



**HAL**  
open science

# Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production des biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne au sein de trois ports de Sfax, Tunisie

Dorra Hentati

► **To cite this version:**

Dorra Hentati. Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production des biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne au sein de trois ports de Sfax, Tunisie. Microbiologie et Parasitologie. Université Montpellier; Université de Sfax (Tunisie), 2018. Français. NNT : 2018MONTG064 . tel-02045890

**HAL Id: tel-02045890**

**<https://theses.hal.science/tel-02045890>**

Submitted on 22 Feb 2019

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biotechnologie & Microbiologie

École doctorale Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement,

Institut National de la Recherche Agronomique (LBE-INRA), France

&

En partenariat international avec

École Doctorale Sciences Fondamentales de La Faculté des Sciences de Sfax

Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux,

Centre de Biotechnologie de Sfax (LBPE-CBS), Tunisie

## Isolement et caractérisation des bactéries marines hydrocarbonoclastes, production des biosurfactants et étude de la biodiversité microbienne au sein de trois ports de Sfax, Tunisie

Présentée par : **Dorra HENTATI**

Le 17 Décembre 2018

Sous la direction de :

Jean-Jacques GODON & Mohamed CHAMKHA

Devant le jury composé de :

Sami MAALEJ, Professeur, Faculté des Sciences de Sfax, Tunisie

Président

Dhouha GHRIBI, Professeur, Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax, Tunisie

Rapporteur

Robert DURAN, Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour, France

Rapporteur

Jérôme HARMAND, Directeur de recherche, LBE-INRA, Narbonne, France

Examineur

Mohamed CHAMKHA, Professeur, Centre de Biotechnologie de Sfax, Tunisie

Directeur de thèse

Jean-Jacques GODON, Directeur de recherche, LBE-INRA, Narbonne, France

Directeur de thèse



UNIVERSITÉ  
DE MONTPELLIER

Ce travail de thèse a été réalisé essentiellement

Au

***Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE) au Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS)- TUNISIE.***

Et en partie en collaboration avec :

***Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE), INRA, Narbonne, FRANCE.***

Dans le cadre d'un Projet PHC-Utique 15G808 intitulé « Biodiversité et dynamique microbienne de certains environnements marins contaminés par des hydrocarbures dans des ports tunisiens - Biodégradation des hydrocarbures pétroliers et production des biosurfactants »

***Et au Laboratoire de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie, Université de Barcelone, ESPAGNE.***

Dans le cadre d'une bourse d'alternance de deux mois sous l'égide du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique (MESRS).

# DEDICACES

Du plus fond du cœur et avec l'intensité de mes émotions, je dédie ce travail :

A mon cher papa **Ezzedine**

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Votre chaleur paternelle a été et sera toujours pour moi d'un grand réconfort.

Ce travail est le fruit de vos sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation et ma formation.

Je souhaite que vous trouviez en moi source de fierté.

A ma chère maman **Fatma**

Tu es l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Puisse

Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A la mémoire de ma aimée et regrettée tante **Moufida** qui nous a quitté si brusquement.

« Que son âme repose en paix ».

A ma chère sœur **Mouna**, son époux **Brahim** et leurs adorables enfants **Med Amine** et **Yasmine**,

A mon cher frère **Wael** et sa fiancée **Nour**

Pour toute l'affection qu'ils m'ont toujours témoignée, je leur souhaite une vie pleine de bonheur, de gloire, de triomphe et de succès.

A Ma très chère **Fadwa**

Pour ton sourire qui fait ma joie dans les moments heureux et qui me donne le courage de continuer dans les moments difficiles.

Merci d'être toujours à mes côtés. Que Dieu nous garde toujours unies.

A ma grande famille qui sont nombreux et que je ne citerai pas ici volontairement de peur

d'oublier l'un d'entre eux avec tout mon respect.

A tous mes amis et en particulier

**Mouna**, **Meriam**, **Raouia** et **Mariam**, pour tous les moments que nous avons partagés durant ces années des plus difficiles aux meilleurs, en espérant pouvoir en partager encore tant d'autres.

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

A tous ceux que j'aime et qui m'aiment

Que Dieu vous réserve bonne santé, bonheur et longue vie

**Dorra**



**« Il n'y a pas de réussite facile ni d'échecs définitifs »**

**Marcel Proust**

# REMERCIEMENTS

## الحمد لله رب العالمين

A l'issue de la rédaction de ce mémoire, je suis convaincue que le travail de thèse universitaire est loin d'être un travail solitaire. C'est avec très grand plaisir que je souhaite remercier tous ceux qui m'ont aidé ou soutenu pendant la préparation de ma thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier infiniment Monsieur **Prof. Sami SAYADI**, Directeur du Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE) et Directeur Général du Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), qui a eu la bienveillance de m'accueillir au sein du LBPE. Je le remercie pour sa confiance, ses conseils forts précieux, ainsi que pour le soutien financier accordé.

Je tiens particulièrement à exprimer fortement ma gratitude et mes sincères sentiments respectueux à mon directeur de thèse Monsieur, **Prof. Mohamed CHAMKHA**, Professeur au Laboratoire des Bioprocédés Environnementaux (LBPE), Centre de Biotechnologie de Sfax (CBS), et responsable du Projet «Bioremédiation», pour ses aides précieuses, ses conseils, ses discussions constructives et commentaires, ses encouragements et surtout d'avoir bien voulu diriger ce travail et de m'avoir accordé sa confiance. Son expertise et son support tout au long de mes travaux ont été grandement profitables. Ce travail représente les fruits de ses discussions. Votre rigueur scientifique, votre clairvoyance et votre perspicacité en même temps que votre amabilité et gentillesse m'ont été d'un grand apport au cours de ce travail. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma reconnaissance pour tous cela. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon plus grand respect pour vos directives et vos conseils tout au long de mes travaux de mastère et de thèse.

J'adresse mes remerciements les plus vifs et mes respects les plus profonds à Monsieur **Dr. Jean-Jacques GODON**, responsable de l'équipe d'Ecologie Microbienne et Biodiversité (EMB), au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE-INRA) de Narbonne, France, d'avoir fait l'honneur d'accepter d'être mon directeur de thèse en France. Je le remercie également pour ses conseils qu'il a su me faire bénéficier, de sa très grande culture scientifique, pour le temps qu'il a bien voulu me consacrer, pour ses conseils judicieux qu'il m'a prodigués et pour ses discussions constructives qu'il n'a cessé de m'orienter vers le bon chemin de la recherche.

Je tiens à remercier fortement Monsieur **Prof. Sami MAALEJ**, Professeur à la Faculté des Sciences de Sfax (FSS) et Directeur de l'Unité de Recherche «Biodiversité et Ecosystème Aquatiques», pour m'avoir honoré d'accepter de présider le jury de ma thèse et de juger ce travail.

Je remercie vivement, **Madame Prof. Dhouha GHRIBI**, Professeur à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Sfax (ISBS) pour l'honneur et le privilège qu'elle m'a accordé en acceptant d'être rapporteur et de juger ce travail.

Mes vifs remerciements s'adressent, également, à Monsieur **Prof. Robert DURAN**, Professeur à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, France, pour l'honneur qu'il m'a fait en assumant la tâche de rapporteur de ma thèse et de juger ce travail.

Je tiens à remercier vivement Monsieur **Dr. Jérôme HARMAND**, Directeur de Recherche au Laboratoire de Biotechnologie de l'Environnement (LBE-INRA) à Narbonne, France, de m'avoir fait l'honneur d'accepter d'être examinateur de ma thèse et de juger ce travail.

Je ne peux pas oublier de remercier très profondément mes collègues **Alif CHEBBI** Post-doctorant à l'Université de Milan, Bicocca, Italie, et ancien doctorant au sein de l'équipe «Bioremédiation» au LBPE, et **Meriam CHEFFI**, Doctorante au LBPE, pour leur soutien permanent, leur gentillesse, leur accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité leur aide, ainsi que pour leurs multiples encouragements. J'ai pris un grand plaisir à travailler avec eux. Je leur souhaite un avenir radieux, beaucoup de succès et plein de réussite dans leur vie.

Mes vifs remerciements s'adressent à Madame **Prof. Angeles MANRESA**, qui m'a permis de réaliser un stage au sein du Laboratoire de Microbiologie à la Faculté de Pharmacie, Université de Barcelone, Espagne, et de m'avoir permis de réaliser une partie de mes travaux de recherche se rapportant à la caractérisation structurale des biosurfactants dans d'excellentes conditions scientifiques.

Je remercie Monsieur **Slim LOUKIL** et Monsieur **Nidhal BACCAR**, Techniciens au LBPE, pour leur contribution technique lors de certaines analyses physico-chimiques des échantillons.

Je tiens à remercier Madame **Najla MHIRI**, Ingénieur au LBPE, Madame **Sonia KCHAOU** Technicienne au LBPE, pour leurs contributions précieuses lors des certaines analyses phylogénétique et phénotypique, respectivement, des souches bactériennes.

Je remercie également Madame **Fatma REZGUI**, Ingénieur au Service d'Analyses du CBS, et Mademoiselle **Lobna JLAIEL**, Technicienne au Service d'Analyses du CBS, pour leur participation précieuse dans les analyses GC-MS.

Je remercie chère Madame **Salma KCHAOU**, Secrétaire du Laboratoire LBPE, pour ses efforts lors des préparations de mes dossiers administratifs. J'exprime vraiment mes sentiments de reconnaissance pour cette admirable dame.

Je tiens à remercier aussi, Madame **Fatma BENAMOR**, Technicienne au LBPE, pour sa sympathie et son bienveillance à nous besoins dans le laboratoire.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à Madame **Fatma HADRICH**, Post-Doctorante au LBPE, pour les nombreuses interactions que nous avons eues, notamment pour la partie de la cytotoxicité et culture cellulaire et à Madame **Asma MAHMOUDI**, Doctorante au LBPE, pour m'avoir aidé et assisté dans la partie «Activité cicatrisante». Elles m'ont fait bénéficier de leur savoir-faire, de leurs précieux conseils et de leur constante gentillesse.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Madame **Sabrina BENMABROUK**, Docteur en Génie Biologique, qui a contribué dans la partie des analyses statistiques, en utilisant le logiciel R.

Je tiens à avouer sincèrement ma profonde gratitude à toute l'équipe de Laboratoire de Biotechnologie de l'environnement (LBE), Narbonne, et plus précisément Mesdames **Valérie BRU-ADAN**, **Anaïs BONNAFOUS** et **Gaëlle SANTA-CATALINA**, Techniciennes au sein de l'équipe d'Ecologie Microbienne et Biodiversité (EMB), qui m'ont aidé à la réalisation de la partie PCR-SSCP. Je remercie également Monsieur Prof. **Jérôme HAMELIN**, Directeur de recherche et Monsieur **Prof. Kim MILFERSTEDT**, Chargé de

Recherche, pour leur aide précieuse dans des analyses statistiques et moléculaires, respectivement.

Je remercie également Monsieur, **Didier MONTET**, HDR Chef de l'équipe Sureté des aliments, Cirad, Montpellier; Monsieur **Michel TORRIJOS**, Ingénieur de recherche LBE-INRA, Narbonne et Monsieur **Jean-François GHIGLIONE**, chargé de recherche CNRS-HDR, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Banyuls sur mer, pour m'avoir honoré d'assister les parcours mi-thèse durant mes travaux de recherche. Je les remercie pour leur sympathie, leurs compétences et leurs conseils très profitables.

Mes très sincères remerciements et mes sentiments distingués s'adressent à tous le personnel de l'Unité de Valorisation des Résultats de la Recherche (UVR) du CBS pour leurs aides importants à réaliser des essais de plusieurs fermentations de la souche FLU5, productrice des biosurfactants, et je cite particulièrement: Monsieur **Ilem HSSAIRI**, Ingénieur Général et Responsable de l'Unité Spécialisée UVR, ainsi que le cadre technique: Messieurs **Adel ZITOUN** (Ingénieur en chef); **Faïcel BOUKHILI** (Technicien); **Kamel M'RAD** (Assistant Principal du Laboratoire); **Nizar ELEUCH** (Assistant Principal du Laboratoire) et **Mohamed AMRI** (Ouvrier).

Je tiens à exprimer mes sentiments de reconnaissance pour mes amies Madame **Imen HALOUANI**, Doctorante, Madame **Neïla MAKHLOUFI**, Stagiaire en PFE, et Mademoiselle **Ilhem FRIKHA**, Stagiaire en PFE, membres du groupe «Bioremédiation» dirigé Par Monsieur Prof. Mohamed CHAMKHA, pour leur soutien et leurs efforts durant ces années. Je leurs souhaite un avenir radieux et plein de réussite.

Que Dr. **Fatma KARRAY**, Dr. **Sonia KHOUFI**, Dr. **Meriem TRIKI-ELLOUZE**, Dr. **Zouhaier BOUALLEGUI**, Dr. **Hatem ZAGHDEN** et Monsieur Prof. **Hafedh DHOUB**, trouvent ici l'expression de ma sympathie pour leur aide morale et leurs discussions amicales, fructueuses et constructives qui m'ont permis de surmonter beaucoup de difficultés. Je remercie également Monsieur **Fathi ALOUI** et Monsieur **Firas FEKI**, Ingénieurs généraux au LBPE.

Mes vifs remerciements à tous mes collègues et amis du LBPE pour les discussions scientifiques que nous avons eu, pour leur sympathie, leur encouragement, leur gentillesse ainsi que pour leur amitié qui n'a cessé de croître au fil du temps, qu'ils soient assurés que je n'oublierais pas ces années passées presque quotidiennement en leur compagnie. Je leur souhaite plein de succès dans leurs projets et je cite: **Fatma, Amina, Imen, Imen, Wiem, Asma, Mouna, Safa, Hana, Ahlem, Najwa, Mariam, ...**

Je tiens enfin à remercier, sans exception, tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont aidé et soutenu afin d'accomplir ce présent travail. J'en oublie certainement encore et je m'en excuse.

Supporté par vous tous, j'ai pu achever ce présent travail.

 **Dorra**

## **Publications Internationales**

- ❖ Un article publié dans la revue “*Environmental Sciences and Pollution Research*” (IF=2,8), intitulée «Biodegradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Bacillus stratosphericus* from Mediterranean seawater of the Sfax fishing harbour, Tunisia» (2016). **Dorra Hentati**, Alif Chebbi, Slim Loukil, Jean-Jacques Godon, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. 23: 15088-15100.
- ❖ Un article publié dans la revue “*Ecotoxicology and Environmental Safety*” (IF=3,974), intitulé «Production and characterization of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5» (2018). **Dorra Hentati**, Alif Chebbi, Fatma Hadrich, Ilhem Frikha, Francesc Rabanal, Sami Sayadi, Angeles Manresa & Mohamed Chamkha. 167: 441-449.
- ❖ Un article soumis dans la revue “*Environmental Sciences and Pollution Research*” (IF=2,8), intitulé: «Efficiency in biodegradation of hydrocarbons and biosurfactant production by a newly halotolerant *Pseudomonas* sp. strain isolated from contaminated seawater» (2018). **Dorra Hentati**, Asma Mahmoudi, Alif Chebbi, Fatma Hadrich, Ilhem Frikha, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha.
- ❖ Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil (2017). Alif Chebbi, **Dorra Hentati**, Hatem Zaghden, Nidhal, Baccar, Fatma Rezgui, Manel Chalbi, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 122: 128-140. (IF =2,429).
- ❖ Promising abilities of mercapto-degrading *Staphylococcus capitis* strain SH6 in both crude oil and waste motor oil as sole carbon and energy sources: its biosurfactant production and preliminary characterization (2018). Alif Chebbi, **Dorra Hentati**, Meriam Cheffi, Rihab Bouabdallah, Cyrine Choura, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 93: 1401-1412 (IF = 2,587).
- ❖ Preliminary characterization of biosurfactant produced by a PAH-degrading *Paenibacillus* sp. under thermophilic conditions (2016). Fatma Zohra Mesbaiah, Kamel Eddouaouda, Abdelmalek Badis, Alif Chebbi, **Dorra Hentati**, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. *Environmental Science and Pollution Research*. 23: 14221-14230 (IF = 2,8).
- ❖ A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement (2018). Bilal Zenati, Alif Chebbi, Abdelmalek Badis, Kamel Eddouaouda, Hocine Boutoumi, Mohamed El Hattab, **Dorra Hentati**, Manel Chelbi, Sami Sayadi, Mohamed Chamkha, Andrea Franzetti. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 154: 100-107 (IF = 3,974).

### **Brevet national**

- ❖ Un brevet national d'invention (INNORPI), intitulé «Biosurfactants de *Bacillus stratosphericus*: Production, caractérisation et potentialités biotechnologiques» (2018). **Dorra Hentati**, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. Référence TN2018/0098, 27 Mars 2018.

### **Communications orales**

- ❖ «Isolement et caractérisation d'une bactérie hydrocarbonoclaste dégradant le fluoranthène» (2014). **Dorra Hentati**, Alif Chebbi, Slim Loukil, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. *Journées Internationales de Biotechnologie (ATB)* (20-24 Décembre 2014, Hammamet).
- ❖ «Isolement et caractérisation d'une bactérie marine hydrocarbonoclaste dégradant le naphthalène (2015)». **Dorra Hentati**, Alif Chebbi, Slim Loukil, Najla Mhiri, Fatma Rezgui, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. *26<sup>ième</sup> Forum International de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB)* (23-26 Mars 2015, Monastir).
- ❖ «Biodegradation of naphthalene and production of biosurfactant by a *Pseudomonas aeruginosa* NAPH6 isolated from the Sfax fishing harbor» (2016). **Dorra Hentati**, Alif Chebbi, Meriam Cheffi, Slim Loukil, Najla Miri, Fatma Rezgui, Jean-Jacques Godon, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. *27<sup>ième</sup> Forum International de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB)* (28-31 Mars 2016, Hammamet).
- ❖ «Production et caractérisation des lipopeptides produits par une nouvelle souche marine, hydrocarbonoclaste FLU5 de *Bacillus stratosphericus*» (2017). **Dorra Hentati**, Alif Chebbi, Meriam Cheffi, Jean-Jacques Godon, Angeles Manresa, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. *28<sup>ième</sup> Forum International de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB)* (21-24 Mars 2017, Hammamet).
- ❖ «Production and characterization of lichenysin biosurfactants from a marine *Bacillus licheniformis* strain PYR2» (2018). **Dorra Hentati**, Neila Makhloufi, Asma Mahmoudi, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. *29<sup>ième</sup> Forum International de l'Association Tunisienne des Sciences Biologiques (ATSB)* (26-29 Mars 2018, Sousse).
- ❖ «Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et production de biosurfactant(s) par une bactérie hydrocarbonoclaste nouvellement isolée». Alif Chebbi, **Dorra Hentati**, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. *Journées Internationales de Biotechnologie (ATB)*, (20-24 Décembre 2014, Hammamet).
- ❖ «Etude de la biodégradation des hydrocarbures par une bactérie marine nouvellement isolée». Meriam Cheffi, **Dorra Hentati**, Alif Chebbi, Slim Loukil, Fatma Rezgui, Najla Mhiri, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. *26<sup>ème</sup> Forum International des Sciences Biologiques et de Biotechnologie (ATSB)* (23-26 Mars 2015, Monastir).

- ❖ «Etude de la biodégradation des hydrocarbures et de la production de biosurfactants par une bactérie marine nouvellement isolée». Meriam Cheffi, **Dorra Hentati**, Alif Chebbi, Slim Loukil, Nidhal Baccar, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. 27<sup>ème</sup> *Forum International des Sciences Biologiques et de Biotechnologie (ATSB)*, (28-31 Mars 2016, Hammamet).

### **Communication par affiche**

- ❖ «Caractérisation physico-chimique des échantillons des eaux de mer et de sédiments provenant des ports de Sfax – Isolement et caractérisation de deux bactéries hydrocarbonoclastes dégradant des HAPs, fluoranthène et naphtalène» (2013). **Dorra Hentati**, Alif Chebbi, Slim Loukil, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. *Journées Internationales de Biotechnologie (ATB)* (21-24 Décembre 2013, Hammamet)



# TABLE DE MATIERES

INTRODUCTION GENERALE.....	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE .....	4
POLLUTION MARINE, HYDROCARBURES ET BIODEGRADATION .....	5
I. Côte Sud de Sfax : «Un littoral dégradé et condamné» .....	5
I.1. Généralité.....	5
I.2. Principales sources de pollution marine à Sfax.....	6
I.2.1. Sites marins pollués .....	6
I.2.1.1. Port de commerce de Sfax .....	6
I.2.1.2. Nouveau port de pêche de Sfax .....	6
I.2.1.3. Embouchure du canal de sidi Salem .....	7
I.2.1.4. Embouchure du canal Hakmouni.....	7
I.2.2. Sites terrestres pollués.....	7
I.2.2.1. Dépôt de phosphogypse.....	7
I.2.2.2. Dépôt de margines .....	7
I.2.2.3. Décharge et centre de transfert de déchets inertes .....	8
II. Pollution marine .....	8
II.1. Sources de la pollution marine.....	9
II.1.1. Pollution physique .....	9
II.1.2. Pollution chimique.....	9
II.1.3. Pollution biologique.....	10
III. Hydrocarbures .....	10
III.1. Généralités.....	10
III.1.1. Hydrocarbures saturés .....	11
III.1.2. Hydrocarbures aromatiques .....	11
III.1.2.1. Hydrocarbures monoaromatiques .....	12
III.1.2.2. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) .....	12
III.1.3. Composés polaires.....	14
III.1.4. Asphaltènes .....	15
III.2. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement marin .....	15
III.2.1. Processus abiotiques.....	15
III.2.1.1. Évaporation .....	15
III.2.1.2. Transport de la nappe d'hydrocarbures .....	15
III.2.1.3. Photo-oxydation .....	15
III.2.1.4. Dissolution.....	15
III.2.1.5. Emulsification .....	15
III.2.1.6. Sédimentation.....	15
III.2.2. Biodégradation .....	18
IV. Biodégradation des HAPs .....	21
IV.1. Biodégradation des HAPs par les bactéries.....	22
IV.1.1. Biodégradation des HAPs à deux noyaux aromatiques : Exemple du naphthalène.....	23
IV.1.2. Biodégradation des HAPs à trois noyaux aromatiques : Exemple du phénanthrène.....	25
IV.1.3. Biodégradation des HAPs à quatre noyaux aromatiques : Exemple du pyrène.....	25
IV.2. Biodégradation des HAPs par les champignons.....	26
IV.3. Biodégradation des HAPs par les algues.....	27
V. Impacts des déversements d'hydrocarbures sur la vie marine .....	27



VI.	Gestion de lutte contre les déversements des hydrocarbures .....	28
VII.	Mode d'accèsion aux hydrocarbures .....	29
	VII.1.1 Utilisation de la phase dissoute .....	30
	VII.1.2. L'accèsion interfaciale .....	30
	VII.1.3. L'accèsion interfaciale facilitée ou émulsification .....	30
	VII.1.4. Le transfert micellaire .....	30
	BIOSURFACTANTS.....	31
I.	Surfactants.....	31
II.	Biosurfactants.....	32
	II.1. Propriétés .....	33
	II.2. Classification .....	34
	II.2.1. Les glycolipides .....	34
	II.2.1.1. Les rhamnolipides .....	34
	II.2.1.2. Les sophorolipides.....	36
	II.2.1.3. Les lipides mannosylerythroïes (LME) et les lipides à tréhalose .....	36
	II.2.2. Les lipopeptides .....	36
	II.2.2.1. Les surfactines .....	37
	II.2.2.2. Les lichensines .....	38
	II.2.2.3. Les iturines .....	38
	II.2.2.4. Les fengycines .....	39
	II.2.3. Les Phospholipides .....	39
	II.2.4. Les acides gras .....	40
	II.2.5. Les lipides neutres .....	40
	II.2.6. Les biosurfactants polymériques.....	40
	II.2.7. Surfactants particuliers .....	41
	II.3. Production de biosurfactants.....	42
	II.3.1. Microorganismes producteurs de biosurfactants.....	42
	II.3.2. Applications .....	43
	II.3.2.1. Environnement .....	43
	II.3.2.2. Activité cicatrisante .....	45
	II.3.2.3. Biofilm .....	46
	II.3.3. Production des biosurfactants à partir des sous-produits .....	49
	II.3.4. Marché de biosurfactants .....	50
	BIODIVERSITE MICROBIENNE.....	53
I.	Introduction.....	53
II.	Étude de la biodiversité microbienne moyennant des approches moléculaires .....	54
III.	Exemples des méthodes moléculaires utilisées pour étudier la biodiversité microbienne des environnements .....	55
	III.1. Méthodes d'Empreintes génétiques.....	55
	III.1.1. Exemple d'une technique d'empreintes génétiques : SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism).....	56
	III.2. Les techniques haut-débit de séquençage massif .....	56
	III.2.1. Exemples des approches moléculaires haut-débit de séquençage massif .....	57
	III.2.1.1. Pyroséquençage.....	57
	III.2.1.2. Séquençage Illumina MiSeq .....	58
	VI. Réponse de la communauté microbienne à la contamination aux hydrocarbures.....	58
	MATERIELS & METHODES.....	60
I.	Biotopes étudiés .....	61
II.	Analyses physico-chimiques des échantillons .....	63

II.1. Mesure de la température et du pH.....	63
II.2. Conductivité électrique et salinité.....	63
II.3. Demande Chimique en Oxygène (DCO).....	63
II.4. Demande Biologique en Oxygène (DBO <sub>5</sub> ).....	64
II.5. Carbone organique total (COT).....	64
II.6. Détermination de l'azote total Kjeldahl (NTK).....	65
II.7. Dosage des minéraux et des métaux lourds.....	65
II.8. Dosage des hydrocarbures totaux.....	65
II.8.1. Extraction en phase liquide.....	66
II.8.2. Extraction en phase solide (Soxhlet).....	66
III. Approche moléculaire PCR-SSCP.....	66
III.1. Préparation des échantillons.....	67
III.1.1. Eaux de mer.....	67
III.1.2. Sédiments marins.....	67
III.2. Extraction des ADNs totaux.....	67
III.3. Amplification pour réalisation de la SSCP.....	68
III.4. SSCP.....	69
IV. Pyroséquançage.....	69
V. Illumina MiSeq.....	70
VI. Composition des milieux de culture.....	70
VI.1. Milieu LB.....	70
VI.2. Milieu BN (Bouillon nutritif).....	70
VI.3. Milieu MH (Muller-Hinton).....	70
VI.4. Milieu de base (MB).....	71
VI.5. Milieu proposé par O'Toole.....	71
VII. Hydrocarbures, huiles et autres.....	71
VIII. Cultures par enrichissements.....	72
IX. Isolement des bactéries hydrocarbonoclastes.....	72
X. Croissance bactérienne.....	73
X.1. Mesure de la densité optique.....	73
X.2. Dénombrement sur milieu solide.....	73
XI. Conservation des souches bactériennes.....	73
XII. Caractérisation phénotypique des souches bactériennes.....	73
XII.1. Etude morphologique des isolats.....	73
XII.1.1. Observation macroscopique.....	73
XII.1.2. Observation microscopique.....	74
XII.2. Coloration de Gram.....	74
XII.3. Test oxydase.....	74
XII.4. Test catalase.....	75
XII.5. Galerie API.....	75
XII.6. Détermination des conditions optimales de croissance.....	76
XII.6.1. Effet du pH sur la croissance.....	76
XII.6.2. Effet de la température sur la croissance.....	76
XII.6.3. Effet de la concentration en NaCl sur la croissance.....	76
XII.7. Test de résistance à la chaleur.....	77
XIII. Etude phylogénétique.....	77
XIII.1. Extraction de l'ADN génomique.....	77
XIII.2. Electrophorèse de l'ADN.....	78

