NY-8 in the presence of decane seemed faster with an OD of 0.46 (Fig. 5c) after 4 days of culture.

Dietzia sp. CNJ898 PLO4

Dietzia spp. was isolated in different environments like tropical soils (Von der Weid et al. 2007), alkaline lakes (Duckworth et al. 1998), contaminated land with oil (Borzenkov et al. 2006), deep marine sediments (Colquhoun et al. 1998), and the skin and the intestinal tract of marine fish (Yumoto et al. 2002). Nowadays, many studies have reported that microorganisms as

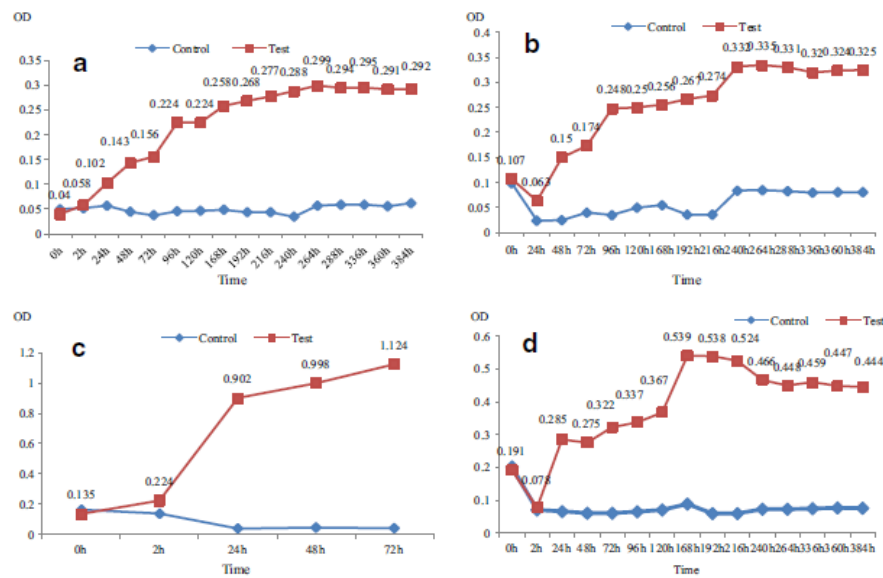


Fig. 4 Growth of *Exiguobacterium aurantiacum* NB11_3A strain (in the presence of a hexane, b heptane, c decane, and d cyclohexane as only source of carbon and energy)

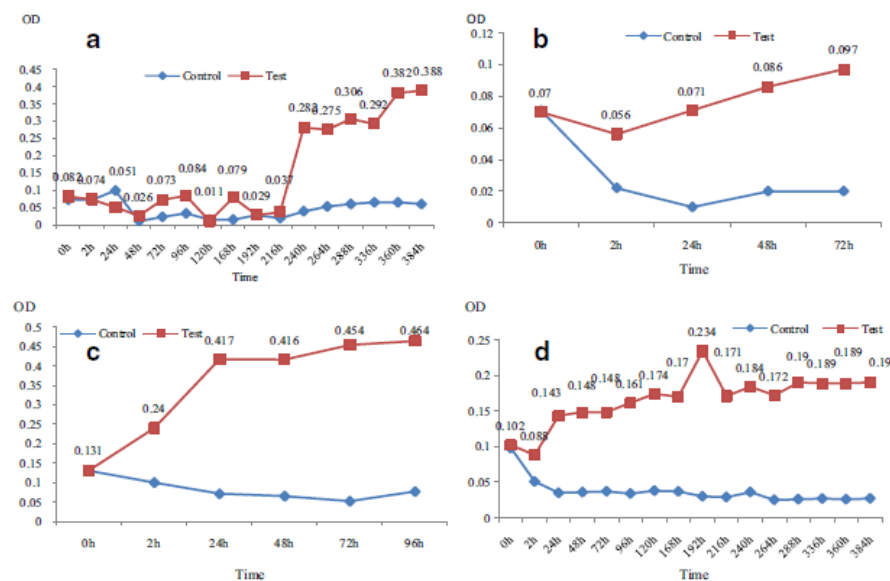


Fig. 5 Growth *Halomonas venusta* strain NY-8 (in the presence of a hexane, b heptane, c decane, and d cyclohexane only source of carbon and energy)

Dietzia sp. (Riis et al. 2003) and *Dietzia maris* and *Rhodococcus erythropolis* (Zvyagintseva et al. 2001) can use crude oil compounds as a growth substrate.

Dietzia sp. CNJ898 PLO4 easily degrades decane and to a lesser extent hexane. The cell adaptation was short with a rapid increase in OD of 0.86 (Fig. 6a) in hexane after 240 h of culture and 1.8 with decane after 48 h (Fig. 6c). The growth rate was lower with heptane and cyclohexane, respectively, with a maximum OD of 0.097–0.43 (Fig. 6b) and 0.32 (Fig. 6d) after 192 h of culture. Lower ODs in early stage with both alkanes were recorded. A resumption of growth was observed after 24 h in heptanes (Fig. 6b) and 48 h in cyclohexane (Fig. 6d), unlike the controls which have a low OD.

Several species of *Dietzia* described to date have shown their ability to degrade aliphatic hydrocarbons (Yumoto et al. 2002). For example, *D. maris* DSM 43672 is able to grow with C6 *n*-alkanes C17, C19, and C23 (Raeiney et al. 1995); *Dietzia psychrocaliphila* uses *n*-alkanes C13, C15, C16, C20, and C24 and pristane but does not use C10 or C32 (Yumoto et al. 2002). *Dietzia* sp. E1 uses *n*-alkanes with lengths chain ranging from C6 to C30 (Bihari et al. 2010). The strain of *Dietzia* 12–45-1b DQ is able to use a wide range of *n*-alkanes (C6–C40), aromatics, and crude oil as a unique carbon

source for growth. Xing Xang-Biao et al. (2011) and Von der Weid et al. (2007) confirmed the ability of *Dietzia cinnamiae* p4 to grow in a wide range of *n*-alkanes of different sizes (C11 to C36), crude oil, and aromatic compounds (e.g., benzene), revealing that this microorganism can be used in bioremediation of petroleum hydrocarbons.

Effect of biostimulation in the presence of refined hydrocarbons

Petroleum products are introduced into the marine environment in the form of refined products. Fuels and oils have compositions that depend on the origin of oil and sudden operations during refining. There are about 230 components for gasoline and 2000 for heavy fuel oil (Soltani 2004). Rejection of products in marine and terrestrial environments causes a proliferation of microorganisms capable to grow on hydrocarbons and their degradation products. Their number is much higher in chronically polluted areas and increases after an intake of hydrocarbons in contaminated sites (Bartha and Atlas 1977). In polluted environments, specialized microorganisms are abundant because of their adaptation to pollutants (Marchal et al. 2003). The amounts of

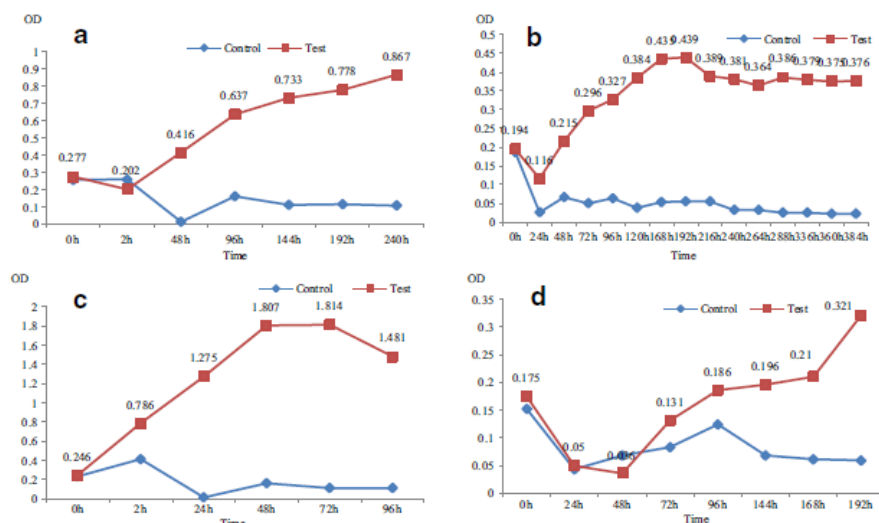


Fig. 6 Growth of *Dietzia* sp. CNJ898PLO4 (in the presence of a hexane, b heptane, c decane, and d cyclohexane as unique source of carbon and energy)