XIII.3. Amplification par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) du gène codant pour l'ARNr 16 S.....	78
XIII.4. Electrophorèse des produits de PCR .....	79
XIV. Tests sur différentes sources de carbone .....	81
XV. Méthodes analytiques : chromatographiques et spectroscopiques .....	82
XV.1. Extraction des hydrocarbures .....	82
XV.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) .....	82
XV.3. Chromatographie en phase gazeuse associée à la spectroscopie de masse (GC-MS).....	83
XV.4. Spectrométries de masse ESI et MALDI-TOF .....	83
XV.5. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) .....	84
XVI. Biosurfactants produits par les bactéries sélectionnées.....	84
XVI.1. Production, récupération, purification et caractérisation.....	84
XVI.1.1. Production et récupération des biosurfactants .....	84
XVI.1.2. Purification des biosurfactants par chromatographie sur colonne de gel de silice et par chromatographie sur couche mince (CCM).....	85
XVI.1.3. Détermination de la concentration micellaire critique CMC .....	86
XVI.1.4. Etude de la stabilité des biosurfactants.....	86
XVI.1.5. Détermination de la tension de surface (TS) .....	86
XVI.1.6. Test de déplacement d'huile.....	87
XVII. Activité cytotoxique .....	87
XVIII. Essais d'applications .....	88
XVIII.1. Remobilisation des hydrocarbures contenus dans un sol contaminé par l'huile de moteurs usée.....	88
XVIII.2. Contrôle du biofilm .....	89
XVIII.2.1. Prétraitement (activité antiadhésive).....	90
XVIII.2.2. Post-traitement (activité anti-biofilm).....	90
XVIII.3. Activité cicatrisante .....	90
XVIII.3.1. Réalisation d'une plaie cutanée mécanique .....	91
XVIII.3.2. Evaluation de l'effet cicatrisant .....	91
XIX. Détection des gènes responsables de la biodégradation des HAPs et de la production des biosurfactants .....	91
XIX.1. Détection des gènes responsables de la biodégradation des HAPs .....	91
XIX.2. Détection des gènes responsables de production des biosurfactants.....	93
XX. Production de biosurfactants produits par la souche FLU5, à différentes échelles : Scale-up.....	94
XXI. Analyses statistiques.....	95
RESULTATS & DISCUSSION.....	97
Chapitre I : Caractérisation physico-chimique des échantillons marins provenant de trois ports de la ville de Sfax, étude de la composition de la communauté microbienne et de sa dynamique. ....	
I. Introduction générale .....	99
II. Caractérisation physico-chimiques des biotopes étudiés .....	100
III. Etude de la biodiversité microbienne des échantillons marins étudiés .....	119
III.1. Technique d'empreinte génétique «PCR-SSCP» .....	120
III.1.1. Etude statistique des paramètres physico-chimiques et des résultats SSCP .....	124

III.2. Etude de la composition microbienne ( <i>Bacteria</i> et <i>Archaea</i> ) de certains échantillons marins étudiés en utilisant des techniques de séquençage haut-débit .....	127
III.2.1. Pyroséquençage .....	127
III.2.2. Illumina MiSeq .....	130
Chapitre II : Isolement, caractérisation et étude des potentialités biodégradatives des souches marines dégradant des hydrocarbures .....	
I. Introduction générale .....	138
II. Enrichissements et isolements des souches hydrocarbonoclastes .....	138
II.1. Cultures par enrichissements en présence de différents hydrocarbures .....	138
II.2. Isolement des souches bactériennes hydrocarbonoclastes .....	143
III. Caractérisation des souches hydrocarbonoclastes sélectionnées .....	145
III.1. Caractérisation de la souche FLU5 .....	145
III.1.1. Caractérisation phénotypique .....	145
III.1.2. Caractérisation phylogénétique de la souche FLU5 .....	147
III.2. Caractérisation de la souche NAPH6 .....	150
III.2.1. Caractérisation phénotypique .....	150
III.2.2. Caractérisation phylogénétique de la souche NAPH6 .....	152
III.3. Caractérisation de la souche PYR2 .....	155
III.3.1. Caractérisation phénotypique .....	155
III.3.2. Caractérisation phylogénétique de la souche PYR2 .....	156
III.4. Caractérisation de la souche CO100 .....	158
III.4.1. Caractérisation phénotypique .....	158
III.4.2. Caractérisation phylogénétique de la souche CO100 .....	161
IV. Etude des potentialités biodégradatives des souches marines isolées sur des hydrocarbures .....	162
IV.1. Etude des potentialités biodégradatives de la souche FLU5 .....	162
IV.1.1. Biodégradation du fluoranthène .....	162
IV.1.2. Biodégradation du pétrole brut par la souche FLU5 .....	165
IV.1.3. Croissance de la souche FLU5 sur d'autres substrats carbonés .....	168
IV.2. Etude des potentialités biodégradatives de la souche NAPH6 .....	170
IV.2.1. Biodégradation du naphthalène .....	170
IV.2.2. Biodégradation du pétrole brut par la souche NAPH6 .....	172
IV.3. Etude des potentialités biodégradatives du pyrène par la souche PYR2 .....	175
IV.4. Etude de potentialités biodégradatives de la souche CO100 .....	177
IV.4.1. Biodégradation du pétrole brut .....	177
IV.4.2. Etude des potentialités biodégradatives des HAPs par la souche CO100 .....	180
V. Détection des gènes responsables de la biodégradation des HAPs .....	182
VI. Conclusion .....	183
Chapitre III : Biosurfactants : Production, caractérisation et essais d'applications .....	185
I. Introduction générale .....	186
II. Evaluation de la production des biosurfactants par les souches FLU5, NAPH6, CO100 et PYR2 sur différentes sources de carbone .....	186
III. Production des biosurfactants par les souches sélectionnées .....	192
IV. Identifications de biosurfactants produits par les souches étudiées .....	196
IV.1. Purification de BS-FLU5, BS-CO100 et BS-PYR2 .....	197
IV.2. Identification des biosurfactants produits par la souche FLU5 de <i>Bacillus stratosphericus</i> ..	198
IV.3. Identification des biosurfactants produits par la souche CO100 de <i>Staphylococcus</i> sp. ....	204
IV.4. Identification des biosurfactants produits par la souche PYR2 de <i>Bacillus licheniformis</i> ....	206

IV.5. Identification des biosurfactants produits par la souche NAPH6 de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	207
V. Détection des gènes responsables de la production des biosurfactants	208
VI. Détermination de la concentration micellaire critique (CMC)	210
VII. Etude de la stabilité vis-à-vis du pH, de la salinité et de la température	216
VIII. Etude de la cytotoxicité des biosurfactants étudiés	219
IX. Essais d'application	221
IX.1. Remobilisation des hydrocarbures contenus dans des sols contaminés par l'huile de moteur usée	221
IX.2. Contrôle des biofilms microbiens	224
IX.3. Activité cicatrisante	229
IX.3.1. Etude chromatique des plaies	230
IX.3.2. Evaluation des surfaces des plaies	232
X. Production des biosurfactants de la souche FLU5 à différentes échelles : «Scale-up»	235
XI. Conclusion	242
CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES	244
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	251
ANNEXE	275
RESUME	322

# Listes des figures

Figure 1. Littoral Sud de Sfax.....	6
Figure 2. Structures chimiques du pentadécane (a), du phytane (b) et du cyclohexane (c).....	11
Figure 3. Structures chimiques des BTEX.....	12
Figure 4. Structures et nomenclature des 16 HAPs prioritaires selon l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (EPA) (Chen <i>et al.</i> , 2014). ....	13
Figure 5. Cycle biogéochimique des hydrocarbures (Le Dû-Lacoste, 2008).....	17
Figure 6. Mécanisme général de biodégradation aérobie des hydrocarbures par les microorganismes (Das <i>et Chandran</i> , 2011). ....	21
Figure 7. Les différentes voies de dégradation microbienne des HAPs (Cerniglia, 1993).....	22
Figure 8. Schéma de fonctionnement des arène-dioxygénases. RED: Réductase; FER: ferrédoxine; ISPαβ: dioxygénase.....	23
Figure 9. Voie métabolique de dégradation du naphthalène par les bactéries (Seo <i>et al.</i> , 2009). ....	24
Figure 10. Principales étapes de la voie de dégradation du phénanthrène par <i>Pseudomonas</i> sp. BZ-3 (Lin <i>et al.</i> , 2014). ....	25
Figure 11. Métabolisme du pyrène par <i>Mycobacterium</i> sp. (Vila <i>et al.</i> , 2001). ....	26
Figure 12. Les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures (Vandecasteele, 2005). ....	30
Figure 13. Surfactant avec des groupements apolaires (hydrophobe) et polaire (hydrophile). ....	31
Figure 14. Tension superficielle en fonction de la concentration en agent tensioactif chimique ou naturel, et détermination de la CMC (concentration micellaire critique) (Santos <i>et al.</i> , 2016). ....	32
Figure 15. Structures chimiques du mono-rhamnolipide (Rha-C10-C10) (a) et di-rhamnolipide (Rha-Rha-C10-C10) (b). ....	34
Figure 16. Structure chimique de la surfactine.....	37
Figure 17. Structure chimique de la lichenysine A. ....	38
Figure 18. Structure chimique de l'iturine A. ....	39
Figure 19. Structure chimique de la fengycine.....	39
Figure 20. Mécanisme de la récupération assistée du pétrole. ....	45
Figure 21. Différentes étapes de la formation d'un biofilm bactérien (Stoodley <i>et al.</i> , 2002). (1) Attachement initial des cellules à la surface; (2) Attachement irréversible des cellules et production d'exopolysaccharides (EPS); (3) Développement précoce de l'architecture du biofilm; (4) Maturation du biofilm; (5) Dispersion des cellules du biofilm. ....	47
Figure 22. Chromatogramme GC-MS montrant des hydrocarbures contenus dans un échantillon des eaux de mer provenant du port de pêche de Sfax (31-12-2013), (Pr : pristane; Ph: phytane; C <sub>12</sub> -C <sub>25</sub> indiquent les <i>n</i> -alcane avec les nombres des atomes de carbone de 12 à 25). ....	113
Figure 23. Les boîtes à moustaches du rapport DCO/DBO <sub>5</sub> dans les trois ports de la ville de Sfax. La boîte (le rectangle) désigne les valeurs comprises entre le premier quartile et le troisième quartile, la ligne à l'intérieur désigne la médiane et les deux traits de part et d'autre du rectangle désignent la valeur minimale et la valeur maximale. ....	116
Figure 24. Les boîtes à moustaches de la teneur des hydrocarbures totaux (HCTot) dans les trois ports de la ville de Sfax. La boîte (le rectangle) désigne les valeurs comprises entre le premier quartile et le troisième quartile, la ligne à l'intérieur désigne la médiane et les deux traits de part et d'autre du rectangle désignent la valeur minimale et la valeur maximale. ....	117
Figure 25. Les boîtes à moustaches du rapport DCO/DBO <sub>5</sub> en fonction de différents ports et des saisons. Les rapports DCO/DBO <sub>5</sub> sont représentés par des boîtes à moustaches où la boîte (le rectangle) désigne les valeurs comprises entre le premier quartile et le troisième quartile, la ligne à l'intérieur désigne la médiane et les deux traits de part et d'autre du rectangle désignent la valeur minimale et la valeur maximale. ....	118
Figure 26. Les boîtes à moustaches du teneur en hydrocarbures totaux (HCTot) en fonction de différents ports et des saisons. Les teneurs en HCTot sont représentés par des boîtes à moustaches où la boîte (le rectangle) désigne les valeurs comprises entre le premier quartile et le troisième quartile, la ligne à l'intérieur désigne la médiane et les deux traits de part et d'autre du rectangle désignent la valeur minimale et la valeur maximale. .	118
Figure 27. Dendrogramme montrant les taux de similarité entre les différents échantillons marins étudiés en se basant sur la composition de la communauté bactérienne de chaque échantillon (PCR-SSCP), durant les années 2015, 2016 et 2017. ....	122
Figure 28. Les boîtes à moustaches de la diversité bactérienne (Indice de diversité de Simpson) en fonction de la nature de l'échantillon (eau ou sédiment). Les indices de diversité de Simpson sont représentés par des boîtes à moustaches où le rectangle désigne les valeurs comprises entre le premier quartile et le troisième quartile, le trait	



à l'intérieur désigne la médiane et les deux traits de part et d'autre du rectangle désignent la valeur minimale et la valeur maximale. ....	123
Figure 29. Analyse en composantes principales (PCA) montrant la variation entre les différents échantillons des eaux de mer polluées prélevées en 2015, 2016 et 2017 en fonction des paramètres physico-chimiques. Les trois ellipses colorées en rouge, vert et bleu représentent, successivement les ports de plaisance, de commerce et de pêche. Les noms des ports ont été abrégés comme suit: CK (rouge), PC (vert), et PP (bleu), pour les ports de plaisance, de commerce et de pêche, respectivement. Les flèches indiquent la direction de l'augmentation maximale et la force (à travers la longueur) de chaque variable à la distribution globale. Les deux premiers axes principaux ont expliqué 58,4% de la variance. ....	126
Figure 30. Biodiversité procaryotique du sédiment marin contaminé par des hydrocarbures provenant du port de pêche de Sfax (Décembre 2013) (Phylum/Classe). ....	128
Figure 31. Abondance relative des différents phyla/classe présents, dans les échantillons des eaux de mer, avec un pourcentage supérieur à 1% des séquences. ....	132
Figure 32. Abondance relative des différents genres identifiés, (ayant des pourcentages > 1%), dans les échantillons des eaux de mer étudiés. ....	133
Figure 33. Observation microscopique de la souche FLU5 après coloration de Gram ..... 145	145
Figure 34. Etude de la croissance de la souche FLU5 en fonction du pH (a), de la température (b) et de la concentration en NaCl (c). $\mu_{max}$ : Taux de croissance maximum.....	147
Figure 35. Electrophorèse sur gel d'agarose (1%, m/v). ....	148
Figure 35 (A): ADN génomique de la souche FLU5; (B): Produit PCR du gène de l'ARNr 16S de la souche FLU5; (C): Produit PCR purifié.....	148
Figure 36. Arbre phylogénétique basé sur 1478 nucléotides de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche FLU5, montrant sa position phylogénétique parmi les espèces apparentées du genre <i>Bacillus</i> . <i>Micrococcus luteus</i> DSM 20030 <sup>T</sup> est utilisé en tant que out group. Les pourcentages <i>Bootstrap</i> sont donnés au niveau des nœuds. Les numéros d'accès ( <i>Genbank</i> ) sont donnés entre parenthèses. Barre d'échelle, 2 substitutions pour 100 nucléotides. ....	149
Figure 37. Observation microscopique de la souche NAPH6 après coloration de Gram.....	151
Figure 38. Etude de la croissance de la souche NAPH6 en fonction du pH (a), de la température (b) et de la concentration en NaCl (c). ....	152
Figure 39. (A): ADN génomique de la souche NAPH6; (B): Produit PCR purifié du gène de l'ARNr 16S de la souche NAPH6.....	153
Figure 40. Arbre phylogénétique basé sur 1469 nucléotides de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche NAPH6, montrant sa position phylogénétique parmi les espèces apparentées du genre <i>Pseudomonas</i> . <i>Micrococcus luteus</i> DSM 20030 <sup>T</sup> est utilisé en tant que out group. Les pourcentages <i>Bootstrap</i> sont donnés au niveau des nœuds. Les numéros d'accès ( <i>Genbank</i> ) sont donnés entre parenthèses. Barre d'échelle, 2 substitutions pour 100 nucléotides. ....	153
Figure 41. Observation microscopique de la souche PYR2 après coloration de Gram (Microscope optique, grossissement X 100). ....	155
Figure 42. Etude de la croissance de la souche PYR2 en fonction du pH (a), de la température (b) et de la concentration en NaCl (c). ....	156
Figure 43. (A): ADN génomique de la souche PYR2; (B): Produit PCR du gène de l'ARNr 16S de la souche PYR2; (C): Produit PCR purifié.....	157
Figure 44. Arbre phylogénétique basé sur 1322 nucléotides de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche PYR2, montrant sa position phylogénétique parmi les espèces apparentées du genre <i>Bacillus</i> . <i>Micrococcus luteus</i> DSM 20030 <sup>T</sup> est utilisé en tant que out group. Les pourcentages <i>Bootstrap</i> sont donnés au niveau des nœuds. Les numéros d'accès ( <i>GenBank</i> ) sont donnés entre parenthèses. Barre d'échelle, 2 substitutions pour 100 nucléotides. ....	157
Figure 45. Observation microscopique après coloration de Gram de la souche CO100 (Microscope optique, grossissement $\times 100$ ). ....	159
Figure 46. Etude de la croissance de la souche CO100 en fonction du pH (a), de la température (b) et de la concentration en NaCl (c). ....	161
Figure 47. (A): ADN génomique de la souche CO100; (B): Produit PCR purifié du gène de l'ARNr 16S de la souche CO100. ....	162
Figure 48. Etude de la cinétique de croissance de la souche FLU5 sur milieu de base contenant 100 mg/l du fluoranthène (■), à 37 °C et à 180 rpm, par suivi de la DO (600 nm) (a) et par des dénombrements sur milieu solide (CFU/ml) (b). Témoin biologique (●), Témoin chimique (▲). ....	163
Figure 49. Evolution des aires des pics du fluoranthène au cours de la biodégradation par la souche FLU5 à 37 °C et 180 rpm. ....	164
Figure 50. Pourcentage de dégradation du fluoranthène (100 mg/l) par la souche FLU5, en fonction de différents temps d'incubation, à 37 °C et 180 rpm. ....	164

Figure 51. Etude de la cinétique de croissance de la souche FLU5 sur milieu de base contenant le pétrole brut (1%, v/v) (■), à 37 °C et à 180 rpm, par suivi de la DO (600 nm) (a) et par des dénombrements sur milieu solide (CFU/ml) (b). Témoin biologique (●), Témoin chimique (▲). .....	165
Figure 52. Biodégradation du PB (1%, v/v) par la souche FLU5 (a), à 30 g/l NaCl et à 37 °C, après 9 j d'incubation, en comparaison avec un témoin chimique (TC) (b). .....	166
Figure 53. Chromatogrammes (GC-MS) au cours de la biodégradation de la fraction aliphatique du pétrole brut (1%, v/v) par la souche FLU5, en présence de 30 g/l à 37 °C et 180 rpm, en fonction du temps (0, 10 et 20 jours). .....	167
Figure 54. Etude de la cinétique de croissance de la souche NAPH6 sur milieu de base contenant 200 mg/l du naphthalène (■), à 37 °C et à 180 rpm, par suivi de la DO (600 nm) (a) et par des dénombrements sur milieu solide (CFU/ml) (b) Témoin biologique (●) et Témoin chimique (▲). .....	170
Figure 55. Chromatogrammes GC-MS au cours de la biodégradation du naphthalène (200 mg/l) par la souche NAPH6, à 37 °C et à 180 rpm, pendant 7 jours. ....	171
Figure 56. Biodégradation du naphthalène (200 mg/l) par la souche NAPH6, en fonction de différents temps d'incubation, à 37 °C et 180 rpm. ....	172
Figure 57. Etude de la cinétique de croissance de la souche NAPH6 sur milieu de base contenant du pétrole brut (1%, v/v) (■), à 37 °C et à 180 rpm, par suivi de la DO (600 nm) (a) et par dénombrements sur milieu solide (CFU/ml) (b). Témoin biologique (●), Témoin chimique (▲). .....	173
Figure 58. Biodégradation du PB (1%, v/v) par la souche NAPH6 (a), à 30 g/l NaCl et à 37 °C, après 8 j d'incubation, en comparaison avec un témoin chimique (TC) (b). .....	173
Figure 59. Chromatogrammes (GC-MS) au cours de la biodégradation de la fraction aliphatique du pétrole brut (1%, v/v) par la souche NAPH6, en présence de 30 g/l, à 37 °C et 180 rpm, en fonction du temps (0, 10 et 20 jours). .....	174
Figure 60. Etude de la cinétique de croissance de la souche PYR2 sur milieu de base contenant 200 mg/l du pyrène (■), à 37 °C et 180 rpm, par suivi de la DO (600 nm) (a) et par dénombrements sur milieu solide (CFU/ml) (b). Témoin biologique (●), Témoin chimique (▲). .....	176
Figure 61. Chromatogrammes GC-FID au cours de la biodégradation du pyrène (200 mg/l) par la souche PYR2, à 37 °C et à 180 rpm, pendant 30 jours. ....	177
Figure 62. Suivi de la croissance de la souche CO100 sur milieu de base contenant du pétrole brut (1%, v/v) (■), en présence de 100 g/l NaCl à 37 °C et 180 rpm, par suivi de la DO (600 nm) (a) et par dénombrements sur milieu solide (CFU/ml) (b). Témoin biologique (●), Témoin chimique (▲). .....	178
Figure 63. Biodégradation du pétrole brut (1%, v/v), par la souche CO100, .....	178
Figure 64. Chromatogrammes (GC-MS) au cours de la biodégradation de la fraction aliphatique du pétrole brut (1%, v/v) par la souche CO100, en présence de 100 g/l, à 37 °C et 180 rpm, en fonction du temps (0, 10 et 20 jours). .....	179
Figure 65. Taux de dégradation des <i>n</i> -alcanes par la souche CO100, en présence de 100 g/l NaCl, après 20 j d'incubation à 37 °C et 180 rpm. ....	180
Figure 66. Suivi de la croissance de la souche CO100 par mesure de la DO à 600 nm sur le phénanthrène (100 mg/l), le fluoranthène (100 mg/l) et le pyrène (100 mg/l), en présence de 100 g/l NaCl, en l'absence de l'extrait de levure, à 37 °C et à 180 rpm. ....	181
Figure 67. Test de déplacement d'huile réalisé avec les surnageants de: la culture FLU5 sur l'huile de friture résiduelle, après 3 jours (a), de la culture NAPH6 sur l'huile de friture résiduelle, après 2 jours (b), de la culture CO100 sur le lait en poudre périmé, après 2 jours (c) et de la culture PYR2 sur le milieu BN, après 4 jours (d). TC : Témoin chimique. ....	191
Figure 68. Evaluation de la croissance (DO à 600 nm) (■), de la tension de surface (●) et du déplacement d'huile (▲) suite à des cultures de la souche FLU5 sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v), à 37 °C et 180 rpm. ....	193
Figure 69. Evaluation de la croissance (DO à 600 nm) (■), de la tension de surface (●) et du déplacement d'huile (▲) suite à des cultures de la souche NAPH6 sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v), à 37 °C et 180 rpm. .	193
Figure 70. Evaluation de la croissance (DO à 600 nm; log (CFU/ml)) (■), de la tension de surface (●) et du déplacement d'huile (▲) suite à des cultures de la souche CO100 sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v) (a) et sur le lait en poudre périmé (20 g/l) (b), à 37 °C et 180 rpm. ....	194
Figure 71. Evaluation de la croissance (DO à 600 nm) (■), de la tension de surface (●) et du déplacement d'huile (▲) suite à des cultures de la souche PYR2 sur le bouillon nutritif (BN), à 37 °C et 180 rpm. ....	195
Figure 72. Chromatographie en couche mince (CCM), sur des plaques de gel de silice 60 G des biosurfactants bruts BS-FLU5, BS-PYR2 et BS-CO100. Révélation par une solution de ninhydrine (a) et par une solution d'acide phosphomolybdique (b). .....	197
Figure 73. Spectre de masse ESI des lipopeptides purifiés produits par la souche <i>Bacillus stratosphericus</i> FLU5. ....	198



Figure 74. Spectres de masse MALDI-TOF MS/MS de lipopeptides produits par <i>Bacillus startosphaericus</i> FLU5: m/z = 1044,7 (a); 1058,8 (b); 1072,8 (c) et 1086,8 (d) (AA : acide aminé; AG: Acide Gras); Ile: isoleucine; Leu: leucine; Glu: acide glutamique; Val: valine).....	203
Figure 75. Spectres de masse ESI des lipopeptides purifiés produits par la souche CO100. ....	205
Figure 76. Spectre de masse ESI des lipopeptides purifiés produits par la souche PYR2 de <i>Bacillus licheniformis</i> . ....	207
Figure 77. Spectre FTIR du biosurfactant brut BS-NAPH6 produit par la souche NAPH6 sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v), à 37 °C et 180 rpm. ....	208
Figure 78. Visualisation des produits de PCR à l'aide d'un bioanalyseur (Agilent 2100). ....	209
Figure 79. Détermination des CMCs des biosurfactants BS-FLU5 bruts (a) produits sur le milieu BN, (■), après 2 jours d'incubation et sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v) (▲), après 3 jours d'incubation et BS-FLU5 purifiés (b) produits sur le milieu BN, à 37 °C et 180 rpm. ....	211
Figure 80. Détermination des CMCs des biosurfactants BS-CO100 bruts (a) et purifiés (b) ....	212
Figure 81. Détermination des CMCs des biosurfactants BS-PYR2 bruts (a) et purifiés (b) ....	213
Figure 82. Détermination des CMCs des biosurfactants BS-CO100 bruts produits ....	215
Figure 83. Détermination de la CMC des biosurfactants BS-NAPH6 bruts produits ....	216
Figure 84. Etude de l'effet du pH, de la température et de la salinité sur la stabilité des biosurfactants BS-FLU5 (a) et BS-NAPH6 (b) moyennant l'évaluation de la tension de surface. ....	217
Figure 85. Etude de l'effet du pH, de la température et de la salinité sur la stabilité des biosurfactants BS-CO100 (a) et BS-PYR2 (b), moyennant l'évaluation de la tension de surface (TS) et le test de déplacement d'huile (TDH). ....	218
Figure 86. Evaluation de la cytotoxicité de différentes doses des biosurfactants BS-FLU5 (a), BS-NAPH6 (b), BS-CO100 (c) et BS-PYR2 (d), contre des cellules humaines HEK-293. Les résultats sont exprimés en terme de pourcentage de viabilité cellulaire, après deux temps d'incubation (24 et 48 h).....	221
Figure 87. Effets de surnageants de la culture FLU5, de la culture NAPH6, de la co-culture (FLU5 + NAPH6), des biosurfactants bruts BS-FLU5, BS-NAPH6, et BS-(FLU5 + NAPH6), ainsi que des surfactants chimiques (Triton X-100, Tween 20, Tween 80 et SDS), sur la remobilisation des hydrocarbures contenus dans un sol contaminé par l'huile de moteurs usée. ....	222
Figure 88. Effet des surnageants des cultures CO100 et PYR2, des biosurfactants bruts BS-CO100 et BS-PYR2, ainsi que des surfactants chimiques (Triton X 100, Tween 20, Tween 80 et SDS) sur la remobilisation des hydrocarbures contenus dans un sol contaminé par l'huile de moteur usée. ....	223
Figure 89. Photographies représentatives de l'aspect macroscopique des plaies le jour de l'incision et après 6,10 et/ou12 jours. Les groupes I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X et XI sont traités par l'eau physiologique, le glycérol (30%), CICAFLORA®, BS-FLU5 (5 mg/ml), BS-FLU5 (10 mg/ml), BS-NAPH6 (5 mg/ml), BS-NAPH6 (10 mg/ml), BS-CO100 (5 mg/ml), BS-CO100 (10 mg/ml), BS-PYR2 (5 mg/ml), et BS-PYR2 (10 mg/ml), respectivement. ....	231
Figure 90. Taux de contraction des plaies pour les différents groupes étudiés BS-FLU5 (a), BS-NAPH6 (b), BS-CO100 (c) et BS-PYR2 (d). ....	233
Figure 91. Evaluation de la biomasse (DO (●), log (CFU/ml) (■)) (a), de la tension de surface (▲) et du déplacement d'huile(♦) (b), suite à des cultures de la souche FLU5, sur milieu ME (250 ml dans un Erlenmeyer de 1 litre), à 37 °C. ....	236
Figure 92. Fermenteur de 20 litres contenant 5 litres de culture FLU5 dans le milieu ME, à 37 °C.....	237
Figure 93. Evaluation de la biomasse (DO (●), log (CFU/ml) (■)) (a), de la tension de surface (▲) et du déplacement d'huile (♦) (b), suite à des cultures de la souche FLU5 dans un fermenteur de 20 litres contenant 5 litres de milieu ME, à 37 °C.....	237
Figure 94. Biosurfactant BS-FLU5 brut extrait après la fermentation de 5 litres. ....	238
Figure 95. Fermenteur de 100 litres contenant 60 litres de culture FLU5 dans le milieu ME, à 37°C.....	238
Figure 96. Evaluation de la biomasse (DO <sub>600 nm</sub> (●), log (CFU/ml) (■) et MVS) (-) (a); de la tension de surface (▲) et du déplacement d'huile suite (♦) (b) à des cultures de la souche FLU5 dans un fermenteur de 100 litres contenant 60 litres de milieu ME, à 37 °C. ....	239
Figure 97. Test de déplacement d'huile réalisé avec le surnageant de la culture FLU5 sur le milieu ME, réalisée dans le fermenteur de 100 litres, après 42 h (a), en comparaison avec un témoin chimique (b). ....	239
Figure 98. Etude de la stabilité des biosurfactants bruts produits par la souche FLU5, ainsi que les surnageants de la culture FLU5 réalisée sur le milieu ME dans le fermenteur de 100 litres, vis-à-vis de deux températures, ambiante (a) et à 4 °C (b) pendant 6 mois.....	239