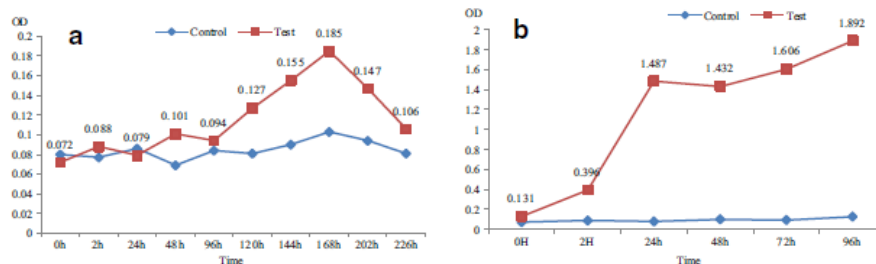


Fig. 9 Growth of *Halomonas venusta* NY-8 in the presence of gasoline (a without biostimulation and b with biostimulation)

addition, at the end of the exponential phase, the OD was 2.193 and 0.436, respectively, for the biostimulated and the nonstimulated mediums.

Concentrations of hydrocarbons

The hydrocarbon concentrations were determined before and after bacterial growth. Table 5 expresses the initial concentration and the different results obtained with the four strains.

All strains appeared to degrade hydrocarbons with different rates. Thus, the maximum degradation was obtained with *H. venusta* strain NY-8 in the presence of heptane 3.12 mg L^{-1} . With *E. aurantiacum* strain NB11_3A, the lowest rate of degradation was observed in the presence of 21.23 mg L^{-1} of cyclohexane. The *V. alginolyticus* PB-WC 11099 gave the best results with all tested *n*-alkanes, but *Dietzia* sp. CNJ898 PLO4 appeared more effective for the degradation of gasoline with a rate of 7.93 mg L^{-1} (Table 5).

The MANOVA analysis at the threshold $\alpha = 0.05$ shows that the values of p are generally less than α we reject at the null hypothesis. Thus, using the Scheffe test with strains *E. aurantiacum* NB11_3A and

V. alginolyticus PB-WC 11099, there are no significant differences compared with heptane, the same for *H. venusta* NY-8 with hexane.

For a threshold $\alpha = 0.01$, as the majority of the values of p are less than 0.01, we have sufficient proof that at $\alpha = 0.01$, the correlations are not zero. There are very significant differences in the degradation of hydrocarbons with the *E. aurantiacum* NB11_3A (using Fisher's test). The results were confirmed by partial correlations for each variable (*E. aurantiacum* NB11_3A, $r = 0.971$; *V. alginolyticus* PB-WC 11099, $r = 0.968$; *H. venusta* NY-8, $r = 0.971$; and *Dietzia* sp. CNJ898 PLO4, $r = 0.922$).

Conclusion

In the current study, several bacterial strains were isolated and identified from the seawaters of two ports subjected to chronic oil pollution. The growth test carried out with four selected strains, *Dietzia* sp. CNJ898 PLO4, *E. aurantiacum* NB11_3A, *H. venusta* NY-8, and *V. alginolyticus* WC PB-11099, have shown that all the strains are able to

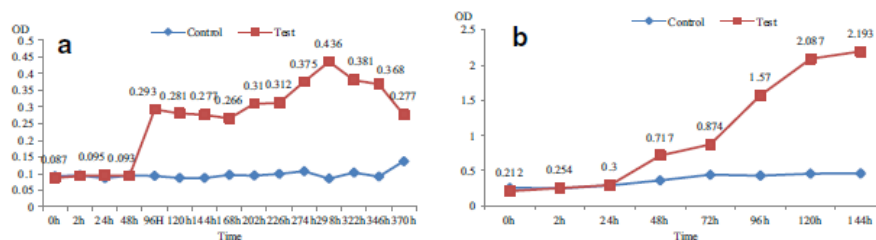


Fig. 10 Growth of *Dietzia* sp. CNJ898 PLO4 in the presence of gasoline (a without biostimulation and b with biostimulation)

Table 5 Concentrations (mg L⁻¹) of hydrocarbons before and after the strain growth