# Liste des tableaux

Tableau 1. Exemples des souches bactériennes marines capables de dégrader des hydrocarbures.....	20
Tableau 2. Exemples des souches bactériennes produisant des rhamnolipides, en utilisant différentes sources de carbone (Chong <i>et al.</i> , 2017). .....	35
Tableau 3. Différents domaines d'application des biosurfactants (Banat <i>et al.</i> , 2000; Santos <i>et al.</i> , 2016).....	43
Tableau 4. Différents substrats de déchets peu coûteux exploités pour la production de biosurfactants. ....	50
Tableau 5. Liste des entreprises développant la production des biosurfactants à l'échelle industrielle ou commercialisant des produits contenant des biosurfactants. ....	52
Tableau 6. Coordonnées géographiques de différents échantillons étudiés. ....	61
Tableau 7. Différents échantillons prélevés en 2013 et 2014. ....	61
Tableau 8. Différents échantillons des eaux de mer et des sédiments prélevés en 2015, 2016 et 2017. ....	62
Tableau 9. Amorces utilisées pour la PCR-SSCP des domaines <i>Bacteria</i> , <i>Archaea</i> et <i>Eucarya</i> . ....	68
Tableau 10. Programme des cycles de la PCR-SSCP pour l'étude des domaines <i>Bacteria</i> et <i>Archaea</i> . ....	68
Tableau 11. Programme des cycles de la PCR-SSCP pour l'étude du domaine <i>Eucarya</i> . ....	69
Tableau 12. Mélange réactionnel de différentes réactions PCR. ....	79
Tableau 13. Programme utilisé pour la réaction de la PCR. ....	79
Tableau 14. Les groupes des rats et les différents traitements cicatrisants. ....	91
Tableau 15. Amorces utilisées pour la réaction PCR spécifique pour amplifier des gènes responsables de la biodégradation des HAPs. ....	92
Tableau 16. Programme utilisé pour la réaction de PCR spécifique pour amplifier les gènes codant pour l'enzyme PAH-RHD $\alpha$ . ....	92
Tableau 17. Programme utilisé pour la réaction de PCR spécifique pour amplifier les gènes codant pour l'enzyme NAPH-Dioxygénase. ....	93
Tableau 18. Caractéristiques des amorces spécifiques développées pour la détection des gènes de biosynthèse des surfactines/lichenysines et des iturines (Tapi <i>et al.</i> , 2010). ....	93
Tableau 19. Programme utilisé pour la réaction de PCR spécifique pour amplifier les gènes responsables de la production des surfactines/lichenysine et des iturines. ....	94
Tableau 20. Caractérisation physico-chimique des échantillons marins étudiés (Valeurs moyennes $\pm$ écart type). ....	103
Tableau 21. Comparaison des teneurs moyennes des métaux lourds ( $\mu\text{g/l}$ ) enregistrées dans les eaux de mer provenant de trois ports (plaisance, commerce et pêche) de la ville de Sfax, par rapport à d'autres eaux de surface et à différentes normes de qualité des eaux marines. ....	108
Tableau 22. Comparaison des teneurs moyennes des métaux lourds ( $\text{mg/kg}$ ) enregistrées dans les sédiments du port de pêche de Sfax, par rapport à d'autres sédiments de surface (1-5 cm) et aux normes de qualité des sédiments marins (SQGs). ....	110
Tableau 23. Teneurs en hydrocarbures totaux (Valeurs moyennes $\pm$ écart-type) enregistrées dans les différents échantillons marins prélevés de trois ports de Sfax. ....	112
Tableau 24. Résultats de croissance des différentes cultures par enrichissements en utilisant des eaux de mer du port de pêche de Sfax comme inoculum. ....	140
Tableau 25. Résultats de la croissance des différentes cultures par enrichissements en utilisant un sédiment provenant du port de pêche de Sfax comme inoculum. ....	141
Tableau 26. Les différents enrichissements choisis. ....	142
Tableau 27. Résultats de croissance des colonies isolées à partir des enrichissements positifs en utilisant les eaux de mer et le sédiment provenant du port de pêche de Sfax, à 37 °C et 180 rpm. ....	144
Tableau 28. Résultats des tests de la galerie API 50 CHB réalisés avec la souche FLU5. ....	146
Tableau 29. Résultats des tests de la galerie API 20E réalisés avec la souche FLU5. ....	146
Tableau 30. Caractéristiques phénotypiques de la souche FLU5 et d'autres souches types proches appartenant au genre <i>Bacillus</i> . ....	150
Tableau 31. Résultats des tests biochimiques de la galerie API 20 NE appliqués sur la souche NAPH6. ....	151
Tableau 32. Caractéristiques phénotypiques de la souche NAPH6 et comparaison avec ceux d'autres souches types proches appartenant au genre <i>Pseudomonas</i> . ....	154
Tableau 33. Caractéristiques phénotypiques de la souche PYR2 et comparaison avec ceux d'autres souches types proches appartenant au genre <i>Bacillus</i> . ....	158
Tableau 34. Résultats des tests de la galerie API Staph réalisés avec la souche CO100. ....	159
Tableau 35. Croissance de la souche FLU5 sur différentes sources de carbone à 37 °C et à 180 rpm. ....	168
Tableau 36. Evaluation de la production de biosurfactants par la souche FLU5 sur différentes sources de carbone, en présence de 30 g/l NaCl, à 37 °C et à 180 rpm, pendant 10 jours. ....	188

Tableau 37. Evaluation de la production de biosurfactant par la souche NAPH6 sur différentes sources de carbone, en présence de 30 g/l NaCl, à 37 °C et à 180 rpm, pendant 10 jours.....	188
Tableau 38. Evaluation de la production de biosurfactants par la souche CO100 sur différentes sources de carbone, en présence de 30 g/l NaCl, à 37 °C et à 180 rpm. ....	188
Tableau 39. Evaluation de la production de biosurfactants par la souche PYR2 sur différentes sources de carbone, en présence de 30 g/l NaCl, à 37 °C et à 180 rpm. ....	189
Tableau 40. Pourcentages de l'inhibition (pré-traitement) et de la perturbation (post-traitement) de la formation des biofilms microbiens sur la surface de polystyrène (plaque de microtitration, 96 puits), par BS-FLU5.....	226
Tableau 41. Pourcentages de l'inhibition (pré-traitement) et de la perturbation (post-traitement) de la formation des biofilms microbiens sur la surface de polystyrène (plaque de microtitration, 96 puits), par BS-CO100.....	227
Tableau 42. Pourcentages de l'inhibition (pré-traitement) et de la perturbation (post-traitement) de la formation des biofilms microbiens sur la surface de polystyrène (plaque de microtitration, 96 puits), par BS-PYR2.....	228

# LISTE DES ABREVIATIONS

<b><math>\mu_{\max}</math></b>	:	Vitesse spécifique maximale de croissance
<b>ACP</b>	:	Analyse en Composante Principale
<b>ADN</b>	:	Acide Désoxyribonucléique
<b>ADNr</b>	:	ADN ribosomal
<b>ARN</b>	:	Acide ribonucléique
<b>ARNr</b>	:	ARN ribosomal
<b>ARNt</b>	:	ARN de transfert
<b>BET</b>	:	Bromure d'Ethidium
<b>CCC</b>	:	Concentration Continue des Critères
<b>CFU</b>	:	Colony Forming Unit
<b>CI</b>	:	Carbone Inorganique
<b>CMA</b>	:	Concentration Maximale Admissible.
<b>CMC</b>	:	Concentration Maximale Admissible.
<b>CO<sub>2</sub></b>	:	Dioxyde de Carbone
<b>COT</b>	:	Carbone Organique Total
<b>CT</b>	:	Carbone Total
<b>CTAB</b>	:	Cétyl Triméthyl Ammonium Bromide
<b>dATP</b>	:	2'-DeoxyAdenosine 5'-TriPhosphate
<b>DBO<sub>5</sub></b>	:	Demande Biologique en Oxygène
<b>DCM</b>	:	Dichlorométhane
<b>DCO</b>	:	Demande Chimique en Oxygène
<b>dCTP</b>	:	2'-DeoxyCytidine 5'-TriPhosphate
<b>ddNTP</b>	:	DiDésoxyriboNucléotides TriPhosphate
<b>DGGE</b>	:	Electrophorèse sur Gel en Gradient Dénaturant
<b>dGTP</b>	:	2'-DeoxyGuanosine 5'-TriPhosphate
<b>DMEM</b>	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>dNTP</b>	:	DésoxyriboNucléotide TriPhosphate
<b>DO</b>	:	Densité Optique
<b>dTTP</b>	:	2'-Deoxythymidine 5'-triphosphate
<b>EDTA</b>	:	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
<b>ERL</b>	:	Effects range low
<b>ERM</b>	:	Effects range median
<b>EPS</b>	:	Exopolysaccharides
<b>ETAP</b>	:	Entreprise Tunisienne d'Activités Pétrolières
<b>FTIR</b>	:	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
<b>GC/MS</b>	:	Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse
<b>GC-FID</b>	:	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme
<b>GCT</b>	:	Groupe Chimique Tunisien
<b>GESAMP</b>	:	Group of Expert on the Scientific Aspects of Marine Pollution
<b>HEK</b>	:	Human Embryon Kidney
<b>IR</b>	:	Infrarouge
<b>IRD</b>	:	Institut de Recherche pour le Développement

<b>KDa</b>	:	KiloDalton
<b>LB</b>	:	Lauria Bertani
<b>MA:</b>	:	Moyenne Annuelle;
<b>MEOR</b>	:	Récupération améliorée du pétrole
<b>mN/m</b>	:	MilliNewton par mètre
<b>MTT</b>	:	Microculture Tetrazolium
<b>MVS</b>	:	Matière Volatile en Suspension
<b>NADH</b>	:	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
<b>NADPH</b>	:	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
<b>NCBI</b>	:	National Center for Biotechnology Information
<b>N-LS</b>	:	N-Lauryl Sarcosine
<b>NQE:</b>	:	Normes de Qualité Environnementale
<b>NRPS</b>	:	Non Ribosomal Peptides Synthétase
<b>ONAS</b>	:	Office National de l'Assainissement
<b>Pb</b>	:	Paire de Base
<b>PBS</b>	:	Tampon Phosphate Salin
<b>PCR</b>	:	Réaction de Polymérisation en Chaîne
<b>pH</b>	:	Potential Hydrogène
<b>ppm</b>	:	Partie par million
<b>q.s.p</b>	:	Quantité suffisante pour
<b>RDA</b>	:	Redundancy Analysis
<b>RFLP</b>	:	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RHD</b>	:	Ring-Hydroxylating Dioxygenases
<b>Rpm</b>	:	Rotation par minute
<b>S/m</b>	:	Siemens par mètre
<b>SD</b>	:	Succinate Déshydrogénase
<b>SDS</b>	:	Sodium DodécylSulfate
<b>SIAPE</b>	:	Société Industrielle d'Acide Phosphorique et d'Engrais
<b>SSCP</b>	:	Single Strand Conformation Polymorphism
<b>SSH</b>	:	Société de Services des Huileries
<b>STS</b>	:	Société Tunisienne du Sucre
<b>TCA</b>	:	Cycle des acides tricarboxyliques
<b>TDH</b>	:	Test de Déplacement d'Huile
<b>TE</b>	:	Tris-EDTA
<b>TPS</b>	:	Tyna Petroleum Services
<b>TS</b>	:	Tension de Surface
<b>TSP</b>	:	Triple Super Phosphate
<b>US-EPA</b>	:	United States Environmental Protection Agency's
<b>UV</b>	:	Ultraviolet

# **INTRODUCTION GENERALE**

## INTRODUCTION GENERALE

La pollution des écosystèmes marins constitue l'un des problèmes environnementaux majeurs par son impact sur la biosphère et la santé humaine. Le milieu marin côtier, largement exploité pour ses richesses économiques (mariculture, pêche,) et touristiques, subit de nombreuses pollutions provenant de rejets directs (déversements de pétrole, effluents urbains et industriels...) et indirects (apports fluviaux et atmosphériques) (Vikas *et* Dwarakish 2015). Les zones portuaires, qui comptent parmi les régions côtières les plus polluées, menacent les communautés benthiques et pélagiques (Dijkstra *et al.*, 2017). Le même constat est fait pour le littoral Sud de Sfax y compris les ports dont la pollution presque généralisée menace sérieusement les ressources naturelles existantes dans la région (les sols, les aquifères et l'écosystème marin) (Drira *et al.*, 2016; Zaghdien *et al.*, 2017).

Les substances xénobiotiques susceptibles de contaminer les eaux sont extrêmement nombreuses et diverses en raison des activités humaines multiples qui peuvent en être la source. Les hydrocarbures, et en particulier les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), sont notamment considérés comme des contaminants prioritaires des écosystèmes marins du fait de leur faible solubilisation dans les milieux aqueux et leur adsorption aux particules solides. De plus, les HAPs, présentent un risque toxicologique important même à des faibles concentrations, notamment par leurs propriétés mutagènes et cancérigènes (Duran *et* Cravo-Laureau, 2016).

Afin de préserver et de restaurer l'environnement et d'éliminer ces polluants, il est donc nécessaire de développer des méthodes fiables et efficaces de dépollution. Les méthodes physiques et chimiques sont appliqués afin d'immobiliser les hydrocarbures et de les détruire pour réduire leurs impacts sur la santé et sur l'environnement (Azubuike *et al.*, 2016). La plupart de ces techniques sont coûteuses et non respectueuses de l'environnement (Azubuike *et al.*, 2016). Toutefois, une approche biologique par bioremédiation peut être envisagée. Elle utilise le pouvoir épurateur des microorganismes de l'environnement, et présente l'avantage d'être peu invasive et moins onéreuse (Nikitha *et al.*, 2017). Les recherches actuelles s'orientent vers l'élimination des hydrocarbures, incluant les HAPs, par des bioprocédés dont l'intérêt de ces nouvelles techniques réside surtout dans l'aspect non polluant et l'absence de sous-produits chimiques. La biodégradation par les populations naturelles de microorganismes est considérée comme le mécanisme principal par lequel la plupart des polluants xénobiotiques, notamment les hydrocarbures sont éliminés de l'environnement (Nikitha *et al.*, 2017).

Par ailleurs, l'addition des agents tensioactifs est une approche prometteuse pour augmenter la biodégradation des hydrocarbures. Ces molécules peuvent augmenter la solubilisation et la dispersion des hydrocarbures et modifier l'affinité entre la cellule microbienne et le composé organique (Geetha *et al.*, 2018). La plupart des surfactants commercialement disponibles sont d'origine chimique et sont des produits dérivés du pétrole. Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont généralement toxiques et non biodégradables (Banat *et al.*, 2000). De ce fait, depuis plusieurs années et grâce à l'essor de la biotechnologie, la production des tensioactifs produits par les microorganismes suscite un grand intérêt par les scientifiques. Ceci est dû principalement aux avantages présentés par ces biomolécules par rapport à leurs homologues chimiques, à savoir la biodégradabilité, la faible toxicité, l'efficacité dans des conditions extrêmes (pH, température et salinité) et la production en présence des ressources renouvelables (Makkar *et al.*, 2011). Les biosurfactants ont de nombreuses applications potentielles couvrant des domaines très variés tels que l'agroalimentaire, la cosmétique, la médecine, l'agriculture, les détergents, la fabrication de textiles, le traitement des métaux, l'industrie pétrolière et la bioremédiation de sites contaminés par les hydrocarbures, grâce à leur capacité d'émulsification et de solubilisation, etc... (Santos *et al.*, 2016). Néanmoins, leurs coûts élevés de production soulignent la nécessité d'optimiser le processus de production pour permettre une éventuelle application à l'échelle industrielle (Banat *et al.*, 2014b). Les biosurfactants peuvent être produits sur des ressources agricoles et de déchets renouvelables, permettant non seulement une diminution significative de coût de production, mais aussi une réduction des quantités des déchets à traiter générés par diverses entreprises (Geetha *et al.*, 2018).

Dans un autre contexte, l'étude de la biodiversité microbienne s'est considérablement développée ces dernières années grâce à l'utilisation des techniques moléculaires et la réalisation des analyses phylogénétiques. En effet, 99% des microorganismes présents dans la nature ne sont pas accessibles par des techniques culturales classiques. Les approches moléculaires permettent d'étudier la diversité microbienne des écosystèmes microbiens complexes, très mal connus, en s'affranchissant de l'étape culturale (Amann *et al.*, 1999; Ranjard, 2012). Par ailleurs, ces techniques moléculaires basées sur l'extraction de l'information génétique (ADN) à partir de différents environnements (eau, sol...), ont permis la caractérisation des modifications dans la composition et la diversité de communautés microbiennes naturelles dans des situations de perturbations environnementales permettant l'identification des groupes microbiens d'intérêts. Parmi ces approches moléculaires, on distingue les techniques d'empreinte génétique équivalente des codes-barres (SSCP, RFLP,



DGGE...). Cet ensemble des techniques permet d'obtenir une image globale de la structure, de la diversité ou encore de l'évolution des communautés sans besoin de savoir quels sont les organismes présents (Monier *et* Cécillon, 2015). Plus récemment, le développement des techniques haut-débit de séquençage massif (pyroséquençage, Illumina, SOLiD, etc...), permettent d'obtenir des dizaines voire des centaines de milliers de séquences d'un génome unique ou d'un métagénome de communautés indigènes présentes dans un échantillon donné (Christen, 2008). L'analyse métagénomique des environnements naturels offrent la possibilité d'avoir une vision plus intégrative de l'ensemble des événements se déroulant dans un écosystème (Ranjard, 2012).

Nous nous sommes intéressés au cours de cette formation doctorale à :

- ❖ La caractérisation physico-chimique des échantillons marins provenant du port de plaisance (Chott Kreknnah), du port de commerce et du port de pêche de la ville de Sfax, Tunisie.
- ❖ L'étude de la biodiversité microbienne et de sa dynamique, moyennant les outils moléculaires (PCR-SSCP, pyroséquençage, Illumina MiSeq), des échantillons marins étudiés.
- ❖ L'isolement et la caractérisation sur les plans phénotypique et phylogénétique des bactéries aérobies marines hydrocarbonoclastes.
- ❖ L'étude des potentialités biodégradatives des hydrocarbures, en particulier des structures complexes et polyaromatiques, par les souches bactériennes marines sélectionnées.
- ❖ Le criblage des souches hyper-productrices de biosurfactants, la production et la caractérisation de ces biomolécules tensioactives.
- ❖ Les essais d'applications des biosurfactants: Remobilisation des hydrocarbures contenus dans les sols et activités biologiques (anti-biofilms, anti-adhésives et activité cicatrisante).

# **SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

## **POLLUTION MARINE, HYDROCARBURES & BIODEGRADATION**

---

### **I. Côte Sud de Sfax: «Un littoral dégradé et condamné»**

#### **I.1. Généralité**

La ville de Sfax, deuxième grand pôle d'activités économiques de la Tunisie avec une population d'environ 948 705 milles habitants, est située sur le littoral Sud de la Méditerranée à environ 300 km au sud de Tunis (APII, 2017). Le littoral de Sfax s'étale sur près de 50 km linéaires, du village de Sidi Mansour au Nord à celui de Chaffar au Sud, et sur une profondeur moyenne d'environ 5 km. L'existence d'un littoral qui se prête à l'implantation d'infrastructures portuaires, a orienté le développement économique de la ville qui a pu afficher clairement son internationalité liée à la prolifération d'industries manufacturières dynamiques. En effet, le port commercial de Sfax est l'un des plus anciens. Il a été créé vers 1905. Il est spécialisé dans l'exportation des produits qui viennent essentiellement du Centre et du Sud du pays, en plus de la production locale comme le sel marin, l'huile d'olive, les phosphates traités et divers autres produits semi-finis ou finis de certaines industries. Une autre composante de l'économie Sfaxienne est l'exploitation du pétrole. Le gisement du gaz naturel de Miskar s'étend sur une superficie totale de 352 km<sup>2</sup> avec une capacité de 22,7 milliards de m<sup>3</sup> (APII, 2017).

Par conséquent, les zones côtières de Sfax ont été transformées en réceptacle de nuisances en tout genre (congestion urbaine, pollutions...) dont l'ampleur ne cesse de progresser en fonction du développement de l'agglomération. En fait, les activités industrielles et les pratiques souvent non respectueuses de l'environnement ont fini soit par occuper fatalement ce littoral ou bien le dégrader de manière presque définitive, d'où, un environnement littoral dégradé, délabré, et abandonné (Projet SMAP III-Tunisie, 2006-2008).



Figure 1. Littoral Sud de Sfax.

## I.2. Principales sources de pollution marine à Sfax

Sfax Sud souffre depuis plusieurs décennies d'une dégradation de son environnement. La zone littorale Sfax Sud subit une pression industrielle accrue. Dans cette zone, l'industrie occupe plus de 50% de la superficie totale.

Sept principaux sites pollués ont été inventoriés sur les côtes Sud de Sfax. Il s'agit de quatre sites marins et trois sites terrestres (COMETE, 2012).

### I.2.1. Sites marins pollués

#### I.2.1.1. Port de commerce de Sfax

Cette zone industrielle se développe à l'intérieur du port de commerce. Elle renferme une centaine d'unités industrielles en relation avec les activités de mer. En effet, ce site a montré des indices de pollution essentiellement par les hydrocarbures et les métaux traces. La pollution par les hydrocarbures a été essentiellement liée au mouvement des navires et aux eaux de ballaste. En outre, la pollution par les métaux lourds résulte des activités d'embarquement du phosphate et des produits phosphatiers ainsi que du débarquement des produits chimiques, principalement le soufre (COMETE, 2012).

#### I.2.1.2. Nouveau port de pêche de Sfax

La qualité des eaux et des sédiments dans le nouveau port de pêche de Sfax a montré une pollution organique élevée. Cette pollution est essentiellement due à l'évacuation des rejets bruts des activités de transformation et de conditionnement des produits de mer ainsi qu'aux activités d'entretien anarchique des bateaux (COMETE, 2012).

### ***1.2.1.3. Embouchure du canal de sidi Salem***

Le canal de Sidi Salem draine les eaux pluviales de la zone industrielle de Sidi Salem et la partie ouest de la ville de Sfax. Ce même canal reçoit certains rejets industriels illicites, ainsi que les eaux brutes de l'abattoir de Sfax. Ces eaux très chargées sont évacuées dans une zone de faible marée (mer morte) au Sud du port de pêche où on assiste à une eutrophisation du milieu (COMETE, 2012).

### ***1.2.1.4. Embouchure du canal Hakmouni***

Le canal Hakmouni évacue les rejets du canal de Sidi Salem vers la mer. Ce canal draine les rejets pollués de la SIAPE, les eaux de lixiviation du terril de phosphogypse, les lixiviats de la décharge de Thyna et les eaux traitées de la STEP de l'ONAS vers la mer (COMETE, 2012).

## **1.2.2. Sites terrestres pollués**

Ils existent trois principaux sites pollués localisés aux alentours de la ville de Sfax et comprennent le terril de phosphogypse, les dépôts de margine et les centres de transfert de déchets inertes. Les travaux de diagnostic réalisés ont montré une continuité de la pollution sur les différents sites.

### ***1.2.2.1. Dépôt de phosphogypse***

Le phosphogypse généré par l'usine de transformation du phosphate du Groupe Chimique Tunisien (GCT) à Sfax (SIAPE) est déposé en terril qui s'étale sur une hauteur de 58 m et couvre une superficie à peu près de 54 hectares (ha). Le volume stocké de ce phosphogypse est estimé à plus de 16 millions de m<sup>3</sup> en 2004 (Charfi *et* El Hbaieb, 2008), d'où la quantité du phosphogypse accumulée jusqu'aujourd'hui peut être estimée aux alentours de 30 millions de tonnes (Chaari, 2017). Ce dernier est constitué par d'acide fluorhydrique, du sulfate de calcium hydraté, des sels, des métaux de Zinc, de Plomb, de Mercure, de Cadmium et de Cuivre, ainsi que de traces d'éléments radioactifs (Felfoul, 2004). Le transport du phosphogypse jusqu'à son lieu de stockage, présente un grand danger pour les eaux souterraines, les eaux marines et les sols. En effet, la contamination peut être due au phénomène de lessivage par les eaux de pluie.

### ***1.2.2.2. Dépôt de margines***

Les margines sont des affluents visqueux, acides, riches en matières organiques et en polyphénols (Sayadi *et al.*, 1996). Elles ont des effets néfastes sur le sol, les fleuves, les

nappes souterraines (risque de contamination), et sur les stations d'épuration, par altération de la qualité de l'eau traitée quand elles sont rejetées sans traitement, sans contrôle et à des doses excessives. Conscients des effets néfastes de ces affluents sur l'environnement, le stockage des margines dans les huileries, est organisé et contrôlé par des sociétés de services des huileries (SSH Sfax), des municipalités ou par des groupements de producteurs, qui constitue le principal mécanisme de gestion de ces affluents. Occupant une superficie de 48 ha, le grand bassin de stockage de margine, localisé à Agareb, présente le principal collecteur de margine pour la région de Sfax (Sahnoun *et al.*, 2006).

### ***1.2.2.3. Décharge et centre de transfert de déchets inertes***

L'ANGed est responsable, à Sfax, de la fermeture et de la réhabilitation des anciennes décharges et de la mise en place de la décharge contrôlée, des centres de transfert et d'un centre de réception des déchets dangereux. En ce qui concerne les centres de transfert, il en existe 7 dans le gouvernorat de Sfax, installés à Thyna, El Aïn, Sakiet Ezzit, Sidi Mansour, Jebeniana, Menzel Chaker et Mahrès. Le centre de transfert de Thyna reçoit 40% des déchets de la commune, tandis que le reste est acheminé vers le centre de transfert de Sidi Mansour au nord de la ville. À l'entrée du centre de transfert, les véhicules de collecte de la municipalité et des sociétés privées de collecte sont enregistrés et pesés au moyen d'un pont bascule; ils déversent ensuite leur chargement dans des caissons de 30 m<sup>3</sup> (10-11 tonnes) qui, une fois remplis, sont chargés et évacués par les véhicules de traction de l'ANGed jusqu'à la décharge contrôlée à Agareb (Dhuy, 2012).

Le centre de transfert de Thyna n'accepte pas les déchets des industriels, qui doivent les acheminer directement à la décharge contrôlée ou bien au centre de transfert de Sakiet Ezzit. La décharge contrôlée de Sfax est située au sein de la réserve forestière naturelle d'El Gonna, à 20 km à l'ouest de la ville (Dhuy, 2012).

## **II. Pollution marine**

La pollution marine est définie comme étant l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, de substances ou d'énergie dans le milieu marin occasionnant des effets néfastes tels que des risques pour la santé humaine, des nuisances envers les ressources biologiques, une altération de la qualité de l'eau de la mer, ainsi que des entraves aux activités maritimes (y compris la pêche) (GESAMP, 1989).

Un pourcentage de 80% de la pollution marine des océans est d'origine continentale, c'est-à-dire qu'elle provient des activités humaines sur les continents et non pas des activités

maritimes. Les divers polluants sont entraînés par le cycle de l'eau des continents (ville, montagne...) vers les océans par les cours d'eau (rivières, fleuves) ou par les nappes phréatiques souterraines (Goeury David, 2014).

## **II.1. Sources de la pollution marine**

Les sources de pollution du milieu aquatique sont diverses. Ces pollutions peuvent être d'origines naturelle ou anthropique. Parmi les pollutions naturelles, on trouve les tempêtes, les éruptions volcaniques, ou les crues qui peuvent, par leur action de brassage, disperser et/ou remettre en suspension des sols ou des sédiments contaminés. Quant aux pollutions d'origine anthropique, elles présentent des causes très multiples. Il peut s'agir de pollutions chroniques, telle que la dispersion de produits chimiques liée aux activités agricoles (produits phytosanitaires, fèces, pesticides), industrielles, portuaires (hydrocarbures), ou de pollutions liées à la vie courante tels que les effluents résiduels, les produits pharmaceutiques et les gaz d'échappement. Il peut également s'agir de pollutions accidentelles telles que les marées noires ou certaines catastrophes nucléaires (Shahidul Islam *et* Tanaka, 2004). En effet, les hydrocarbures représentent une importante source de pollution, notamment en cas d'accident pendant le transport par la mer ou par fuite ou accident sur une plate forme pétrolière, sur une barge de stockage pétrolière, ou sur un pipeline de transport sous-marin (Chalghmi, 2015).

### **II.1.1. Pollution physique**

La pollution physique peut être soit de nature mécanique, thermique ou radioactive. Une pollution mécanique est due à une charge importante des eaux en éléments en suspension provenant d'effluents industriels ou d'eaux usées de carrières ou de chantiers divers. Une pollution thermique quant à elle est causée par le rejet d'eaux chaudes provenant des centrales électriques des sources thermales. La pollution par les agents radioactifs est pour sa part limitée par le contrôle strict effectué dans les installations nucléaires; toutefois, les risques demeurent dans certains hôpitaux face aux déchets d'utilisation des radioéléments (Potters, 2013).

### **II.1.2. Pollution chimique**

L'immense majorité des nuisances est causée par ce type de rejets. Parmi lesquels, on distingue ceux de nature minérale et les effluents organiques. La pollution à dominance minérale est caractérisée par la présence d'éléments chimiques, tels que les phosphates, les nitrates, les nitrites, les sulfates, l'ammoniaque, ou de substances non naturelles à toxicité immédiate ou différée, comme les pesticides, les métaux lourds, les détergents, qui



s'accumulent dans les tissus des organismes vivants (Richir *et* Gobert, 2016). Les premiers sont déversés dans le milieu aquatique sous forme d'excédents d'engrais agricoles qui sont entraînés par le ruissellement, le lessivage ou la lixiviation. Si leur charge devient élevée, on observe alors une forte multiplication des populations algales débouchant à l'eutrophisation et au vieillissement précoce du cours d'eau (Tuffery, 1980). Quant aux pesticides, aux métaux lourds et aux détergents, la réponse de leur action sur les biocénoses reste liée à l'espèce. En effet, lorsque la concentration en ces toxiques atteint ou dépasse la dose létale d'un taxon donné, celui-ci meurt.

La pollution organique a des origines multiples. Les sources principales sont les rejets des agglomérations urbaines, les industries agro-alimentaires telles que les laiteries, les conserveries, les tanneries etc... (Tuffery, 1980). Les apports importants de matières organiques agissent sur les organismes, sur la production des biocénoses et sur le vieillissement des plans d'eau.

### **II.1.3. Pollution biologique**

Il s'agit de l'introduction d'un ou des microorganismes (bactéries, champignons, virus) dans une zone où ils sont normalement absents et dans laquelle ils ont un impact non négligeable. Ces microorganismes peuvent proliférer à leur arrivée dans le milieu marin et devenir envahissants, tout en causant de multiples impacts sur le milieu naturel comme une compétition pour la nourriture et la lumière avec les espèces indigènes ainsi que la dispersion des toxines dans le milieu naturel (Potters, 2013).

Cette pollution peut résulter du rejet, dans les eaux continentales ou littorales, d'une grande variété de substances organiques fermentescibles d'origines multiples (effluents urbains, industries, élevages, matières fécales...). Elle se traduit par une forte contamination bactériologique et soulève, dans la plupart des cas, de vrais problèmes d'hygiène dont la qualité des eaux et la salubrité des plages (Mearns *et al.*, 2018).

## **III. Hydrocarbures**

### **III.1. Généralités**

Les hydrocarbures (pétrole brut et gaz naturels) sont des molécules organiques contenant exclusivement des atomes de carbone et d'hydrogène. Ils se forment à partir de débris d'algues, de résidus de la faune marine et du plancton transformés biogéochimiquement sur de très longues périodes. Cette transformation se fait sous l'influence de la température et de la pression (Head *et al.*, 2003). On distingue trois principaux groupes: les alcanes, les



hydrocarbures monoaromatiques et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (Adedosu *et al.*, 2013).

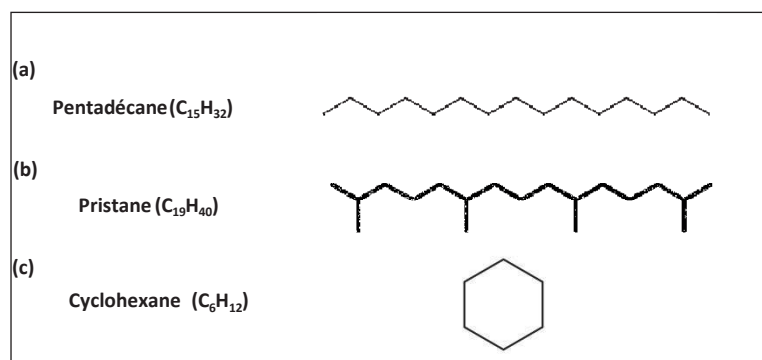
### III.1.1. Hydrocarbures saturés

Les hydrocarbures saturés, appelés également « paraffines », diffèrent des autres hydrocarbures par le fait que leurs atomes ne sont liés que par des liaisons simples. Ils sont beaucoup plus légers que les autres hydrocarbures et en général, ils représentent entre 30 et 50% des hydrocarbures totaux d'un pétrole brut (Tissot *et Welte*, 1978). Parmi lesquels, on distingue :

- **Les alcanes linéaires:** (*n*-alcanes,  $C_nH_{2n+2}$ ), dont la longueur de leur chaîne varie de 7 à 40 atomes de carbone. Ils constituent une des classes les plus abondantes (10 à 40% des hydrocarbures totaux d'un brut pétrolier). Exemple: Pentadécane ( $C_{15}H_{32}$ ) (Fig. 2a).

- **Les alcanes ramifiés:** les plus abondants sont les *iso*-alcanes (groupement méthyle en position 2) et les *antéiso*-alcanes (groupement méthyle en position 3). On retrouve des poly-ramifiés tels que les isoprénoides (Exemples: pristane ( $C_{19}H_{40}$ ) (Fig. 2b) et phytane ( $C_{20}H_{42}$ )), qui sont beaucoup moins nombreux (Tissot *et Welte*, 1978; Nakajima *et al.*, 1985).

- **Les cycloalcanes** ( $C_nH_{2n}$ ): appelés aussi cyclanes; ce sont des alcanes sur lesquels les carbones sont liés par des liaisons simples de manière à former un cycle (Dooley *et al.*, 2014). Exemple: Cyclohexane ( $C_6H_{12}$ ) (Fig. 2c).



**Figure 2.** Structures chimiques du pentadécane (a), du phytane (b) et du cyclohexane (c).

### III.1.2. Hydrocarbures aromatiques

Ils regroupent les hydrocarbures aromatiques monocycliques et polycycliques. 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 (Wang Hai

et Frenklach 1994). En plus de leur présence dans les pétroles, les hydrocarbures aromatiques sont présents dans divers environnements, comme les sols et les sédiments (Kim *et al.*, 2013).

### III.1.2.1. Hydrocarbures monoaromatiques

Ils sont des molécules ubiquistes dans l'environnement, tels que les BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène et *o*, *m*, *p*-Xylènes) (Fig. 3). Ils se trouvent surtout dans l'essence et les carburants des avions et sont largement répandus dans les synthèses industrielles (Paralovo *et al.*, 2016). Les BTEX sont des composés volatils, inflammables, cancérigènes et neurotoxiques et sont classifiés comme polluants prioritaires selon l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (Hazrati *et al.*, 2016).

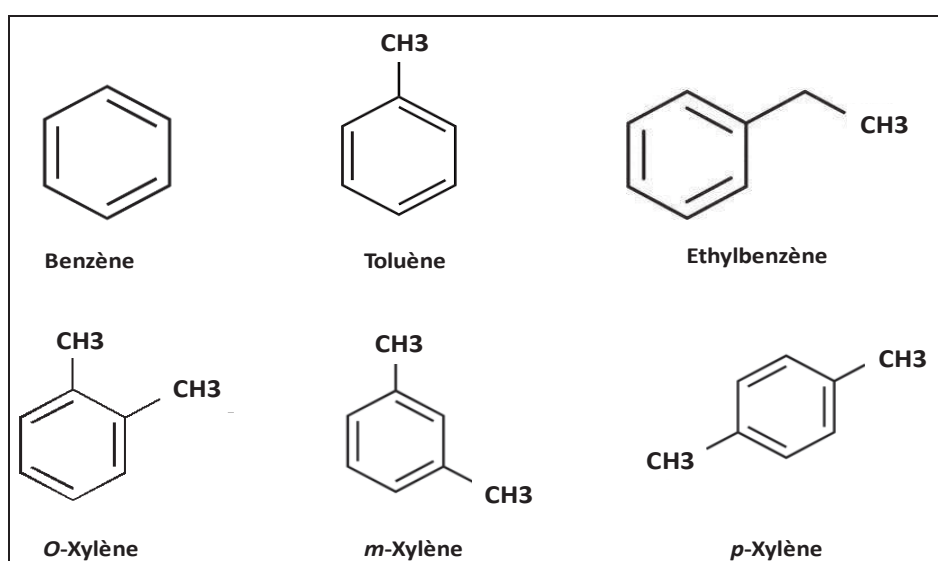
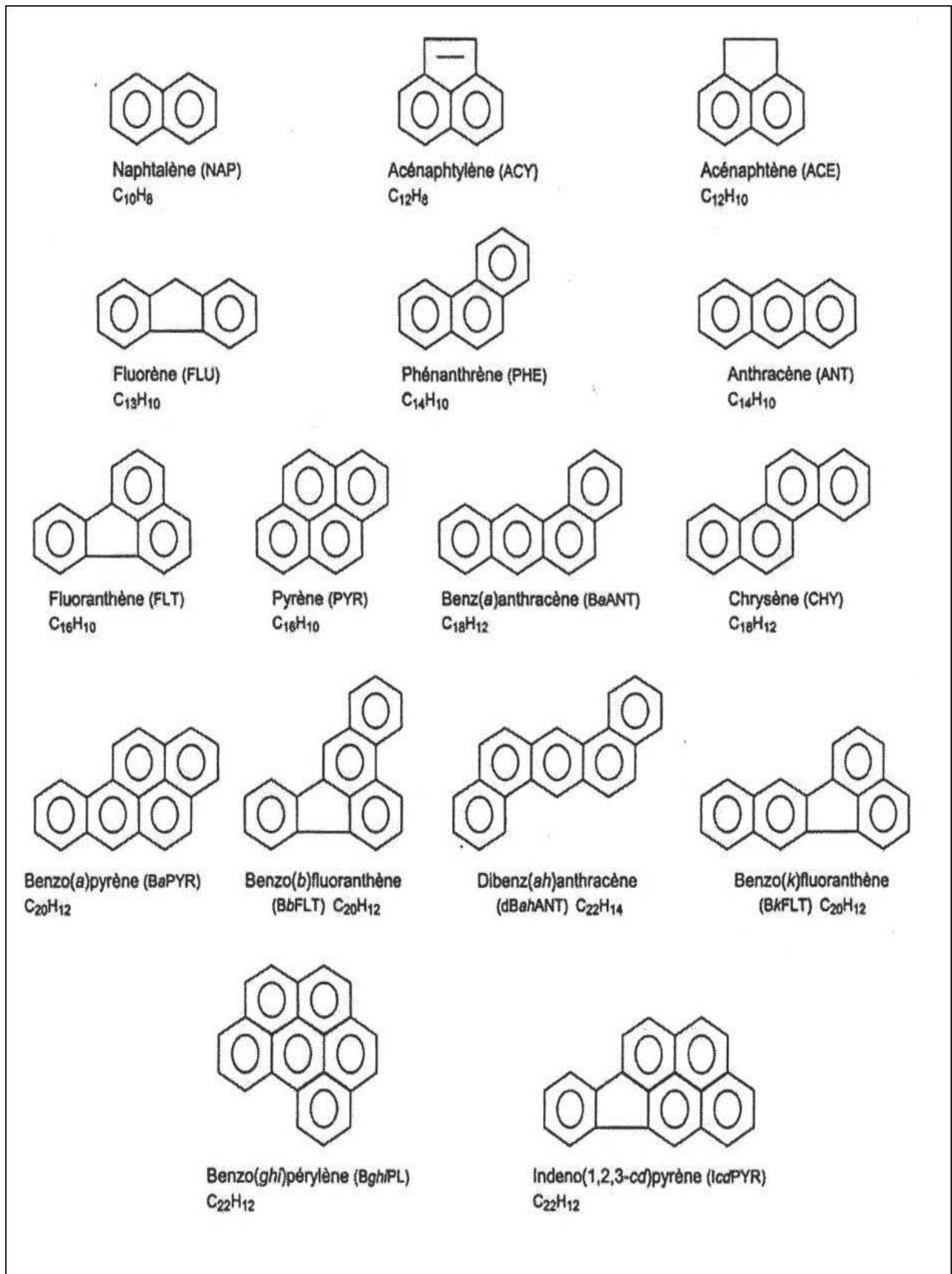


Figure 3. Structures chimiques des BTEX.

### III.1.2.2. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs)

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont des composés organiques comportant au moins deux cycles benzéniques. Le plus simple d'entre eux est le naphthalène, composé de 2 cycles et le plus complexe est le coronène (7 cycles). Ces composés sont souvent récalcitrants, dotés de faible biodégradabilité, d'une hydrophobicité élevée et, pour certains, d'une forte toxicité. Ceci explique que plusieurs HAPs figurent dans la liste des substances prioritaires selon l'Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis (EPA-US) (Duran *et Cravo-Laureau*, 2016) (Fig. 4). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont parmi les polluants les plus fréquemment rencontrés dans les environnements côtiers. La plupart des HAPs de milieu marin sont issus des retombées atmosphériques, du ruissellement urbain, de l'abrasion de l'asphalte, des effluents urbains et industriels et du déversement ou fuite du pétrole (Duran *et Cravo-Laureau*, 2016).



**Figure 4.** Structures et nomenclature des 16 HAPs prioritaires selon l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (EPA) (Chen *et al.*, 2016).

Les HAPs sont émis dans l'environnement par des processus naturels ou anthropiques. Les processus naturels de génération des HAPs sont divers. Parmi eux, les feux de forêt et de prairie sont considérés comme les plus importants. Mais, il existe d'autres processus tels que les éruptions volcaniques, l'érosion des roches, les fuites de réservoirs naturels ainsi que la production d'hydrocarbures par les végétaux supérieurs (cires) ou par les algues. Deux sources anthropiques sont généralement distinguées: d'une part les sources pétrolières, correspondant à une pétrogénèse à basse température, et d'autre part les sources pyrolytiques correspondant à des processus de combustion à haute température. La circulation automobile constitue l'une des principales sources d'hydrocarbures puisqu'elle combine les deux processus. Les véhicules émettent des gaz d'échappement provenant de la combustion incomplète des carburants (Aislabie *et al.*, 1998) et sont aussi à l'origine de déversements de produits variés tels que les carburants, les huiles lubrifiantes ou les débris de pneumatiques (Hahn *et Pfeifer* 1994; Nikitha *et al.*, 2017).

Les propriétés physico-chimiques des HAPs dictent leur comportement et leur distribution dans l'environnement. Les HAPs sont caractérisés par des points de fusion et d'ébullition élevés. A l'exception du naphthalène, leurs solubilités dans l'eau vont de très faibles à faibles et leurs tensions de vapeur, de faibles à modérément élevées (Annexe I).

La persistance des HAPs augmente avec le nombre des cycles de la molécule. Par exemple, le naphthalène et les composés de faibles masses moléculaires, étant plus solubles et plus volatiles, sont peu persistants et donc peu bioaccumulables. En revanche, les composés de masses moléculaires élevées sont très persistants et par conséquent bioaccumulables (Kanaly *et Harayama*, 2000). Par ailleurs, les HAPs ont une réactivité faible. Ils sont stables chimiquement et auront tendance à être rémanents (Haritash *et Kaushik* 2009). Ils peuvent être distribués partout dans l'environnement et transportés loin de leur source d'émission (Simonich *et al.*, 2011).

### III.1.3. Composés polaires

Les composés polaires correspondent à des molécules hétérocycliques, et représentent 5 à 25% de la composition des pétroles bruts. On trouve des composés oxygénés (acides carboxyliques, phénols, aldéhydes, alcools...), des composés soufrés (sulfures, disulfures, mercaptans...) et des composés azotés (quinoléines, pyridines) (Colati *et al.*, 2013).

#### **III.1.4. Asphaltènes**

Les asphaltènes correspondent à une classe de composés de hautes masses moléculaires, insolubles dans le pentane ou l'hexane. Ils sont essentiellement constitués des molécules de carbone et d'hydrogène. D'ailleurs, ils contiennent également des hétéroatomes tels que le soufre, l'azote et l'oxygène avec des quantités significatives, tandis que les métaux, comme, le nickel et le Vanadium sont également présents en petite quantité et avec des proportions variables (Schuler *et al.*, 2015).

### **III.2. Devenir des hydrocarbures dans l'environnement marin**

Dès son déversement dans l'environnement marin, l'hydrocarbure est soumis à de nombreux processus naturels, qui vont entraîner des modifications de son aspect général et de ses caractéristiques physico-chimiques. La figure 5 illustre les sources des hydrocarbures et les différents processus qu'ils peuvent subir en milieu marin. Ces processus sont soumis au contrôle de facteurs abiotiques et biologiques.

#### **III.2.1. Processus abiotiques**

##### **III.2.1.1. Évaporation**

Lorsque déversés en mer ou sur la côte, l'évaporation est le processus de transformation le plus important des hydrocarbures lors des deux premiers jours d'évolution de la nappe. Selon le type de pétrole, elle peut affecter la quasi totalité ou une partie insignifiante du pétrole déversé. Elle agit sur les fractions légères et elle s'intensifie lorsque l'étalement des hydrocarbures est important. L'agitation de la mer et des vents favorisent fortement l'évaporation (Goeury Cédric, 2012).

##### **III.2.1.2 Transport de la nappe d'hydrocarbures**

Le transport d'une nappe d'hydrocarbures est généralement induit par le courant, le vent, les vagues et la diffusion turbulente. La vitesse d'étalement dépend du point d'écoulement et de la viscosité. En effet, les hydrocarbures légers s'étaleront très rapidement, quelle que soit la température de la mer, alors que les hydrocarbures lourds s'étaleront plus lentement et resteront épais plus longtemps, notamment dans les mers froides, qui constituent des environnements réduisant la vitesse de dispersion (ANPE, 2012).

### III.2.1.3. Photo-oxydation

Elle se produit en surface de l'eau suite à l'exposition des hydrocarbures à l'air libre et aux radiations solaires. Elle aboutit à des dérivés polaires généralement solubles dans l'eau (Marchand *et* Kantin, 1997). La photo-oxydation sera plus rapide lorsque les hydrocarbures sont étalés en film mince (Chalghmi, 2015).

### III.2.1.4. Dissolution

Généralement, on estime qu'une très faible partie de la masse d'hydrocarbure déversée va se dissoudre dans l'eau, ainsi peu de modèles prennent ce phénomène en compte. La présence de sels minéraux contribue à réduire l'espace limité disponible pour les molécules d'hydrocarbures. En fait, plus l'eau de mer est salée (c'est le cas de la Méditerranée), plus la dissolution est faible (Marchand *et* Kantin, 1997).

### III.2.1.5. Émulsification

L'émulsification est un processus qui conduit à la formation d'une émulsion d'eau et de pétrole. Les émulsions directes « huile dans l'eau » peuvent être facilement dispersées par les courants et les mouvements de turbulence. Par contre, les émulsions de type inverse tendent vers une consistance semi-solide et sont à l'origine des boulettes de goudron, que l'on trouve échouées sur la côte. L'émulsification est un facteur très important dans la disparition du pétrole de la surface de la mer (Bertrand *et al.*, 1989).

### III.2.1.6. Sédimentation

Le devenir et les effets des hydrocarbures dispersés dépendent significativement de la quantité d'éléments solides en suspension dans la colonne d'eau. Les gouttelettes d'hydrocarbures dispersées peuvent adhérer aux éléments solides en suspension, leurs caractéristiques physiques sont alors modifiées. Les particules solides en suspension sont susceptibles de se déposer sur les fonds marins, où elles seront accumulées dans des zones de dépôts sous l'action de la sédimentation. Dans les situations les plus défavorables, lorsque les concentrations en gouttelettes d'hydrocarbures et en sédiments en suspension sont élevées, un dépôt important de particules contaminées pourrait entraîner une pollution significative des sédiments du fond marin. Ces particules sont susceptibles de persister pendant des années et d'avoir des effets durables (Bertrand *et* Mille, 1989).



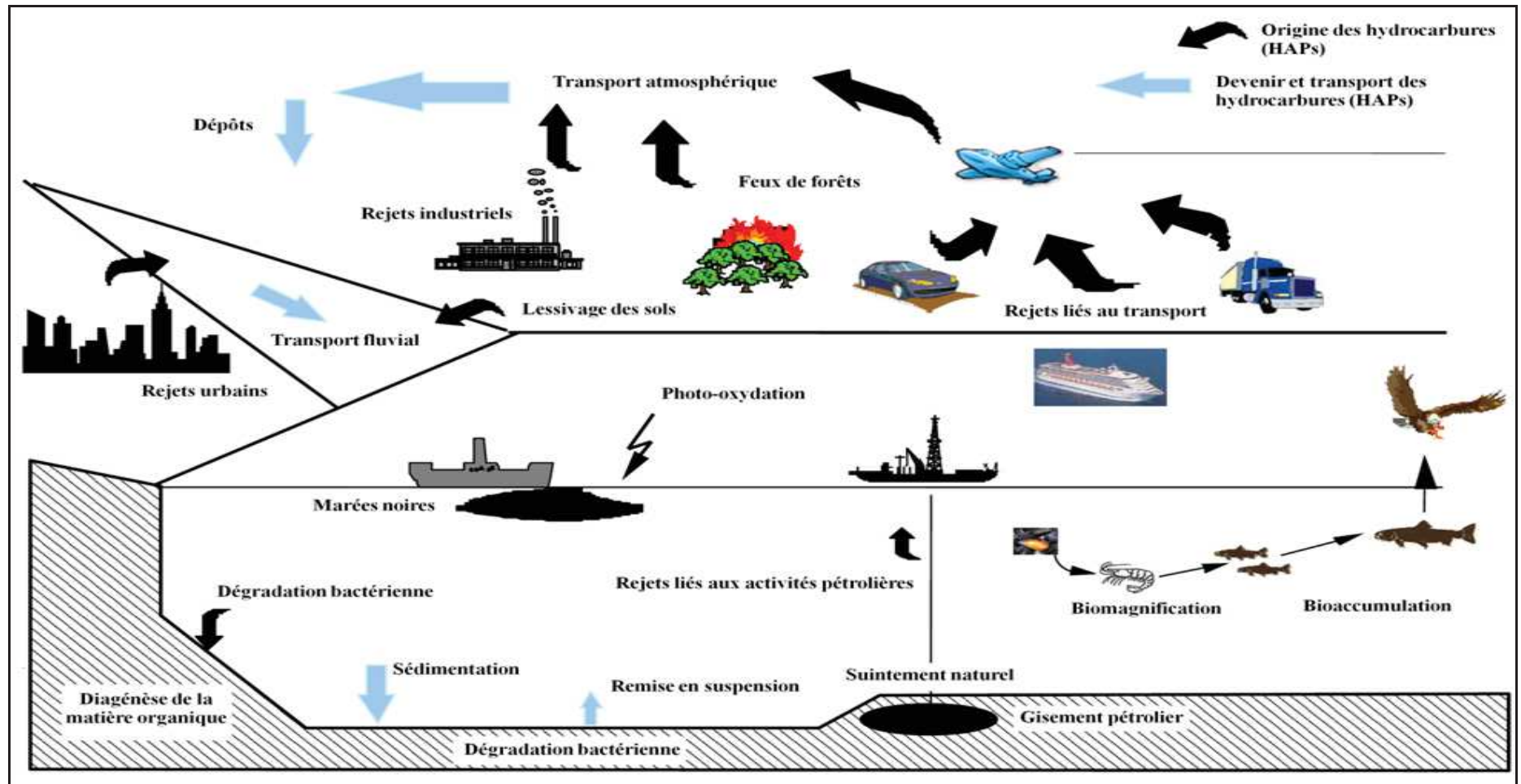


Figure 5. Cycle biogéochimique des hydrocarbures (Le Dû-Lacoste, 2008).



### III.2.2. Biodégradation

Les bactéries marines ont évolué pour produire des enzymes leur permettant d'utiliser les hydrocarbures issus des pétroles bruts comme source de carbone et d'énergie (Haritash *et* Kaushik, 2009). On parle alors de la bioremédiation qui peut être définie comme un processus d'ingénierie qui utilise des mécanismes biochimiques des organismes pour dégrader les polluants environnementaux, et les transformer en produits finaux moins complexes, tels que le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) et de l'eau (H<sub>2</sub>O) (Gillespie *et* Philp, 2013). À travers ce processus naturel, la majorité des hydrocarbures issus d'un déversement se biodégradent, l'énergie et les matériaux qu'ils contiennent étant alors intégrés à la chaîne alimentaire (Head *et al.*, 2006). La dégradation requiert un niveau approprié d'oxygène, des nutriments et des oligo-éléments; sa vitesse dépend principalement du rapport entre la surface et le volume d'hydrocarbure. Ainsi les gouttelettes finement dispersées se dégraderont rapidement alors qu'une nappe épaisse ou une flaque d'hydrocarbure sur la côte se dégradera plus lentement. Les grosses molécules d'hydrocarbures ne sont pas facilement biodégradables et peuvent persister pendant plusieurs années; elles comprennent en outre certains HAPs qui peuvent s'avérer toxiques mais présentent un niveau faible de solubilité dans l'eau et donc un niveau très réduit de disponibilité biologique. Certains des hydrocarbures les plus lourds, comme les asphaltènes sont si résistants à la biodégradation qu'une plaque bitumeuse, bien qu'inerte, est susceptible de persister pendant des centaines d'années (Haritash *et* Kaushik, 2009).

Les bactéries sont les principaux dégradeurs d'hydrocarbures dans le milieu marin (Leahy *et* Colwell, 1990). Seules les archées halophiles des genres *Haloferax*, *Halobacterium* *Halococcus* *et* *Haloarcula*, ont été identifiées comme capables de dégrader des hydrocarbures (Al-Mailem *et al.*, 2010, Tapilatu *et al.*, 2010). Chez les eucaryotes, plus de 140 genres de champignons, lignolytiques et non lignolytiques, sont capables de dégrader les hydrocarbures, mais pas comme source unique de carbone (Cerniglia *et* Sutherland, 2010). Certaines levures ainsi que des champignons filamenteux ont un rôle dans la dégradation des hydrocarbures en milieu côtier (Jeanbille *et al.*, 2016).

Pour les bactéries, on compte en tout plus de 175 genres qui comportent des isolats capables de dégrader les hydrocarbures (Prince *et al.*, 2010). Ces genres sont répartis dans les phyla des *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *et* *Proteobacteria*. La majorité des bactéries qui dégradent les hydrocarbures décrite actuellement appartiennent aux Proteobactéries. Ils appartiennent pour la plupart aux

Gammaprotéobactéries (*Marinobacter*, *Alcalinovorax*, *Oleispira*, *Oleiphilus*, *Antarctica*, *Thalassolituus*; *Neptunomonas*, *Cycloclasticus*) (Head *et al.*, 2006).

Le tableau 1, ci-dessous présente quelques exemples des souches bactériennes isolées à partir du milieu marin et ayant des capacités biodégradatives des hydrocarbures. Ces souches ont été identifiées aux différents genres tels que: *Bacillus*, *Marinobacter*, *Cycloclasticus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Oleispira*, *Alcanivorax*.

**Tableau 1.** Exemples des souches bactériennes marines capables de dégrader des hydrocarbures.

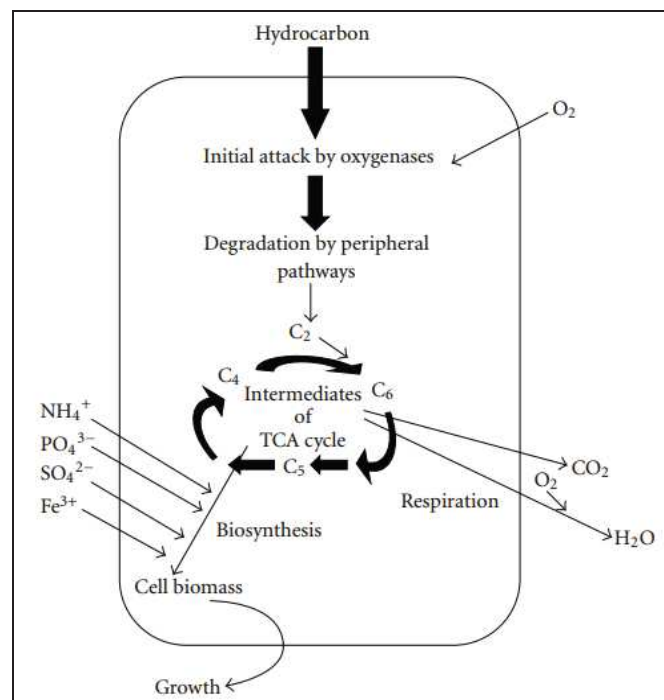
Espèces bactériennes	Souches	Hydrocarbures	Références
<i>Alcanivorax borkumensis</i>	SK2	Alcanes	Schneiker <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus subtilis</i>	LB1	B; T; E, X;	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Bacillus mojavensis</i>	JB5	B; T	Wang Lin <i>et al.</i> , 2008
<i>Cycloclasticus spirillensus</i>	P1	NAP; FL; PHE; ANT; FLU; PYR; PB	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Marinobacter</i> sp.	NCE312	NAP, 1-MN, 2-MN	Hedlund <i>et al.</i> , 2001
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	SdK644	NAP; ANT; PYR; C16; PB	Zenati <i>et al.</i> , 2018
<i>Marinobacter hydrocarbonoclasticus</i>	SP17	C14; C16; C19; C20; C21; PHE	Gauthier <i>et al.</i> , 1992
<i>Oleispira antarctica</i>	RB8	C10-C18	Yakimov <i>et al.</i> , 2003
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	LE9	B; T; E, X	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Rhodococcus rhdochrous</i>	LE2	B; T; E, X	Wang <i>et al.</i> , 2008

**B:** Benzène; **T:** Toluène; **E:** Ethylbenzène; **X:** Xylènes;

**NAP:** Naphtalène; **FL:** Fluorène; **PHE:** Phénanthrène, **ANT:** Anthracène; **FLU:** Fluoranthène, **PYR:** Pyrène; **PB:** Pétrole brut; **1-MN:** 1-méthyl-naphthalène; **2-MN:** 2-méthyl-naphthalène;

**C10:** Décane; **C14:** Tétradécane; **C16:** Hexadécane; **C18:** Octadécane; **C19:** Pristane; **C20:** Eicosane; **C21:** Heneicosane.