Hydrocarbons <i>n</i> -alkanes and gasoline	Initial concentration	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i> strain NB11_3A	<i>Vibrio alginolyticus</i> PB-WC 11099	<i>Halomonas venusta</i> strain NY-8	<i>Dietzia</i> sp. CNJ898 PLO4
Cyclohexane	27	21.23 ± 01.18	7.07 ± 00.24	8.60 ± 00.16	11.47 ± 00.16
Decane	27	6.53 ± 00.89	4.43 ± 00.16	11.35 ± 01.16	5.20 ± 00.32
Heptane	27	9.53 ± 00.52	3.76 ± 00.05	3.12 ± 00.39	5.60 ± 00.56
Hexane	27	3.48 ± 00.60	5.13 ± 00.16	7.25 ± 00.12	5.93 ± 00.41
Gasoline	27	9.00 ± 00.16	13.66 ± 00.27	10.00 ± 00.16	7.93 ± 00.08

grow in the presence of hydrocarbons, but with a different kinetic growth, suggesting that they are able to use these molecules as a source of carbon and energy. In addition, nitrogen and phosphate input accelerate the growth of the studied strains. The tested strains appeared to be very active, in which the best results of biodegradation were obtained with *V. alginolyticus* PB-11099 WC. These bacteria could thus be used for bioremediation to fight against marine oil pollution.