La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes est considérée comme le processus principal d'élimination de ces contaminants (Haritash *et* Kaushik, 2009). Un schéma général de la biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes en condition aérobie, a été proposé par Das *et* Chandran, 2011 (Fig. 6). L'attaque initiale est effectuée par l'incorporation d'oxygène, clé de la réaction enzymatique catalysée par des oxygénases et des peroxydases. Par la suite, les voies périphériques de biodégradation convertissent les hydrocarbures étape par étape en intermédiaires du catabolisme, à l'aide par exemple du cycle des acides tricarboxyliques (TCA ou cycle de Krebs). Les métabolites comme l'acétyl-CoA, le pyruvate ou le succinate sont utilisés comme des précurseurs pour la biosynthèse de molécules pour la biomasse de la cellule. Les sucres nécessaires à de nombreuses biosynthèses et à la croissance sont produits par la glycogénèse (Das *et* Chandran, 2011).



**Figure 6.** Mécanisme général de biodégradation aérobie des hydrocarbures par les microorganismes (Das *et* Chandran, 2011).

#### IV. Biodégradation des HAPs

Un grand nombre des bactéries, champignons et algues ont la capacité de dégrader les hydrocarbures et ces biodégradations peuvent être faites soit par des souches pures, soit par des consortia de microorganismes. Les champignons hydroxylent les HAPs en vue de leur détoxification, tandis que les bactéries oxydent les HAPs pour assimiler leur carbone (Cerniglia, 1993). Les différentes voies de dégradation microbienne des HAPs sont présentées sur la figure 7.

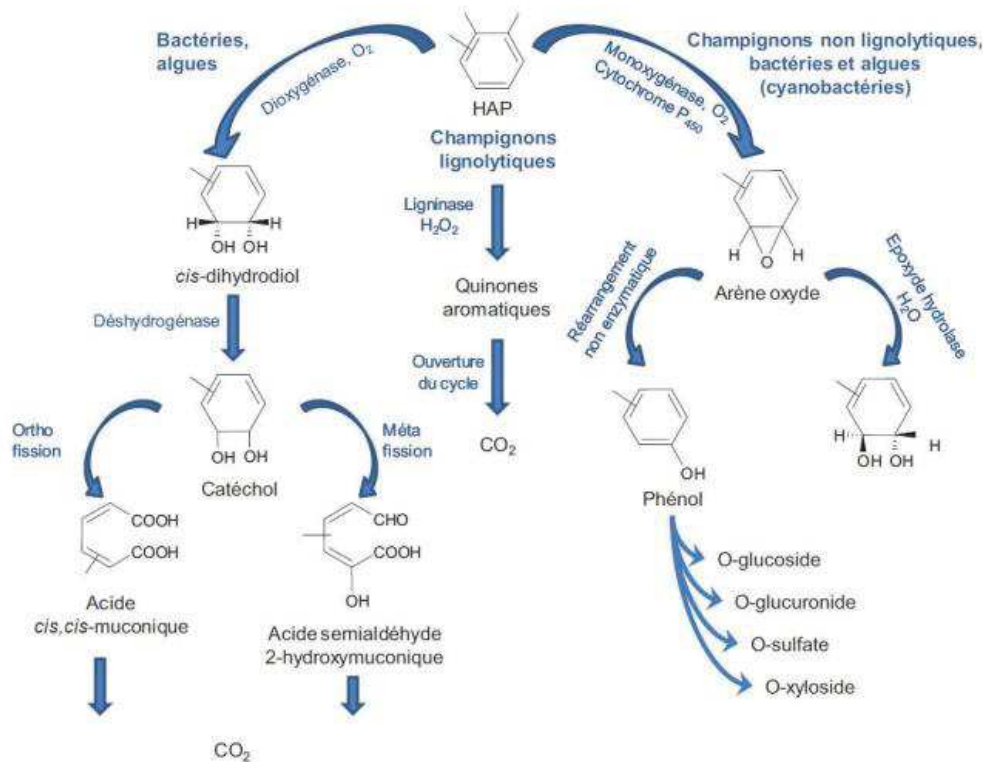


Figure 7. Les différentes voies de dégradation microbienne des HAPs (Cerniglia, 1993).

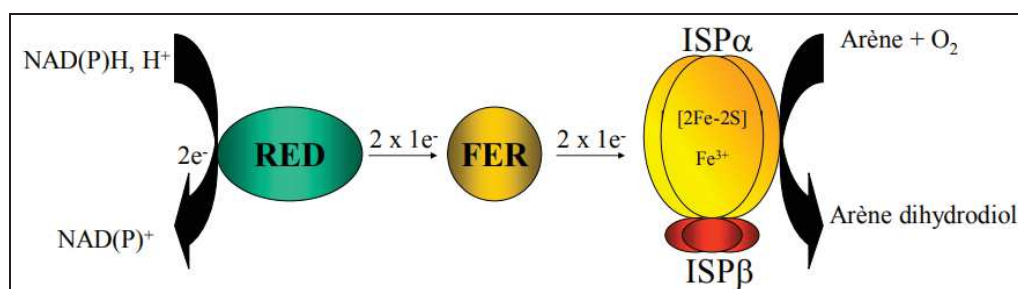
#### IV.1. Biodégradation des HAPs par les bactéries

La dégradation bactérienne aérobie des HAPs est initiée généralement par l'action d'une dioxygénase (incorporation de deux atomes d'oxygène) qui attaque un des noyaux aromatiques conduisant à la formation d'un *cis*-dihydrodiol (Fig. 7). Ce dernier est ensuite déshydraté en catéchol, un intermédiaire central de la biodégradation aérobie des composés aromatiques, qui va subir le clivage du noyau aromatique. Cette ouverture se passe entre les deux groupements hydroxyles (*ortho*-fission) ou entre un carbone hydroxylé et un carbone non substitué (*mé*ta-fission) et va aboutir à la formation de composés simples (succinate, pyruvate) pouvant entrer dans le métabolisme central des bactéries. Cette biodégradation directe a lieu pour les HAPs de faible poids moléculaire. Cependant, peu de bactéries peuvent utiliser les HAPs de masse moléculaire élevée comme unique source de carbone et d'énergie. Ainsi, la biodégradation des HAPs de haute masse moléculaire se fait généralement par co-métabolisme (Fang *et al.*, 2013). Dans ce cas, les bactéries utilisent un substrat structurellement proche aux HAPs de haut poids moléculaire (par exemple, un HAP ayant une faible masse moléculaire) pour leur croissance. Parallèlement, les enzymes non spécifiques produites sont donc impliquées dans la dégradation des HAPs à haute masse moléculaire (Johnsen *et al.*, 2005). Dans le cas des cultures mixtes, des intermédiaires métaboliques

peuvent être dégradés par d'autres souches présentes. A noter que quelques bactéries, comme *Mycobacterium* sp. peuvent aussi dégrader les HAPs par l'intermédiaire de monooxygénases à cytochrome P450 en formant des trans-dihydrodiols de manière similaire aux champignons non lignolytiques (Fig. 7) (Rehmann *et al.*, 1998).

Les gènes codant pour les enzymes impliquées dans les différentes étapes métaboliques de la dégradation bactérienne aérobie des HAPs, ont été décrits pour une large gamme de bactéries à Gram négatif et positif (Cébron *et al.*, 2008). L'étape initiale du métabolisme des HAPs se produit généralement par l'incorporation d'oxygène moléculaire dans le noyau aromatique par un système enzymatique multicomposant « les arène-dioxygénases » (ring-hydroxylating dioxygenases ou RHD), générant des *cis*-dihydrodiols (Cébron *et al.*, 2008).

Ce complexe enzymatique est composé d'une ferrédoxine réductase, d'une ferrédoxine et de la dioxygénase proprement dite. La composante dioxygénase (appelée aussi ISP pour iron sulfur protein) est souvent un hétérohexamère constitué de trois sous-unités  $\alpha$  et de trois sous-unités  $\beta$ . Chaque sous-unité  $\alpha$  comporte un centre [2Fe-2S] de type Rieske, ainsi qu'un atome de fer mononucléaire au site catalytique. Peu d'informations sont disponibles sur le rôle de la sous-unité  $\beta$ . L'hydroxylation du substrat est rendue possible grâce à l'activation de l'oxygène par une réduction à deux électrons: le NADH (ou parfois le NADPH) cède deux électrons à la réductase (RED) qui les transmet un par un à la ferrédoxine (FER). Cette dernière les transporte alors à la dioxygénase (ISP $\alpha\beta$ ) qui catalyse ainsi la réaction de dihydroxylation (Haddock *et Gibson*, 1995) (Fig. 8).



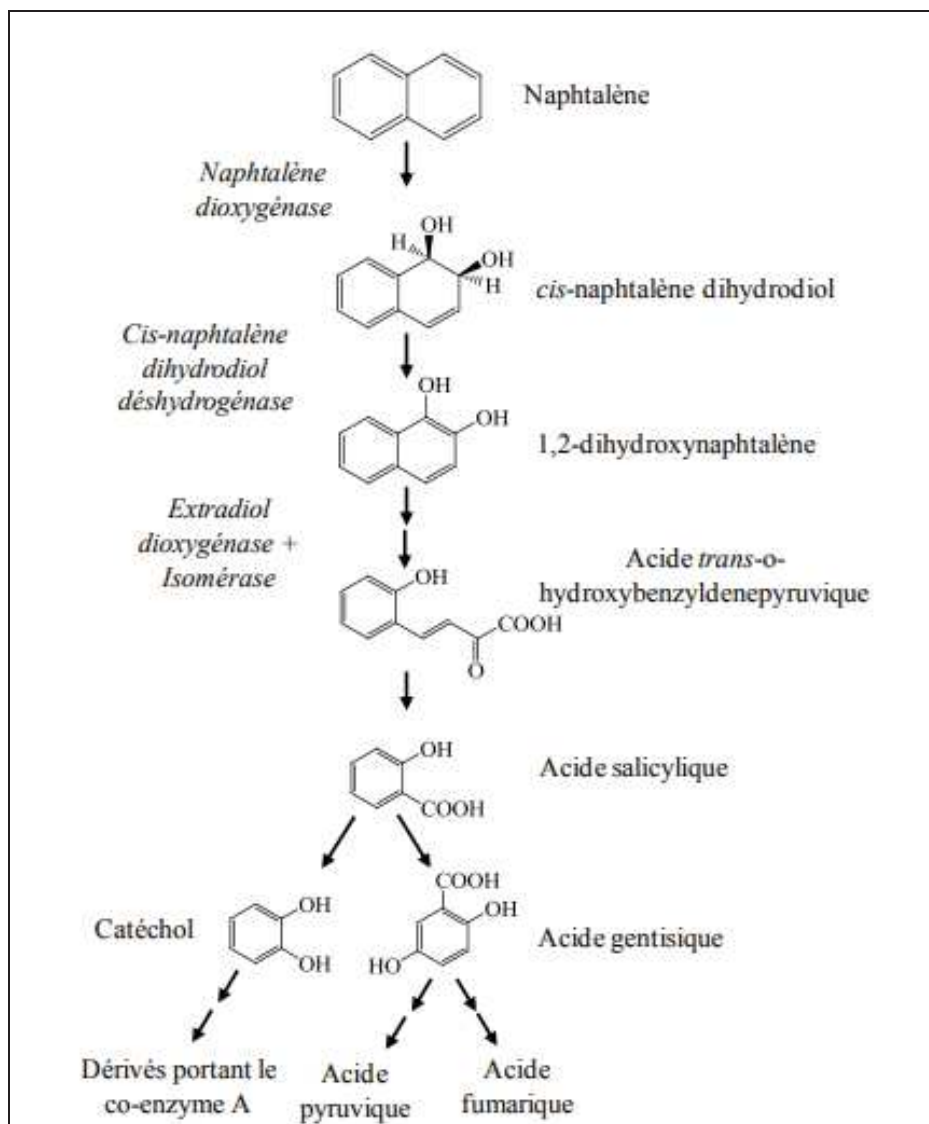
**Figure 8.** Schéma de fonctionnement des arène-dioxygénases. RED: Réductase; FER: ferrédoxine ; ISP $\alpha\beta$ : dioxygénase.

Quelques exemples des voies de biodégradation des HAPs ayant deux, trois et quatre noyaux aromatiques, sont décrits ci-dessous:

#### IV.1.1. Biodégradation des HAPs à deux noyaux aromatiques: Exemple du naphtalène

Le naphtalène est l'un des HAPs les plus simples et les plus facilement biodégradables. La voie de dégradation du naphtalène a été étudiée en détail et sert de modèle pour expliquer

la dégradation des autres HAPs par les bactéries (Fig. 9). La «voie périphérique» est initiée par l'incorporation de deux atomes d'oxygène sur deux carbones adjacents du substrat, *via* l'action d'une naphthalénoxygénase, conduisant à la formation d'un *cis*-dihydrodiol. Ce dernier est par la suite ré-aromatisé par l'intermédiaire d'une dihydrodiol déshydrogénase pour former un intermédiaire dihydroxylé, puis le noyau aromatique est clivé par une extradioldioxygénase. Après réarrangement, catalysé par une isomérase, une aldolase aboutit à la production de pyruvate et d'acide salicylique. Selon le type de bactérie, l'acide salicylique est ensuite oxydé en catéchol ou en acide gentisique. C'est là que commence la «voie centrale» qui convertit en plusieurs étapes l'intermédiaire catécholique en acétyl coenzyme A et en acide pyruvique ou fumarique, des intermédiaires du cycle de Krebs (Seo *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2008).

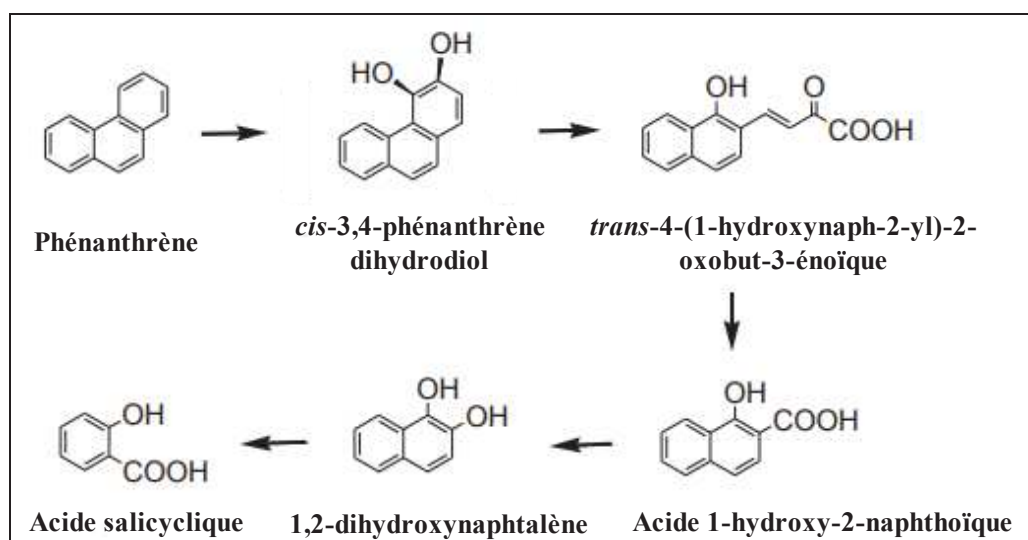


**Figure 9.** Voie métabolique de dégradation du naphthalène par les bactéries (Seo *et al.*, 2009).



#### IV.1.2. Biodégradation des HAPs à trois noyaux aromatiques: Exemple du phénanthrène

Pour une grande majorité de bactéries, la dégradation du phénanthrène nécessite les mêmes étapes biochimiques que la dégradation du naphthalène. La dégradation commence par une attaque d'une dioxygénase, majoritairement effectuée en position 3,4, aboutissant à la formation du *cis*-3,4-phénanthrène dihydrodiol (Fig. 10). Celui-ci est ensuite converti en 3,4-dihydroxyphénanthrène grâce à l'action d'une déshydrogénase. Ce composé va être clivé en position *meta* pour former un acide *trans*-4-(1-hydroxynaph-2-yl)-2-oxobut-3-énoïque par l'intermédiaire d'une dioxygénase et d'une isomérase. Une hydratase-aldolase et un aldéhyde déshydrogénase, sont impliqués par la suite pour former l'acide 1-hydroxy-2-naphthoïque. Grâce à l'action d'une hydroxylase, ce dernier composé est converti en 1,2-dihydroxynaphthalène qui sera dégradé selon la voie décrite précédemment pour le naphthalène (Seo *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2014).



**Figure 10.** Principales étapes de la voie de dégradation du phénanthrène par *Pseudomonas* sp. BZ-3 (Lin *et al.*, 2014).

#### IV.1.3. Biodégradation des HAPs à quatre noyaux aromatiques: Exemple du pyrène

D'après Vila *et al.* (2001), la voie de dégradation du pyrène chez la souche *Mycobacterium* sp. commence par une attaque du pyrène soit par une dioxygénase en positions C-4 et C-5 en *cis*-4,5-dihydroxy-4,5-dihydropyrène ou par une monooxygénase aux mêmes positions pour donner des *trans*-4,5-dihydroxy-4,5-dihydropyrène (Fig. 11). La déshydrogénation générant le dihydropyrène, est suivie d'un clivage *ortho* du cycle oxydé, donnant l'acide phénanthrène 4,5-dicarboxylique. Ce dernier est décarboxylé donnant l'acide 4-phénanthrène carboxylique, qui pourrait être dégradé en acide phtalique.

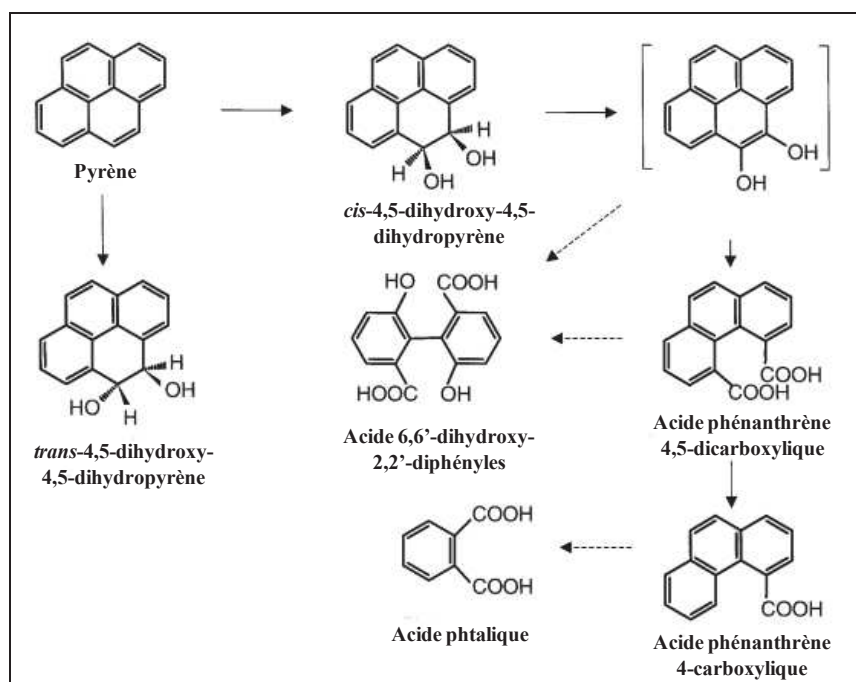


Figure 11. Métabolisme du pyrène par *Mycobacterium* sp. (Vila *et al.*, 2001).

## IV.2. Biodégradation des HAPs par les champignons

Les champignons possèdent, généralement, des vitesses de croissance et de dégradation moins rapides que celles des bactéries. Les voies de dégradation des HAPs chez les champignons non lignolytiques (généralement majoritaires) et les champignons lignolytiques (connus sous le terme de pourriture blanche) sont différentes. Au moins deux mécanismes sont appliqués dans la biodégradation des HAPs par les champignons: l'un fait intervenir le système enzymatique du cytochrome P450 et l'autre utilise les enzymes solubles extracellulaires du catabolisme de la lignine (les laccases et les peroxydases) (Tortella *et al.*, 2005).

Chez les champignons non-lignolytiques, la première étape de biodégradation consiste en une oxydation du HAP par le système enzymatique du cytochrome P450 (incorporation d'un seul atome d'oxygène par la monooxygénase), conduisant à la formation d'un oxyde d'arène. Celui-ci subit ensuite une réaction d'hydratation catalysée par des époxydes hydrolases, pour former des trans-dihydrodiols. L'oxyde d'arène peut également être transformé en dérivé phénolique par un réarrangement non enzymatique. Ce dérivé phénolique peut ensuite servir de substrat pour des réactions de sulfatation, de méthylation ou de conjugaison avec un glucose, un xylose ou un acide glucuronique (Cerniglia, 1993).

Les champignons lignolytiques sont capables de sécréter par voie extracellulaire des enzymes impliquées dans la dégradation de la lignine et de la cellulose: les laccases et les peroxydases. Ces enzymes sont responsables de la capacité des champignons à dégrader des

composés toxiques complexes ayant des poids moléculaires élevés, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, avec la formation de quinones et d'acides aromatiques (Colombo *et al.*, 1996).

### IV.3. Biodégradation des HAPs par les algues

Les algues photo-autotrophes oxydent les HAPs pour former des intermédiaires hydroxylés (Labana *et al.*, 2007). Il existe très peu d'information sur la biodégradation des HAPs par les algues et sur les enzymes impliquées. La capacité de quatre espèces de microalgues *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus platydiscus* et *Chlorella vulgaris* à dégrader le fluoranthène (1 mg/l), le pyrène (1 mg/l) et leur mélange (chacun à 0,5 mg/l), a été montrée (Lei *et al.*, 2007). Cependant, ni l'identification de métabolites, ni la mesure des activités enzymatiques, n'a été effectuée dans cette étude. La biotransformation du benzo(a)pyrène par les algues Chara (*Chara aspera*), les algues vertes (*Cladophora glomerata* et *Enteromorpha intestinalis*), brunes (*Chorda filum* et *Fucus vesiculosus*) et rouges (*Furcellaria lumbricalis*), a été également étudiée (Kirso *et Irha*, 1998). Il a été montré que leurs systèmes enzymatiques les plus importants impliqués dans la détoxification du benzo(a)pyrène étaient l'*o*-diphénoloxidase, le cytochrome P450 et une peroxydase (Kirso *et Irha*, 1998). Par ailleurs, il a été montré que *Selenastrum capricornutum* métabolise le benzo(a)pyrène en *cis*-dihydrodiol par l'intermédiaire de système enzymatique dioxygénase (Warshawsky *et al.*, 1995).

## V. Impacts des déversements d'hydrocarbures sur la vie marine

En milieu marin tous les niveaux trophiques sont vulnérables à la contamination par les hydrocarbures commençant des planctons aux mammifères marins. Les organismes planctoniques sont relativement sensibles aux effets toxiques d'une exposition aux hydrocarbures, en particulier aux fractions solubles dans l'eau et aux petites gouttelettes d'hydrocarbures. En effet, des études de laboratoire ont décrit un large éventail d'effets aiguës, chroniques et sublétaux sur diverses espèces et à divers stades de vie. Cependant, la plupart des études sur les communautés planctoniques naturelles en mer ont permis de mettre en évidence un retour rapide à des densités et des compositions de communauté normales, une fois que les concentrations en hydrocarbures dans l'eau sont revenues à un niveau normal (ITOPF, 2011). Les mollusques et les crustacés de mer (moule, crabe, crevette, huître) sont les plus susceptibles d'accumuler les hydrocarbures à cause de leur mode de vie. Les crustacés qui se nourrissent de détritus ou de particules en suspension seront affectés par

perturbation de leur taux de reproduction (réduction du taux d'éclosion) ou leurs habitudes alimentaires. Par contre, les huîtres accumulent moins d'hydrocarbures que les moules, car elles sont capables de se fermer pendant des périodes assez longues une fois soumises à l'agression d'un agent chimique toxique. Les moules, par contre, ne peuvent pas empêcher les polluants de pénétrer (Chalghmi, 2015).

Les hydrocarbures peuvent affecter également les oiseaux *via* trois voies de contamination: Par le contact direct avec les plumes, qui peut conduire à l'hypothermie et réduire leur capacité à se déplacer ou s'alimenter; par l'ingestion d'hydrocarbures lors du lissage ou de la consommation d'aliments contaminés; ou par le transfert de la contamination aux œufs ou aux jeunes pouvant réduire le taux de survie (Anderson *et al.*, 2006).

## **VI. Gestion de lutte contre les déversements des hydrocarbures**

Les marées noires dues aux déversements massifs de pétrole lors de naufrage de pétroliers géants, provoquent dans le milieu marin des dommages très importants qui affectent aussi bien les écosystèmes que les activités économiques telles que la pêche, l'aquaculture et le tourisme (Wiese *et al.*, 2003). Cependant, d'autres déversements d'hydrocarbures, moins médiatisés, causent autant de problèmes écologiques sur le long terme. Citons les déversements de plates-formes de forage en mer, et la pollution chronique par les hydrocarbures. Les déversements chroniques illégaux représentent 60 à 70% des hydrocarbures que l'on retrouve en mer contre 30 à 40% pour les marées noires relatives aux catastrophes (Patton *et al.*, 1980). Ces déversements chroniques peuvent être dus au traitement du pétrole par raffinage, aux écoulements urbains lors de ruissellement, aux rejets des navires, et aux rejets opérationnels des activités pétrolières extracôtières (O'Hara *et al.*, 2010).

Afin de réduire les impacts de déversement des hydrocarbures, plusieurs opérations de lutte ont été prises en considération. Ces opérations sont fortement conditionnées par les conditions météorologiques, la nature du pétrole incriminé (léger ou lourd) et la proximité de sites sensibles à protéger (productions aquacoles, sites touristiques...).

Dans certaines circonstances, il est possible de confiner les déversements en mer à l'aide de barrières flottantes et de récupérer une partie des hydrocarbures échappés à l'aide d'écumeurs (ANPE, 2012). En outre, en zone côtière et/ou portuaire, il est possible de recourir aux barrages absorbants et aux matériaux naturels ou synthétiques conditionnés en boudins. Leur pouvoir d'absorption peut atteindre trois à six fois leur propre poids. Cependant, ils sont d'une faible résistance mécanique et ne conviennent que pour les zones peu agitées

sans courant. Dans le cas du pétrole lourd, il faut avoir recours à des chalutages pour récupérer les hydrocarbures (ANPE, 2012).

Les techniques de lutte offshore, pouvant avoir des impacts potentiels sur l'environnement marin, incluent l'usage de dispersants et le brûlage contrôlé *in situ*. Cette dernière technique a été utilisée sur des nappes offshore où il était possible de maintenir une épaisseur de nappe suffisante pour entretenir la combustion. Cette méthode génère d'importantes quantités de fumées, avec un impact potentiel sur la qualité de l'air. Les fumées se dissipent rapidement et ne semblent pas avoir d'impacts significatifs lorsque le brûlage est correctement mis en œuvre. Les résidus de combustion peuvent flotter ou couler en fonction des caractéristiques de l'hydrocarbure. Les études ont montré que les résidus brûlés sont moins toxiques que les hydrocarbures vieillissants pour l'environnement aquatique (IPIECA-IOGP, 2015). En outre, bien que les dispersants chimiques favorisent la transformation de la nappe de pétrole en micro-gouttelettes plus faciles à dégrader par les microorganismes, leur toxicité est avérée et ils risquent de contaminer la colonne d'eau, les sédiments et leurs organismes (Talluto, 2013). En 1967, le naufrage du Torrey Canyon au large du Cornwall a généré un déversement de 100 000 tonnes d'hydrocarbures. Des dispersants chimiques ont été utilisés afin de favoriser la dispersion de gouttelettes dans l'eau et de réduire éventuellement l'émulsification qui se serait formée. Il a été démontré que les dégâts provoqués sur les côtes n'étaient pas dus aux hydrocarbures qui s'y étaient déposés mais plutôt aux 14 000 tonnes de dispersants utilisés pour neutraliser les hydrocarbures (Talluto, 2013). Les dispersants ne sont généralement pas autorisés en zone côtière à cause des faibles profondeurs et de la sensibilité des espèces benthiques (18 composés sont autorisés par l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (EPA)) (Couillard *et al.*, 2005).

## VII. Mode d'accès aux hydrocarbures

Certains microorganismes utilisent les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie pour leur croissance. Les hydrocarbures sont des composés hydrophobes dont la solubilité diminue d'autant que la masse moléculaire est importante. De ce fait, ils ont développé des stratégies pour utiliser ce type de substrat. Quatre modes d'accès, expliquant l'assimilation des hydrocarbures par les microorganismes, ont été proposés (Bouchez-Naitali *et al.*, 1999) (Fig. 12).

### VII.1.1. Utilisation de la phase dissoute

L'assimilation en phase aqueuse est surtout rapportée pour des alcanes légers et certains hydrocarbures aromatiques suffisamment solubles. C'est sous forme solubilisée que le substrat pénètre dans la cellule (Bouchez *et al.*, 1995).

### VII.1.2. L'accession interfaciale

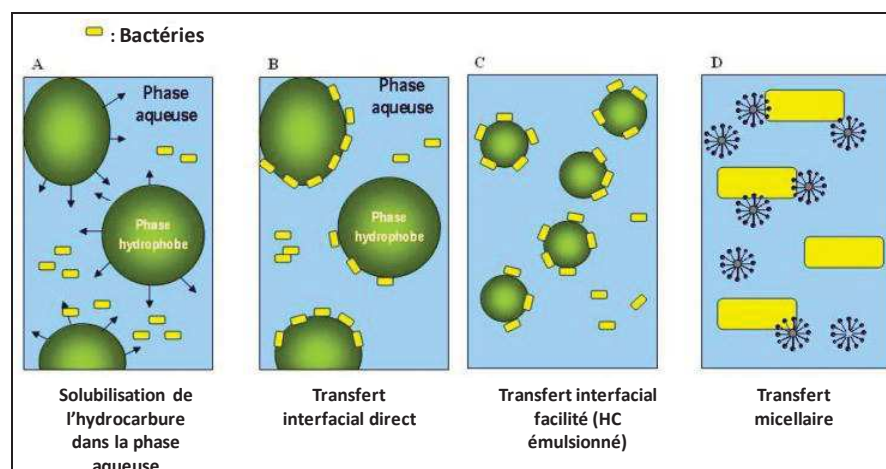
Les microorganismes utilisant les alcanes peu solubles possèdent fréquemment une membrane externe hydrophobe (Rosenberg *et al.*, 1989). L'hydrophobicité élevée de la membrane cellulaire externe permet l'adhésion du microorganisme aux gouttelettes du substrat présentes dans le milieu aqueux. Le substrat pénètre directement dans la cellule par diffusion ou transport actif sans se dissoudre dans la phase aqueuse (Ducker, 1996).

### VII.1.3. L'accession interfaciale facilitée ou émulsification

Des biosurfactants produits par des microorganismes accélèrent le transfert de l'hydrocarbure dans la cellule après contact direct substrat-cellule. Ce transfert facilité est dû à une augmentation de l'aire interfaciale entre la phase hydrophobe et la phase hydrophile (Perfumo *et al.*, 2010).

### VII.1.4. Le transfert micellaire

Il existe une formation d'une microémulsion suite à une pseudosolubilisation de l'hydrocarbure par des biosurfactants produits par le microorganisme. La micelle entre en contact avec la cellule. La surface externe de la micelle est majoritairement hydrophile et le transfert micellaire est privilégié chez les microorganismes dont l'hydrophobicité de l'enveloppe cellulaire est faible (Bouchez-Naitali *et al.*, 1999).



**Figure 12.** Les mécanismes d'accession des microorganismes aux hydrocarbures (Vandecasteele, 2005).

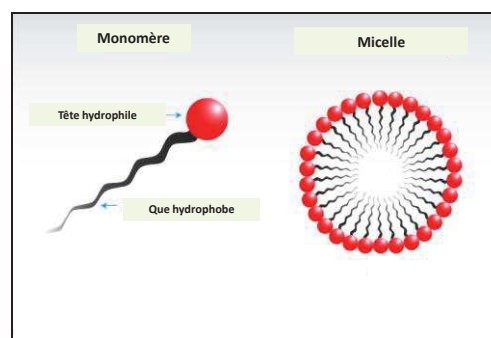
---

# BIOSURFACTANTS

---

## I. Surfactants

Un agent de surface ou tensioactif ou surfactant est une substance capable de modifier la tension superficielle entre deux surfaces. Les composés tensioactifs sont des molécules amphiphiles composées de deux domaines de polarités différentes: l'un hydrophile et polaire (affinité pour l'eau) et un autre hydrophobe et apolaire (affinité pour les lipides) (Morelli *et Szajer*, 2000) (Fig. 13). Ces composés ont la propriété de se concentrer et de s'agréger aux interfaces afin d'abaisser les tensions de surface (interfaces liquide/gas) et les tensions interfaciales (liquide/solide ou liquide/liquide), tout en réduisant les forces répulsives entre deux phases différentes qui à leur tour se mélangent et s'interagissent plus facilement (Desai *et Banat*, 1997). En effet, aux interfaces eau-matière grasse, par exemple, les surfactants concentrent leur partie lipophile, comprenant généralement des acides gras saturés, insaturés ou hydrocarbonés dans le corps gras. Leur partie hydrophile, constituée par un acide aminé ou un peptide, des anions ou des cations, des mono-di-ou polysaccharides, s'immergent dans l'eau. Ces agrégats de molécules tensioactives ainsi formés s'appellent des micelles (Desai *et Banat*, 1997).

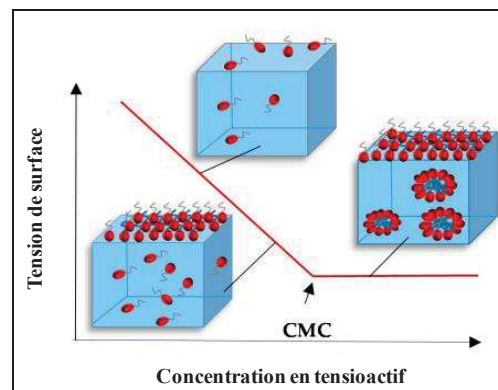


**Figure 13.** Surfactant avec des groupements apolaire (hydrophobe) et polaire (hydrophile).

Les tensioactifs sont classés selon la nature de leur tête polaire en quatre grandes familles (Shekhar *et al.*, 2014): les tensioactifs cationiques chargés positivement, les anioniques dont la tête polaire est chargée négativement, les amphotères possédant à la fois une charge négative et une charge positive et les non-ioniques.



Les surfactants sont parfois dénommés selon la fonction qu'ils remplissent: détergents, agents dispersants, agents de solubilisation, agents mouillants, agents émulsifiants et agents moussants (Santos *et al.*, 2016). Les caractéristiques physico-chimiques qui définissent un agent tensioactif sont sa capacité à augmenter la solubilité des composés hydrophobes dans l'eau pour former des émulsions d'hydrocarbures avec l'eau, et réduire la tension de surface (Dessai *et Banat*, 1997). Plus la concentration de surfactant en solution est élevée, plus la tension de surface est réduite. Toutefois, à une certaine concentration de surfactants, la tension de surface atteint une valeur minimale constante, connue comme la concentration micellaire critique (CMC), qui est la concentration en tensioactif dans un milieu au-dessus de laquelle des micelles se forment spontanément (Fig. 14) (Santos *et al.*, 2016).



**Figure 14.** Tension superficielle en fonction de la concentration en agent tensioactif chimique ou naturel, et détermination de la CMC (concentration micellaire critique) (Santos *et al.*, 2016).

La production mondiale actuelle de surfactants chimiques se chiffre à plus de 18 millions de tonnes par année (Marketsandarkets, 2016). Les tensioactifs synthétiques sont des produits dérivés du pétrole et présentent 95% du marché international des surfactants en 2012 (Marketsandarkets, 2016). Ils présentent un risque pour l'environnement car ils sont toxiques et non biodégradables (Santos *et al.*, 2016). C'est pour cette raison, et depuis plusieurs années, que les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des organismes vivants: les tensioactifs biologiques ou biosurfactants. Les biotensioactifs possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non ou faiblement toxiques (Sriram *et al.*, 2011).

## II. Biosurfactants

Les biosurfactants sont un groupe hétérogène de molécules tensioactives et amphiphiles produits généralement par des organismes vivants à savoir les bactéries, les champignons et les levures (Marchant *et Banat*, 2012). La plupart des biosurfactants sont des

agents extracellulaires. Ils sont excrétés par les microorganismes en croissance dans le milieu de culture à la suite de leur biosynthèse (Salihu *et al.*, 2009). Par ailleurs, on peut trouver des biosurfactants intracellulaires (Padmapriya *et al.*, 2013). Dans d'autres cas, les biosurfactants peuvent rester adhérents à la membrane cellulaire suite à leur synthèse et la cellule, elle-même, peut jouer le rôle de biosurfactant (Maneerat *et Phetrong*, 2007; Muthusamy *et al.*, 2008).

## II.1. Propriétés

En comparaison avec leurs équivalents chimiques de synthèse, les biosurfactants présentent de nombreux avantages. Ils sont respectueux de l'environnement, moins toxiques et biodégradables. Ils sont doués des activités anti-microbienne, anti-virale, anti-tumorale, anti-adhésive, anti-biofilm, etc... Certains peuvent être actifs à des pH, des températures et des salinités extrêmes (Santos *et al.*, 2016).

Les principales caractéristiques des surfactants dérivés des microorganismes sont discutées ci-dessous:

- **Activité de surface et d'interface:** Le tensioactif aide à réduire la tension superficielle et la tension interfaciale. Des biosurfactants sont plus efficaces que les tensioactifs chimiques en raison de leur faible CMC (Desai *et Banat*, 1997);
- **Tolérance à la température, au pH et à la salinité:** La plupart des biotensioactifs sont résistants aux facteurs environnementaux extrêmes tels que la température, la salinité et le pH (Banat *et al.*, 2000);
- **Biodégradabilité:** Ils sont facilement dégradés par les bactéries et autres organismes microscopiques; par conséquent, ils ne posent pas beaucoup de menace pour l'environnement (Mohan *et al.*, 2006);
- **Faible toxicité:** Bien que peu de recherches soient disponibles dans le sujet de la toxicité des biosurfactants, ces biomolécules sont généralement considérées comme des produits non ou faiblement toxiques et sont appropriées pour les utilisations pharmaceutiques, cosmétiques et alimentaires (Vijayakumar *et Saravanan*, 2015);
- **Disponibilité des matières premières:** Les biosurfactants peuvent être produits à partir de déchets renouvelables et des sous-produits utilisés comme sources de carbone. Cette caractéristique rend la production de biosurfactants économique et permet l'utilisation des déchets en les valorisant et en réduisant leur effet polluant en même temps permettant une diminution significative du coût de la production (Banat *et al.*, 2000);

- **Autres avantages:** Les biosurfactants sont caractérisés par leur biocompatibilité et leur digestibilité, ce qui garantit leur application dans des produits alimentaires et des produits cosmétiques (Santos *et al.*, 2016).

## II.2. Classification

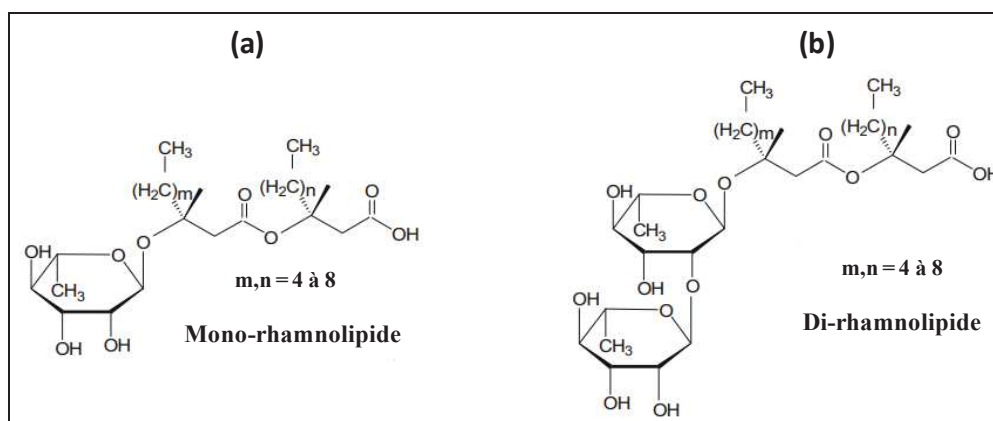
On distingue sept classes de biosurfactants selon la structure chimique: les glycolipides, les lipopeptides, les acides gras, les phospholipides, les lipides neutres, les tensioactifs polymériques et les surfactants particuliers (Santos *et al.*, 2016).

### II.2.1. Les glycolipides

Ils sont constitués d'hydrates de carbone en combinaison avec une longue chaîne d'acides aliphatiques ou d'acides hydroxyaliphatiques. Les rhamnolipides, les tréhalolipides et les sophorolipides sont les glycolipides les plus étudiés (Rosenberg *et Ron*, 1999).

#### II.2.1.1. Les rhamnolipides

Les rhamnolipides sont des molécules amphiphiles qui possèdent d'excellentes propriétés tensioactives et qui ont été exhaustivement étudiés depuis leur découverte par Jarvis *et Johson*, 1949. Ils sont produits principalement par l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010). Leur composition est dominée par la présence d'une combinaison di-rhamnolipide de L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl-hydroxydécanoyle-hydroxydécanoate (Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>) et L-rhamnopyranosyl-L-rhamnopyranosyl-hydroxydécanoate (Rha-Rha-C<sub>10</sub>), ainsi que leur congénères mono-rhamnolipide (Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>) (Fig. 15). Des techniques analytiques ont conduit à la découverte d'autre congénères et homologues de nature rhamnolipidique (environ 60) moins abondants, produits à différentes concentrations par cette espèce de *P. aeruginosa* (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2010).



**Figure 15.** Structures chimiques du mono-rhamnolipide (Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>) (a) et du di-rhamnolipide (Rha-Rha-C<sub>10</sub>-C<sub>10</sub>) (b). Les valeurs de m et n peuvent être identiques ou différentes.

Les rhamnolipides sont principalement produits par *Pseudomonas aeruginosa*. Toutefois, d'autres microorganismes tels que *P. chlororaphis*, *P. plantarii*, *P. putida*, *P. fluorescens* et *Burkholderia thailandensis* ont été également décrits pour leur capacité à produire ces biomolécules. Le tableau 2 ci-dessous, présente les principales souches isolées capable de synthétiser des rhamnolipides, en indiquant la source de carbone utilisée (Chong et Li, 2017).

**Tableau 2.** Exemples des souches bactériennes produisant des rhamnolipides, en utilisant différentes sources de carbone (Chong et Li, 2017).

Microorganisme	Source de carbone	Références
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Huile de tournesol (2,5%, m/v)	Muller et al., 2011.
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> NRRL B-30761	Glucose (2%, m/v)	Gunther et al., 2005
<i>Pseudomonas fluorescens</i> HW-6	Hexadécane (1,5%, m/v)	Vasileva-Tonkova et al., 2006
<i>Pseudomonas indica</i> MTCC 3714	Son de riz + son de riz déshuilé + glucose (4%, m/v)	Abouseoud et al., 2008
<i>Pseudomonas luteola</i> B17	Mélasses (5%, m/v)	Onbaslil et al., 2009
<i>Pseudomonas putida</i> B12	Mélasses (5%, m/v)	Onbaslil et al., 2009
<i>Pseudomonas nitroreducens</i>	Glucose (4%, m/v)	Onwosi et al., 2012
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Mannitol (1%, m/v) + charbon (1%, m/v) charbon	Singh et al., 2013
<i>Burkholderia glumae</i>	Huile de canola (2%, m/v)	Costa et al., 2011
<i>Burkholderia kururiensis</i> KP23 <sup>T</sup>	Glycérol (3%, m/v)	Tavares et al., 2013
<i>Burkholderia plantarii</i> DSM 9509 <sup>T</sup>	Glucose (1%, v/v)	Hörmann et al., 2010
<i>Burkholderia pseudomallei</i> NCTC 10274	Glycérol (4%, v/v)	Haussler et al, 1998
<i>Acinetobacter</i> sp. YC-X 2	<i>n</i> -hexadécane (0,186%, m/v)	Chen et al., 2012
<i>Enterobacter asburiae</i> NRRL B-59189	Citrate de sodium (2%, m/v)	Rooney et al., 2009
<i>Nocardioides</i> sp. A-8	<i>n</i> -paraffine (2%, v/v)	Vasileva-Tonkova et al., 2005
<i>Pantoea stewartii</i>	Glycérol (1%, v/v)	Rooney et al., 2009
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. PNK-04	Mannitol (2%, m/v)	Nayak et al., 2009
<i>Renibacterium salmoninarum</i> 27BN	<i>n</i> -hexadécane (2%, m/v)	Christova et al., 2004
<i>Serriatia rubidaea</i> SNAU02	Mannitol (2,931%, m/v)	Nalini et al., 2013
<i>Streptomyces</i> sp. ISP2-49 <sup>E</sup>	Glucose (0,4%, m/v)	Yan et al., 2014
<i>Tetragenococcus koreensis</i> sp. nov.	Glucose (1%, m/v) + acétate de sodium (1%, m/v)	Lee et al., 2005
<i>Thermus aquaticus</i> CCM 3488	Huile de tournesol (0,2%, m/v)	Řezanka et al., 2011
<i>Meiothermus ruber</i> CCM 2842	Huile de tournesol (0,2%, m/v)	Řezanka et al., 2011

### II.2.1.2. Les sophorolipides

Les sophorolipides (SLP) sont des glycolipides produits principalement par certaines levures appartenant au genre *Candida* (Cortés-Sánchez *et al.*, 2013). Parmi les microorganismes (champignons) qui ont été identifiés comme des producteurs des sophorolipides, on peut citer: *Candida bombicola*, *Candida batistae*, *Candida floricola*, *Candida riodecensis*, *Candida rugosa*, *Candida kuoi*, *Candida stellata*, *Candida apicola*, *Rhodotorula bogoriensis*, *Cyberlindnera samutprakarnensis*, *Torulopsis gropengiesseri*, *Torulopsis petrophilum* et *Wickerhamiella domercqiae* (de Oliveira *et al.*, 2015). Parmi ces espèces, *Candida bombicola* se distingue comme la levure productrice de SLP la plus étudiée, avec un rendement et une productivité les plus élevés (de Oliveira *et al.*, 2015). Ses sophorolipides purifiés sont caractérisés par une diminution de la tension de surface de l'eau ultra-pure (73 mN/m) à 33 mN/m et une diminution de la tension interfaciale *n*-hexadécane/eau de 40 à 5 mN/m (Abdel-mawgoud *et al.*, 2008; Díaz De Rienzo *et al.*, 2015). Ces glycolipides sont constitués d'un dimère d'hydrate de carbone sophorose (2-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranose), lié à un acide gras hydroxylé à longue chaîne à travers une liaison glycosidique. Les sophorolipides possèdent des applications médicales vu leurs propriétés anti-microbiennes et anti-cancérogènes remarquables (Callaghan *et al.*, 2016). Ils sont également appliqués dans des autres domaines tels que l'agronomie, la cosmétologie, les industries agroalimentaires et l'environnement (de Oliveira *et al.*, 2015).

### II.2.1.3. Les lipides mannosylerythrioles (LME) et les lipides à tréhalose

Les lipides mannosylerythrioles (LME), qui sont des glycolipides de levures, sont produits par *Pseudozyma antarctica* après croissance sur des huiles végétales, comme l'huile de soja (Lang, 2002). Les lipides à tréhalose sont produits par des espèces de *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Arthrobacter* et *Rhodococcus*. Ces biomolécules purifiées sont caractérisées par une diminution de la tension de surface de l'eau ultrapure à 25 mN/m (Vijayakumar *et Saravanan*, 2015).

## II.2.2. Les lipopeptides

Les lipopeptides sont des molécules amphiphiles composés d'un cycle peptidique attaché à une chaîne d'acide gras. La synthèse des lipopeptides est effectuée par une voie indépendante du ribosome, en utilisant de grands complexes multi-enzymatiques appelés synthétases ou «Non Ribosomal Peptides Synthetase (NRPS)». Ce sont des enzymes remarquables par leur masse élevée ( $5 \cdot 10^6$  Da) et organisées en modules. Elles représentent à

la fois la matrice et jouent un rôle comparable à celui de l'ARNm dans la voie classique, mais aussi dans la machinerie biosynthétique, une fonction réalisée par les ARNt et les ribosomes au sein de la synthèse protéique classique (Ongena *et al.*, 2008).

Les lipopeptides peuvent être linéaires ou bien cycliques, en se basant à la topologie de la chaîne peptidique. Les polymyxines, la daptomycine, la surfactine, l'iturine, la fengycine, la lichenysine, la paenibactérine, et la pseudofactine sont des lipopeptides cycliques (Patel *et al.*, 2015). La tridecaptine A1, la tridecaptine B1, les gageostatines A et C sont tous des exemples des lipopeptides linéaires (Patel *et al.* 2015).

Ces lipopeptides cycliques sont synthétisés par de nombreuses espèces à Gram positif, telles que *Bacillus*, *Lactobacillus* et *Streptomyces*. Certaines espèces à Gram négatif, y compris *Pseudomonas* et *Serratia*, sont également connues par leur production des lipopeptides (Henkel *et al.*, 2017). Le genre *Bacillus* est connu comme le producteur le plus populaire et le plus efficace des lipopeptides, et en particulier: les surfactines, les iturines et les fengycines, différentes en fonction de leur séquence d'acides aminés (de França *et al.*, 2015).

### II.2.2.1. Les surfactines

La surfactine est l'un des biotensioactifs le plus intéressant et le plus étudié en raison de son efficacité remarquable avec une capacité de diminuer la tension de surface de l'eau ultrapure de 72 à 27 mN/m, ainsi que des activités anti-microbienne, anti-virale et anti-tumorale importantes (de França *et al.*, 2015; Reis *et al.*, 2013). La surfactine est un lipopeptide anionique cyclique composé d'un heptapeptide (L-asparagine, L-leucine, acide glutamique, L-leucine, L-valine et deux D-leucines) lié à un acide gras de longueur variable allant de 12 à 16 atomes de carbone avec une liaison hydroxyle entre le groupement OH du carbone N° 3 de l'acide aminé N° 7 (de França *et al.*, 2015) (Fig. 16). Plusieurs variantes de surfactine ont été décrites telles que la pumilacidine de *Bacillus pumilus* ou la lichénysine de *Bacillus licheniformis* (Hamley, 2015).

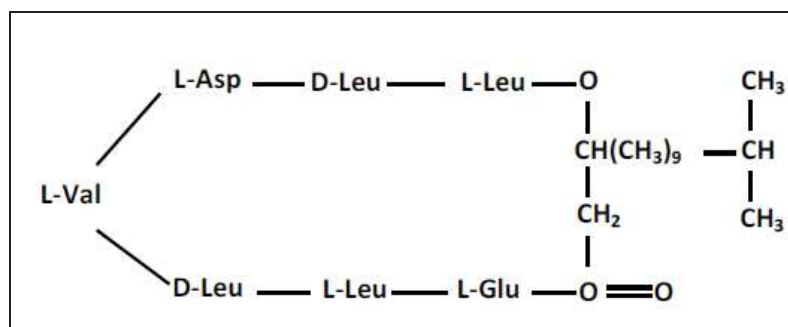


Figure 16. Structure chimique de la surfactine.

### II.2.2.2. Les lichenysines

Des souches de *Bacillus licheniformis* produisent principalement huit types de lichenysines, de structure proche de celle de la surfactine, et qui sont plus efficaces en tant qu'agent de surface. En effet, la concentration micellaire critique (CMC) de la lichenysine purifiée est inférieure à celle de la surfactine (Yakimov *et al.*, 1995). Ils s'agissent de la lichenysine A, la lichenysine B, la lichenysine C, la lichenysine D, la lichenysine G, [val7] lichenysine G, [Ile] lichenysine G et [Il2, 4] lichenysine D (Li *et al.*, 2008). Structuralement, la partie lipidique est formée d'un acide gras linéaire ou bronché avec une liaison  $\beta$ -hydroxy. La partie protéique est composée de 7 acides aminés: acide glutamique à l'extrémité N-terminale, asparagine, valine, 3 \* leucine, et isoleucine à l'extrémité C-terminale (Cochrane *et Vederas*, 2016) (Fig. 17).

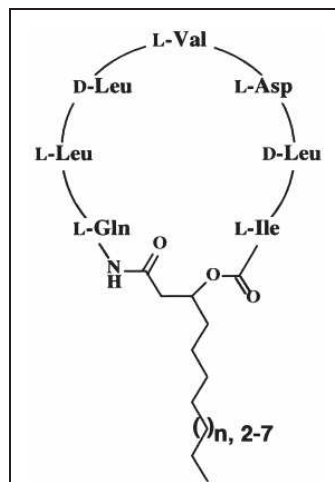


Figure 17. Structure chimique de la lichenysine A.

### II.2.2.3. Les iturines

La famille des iturines comporte les groupes suivants: les iturines, les mixirines, la subtilene A, la mycosubtiline, la mojavensine, et les bacillomycines. Structuralement, l'iturine A est un lipopeptide cyclique à 7 acides aminés avec un seul acide aminé lié par une liaison  $\beta$ -aminoacide à l'acide gras adjacent (Cochrane *et Vederas*, 2016) (Fig. 18). Les iturines sont connues comme des agents de lutte biologique très puissants contre les agents phytopathogènes tels que *Xanthomonas campestris* pv. *Cucurbitae*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium graminearum*, etc... (Patel *et al.*, 2015).





peu d'exemples de production extracellulaire des phospholipides. Des phospholipides extracellulaires, produits par la souche KJ564272 de *Staphylococcus hrominis*, ont révélé des activités physiologiques de stimulation immunologique d'une espèce de poisson, *Oreochromis mossambicus* (Rajeswari *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent que l'application des phospholipides s'avère très intéressante en aquaculture pour faire face aux maladies et par conséquent pour augmenter la production (Rajeswari *et al.*, 2016).

#### II.2.4. Les acides gras

Les acides gras considérés comme des agents tensioactifs résultent de l'oxydation microbienne des alcanes (Rehm *et* Reiff, 1981). Ces biomolécules sont douées des activités de surface et des activités biologiques notables (McClemets *et* Gumus, 2016). A titre d'exemple, l'acide spiculisporique qui est produit par *Pebicillium spiculisporum* avec un rendement de production important (110 g/l) et contribue à l'élimination de certains métaux lourds (Mulligan, 2005). Les acides corynomycologiques, des acides gras complexes contenant des groupes hydroxyle et des branches d'alkyle, sont également décrits comme des tensioactifs puissants (MacDonald *et al.*, 1981).

#### II.2.5. Les lipides neutres

Plusieurs microorganismes sont capables de produire des lipides neutres doués des propriétés tensioactives (Santos *et al.*, 2016). Des bactéries marines hydrocarbonoclastes, par exemple, sont capables de stocker des lipides neutres (Exemple: des triacyglycérols, diacyglycérols, des cériques et des polyhydroxyalcanoates) qui peuvent être utilisés comme des sources d'énergie en cas de l'appauvrissement en nutriments du milieu (Nakano *et al.*, 2012). Une souche *Marinobacter* sp. PAD-2 est montrée capable de produire un cérique, sur l'hexadécane comme substrat, réduisant la tension de surface de l'eau à 33 mN/m (Nakano *et al.*, 2012). Les lipides neutres de la souche ATCC 4277 de *Nocardia erythropolis* (MacDonald *et al.*, 1981) ont pu réduire la tension de surface à 37 mN/m en montrant des activités émulsifiantes importantes.

#### II.2.6. Les biosurfactants polymériques

Ce sont généralement des polymères d'hétéro-saccharides contenant des protéines. Le plus connu est l'émulsane. Les sous-classes les plus connues des biosurfactants polymériques sont présentées ci-dessous :

- **Emulsane:** C'est un polysaccharide sur lequel sont greffés des acides gras. Une souche RAG-1T de *Acinetobacter venetianus* a montré ses potentialités de produire un

emulsane (masse moléculaire > 34,5 KDa) possédant des applications en biorémediation (émulifications des hydrocarbures) (Fondi *et al.*, 2012).

- **Alasane:** Il s'agit d'un complexe anionique d'hétéro-polysaccharide et protéine. Un isolat bactérien KA53 d'*Acinetobacter radioresistens* a été décrit pour sa capacité à synthétiser l'alsane, un complexe de polysaccharide et de protéine de poids moléculaire élevé (Salehizadeh *et* Mohammadizad, 2009).
- **Liposane:** C'est un complexe de polysaccharide et lipide. Une étude par Cirigliano *et* Carman, 1984, a montré la capacité de la souche *Candida lipolytica* ATCC 8662 à produire le liposane, un émulsifiant extracellulaire hydrosoluble composé de 83% de glucides et de 17% de protéines.
- **Biodispersane:** C'est un polysaccharide extracellulaire anionique. Un tensioactif de type biodispersane produit par *Acinetobacter calcoaceticus* A2, a montré son efficacité à disperser le calcaire (Rosenberg *et al.*, 1989).
- **Glycolipo-protéine:** Il s'agit d'un complexe de lipides, protéines et polysaccharides. Une recherche faite par Camacho-Chab *et al.* (2013), a démontré que la souche MC3B-10 de *Microbacterium* sp. synthétise une glycolipoprotéine non-ionique respectueuse de l'environnement capable d'émulsionner des hydrocarbures aromatiques et des huiles. La nature chimique et la stabilité de ce bioémulsifiant suggèrent son application potentielle dans la biorestauration des environnements marins et dans les cosmétiques.