References

- Arulazhagan, P., Vasudevan, N., & Yeom, I. T. (2010). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a halotolerant bacterial consortium isolated from marine environment. *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 7(4), 639–652.
- Atlas, R. M., & Atlas, M. C. (1991). Biodegradation of oil and bioremediation of oil spills. *Current Opinion in Biotechnology*, 2, 440–443.
- Bartha, R., & Atlas, R. M. (1977). The microbiology of aquatic oil spills. *Advances in Applied Microbiology*, 22, 225–266.
- Batisson, I., Crouzet, O., Hoggan, P. B., Sancelme, M., Mangot, J. F., Mallet, C., & Bohatier, J. (2009). Isolation and characterization of mesotriene-degrading *Bacillus* sp. from soil. *Environmental Pollution*, 157, 1195–1201.
- Bihari, Z., Szabo, Z., Szvetnik, A., Balazs, M., Bartos, P., Tolmacsov, P., Zambou, Z., & Kiss, T. (2010). Characterization of a novel long chain *n*-alkane degrading strain, *Dietzia* sp. E1. *Z. Naturforsch.*, 65, 693–700.
- Borzenkov, I. A., Milekhina, E. I., Gotoeva, M. T., Rozanova, E. P., & Beliaev, S. S. (2006). The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tatarstan, western Siberia, and Vietnam. *Microbiology*, 75, 82–89.
- Cappello, S., Caruso, G., Zampino, D., Monticelli, L. S., Maimone, G., Denaro, R., Tripodo, B., Troussellier, M., Yakimov, M. M., & Giuliano, L. (2007). Microbial community dynamics during assays of harbour oil spill bioremediation: a microscale simulation study. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), 184–194.
- Cappello, S., Genovese, M., Della Torre, C., Crisari, A., Hassanshahian, M., Santisi, S., Calogero, R., & Yakimov, M. M. (2012). Effect of bioemulsificant exopolysaccharide EPS 2003 on microbial community dynamics during assays of oil spill bioremediation: a microcosm study. *Marine Pollution Bulletin*, 64(12), 2820–2828.
- Colquhoun, J. A., Moxson, J., Goodfellow, M., Ward, A. C., Horikoshi, K., & Bull, A. T. (1998). Novel rhodococci and other mycolate actinomycetes from the deep sea. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 74, 27–40.
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, 1–13.
- Dastgheib, S. M. M., Amoozegar, M. A., Khajeh, K., Shavandi, M., & Ventosa, A. (2012). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, 789–798.
- Dobson, S. J., & Franzmann, P. D. (1996). Unification of the genera *Deleya*, *Halomonas*, and *Halovibrio* and the species *Paracoccus halodenitrificus* into a single genus *Halomonas*, and placement of the genus *Zymobacter* in the family *Halomonadaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46, 550–558.
- Duckworth, A. W., Grant, S., Grant, W. D., Jones, B. E., & Meijer, D. (1998). *Dietzia natronolimnias* sp. nov., a new member of the genus *Dietzia* isolated from an East African soda lake. *Extremophile*, 2, 359–366.
- Franzmann, P. D., Wehmeyer, U., & Stackebrandt, E. (1988). *Halomonadaceae* fam. nov., a new family of the class *Proteobacteria* to accommodate the genera *Halomonas* and *Deleya*. *Systematic and Applied Microbiology*, 11, 16–19.
- Gabet, S. (2004). Remobilisation d'hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat de l'université de Limoges, spécialité Chimie et Microbiologie de l'Eau, p. 177.
- Gita, M., & Supama, M. (2008a). Biodegradation rate of diesel range *n*-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *Indian Journal of Biotechnology*, 7, 295–306.
- Gita, M., & Supama, M. (2008b). Biodegradation rate of diesel range *n*-alkanes by bacterial cultures *Exiguobacterium aurantiacum* and *Burkholderia cepacia*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61, 240–250.
- Gong, Y., Zhao, X., Cai, Z., O'Riely, S., Hao, X., & Zhao, D. (2013). 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*. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.12.024.
- Grossart, H. P., Levoid, F., Allgaier, M., Simon, M., & Brinkhoff, T. (2005). Marine diatom species harbour distinct bacterial communities. *Environmental Microbiology*, 7, 860–873.
- Hand, D. J. & Taylor, C. C. (1987). Multivariate analysis of variance and repeated measures: a practical approach to behavioural scientists. Chapman & Hall (Ed), p. 340.
- Hassanshahian, M., Imtiaz, G., & Cappello, S. (2012). Isolation and characterization of crude-oil-degraded bacteria of the Persian Gulf and the Caspian Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 64, 7–12.
- Jain, R. K., Kapur, M., Labana, S., Lal, B., Sarma, P. M., Bhattacharya, D., & Thakur, I. S. (2005). Microbial diversity: application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Current Science*, 89(1), 101–112.
- J.O.R.A.: Journal Officiel de la République Algérienne n° 26 (2006).
- Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J., Neter, J., & Li, W. (2005). Applied linear statistical models. McGraw-Hill (5 edn), p. 1396.
- Leahy, J. G., & Colwell, R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbial Reviews*, 54, 305–315.
- Liu, Y., Li, L., Wu, Y., Tian, W., Zhang, L., Xu, I., Shen, Q., & Shen, B. (2010). Isolation of an alkane-degrading *Alcanivorax* sp. strain 2B5 and cloning of the alkB gene. *Bioresource Technology*, 101, 310–316.
- Marchal, N., Bourdon, J.L., & Richard, C.L. (Eds.) (1982). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin. 482 pp.
- Marchal, R., Perret, S., Solano-Serena, F., & Vandecasteele, J. P. (2003). Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil & Gas Science and Technology Review, IFP*, 58(4), 441–448.
- Mnif, S., Rojas, R., Miranda, C. D., Amaro, A. M., et al. (2009). Pathogenicity of a highly exopolysaccharide-producing *Halomonas* strain causing epizootics in larval cultures of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Microbiol Ecology*, 57, 129–139.
- Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., & Sayadi, S. (2011). Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oil field-selected bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 525–536.
- Molina, M., Gonzalez, N., Bautista, L., Sanz, R., Simarro, R., Sanchez, I., & Sanz, J. (2009). Isolation and genetic identification of PAH degrading bacteria from microbial consortium. *Biodegradation*, 20(6), 789–800.
- Moxley, K., & Schmidt, S. (2010). Preliminary characterization of an estuarine, benzoate-utilizing *Vibrio* sp. isolated from Durban harbour, South Africa. In A. Mendez-Vilas (Ed.), *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology* (Vol. 2, pp. 1249–1254).
- Okamoto, T., Maruyama, A., Imura, S., Takeyama, H., & Naganuma, T. (2004). Comparative phylogenetic analyses of *Halomonas variabilis* and related organisms based on 16 r RNA, gyrB and ect BC. Gene sequences. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, 323–333.
- Olajire, A. A., & Essien, J. P. (2014). Aerobic degradation of petroleum components by microbial consortia. *Petroleum & Environmental Biotechnology*, 5, 195. doi:10.4172/2157-7463.1000195.
- Perry, J. J., Staley, T. J., & Lory, S. (2004). Croissance des microorganismes. In A. Sinauer (Ed.), *Microbiologie, Inc, sous le titre Microbial Life* ©2002, USA (p. 136).
- Raciney, F. A., Klatte, S., Kroppenstedt, R. M., & Stackebrandt, E. (1995). *Dietzia*, new genus including *Dietzia maris* comb. nov., formerly *Rhodococcus maris*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45, 32–36.
- Rahman, K. S. M., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P., & Banat, I. M. (2004). Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology*, 85, 257–261.
- Ratlege, C. (1978). Degradation of aliphatic hydrocarbons. In R. J. Atkinson (Ed.), *Development in biodegradation of hydrocarbons* (Vol. 1, pp. 1–46). London: Applied Sciences Publishers.
- Riis, V., Kleinstuber, S., & Babel, W. (2003). Influence of high salinities on the degradation of diesel fuel by bacteria consortia. *Canadian Journal of Microbiology*, 49, 713–772.
- Rojas, R., Miranda, C. D., & Amaro, A. M. (2009). Pathogenicity of a highly exopolysaccharide-producing *Halomonas* strain causing epizootics in larval culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Microbiol Ecology*, 57, 129–139.
- Saitsou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- Sauret, C. (2011). Ecologie des communautés bactériennes marines soumises à une pollution pétrolière. Influence des facteurs environnementaux, de la prédation et de la récurrence des pollutions. Thèse de Doctorat. Université Pierre et Marie Curie. Paris 6. p 167.
- Simon-Colin, C., Raguénès, G., Cozien, J., Guezennec, J. G. (2008). *Halomonas profundus* sp. nov, a new PHA-producing bacterium isolated from deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1425–1432.
- Sivaraman, C., Ganguly, A., Nikolaus, M., & Muturi, S. (2011). Isolation of hydrocarbonoclastic bacteria from bilge oil contaminated water. *International journal of Environmental Science and Technology*, 8(3), 461–470.
- 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, University of Pierre et Marie curie. Paris 6. p 284.
- Tamura, K., Nei, M., & Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 101, 11030–11035.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599.
- Tantillo, G. M., Fontanarosa, M., Di Pinto, A., & Musti, M. (2004). Updated perspectives on emerging vibrios associated with human infections. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 117–126.
- Thompson, F. L., Lida, T., & Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68, 403–431.
- Van Hamme, J. D., & Ward, O. P. (2001). Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas* sp. strain ja 5-b45 and