### II.2.7. Surfactants particuliers

On trouve deux types de biosurfactants particuliers (Shekhar *et al.*, 2014):

- Des vésicules extracellulaires: Certains microorganismes secrètent des métabolites extracellulaires vésiculaires, appelés des biosurfactants particuliers, qui contribuent dans l'adsorption des *n*-alcanes par la membrane cellulaire (Mnif *et* Ghribi, 2015). A titre d'exemple, la souche HO1-N de *Acinetobacter* sp. est capable de produire des vésicules, doués d'une activité de surface et composés par des protéines, des phospholipides, et des lipopolysaccharides, qui sont impliqués dans l'adhérence des cellules aux hydrocarbures. Ces molécules sont souvent connues comme des agents bio-émulifiants (Mnif *et* Ghribi, 2015).
- Des cellules bactériennes entières peuvent jouer parfois le rôle d'un surfactant.

### II.3. Production de biosurfactants

Le succès de l'utilisation et la production des biosurfactants passe par une diminution des coûts de production. Cette diminution pourra être atteinte grâce à la valorisation de substrats de croissance de produits à faible coût. Par exemple, Makkar *et* Cameotra (2002), indiquent qu'il est possible d'utiliser des déchets et des produits agricoles d'une part pour diminuer les coûts, mais aussi pour diminuer les quantités de déchets à traiter de diverses entreprises (huiles de moteurs usagées...).

#### II.3.1. Microorganismes producteurs de biosurfactants

Les biosurfactants sont principalement produits par des microorganismes se développant de manière aérobie, en utilisant une ou plusieurs sources de carbone, comme les hydrates de carbone, des huiles ou des hydrocarbures. Ces microorganismes sont en général des levures, des champignons ou des bactéries. Le principal rôle physiologique du biosurfactant est de permettre aux microorganismes de se développer sur des substrats insolubles en réduisant la tension interfaciale entre l'eau et le substrat, rendant ce dernier plus facilement accessible aux cellules (Mata Sandoval *et al.*, 2000).

Les microorganismes producteurs de biosurfactants ont été isolés à partir d'une grande diversité de milieux, notamment le sol, l'eau de mer, les sédiments marins, les champs de pétrole (Yakimov *et al.*, 1995) et même des environnements extrêmes (Cameotra *et* Makkar, 1998). Nombreux microorganismes extrémophiles se retrouvent dans plusieurs milieux marins extrêmes, tels que les événements hydrothermaux, des sources chaudes, des lacs salés et les planchers en haute mer. La capacité de ces microorganismes pour tolérer des températures extrêmes, la salinité et la pression, démontre leur grand potentiel pour des procédés biotechnologique (Dalmaso *et al.*, 2015).

Les genres bactériens connus pour leur production des biosurfactants comprennent: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Acinetobacter*, *Thiobacillus*, *Serratia*, *Arthrobacter*, *Alcanivorax*, et *Halomonas* (Bodour *et al.*, 2003; Mnif *et al.*, 2011). Bien que de nombreuses espèces produisent des biosurfactants, la régulation de leur synthèse est encore mal connue, sauf pour les souches de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* qui sont les bactéries les plus étudiées (Banat *et al.*, 2000).

### II.3.2. Applications

Compte tenu de leurs potentialités et de leur innocuité, les surfactants biologiques sont largement utilisés dans de nombreux domaines d'applications tels que la production alimentaire, l'agriculture, la chimie, l'industrie pharmaceutique et la cosmétique (Tableau 3). Ces dernières années, les biotensioactifs ont été utilisés comme des solutions de rechange pour les tensioactifs chimiques et devraient trouver de nombreuses applications environnementales et industrielles, tels que la biorestauration des polluants, la récupération améliorée du pétrole, la lubrification, la détergence, la solubilisation et la dispersion (Singh *et al.*, 2007). L'application de biosurfactants a été également augmentée dans les produits cosmétiques (les crèmes antirides, crèmes hydratantes, et les cosmétiques de nettoyages) (Kanlayavattanakul *et* Lourith, 2010) et les produits de santé et de soins (la lutte contre de nombreuses maladies, agents thérapeutiques conduisant à une réduction d'un grand nombre d'infections sans l'utilisation de produits chimiques de synthèse et de médicaments) (Rodrigues *et al.*, 2006).

**Tableau 3.** Différents domaines d'application des biosurfactants (Banat *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2016).

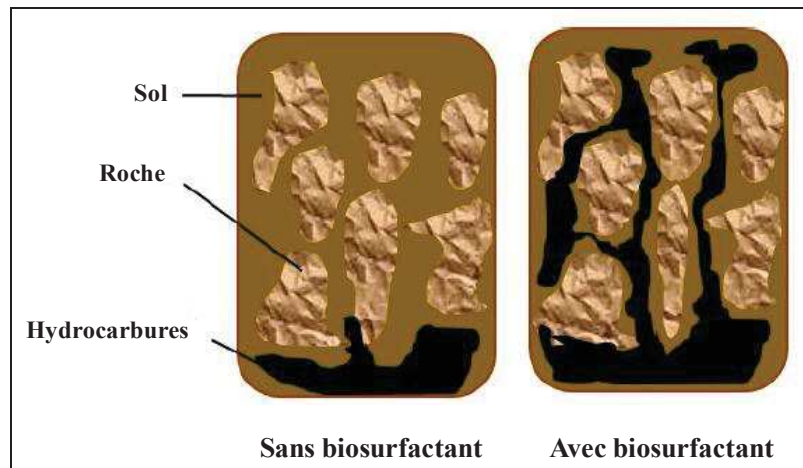
Domaine	Application
Environnement	Bioremédiation: Opérations de nettoyage des déversements d'hydrocarbures; Assainissement et rinçage du sol; Solubilisation des huiles.
Pétrole	Récupération améliorée du pétrole (MEOR).
Exploitation minière	Opérations de nettoyage des métaux lourds: Elimination des ions métalliques des solutions aqueuses, du sol et des sédiments.
Aliments	Solubilisation des huiles aromatisées; Amélioration de la texture des produits à base de matières grasses.
Médicaments	Agents antiadhésifs; antifongiques; antibactériens; antiviraux; anticancéreux, cicatrisants.
Agriculture	Biopesticides; fongicides; antiparasites.
Cosmétiques	Nettoyant; Préparation des crèmes hydratantes dermatologiquement compatibles, les crèmes antirides
Chimie	Détergent domestique et industriel; Peinture: dispersant, émulsifiant. Textile: agent de mouillage.

#### II.3.2.1. Environnement

Dans le domaine environnemental, les biosurfactants sont capables de solubiliser les composés xénobiotiques tels que les hydrocarbures, améliorant ainsi leur biodégradabilité

et de chélater les métaux lourds (exp. le zinc, le plomb, le cadmium et le cuivre) permettant ainsi leur élimination des sites contaminés (Mulligan, 2005). Les principales utilisations sont la bioremédiation des sites contaminés par les hydrocarbures, la dispersion des nappes de pétrole et une meilleure récupération du pétrole (Gassara *et al.*, 2017).

Bien qu'utilisés dans de nombreux domaines, les biotensioactifs voient une utilisation de plus en plus prometteuse dans les techniques de remédiation des sites contaminés (Ron *et Rosenberg*, 2014). La remédiation assistée par les biosurfactants présente de nombreux avantages. En effet, le biosurfactant augmente les surfaces des composés hydrocarbonés peu solubles en diminuant les tensions interfaciales et superficielles, ce qui entraîne une biodisponibilité accrue et une mobilité des polluants (Mahanty *et al.*, 2006). Par conséquent, en introduisant des surfactants d'origine biologique dans un site contaminé, une biodégradation améliorée peut être obtenue grâce à la solubilisation, à la mobilisation, ou à l'émulsification d'hydrocarbures (Ron *et Rosenberg*, 2014). En général, grâce aux procédés de récupération du pétrole, les puits pétroliers produisent un tiers à la moitié du pétrole initialement présent dans le gisement. Les résidus d'huile contenus dans les petits pores des réservoirs pétroliers représentent 50 à 65% de la quantité exploitée, qui sont piégés par des forces de capillarité, ainsi que par la présence d'une tension interfaciale entre l'hydrocarbure et la phase aqueuse (Santos *et al.*, 2016). Des réductions de la tension interfaciale sont nécessaires pour la mobilisation de ces hydrocarbures emprisonnés en utilisant des agents tensioactifs (Austad *et Taugbøl*, 1995). Dans la récupération du pétrole, l'utilisation de la chaleur, des agents tensioactifs, des processus microbiens et l'injection de gaz conduisent à la récupération d'une partie importante de l'huile retenue (Santos *et al.*, 2016). Les agents tensioactifs biologiques ont été utilisés pour réduire la tension interfaciale entre l'huile/eau et huile/roche, conduisant à une réduction des forces capillaires qui empêchent l'huile de se déplacer à travers les pores des roches (Fig. 20). Les biosurfactants forment également une émulsion à l'interface huile-eau, stabilisant l'huile désorbée dans l'eau, ce qui permet son élimination par l'injection d'eau dans le puits pétrolier (Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011).



**Figure 20.** Mécanisme de la récupération assistée du pétrole.

### ***II.3.2.2. Activité cicatrisante***

La cicatrisation cutanée est un phénomène biologique très dynamique, qui se met en place après une blessure de manière à rétablir le plus rapidement possible l'intégrité et l'homéostasie de la peau (Boateng *et* Catanzano, 2015). La fermeture correcte d'une lésion est possible grâce à la coopération entre de nombreux médiateurs solubles (facteurs de croissance et cytokines), la mise en jeu de différents types cellulaires (cellules inflammatoires, endothéliales, sanguines, épithéliales et immunitaires) et les interactions avec la matrice extracellulaire (Boateng *et al.*, 2008). La cicatrisation d'une plaie profonde (qui atteint également le derme) est classiquement divisée en trois étapes principales qui se recoupent spatialement et temporellement: la phase inflammatoire, la phase épithéliale et la phase de remodelage tissulaire (Martin, 1997). Les myofibroblastes pathologiques sont souvent impliqués dans la cicatrisation cutanée en générant une force contractile et en exagérant des fibres de collagène, mais aucun composé n'a été trouvé pour inhiber les myofibroblastes sans présenter une toxicité sévère pour les cellules physiologiques environnantes (Chong *et al.*, 2016). Les antibiotiques sont généralement utilisés pour le traitement des plaies infectieuses. Malheureusement, le développement de la résistance est très préoccupant en dehors des effets secondaires de ces antibiotiques (Santanu *et al.*, 2017). Par ailleurs, les espèces réactives contenant de l'oxygène et de l'azote présentes sur le site de la plaie retardent le processus de guérison par une oxydation lipidique, une altération de l'ADN et une inactivation de l'enzyme neutralisant les radicaux libres (Santanu *et al.*, 2017). C'est pourquoi, la recherche d'un nouvel agent cicatrisant sûr et efficace avec des activités antimicrobienne et antioxydante potentielles présente un avantage supplémentaire pour accélérer le processus de guérison (Tamara *et al.*, 2006; Santanu *et al.*, 2017).

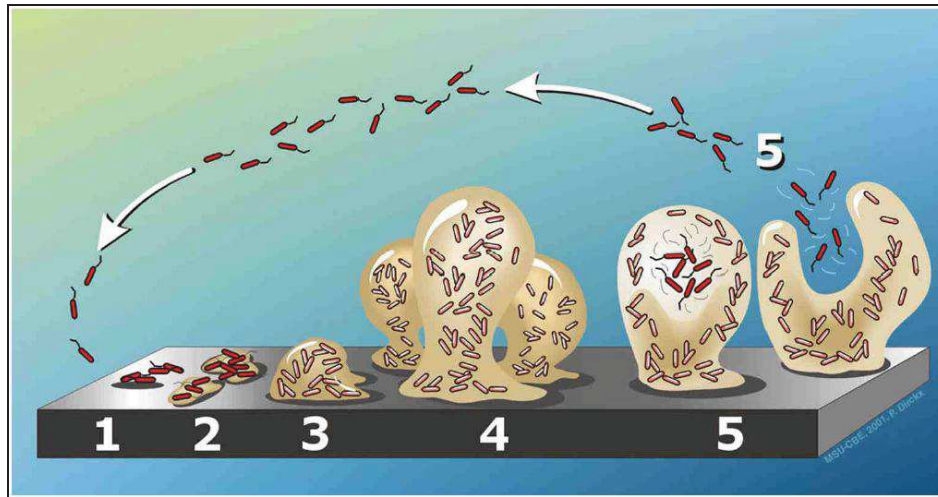


Dans ce contexte, les scientifiques se sont intéressés à des substances naturelles tels que les surfactants produits par des organismes vivants ou les biosurfactants, dans la réparation et/ou la régénération des tissus, en raison de leur faible irritation et même des effets anti-irritants, et de leur compatibilité avec la peau (Tamara *et al.*, 2006). Les biosurfactants sont dotés de propriétés intéressantes potentiellement utiles dans l'industrie cosmétique en raison de ses propriétés de surface uniques, en exerçant des activités anti-rides et hydratantes sur la peau humaine. Par ailleurs, ces biomolécules sont caractérisées par leur activités anti-oxydante et anti-microbienne intéressantes (Santos *et al.*, 2016). Elles sont utilisées en tant qu'agents nettoyants et anti-rides stimulant la production de collagène et d'élastine, en raison de leurs propriétés anti-radicalaires et hydratantes. Cela ouvre la possibilité que des biosurfactants puissent être utilement incorporés dans une large gamme de produits de soins de la peau à la place de surfactants chimiques, ce qui aurait l'avantage supplémentaire d'aider à la guérison de lésions cutanées mineures (Marchant *et Banat*, 2012). Les rhamnolipides, en tant que composés tensioactifs, se sont révélés efficaces pour de nombreux traitements de la peau, comme la cicatrisation des plaies, la guérison du choc de brûlure et le traitement des rides (Randhawa *et Rahman*, 2014). Des entreprises cosmétiques aux États-Unis ont déjà développé et commercialisé leurs produits formulés à base de lipopeptides, qui contribuent directement à stimuler la production de collagène et d'élastine, en tant qu'agents anti-âge (Mandal *et al.*, 2013).

### **II.3.2.3. Biofilm**

Le biofilm peut être décrit comme un agglomérat de microorganismes, s'adhérant à une surface inerte ou vivante et englués dans leur propre matrice d'exopolysaccharides adhésive et protectrice (Banat *et al.*, 2014a). Les biofilms sont présents partout où la vie peut exister, dans les sols, les eaux, les aliments, etc... (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Bridier *et al.*, 2014).

La formation d'un biofilm bactérien sur une surface immergée comporte plusieurs étapes successives dont, le conditionnement organique de la surface, l'adhésion initiale des cellules à la surface, une phase de prolifération aboutissant à la formation de micro-colonies et une phase de maturation du biofilm ou d'équilibre. A partir du biofilm, des agrégats bactériens vont pouvoir se détacher et secondairement coloniser des surfaces adjacentes (détachement partiel ou dispersion du biofilm) (Stoodley *et al.*, 2002) (Fig. 21).



**Figure 21.** Différentes étapes de la formation d'un biofilm bactérien (Stoodley *et al.*, 2002).

(1): Attachement initial des cellules à la surface; (2): Attachement irréversible des cellules et production d'exopolysaccharides (EPS); (3): Développement précoce de l'architecture du biofilm; (4): Maturation du biofilm et (5): Dispersion des cellules du biofilm.

La formation des biofilms est nécessaire pour économiser l'énergie bactérienne et plusieurs microorganismes l'utilisent pour protéger leur niche écologique. En effet, les microorganismes gravitent vers des surfaces solides formant des biofilms pour se protéger des défis environnementaux (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). La formation des biofilms est affectée par divers facteurs, y compris le type de microorganisme, l'hydrophobicité, les charges électriques de surface, les conditions environnementales et la capacité des microorganismes à produire des polymères extracellulaires qui aident les cellules à s'ancrer sur les surfaces (Coronel-León *et al.*, 2016).

La formation du biofilm est un phénomène qui touche de nombreux secteurs d'activités, et peut engendrer de plusieurs problèmes, comme par exemple dans le domaine agroalimentaire. En effet, il peut entraîner la biocorrosion des surfaces et le colmatage des systèmes de filtration. De plus, les biofilms favorisent le développement de flores pathogènes capables de résister aux différentes procédures de désinfection sur les équipements industriels, provoquant ainsi un véritable enjeu de santé publique (O'Toole, 2011). D'autre part, les biofilms sont aussi responsables de ce que l'on appelle les *biofouling* (ou bio-salissure ou encore encrassement biologique), toute croissance non désirée des organismes (micro et/ou macro) vivants sur une surface (Flemming *et al.*, 2011; Chebbi *et al.*, 2017a). En fait, ce phénomène se produit sur toutes les surfaces présentes dans un milieu humide qu'elles soient terrestres ou aquatiques. Les domaines d'activités confrontés à ce phénomène sont nombreux tels que le secteur médical (les biofilms sont présents sur les prothèses, l'émail des dents, les lentilles de contact, les instruments médicaux, etc...) (Rodrigues *et al.*, 2006) et de même,

tous les secteurs industriels doivent faire face à ce problème puisque la plupart sont confrontées à minima à des systèmes de circulation d'eau (échangeurs de chaleur, systèmes de refroidissement...) (Brian-Jaisson, 2014). Le secteur maritime n'échappe évidemment pas à cette problématique. Les structures et les équipements marins sont plus sujets au biofouling que les équipements terrestres, étant donné que les environnements aquatiques sont plus riches en éléments nutritifs et donc plus propices à la colonisation de surface (Wahl, 2012). Les biofilms apparaissent sur des surfaces aussi variées comme les coques de bateaux, les plates-formes pétrolières, les pipelines, les structures aquacoles et portuaires. Ils peuvent perturber et endommager les appareils de mesures scientifiques (caméras ou capteurs). Dans le cas des navires, l'accumulation des salissures sous la ligne de flottaison entraîne une diminution de la vitesse du bateau et par conséquent une surconsommation de carburant, un coût de maintenance élevé, ainsi qu'une diminution de la durée de vie des navires (notamment du fait de la biocorrosion) (Schultz *et al.*, 2011; Brian-Jaisson, 2014). Les bactéries qui se développent en tant que biofilm restent également, un défi important dans le domaine biomédical, puisqu'elles ont tendance à être plus tolérantes aux traitements antimicrobiens (Rodrigues *et al.*, 2006). La formation de biofilm commence immédiatement une fois qu'un dispositif biomédical a été placé dans sa niche corporelle. Le contrôle de la croissance microbienne est nécessaire dans ces environnements microbiologiquement sensibles où les surfaces fournissent des conditions favorables à la prolifération des microorganismes. Le besoin de nouveaux agents antimicrobiens pour surmonter la tolérance ou la résistance aux antibiotiques bactériens dans les biofilms conduit à des recherches sur de nouvelles stratégies pour lutter contre les infections bactériennes chroniques. Bridier *et al.*, 2014, ont passé en revue les stratégies écologiques potentielles qui incluent les huiles essentielles, les bactériophages, les enzymes, les biocides et les biosurfactants pour éviter la formation de biofilms (Coronel-León *et al.*, 2016). Les biosurfactants peuvent être considérés comme des produits de nettoyage respectueux de l'environnement, en raison de leur origine naturelle et leur relative facilité de préparation et utilisation (Cameotra *et* Makkar, 2004). Ces biomolécules qui sont dotées par des potentialités anti-adhésives (empêcher l'adhérence microbienne sur les surfaces) et anti-biofilm (perturber ou déstabiliser les biofilms déjà formés) puissantes, ont beaucoup attiré l'attention de la communauté scientifique et ont fait l'objet de recherches récentes en biotechnologie, pour lutter contre la colonisation bactérienne et fongique des surfaces celles d'intérêt biomédical et autres (Banat *et al.*, 2014a).

Les biosurfactants sont capables de modifier l'hydrophobicité de la surface qui, à son tour, affecte l'adhérence des microbes. Par ailleurs, ces biotensioactifs, peuvent affecter le

développement des flagelles, suggérant des changements dans la capacité d'attachement des bactéries (Rivardo *et al.*, 2009). Leur effet dépend de l'hydrophobicité bactérienne initiale ainsi que du type et de la concentration des biosurfactants. Coronel-León *et al.*, 2016, ont mentionné que l'activité anti-biofilm des lichenysines LchAL1.1 pourrait être une conséquence de la pénétration et de l'adsorption de biosurfactant à l'interface entre la surface solide et les bactéries formant des biofilms attachés, réduisant ainsi la tension interfaciale et favorisant le détachement bactérien. Des biosurfactants produits par les souches *Lactococcus lactis* et *Streptococcus thermophilus* ont été démontrés efficaces contre un biofilm multi-espèce formé sur une prothèse vocale (Rodrigues *et al.*, 2004). Une autre étude a révélé que l'adhésion des biofilms de *Salmonella enterica* et d'*Escherichia coli* sur des cathéters urinaires a été inhibée en recouvrant 5 µg de surfactine à la surface du dispositif (Harshey *et al.*, 2003). Ceci montre l'efficacité des surfactants biologiques dans la réduction des infections hospitalières sans recours à des médicaments ou à des agents chimiques de synthèse (Harshey *et al.*, 2003).

### **II.3.3. Production des biosurfactants à partir des sous-produits**

La source de carbone est l'un des paramètres le plus influent la production des tensioactifs biologiques. Ainsi, le succès de l'utilisation et de la production des biosurfactants passe nécessairement par une diminution des coûts de production. Cette diminution pourra être atteinte grâce à la valorisation de substrats de croissance de produits à faible coût (Banat *et al.*, 2014b). Le substrat peut représenter jusqu'à 50% des coûts de production totaux d'où l'importance du choix des sources de carbone alternatives peu coûteuses (De Almeida *et al.*, 2016). Un certain nombre de déchets renouvelables et bon marché a été exploré comme substrats pour la production de biosurfactants, ce qui a permis d'élaborer une stratégie efficace de réduction des coûts, associée à la gestion des déchets en réduisant les quantités des déchets à traiter générés par diverses entreprises (Makkar *et al.*, 2011; Geetha *et al.*, 2018).

Le tableau 4, résume des matériaux peu coûteux exploités comme substrats pour la production des biosurfactants. La sélection des déchets devrait assurer un bon équilibre en nutriments pour permettre la croissance microbienne et la production de biosurfactants. Les déchets industriels à haute teneur en glucides ou en lipides sont idéaux pour être utilisés comme sources de carbone (Singh *et al.*, 2018).

**Tableau 4.** Différents substrats de déchets peu coûteux exploités pour la production des biosurfactants.

Type d'industrie / déchets	Type d'espèce microbienne	Références
<b>Résidus industriels et agroalimentaires:</b> mélasse de dattes, bagasses de canne à sucre, écorces d'orange, farine d'écorce de sésame, résidus de thon, écorces de bananes, écorces de pommes de terre, liqueurs de maïs, gâteaux de cacahuètes, résidus de moringa.	<i>Halobacteriaceae archaeon</i> , <i>Bacillus pumilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Cunninghamella phaeospora</i> , <i>Candida tropicalis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Chooklin <i>et al.</i> , 2014; Sharma <i>et al.</i> , 2015; Kumar <i>et al.</i> , 2016; Lins <i>et al.</i> , 2016; Rubio-Ribeaux <i>et al.</i> , 2017; Magalhaes <i>et al.</i> , 2018
<b>Déchets animaux:</b> déchets d'abattoir, graisses animales, déchets de transformation du poisson	<i>Pseudomonas gessardii</i> , <i>Nocardia higoensis</i> <i>Aneurinibacillus migulanus</i>	Ramani <i>et al.</i> , 2012; Patil <i>et al.</i> , 2016; Sellami <i>et al.</i> , 2016
<b>Déchets agro-industriels et des usines</b> (y compris les déchets de raffinerie): déchets d'oliviers, effluents traités à la tannerie, déchets de l'industrie de l'huile de palme, déchets de l'industrie de l'huile de soja	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus pseudomycooides</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Kiran <i>et al.</i> , 2014; Gudiña <i>et al.</i> , 2016; Li <i>et al.</i> , 2016; Moya-Ramírez <i>et al.</i> , 2016; Radzuan <i>et al.</i> , 2017
<b>Huile de cuisson usagée:</b> déchets de friture d'huile de noix de coco, huile de cuisson usée, huile de friture résiduelle	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida lipolytica</i>	Haba <i>et al.</i> , 2000; George <i>et Jayachandran</i> 2013; Lan <i>et al.</i> , 2015; Souza <i>et al.</i> , 2016

### II.3.4. Marché de biosurfactants

Les surfactants ont une demande énorme dans le monde entier. Le marché mondial des surfactants était estimé à 30,64 milliards USD en 2016 et pourrait atteindre 39,86 milliards USD en 2021 (Markets and Markets, 2016). Avec des réglementations plus strictes sur des procédés plus écologiques et vue la demande énorme, les biosurfactants constituent une part importante du marché des surfactants. En 2013, le marché mondial des biosurfactants était de 3, 44,068.40 tonnes et pourrait atteindre 4, 61,991.67 tonnes en 2020, avec un taux de croissance annuel moyen de 4,3% entre 2014 et 2020 (Grand View Research, 2015, Singh *et al.*, 2018). La génération de revenus sur le marché des biosurfactants a dépassé 1,8 milliard de dollars en 2016 et pourrait atteindre 2,6 milliards de dollars en 2023 (Global Markets Insights, 2018).

Les régions qui couvrent le marché mondial des biosurfactants sont essentiellement: L'Europe (Allemagne, France, Italie, Royaume-Uni, Espagne); l'Amérique du Nord (US, Canada, Mexique); l'Amérique du Sud (Argentine, le Brésil, Chili); l'Asie-Pacifique (Japon, Chine, Inde, Australie, Nouvelle-Zélande, Corée du Sud), Moyen-Orient (Arabie Saoudite,

UAE, Qatar) et l’Afrique du Sud. L'Europe est en train d'émerger et devrait continuer à se développer en tant que le plus producteur des biosurfactants dans le marché mondial (environ 53%), suivie par les États-Unis. Cependant, les pays en développement comme l’Asie, l’Afrique et l’Amérique latine sont considérés comme des consommateurs croissants de biosurfactants. Ces régions essaient de développer des stratégies pour s’émerger dans le marché mondial de ces biotensioactifs (Global Markets Insights, 2018).

Actuellement, il y a une nette augmentation de création des entreprises qui investissent dans le domaine des biosurfactants. Certaines des principales compagnies du marché mondial des biosurfactants sont présentées dans le tableau 5 (Global Market Insights, 2018).

L’entreprise *AGAE technologies Ltd*, installée aux États-Unis a récemment introduit R95, un rhamnolipide dont la qualité et la pureté ont été validées par HPLC/MS. Alors que l’entreprise *Jeneil Biosurfactants*, une autre société en Amérique, est aussi connue par sa commercialisation des rhamnolipides. Les firmes *Fraunhofer IGB* en Allemagne et *Cognis* (Allemagne, États Unis) commercialisent des glycolipides, de lipides à base de cellobiose et de lipides à base de mannosylérythritol. Le Groupe soliance (France), *MG Intobio* (Corée du Sud), *Saraya* (Japon) et *Ecover Belgium* (Belgique), sont des firmes productrices des sophorolipides. Quant à la firme *lipofabrik* (Lille, France) qui est réputée dans le marché mondial pour la production des lipopeptides (surfactine, fengycine...). *Cognis* a récemment annoncé la production d’un biotensioactif alkyl polyglucoside APG®, fabriqué à partir d'huile végétale ou d'amidon, tandis que *Jeneil Biosurfactants*, aux États-Unis, commercialise actuellement ZONIX, un biofongicide à base de rhamnolipides et de RECO, un biosurfactant utilisé dans le nettoyage et la récupération des huiles. D'autre part, *Paradigm Biomedical Inc* (USA), s'engage dans la recherche des produits pharmaceutiques dérivés des rhamnolipides (Global Market Insights 2018).



**Tableau 5.** Liste des entreprises développant la production des biosurfactants à l'échelle industrielle ou commercialisant des produits contenant des biosurfactants.