- Rhodococcus* sp. strain f9-79 during growth on crude oil and effect of chemical surfactant on them. *Appl. Environ Microbiol.*, 67(10), 4874–4879.
- Von der Weid, I., Marques, J. M., Cunha, C. D., Lippi, R. K., Dos Santos, S. C., Rosado, A. S., Lins, U., & Seldin, L. (2007). Identification and biodegradation potential of a novel strain of *Dietzia cinnamea* isolated from a petroleum-contaminated tropical soil. *Systematic and Applied Microbiology*, 30, 331–333.
- Wang, Y. N., Cai, H., Chi, C. Q., Lu, A. H., Lin, X. G., Jian, Z. F., et al. (2007). *Halomonas shengliensis* sp. nov., a moderately halophilic, denitrifying, crude-oil-utilizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 1222–1226.
- Wang, Z. F., Xiao, T., Pang, S., Liu, M., & Yue, H. (2009). Isolation and identification of bacteria associated with the surfaces of several algal species. *Chinese Journal of Oceanography and Limnology*, 27, 487–492.
- Xing Xang-Biao, W., Chang-Qiao, C., Yong, N., Yue-Qin, T., Yan, T., Gang, W., & Xiao-Lei, W. (2011). Degradation of petroleum hydrocarbons (C₆–C₄₀) and crude oil by a novel *Dietzia* strain. *Bioresource Technology*, 102, 7755–7761.
- Yumoto, L., Nakamura, A., Iwata, H., Kojima, K., Kusumoto, K., Nodasaka, Y., & Matsuyama, H. (2002). *Dietzia psychralcaliphila* sp. nov., a novel facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 85–90.
- Zhang, Z., Hou, Z., Yang, C., Ma, C., Tao, F., & Xu, P. (2011). Degradation of *n*-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource. Technol.*, 102, 4111–4116.
- Zvyagintseva, I. S., Poglasova, M. N., Gotoeva, M. T., & Belyaev, S. S. (2001). Effect of the medium salinity on oil degradation by *Nocardioform* bacteria. *Microbiology*, 70, 652–656.