Nom de la compagnie	Produit	Pays	Contact / Adresse web
Lipofabrik	Lipopeptides (Fengycine, Plipastatine, Iturine, Lichenysine, Mycosubtiline, Surfactine)	France	<a href="http://www.lipofabrik.com/">http://www.lipofabrik.com/</a>
AGAE Technologies	Rhamnolipides	Etats-Unis	<a href="http://www.agaetech.com/">http://www.agaetech.com/</a>
Urumqi Unite Bio-Technology Co., Ltd.	Rhamnolipides	Chine	<a href="https://unite-xj.en.alibaba.com/productlist.html">https://unite-xj.en.alibaba.com/productlist.html</a>
Allied Carbon Solutions Co., Ltd.	Bio Surfactants ACS-Sophor <sup>®</sup> (Sophorolipides)	Japan	<a href="http://www.allied-c-s.co.jp/english.php">http://www.allied-c-s.co.jp/english.php</a>
MG Intobio Co., Ltd.	Sopholine (Sophorolipides)	Corée du Sud	<a href="https://mgintobio.fm.alibaba.com/productlist.html">https://mgintobio.fm.alibaba.com/productlist.html</a>
JENEIL BIOTECH	Produits des Biosurfactants	Etats-Unis	<a href="http://www.jeneilbiotech.com/">http://www.jeneilbiotech.com/</a>
BioFuture Ltd.	Mélanges de bactéries productrices de biosurfactants	Irlande	<a href="http://www.biofuture.ie/">http://www.biofuture.ie/</a>
Soliance (part of Givaudan SA)	Sopholiance S (sophorolipides)	France	<a href="http://www.soliance.com/dtproduit.php?id=42">http://www.soliance.com/dtproduit.php?id=42</a>
Kaneka Corporation	KANEKA Surfactin (Surfactine de Sodium)	Japan	<a href="http://www.kaneka.co.jp/kaneka-e/">http://www.kaneka.co.jp/kaneka-e/</a>
Kanebo Cosmetics Inc.	Mannosylérythritol lipide B (MEL-B), surfactine de sodium (SFNa)	Japan	<a href="http://www.kanebo.com/science/skincare/biosurfactants.html">http://www.kanebo.com/science/skincare/biosurfactants.html</a>
Saraya Co. Ltd.	Yashinomi Vegetable Wash et Yashinomi Eco Wash (sophorolipides)	Japan	<a href="http://worldwide.saraya.com/">http://worldwide.saraya.com/</a>
Rhamnolipids Companies, Inc.	Rhamnolipides	Etats-Unis	<a href="http://rhamnolipid.com/">http://rhamnolipid.com/</a>
SyntheZyme LLC.	Sophorolipides	Etats-Unis	<a href="http://www.synthezyme.com/index.html">http://www.synthezyme.com/index.html</a>
TensioGreen Corporation	Rhamnolipids, Lipopeptides, Trehalolipids	Etats-Unis	<a href="http://www.tensiogreen.com/index.php">http://www.tensiogreen.com/index.php</a>
ZFA Technologies Inc.	BERO biosurfactant	Chine	<a href="http://www.zfatech.com/index.php?lang=en">http://www.zfatech.com/index.php?lang=en</a>
Logos Technologies, LLC.	NatSurFact (Rhamnolipids)	Etats-Unis	<a href="https://www.natsurfact.com/">https://www.natsurfact.com/</a> OR <a href="https://www.logostech.net/">https://www.logostech.net/</a>
TeeGene Biotech LTD.	Rhamnolipids and Lipopeptides	Royaume-Uni	<a href="http://www.teegene.co.uk/">http://www.teegene.co.uk/</a>
GlycoSurf LLC.	Rhamnolipids (chemically synthesized)	Etats-Unis	<a href="http://glycosurf.com/">http://glycosurf.com/</a>



---

## BIODIVERSITE MICROBIENNE

---

### I. Introduction

L'étude microbiologique a longtemps été fondée sur des critères morphologiques et biochimiques (Rajendhran *et al.*, 2011). Les microorganismes sont détectés par culture ou par isolement sur des milieux de croissance nutritifs ou sélectifs, permettant ainsi la croissance de la biomasse ou la sélection des individus spécifiques. Toutefois, ces techniques de mise en culture présentent l'inconvénient de ne donner qu'une vue restreinte de la diversité naturelle. En effet, 99% des microorganismes présents dans la nature ne sont pas accessibles par des techniques culturelles classiques (Amann *et al.*, 1995). Ceci peut être attribué à différentes causes (Amann *et al.*, 1995; Ward *et al.*, 1997):

- Le milieu de culture choisi ne peut pas être universel. De plus, les conditions de l'environnement ne peuvent pas être reproduites sur un même et seul milieu de culture, en particulier pour les environnements à forts gradients physicochimiques.
- Certains microorganismes hors de leur environnement peuvent entrer dans un état viable mais non cultivable. Il s'agit d'un état d'adaptation aux conditions de stress, notamment nutritionnel. Il s'accompagne de modifications physiologiques et structurales dont le rétablissement n'est pas simplement possible sur milieu synthétique.
- La quantité d'inoculum choisie pour réaliser l'enrichissement influence le type de cellules enrichies.
- Des populations inférieures numériquement peuvent supplanter des populations majoritaires moins adaptées au milieu de culture.
- Des microorganismes différents possédant des conditions de croissance similaires seront difficilement distinguables.
- Certaines cellules sont impossibles à obtenir en culture pure tels que les microorganismes syntrophes et symbiotes.

C'est suite à toutes ces contraintes que s'est développée une nouvelle approche basée sur l'analyse, non plus de la cellule, mais de l'information génétique qu'elle contient (sous forme d'ADN génomique ou ARN ribosomiaux). Ces approches moléculaires permettent d'effectuer la détection, le suivi et l'étude de la diversité microbienne dans un environnement donné en se basant sur le génotype plutôt que sur le phénotype, c'est-à-dire le potentiel génétique des microorganismes indépendamment des conditions du milieu ou de l'environnement (Torsvik *et al.*, 1996).

## II. Étude de la biodiversité microbienne moyennant des approches moléculaires

Notre connaissance de la diversité microbienne s'est considérablement améliorée grâce aux apports de la biologie moléculaire et de la phylogénie. Les analyses comparatives de la petite sous-unité du ribosome et d'autres gènes ont démontré que le monde du vivant était découpé en 3 domaines: *Bacteria*, *Eucarya* et *Archaea* (Woese, 1987). Alors que l'on estime que plus de 99% des microorganismes présents dans la nature ne sont pas accessibles par des techniques culturales standards (Amann *et al.*, 1995), les méthodes moléculaires donnent un élan considérable aux études de diversité microbienne en s'affranchissant de l'étape culturale. Les ARNs ribosomiaux 5S, 16S et 23S pour les microorganismes procaryotes (Domaines *Bacteria* et *Archea*) et 5.8S, 18S et 28S pour les microorganismes eucaryotes (Domaine *Eucarya*), dont la présence est universelle et la fonction est conservée, ont été rapidement choisis comme des marqueurs en phylogénie (Fox *et al.*, 1977). Ces derniers sont constitués d'une alternance de domaines variables et conservés. L'ARNr 16S et l'ARNr 18S sont employés comme des molécules de références en phylogénie. De nombreuses séquences des ARNs ribosomiaux des microorganismes cultivables et non cultivables sont disponibles dans les banques de gènes. Ces marqueurs d'ARNr, ainsi que d'autres gènes, sont employés dans diverses techniques moléculaires d'écologie microbienne. On peut, ainsi sans mise en culture et sans même les avoir observés, identifier la plupart des microorganismes présents dans un milieu complexe et en obtenir une image à la fois qualitative (le nombre d'espèce) et quantitative (la fréquence de chaque espèce) (Godon *et Moletta*, 1998). Par ailleurs, ces techniques moléculaires basées sur l'extraction de l'information génétique (ADN) à partir de différents environnements (eau, sol...), ont permis la caractérisation des modifications dans la composition et la diversité de communautés microbiennes naturelles dans des situations de perturbations environnementales permettant l'identification des groupes microbiens d'intérêts. Plus globalement, ces outils ont mené à des génotypages et séquençages des communautés

microbiennes en moyen débit allant même jusqu'à la caractérisation du métagénome d'un biotope donné et fournissant la plupart des séquences d'ADN présentes dans les bases de données internationales (Ranjard, 2012).

Depuis le développement de ces outils d'écologie moléculaire, le nombre d'études portant sur la caractérisation de la diversité des communautés microbiennes des environnements naturels a augmenté de façon exponentielle (Morris *et al.*, 2002). Toutes ces études sont très prometteuses et, dans certains cas fournissent des éléments de compréhension indispensables des modifications chroniques ou ponctuelles de la diversité microbienne des environnements naturels. Néanmoins, elles mènent dans certains cas à des résultats contradictoires ou difficilement comparables à cause du manque de standardisation des stratégies d'échantillonnages ou des techniques moléculaires appliquées. Par exemple, l'estimation de la diversité bactérienne du sol varie de 1000 à 1 000 000 d'espèces par gramme de sol selon les techniques utilisées (Gans *et al.*, 2005). Par conséquent, les résultats sont difficiles à comparer et ne permettent pas, au final, des avancées significatives dans notre compréhension des communautés microbiennes, de leur diversité et de leur rôle dans le fonctionnement biologique du sol (Ranjard, 2012).

### **III. Exemples des méthodes moléculaires utilisées pour étudier la biodiversité microbienne des environnements**

#### **III.1. Méthodes d'empreintes génétiques**

La réalisation d'empreintes génétiques des communautés, équivalent des codes-barres, permet d'obtenir une image globale de la structure, de la diversité ou encore de l'évolution des communautés. L'avantage de cette approche est qu'il n'est pas nécessaire de savoir quels sont les organismes présents (Monier *et Cécillon*, 2015). Ces approches permettent de différencier les microorganismes ou groupes de microorganismes et dans certains cas d'identifier les membres dominants de la communauté. Les résultats fournis (images des gels d'électrophorèse, analyses statistiques type ACP, indices de diversité...) permettent d'avoir une information qualitative sur la structure et la diversité des communautés. Des échantillonnages multiples (temps et espaces) vont permettre de comprendre la dynamique des populations sur le site et de faire le lien avec les autres paramètres du site. Ces approches restent cependant globales et peuvent être couplées à d'autres outils pour une information plus ciblée comme le séquençage. Parmi ces méthodes d'empreintes moléculaires, on trouve : SSCP, DGGE, RFLP...etc. (Monier *et Cécillon*, 2015).

### III.1.1. Exemple d'une technique d'empreintes génétiques: SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

La technique de SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) ou d'analyse de polymorphisme de confirmation d'acides nucléiques simples brins est une méthode sensible fréquemment utilisée en écologie microbienne (Chamkha *et al.*, 2008). Elle permet de séparer les molécules d'ADNr 16S en fonction de leur séquence (Zumstein *et al.*, 2000). Le principe de cette technique consiste à une conformation différente de l'ADN monocaténaire qui détermine la mobilité dans un gel dénaturant. Après extraction des ADNs totaux du système biologique étudié et amplification par PCR d'une zone variable de l'ADNr 16S (environ 200 pb), les produits de PCR sont dénaturés, en présence de chaleur et d'un agent dénaturant (formamide), et déposés sur un gel de polyacrylamide dans des conditions non dénaturantes. La migration électrophorétique des ADNs monocaténaires se fera en fonction de leur structure secondaire. Une communauté microbienne est donc représentés par un profil où chaque pic correspond à une séquence de région variable de l'ADNr 16S, et par extension à une espèce de microorganisme. L'aire de chaque pic donne une indication semi-quantitative sur l'abondance du microorganisme dans la population microbienne. La séquence de l'ADNr 16S correspondant à chaque pic peut être déterminée en comparant la migration des séquences préalablement isolées par clonage, à la migration du profil total. Les clones correspondant à pic du profil sont séquencés et identifiés par comparaison à des bases de données de séquences d'ADNr 16S (Godon *et al.*, 2001). Cette technique SSCP permet d'obtenir une empreinte moléculaire des écosystèmes microbiens. Elle permet de caractériser, sans mise en culture, la diversité microbienne, de comparer les microflores semblables et d'en suivre la dynamique (Chamkha *et al.*, 2008).

### III.2. Les techniques haut-débit de séquençage massif

Plus récemment, le développement des techniques haut débit de séquençage massif permet d'obtenir des dizaines voire des centaines de milliers de séquences d'un génome unique ou d'un métagénome de communautés indigènes avec des applications prometteuses pour les communautés microbiennes naturelles (Christen *et al.*, 2008). L'analyse métagénomique des environnements naturels doit permettre de mieux décrypter les assemblages taxonomiques et fonctionnels des communautés indigènes, d'identifier leurs rôles potentiels dans le fonctionnement biologique des écosystèmes et les services écosystémiques associés (Ranjard, 2012).

Ces technologies dites NGS (Next Generation Sequencing), ou nouvelles générations de séquenceurs, permettent aujourd'hui de séquencer des millions de fragments sur des longueurs allant jusqu'à 750 paires de bases. Parmi ces NGS nous pouvons citer: Pyroséquençage, Illumina Miseq, SOLiD, etc... Un travail de bioinformatique ultérieur est nécessaire afin, de valider, d'annoter, d'identifier des séquences par comparaison avec des bases de données de séquences connues.

Ce type d'analyse de séquençage massif permet non seulement d'identifier des organismes présents, mais aussi d'identifier des gènes codant des enzymes impliquées dans des voies métaboliques relatives aux processus environnementaux étudiés. Sa force réside dans la quantité de séquences générée et la précision de l'information. Le biais principal de cette technologie, qui est également un biais pour les autres outils de biologie moléculaire, est qu'une grande partie des séquences obtenues est inconnue et n'est donc pas référencée dans les bases de données. L'analyse porte donc seulement sur les organismes et fonctions référencés dans les bases de données (Monier *et* Cécillon, 2015). Plus concrètement, étant donné que l'ensemble des gènes de biodégradation, par exemple, n'est pas encore connu, les analyses de biologie moléculaire peuvent donc sous-estimer le potentiel de biodégradation d'un site donné (Monier *et* Cécillon, 2015).

### **III.2.1. Exemples des approches moléculaires haut-débit de séquençage massif**

#### ***III.2.1.1. Pyroséquençage***

La méthode de pyroséquençage de l'ADN a été décrite par Hyman en 1988. Elle est améliorée par Ronaghi *et al.* en 1996 et 1998, en introduisant la PCR. En 2005, la commercialisation du premier pyroséquenceur 454 a été effectuée par Margulies *et al.* Ce séquenceur est basé sur l'intégration de deux technologies: le pyroséquençage et la technologie des plaques en fibre optique picotitrées permettant la réalisation en parallèle de 300 000 réactions de PCR (Leamon *et al.*, 2003).

Le principe de cette technique consiste à réaliser un séquençage par quantification d'un signal lumineux émis lors de l'incorporation d'un nucléotide. Les nucléotides sont incorporés l'un après l'autre dans le milieu réactionnel. Si le nucléotide ajouté dans le milieu correspond à celui attendu par la polymérase, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse, puis, par une réaction enzymatique, émet un signal lumineux interprété par le séquenceur (Margulies *et al.*, 2005).

La technique de pyroséquençage ne nécessite pas de clonage, et permet une lecture directe de la séquence obtenue après le séquençage. C'est une méthode rapide permettant de générer un nombre important de séquences en parallèle (jusqu'à un million de séquences pour un, run" dans la version Titanium, avec une taille relativement grande (700 pb dans le cas du séquenceur 454 GS FLX Titanium, en 24h) (Shokralla *et al.*, 2012). Pour ces raisons, le pyroséquençage est devenue aujourd'hui la méthode de séquençage de référence en écologie.

### **III.2.1.2. Séquençage Illumina MiSeq**

Le système MiSeq est la première solution de séquençage de bout en bout qui permet de réaliser dans un seul instrument la génération d'amplifiats, le séquençage, l'amplification et l'analyse des données. Le système MiSeq tire parti de la technologie de séquençage par synthèse (SBS) d'Illumina, la chimie de séquençage nouvelle génération la plus largement utilisée. Le système MiSeq constitue la plateforme idéale pour réaliser des analyses génétiques rapides et économiques (Quail *et al.*, 2012).

La chimie SBS d'Illumina est issue de la technologie de séquençage nouvelle génération la plus généralement adoptée. Elle permet d'obtenir une qualité de données exceptionnelle, grâce une méthode exclusive fondée sur des terminateurs réversibles, qui détecte chacune des bases à mesure qu'elles sont incorporées à des brins d'ADN massivement parallèles. Les marqueurs fluorescents des terminateurs sont imagés à mesure que chaque dNTP est ajouté, puis clivé afin de permettre l'intégration de la base suivante. Les quatre dNTP liés à des terminateurs réversibles étant présents au cours de chaque cycle, la compétition naturelle réduit au minimum le biais lié à l'incorporation. Les appels de bases sont réalisés directement à partir des mesures d'intensité du signal durant chaque cycle, ce qui réduit sensiblement les taux bruts d'erreurs par rapport à d'autres technologies. Le résultat final est un séquençage base par base d'une extrême précision, qui élimine la quasi-totalité des erreurs de séquence imputables au contexte, même dans des régions de séquences répétitives ou d'homopolymères. Le séquençage Illumina procure un rendement inégalé en matière de données exemptes d'erreurs, avec les échantillons de séquençage les plus complexes ou sensibles (Liu *et al.*, 2012).

## **VI. Réponse de la communauté microbienne à la contamination aux hydrocarbures**

Les communautés microbiennes sont extrêmement sensibles aux changements rapides de l'environnement et peuvent être utilisées comme indicateurs de stress, car des changements

dans l'abondance relative de taxons spécifiques ou de gènes fonctionnels peuvent indiquer des changements dans la dynamique physico-chimique des écosystèmes (Jeffries *et al.*, 2016).

Les techniques culturales, d'empreintes moléculaires et de séquençage massif, ont mis en évidence, la dominance de bactéries hydrocarbonoclastes au sein des communautés bactériennes, lors d'une contamination par des hydrocarbures. L'analyse de la biodiversité microbienne dans les milieux marins contaminés par des hydrocarbures a été focalisée surtout, sur la réponse de la communauté microbienne suite à des marées noires. En revanche, les recherches analysant la réponse des communautés microbiennes à la contamination chronique par les hydrocarbures sont très rares (Jeanbille *et al.*, 2016). Les marées noires ont pour effet la réduction de la diversité bactérienne (Head *et al.*, 2006).

Les recherches visant la réponse de la communauté bactérienne à une contamination chronique aux hydrocarbures, ont révélé des résultats différents. Dans certains cas, une diminution de la diversité bactérienne dans des sédiments marins pollués de manière chronique, a été observée (Korlević *et al.*, 2015; Rosano-Hernández *et al.*, 2012). Par contre, d'autres études, ont montré que la diversité bactérienne est maintenue même dans les échantillons pollués (Paissé *et al.*, 2008; Hernandez-Raquet *et al.*, 2006). Une étude récente réalisée par Won *et al.*, 2017, a montré une absence de différence au niveau de la composition des communautés microbiennes des sédiments marins contaminés et celle des échantillons non contaminés (Won *et al.*, 2017). De même, un effet marginal de la contamination chronique aux hydrocarbures, sur la structuration des communautés bactériennes des sédiments marins, a été observé (Jeanbille *et al.*, 2016). Ceci peut être interprété, par le fait que des concentrations en hydrocarbures plus faibles et constantes ou qui varient peu, exercent une pression continue sur les communautés, les maintenant à un état de stabilité proche de celui des communautés de sédiments non contaminés (Jeanbille, 2015).



# **MATERIEL & METHODES**

## I. Biotopes étudiés

Notre étude a été menée sur des échantillons des eaux de mer de surface contaminées par des hydrocarbures provenant du port de pêche, du port de commerce et du port de plaisance (Chott Kerkennah) de la ville de Sfax, Tunisie, ainsi que des échantillons de sédiments de surface (1-5 cm) contaminés également par des hydrocarbures et ayant comme origine le port de pêche de Sfax. D'autres échantillons des eaux de mer prélevées à partir des zones présumées lointaines de la pollution de chaque port, ont été également collectés et considérés comme des témoins. Les coordonnées géographiques de différents échantillons étudiés sont présentées dans le tableau 6:

**Tableau 6.** Coordonnées géographiques de différents échantillons étudiés.

Ports	Eaux polluées	Eaux témoins
<b>Port de pêche</b>		
Site 1	34°71'58.63" N. 10°76'12.61" E	34°71'54.42" N. 10°76'54.86" E
Site 2	34°71'58.39" N. 10°76'51.64" E	
Site 3	34°71'31.91" N. 10°76'52.02" E	
Site 4	34°71'30.96" N. 10°76'15.00" E	
<b>Port de commerce</b>	34°72'93.04" N. 10°77'71.53" E	34°72'88.45" N. 10°77'69.82" E
<b>Port de plaisance</b>	34°72'86.69" N. 10°76'41.93" E	34°72'96.79" N. 10°76'20.90" E

Les eaux de mer issues du port de pêche de Sfax ont été collectées à partir de quatre différents sites et mélangées dans un seul échantillon. Les sédiments ont été collectés à partir du port de pêche de Sfax de coordonnées: 34°71'58.51" N. 10°76'51.67" E.

Les tableaux 7 et 8 ci-dessous, récapitulent les différents échantillons prélevés (93 échantillons) au cours de cette étude, ainsi que leurs noms accordés.

**Tableau 7.** Différents échantillons prélevés en 2013 et 2014.

Année	Echantillons	Nature	Port	Saison - Mois
2013	PP01-13	Eaux	Pêche	Hiver-Janvier
	CK01-13	Eaux	Plaisance	Hiver-Janvier
	Sed01-13	Sédiments	Pêche	Hiver-Janvier
2014	PP04-14	Eaux	Pêche	Printemps-Avril
	PP08-14	Eaux	Pêche	Eté-Août
	CK04-14	Eaux	Plaisance	Printemps-Avril
	CK08-14	Eaux	Plaisance	Eté-Août
	Sed04-14	Sédiments	Pêche	Printemps
	Sed08-14	Sédiments	Pêche	Eté-Août

Tableau 8. Différents échantillons des eaux de mer et des sédiments prélevés en 2015, 2016 et 2017.

Echantillons 2015	Echantillons 2016	Echantillons 2017	Nature	Port	Saison - Mois
PP01-15	PP01-16	PP01-17	Eaux	Pêche	Hiver-Janvier
PPTem01-15	PPTem01-16	PPTem01-17	Eaux	Pêche (Témoin)	Hiver-Janvier
PP04-15	PP04-16	PP04-17	Eaux	Pêche	Printemps-Avril
PPTem04-15	PPTem04-16	PPTem04-17	Eaux	Pêche (Témoin)	Printemps-Avril
PP07-15	PP07-16	PP07-17	Eaux	Pêche	Été-Août
PPTem07-15	PPTem07-16	PPTem07-17	Eaux	Pêche (Témoin)	Été-Août
PP09-15	PP09-16	PP09-17	Eaux	Pêche	Automne-Septembre
PPTem09-15	PPTem09-16	PPTem09-17	Eaux	Pêche (Témoin)	Automne-Septembre
PC01-15	PC01-16	PC01-17	Eaux	Commerce	Hiver-Janvier
PCTem01-15	PCTem01-16	PCTem01-17	Eaux	Commerce (Témoin)	Hiver-Janvier
PC04-15	PC04-16	PC04-17	Eaux	Commerce	Printemps-Avril
PCTem04-15	PCTem04-16	PCTem04-17	Eaux	Commerce (Témoin)	Printemps-Avril
PC07-15	PC07-16	PC07-17	Eaux	Commerce	Été-Août
PCTem07-15	PCTem07-16	PCTem07-17	Eaux	Commerce (Témoin)	Été-Août
PC09-15	PC09-16	PC09-17	Eaux	Commerce	Automne-Septembre
PCTem09-15	PCTem09-16	PCTem09-17	Eaux	Commerce (Témoin)	Automne-Septembre
CK01-15	CK01-16	CK01-17	Eaux	Plaisance	Hiver-Janvier
CKTem01-15	CKTem01-16	CKTem01-17	Eaux	Plaisance (Témoin)	Hiver-Janvier
CK04-15	CK04-16	CK04-17	Eaux	Plaisance	Printemps-Avril
CKTem04-15	CKTem04-16	CKTem04-17	Eaux	Plaisance (Témoin)	Printemps-Avril
CK07-15	CK07-16	CK07-17	Eaux	Plaisance	Été-Août
CKTem07-15	CKTem07-16	CKTem07-17	Eaux	Plaisance (Témoin)	Été-Août
CK09-15	CK09-16	CK09-17	Eaux	Plaisance	Automne-Septembre
CKTem09-15	CKTem09-16	CKTem09-17	Eaux	Plaisance (Témoin)	Automne-Septembre
Sed01-15	Sed01-16	Sed01-17	Sédiments	Pêche	Hiver-Janvier
Sed04-15	Sed04-16	Sed04-17	Sédiments	Pêche	Printemps-Avril
Sed07-15	Sed07-16	Sed07-17	Sédiments	Pêche	Été-Août
Sed09-15	Sed09-16	Sed09-17	Sédiments	Pêche	Automne-Septembre

**PP:** Port de pêche; **PC:** Port de commerce; **CK:** Chott Kerkennah (Port de plaisance); **Sed:** Sédiment; **Tem:** Témoin.

Les échantillons des eaux de mer et des sédiments marins, ont été transférés dans des bouteilles en verres stériles et dans des sacs d'échantillonnage stériles, respectivement. Pour les études moléculaires, les échantillons des eaux de mer (1 litre) ont été filtrés à travers un filtre Millipore stérile (filtre EMD Millipore S-Pak GSWG047S6 en ester de cellulose de 0,22 µm de porosité et d'un diamètre de 47 mm) et congelés à -20 °C. Des aliquots des sédiments ont également été stockés dans des tubes Falcon stériles à -20 °C, avant l'extraction de l'ADN.

Les échantillons des eaux de mer ont été utilisés directement pour les analyses physico-chimiques. Par contre, les échantillons des sédiments ont subi un prétraitement, afin de déterminer: le pH, la conductivité électrique (CE), les minéraux, les métaux et les

hydrocarbures totaux. En effet, pour la mesure du pH et de la CE, une masse d'environ 10 g de sédiment diluée 10 fois par l'eau ultra-pure, a été soumise sous agitation mécanique pendant 24 h. Par la suite, une centrifugation à 4500 rpm pendant 20 minutes et une filtration sur des filtres Millipore (0,45  $\mu\text{m}$ ) ont été effectuées (Cazalet, 2012). Pour déterminer les minéraux et les métaux, une masse de 5 g de sédiment a été séchée, à 105 °C pendant 24 h, puis elle a été légèrement broyée dans un mortier d'agate, tamisée à 1 mm, et incubée à 600 °C pendant 2 h. Pour le dosage des hydrocarbures totaux, une quantité de 5 g d'échantillon a été séchée à 50 °C pendant 48 h, puis, elle a été mélangée et homogénéisée par tamisage à 1 mm.

## II. Analyses physico-chimiques des échantillons

### II.1. Mesure de la température et du pH

La température a été mesurée *in situ* à l'aide d'un thermomètre (JULABO). Le pH a été mesuré par électrochimie à l'aide d'un pH-mètre (IstekNeoMet) comportant une électrode sélective qui sera en contact de la solution en question.

### II.2. Conductivité électrique et salinité

La détermination de la conductivité électrique est une mesure indirecte de la salinité. La conductivité électrique a été mesurée à l'aide d'un conductimètre (CONSORT C831). L'unité de la conductivité électrique est le Siemens par mètre (S/m). La salinité est déterminée approximativement en multipliant la conductivité électrique par un facteur de correction qui dépend de la valeur de la conductivité. Pour une conductivité supérieure > 10000  $\mu\text{S}$ , le facteur de correction est = 0,85.

### II.3. Demande Chimique en Oxygène (DCO)

La demande chimique en oxygène (DCO) détermine la quantité globale de dioxygène requise pour l'oxydation des matières organiques et minérales contenues dans un échantillon par des oxydants chimiques forts (Rodier *et al.*, 1996). Elle permet d'évaluer la charge polluante. La DCO s'exprime en g d' $\text{O}_2$ /l.

La demande chimique en oxygène a été déterminée selon la méthode de Knechtel (1978). Une solution de dichromate de potassium en excès est utilisée comme agent chimique d'oxydation, en présence d'acide sulfurique, de sulfate d'argent et de du sulfate de mercure. Le sulfate d'argent joue le rôle de catalyseur de la réaction d'oxydation, alors que le sulfate de mercure joue le rôle de complexant pour les éventuels chlorures. L'échantillon dilué (2,5 ml)

est mélangé avec 1,5 ml d'une solution de bichromate de potassium (10,215 g de  $K_2Cr_2O_7$  + 8,5 g de  $HgSO_4$  + 250 ml  $H_2SO_4$  (18 M), q.s.p. 1000 ml eau) et 3,5 ml de  $H_2SO_4$  (18 M) contenant 10 g/l d' $AgSO_4$ . Le mélange réactionnel est emporté à ébullition dans un réacteur «Thermo BATH-ALB64, FNEPCR» à une température de 150 °C pendant 2 h. Après refroidissement, l'excès de dichromate de potassium est mesuré par spectrophotométrie à 600 nm et la DCO est déterminée grâce à une courbe étalon. La courbe d'étalonnage est réalisée avec de l'hydrogénophthalate de potassium ( $C_8H_5KO_4$ ), à différentes concentrations de 0 g/l à 0,8 g/l, après application de la procédure dans les mêmes conditions.

#### II.4. Demande Biologique en Oxygène (DBO<sub>5</sub>)

La demande biologique en oxygène est la quantité d'oxygène nécessaire aux microorganismes pour assimiler les substances organiques (biodégradables) par voie biologique. Généralement, elle est calculée au bout de cinq jours et exprimée en g d' $O_2$ /l. La DBO<sub>5</sub> permet d'évaluer la fraction biodégradable de la charge polluante carbonée (Rodier *et al.*, 1996). Elle est mesurée dans une enceinte tempérée et ventilée à 20 °C (BSB-Controller Model 620T (WTW)), fonctionnant selon le principe barométrique qui repose sur une mesure de pression.

Le principe de la méthode respirométrique se résume comme suit: Le  $CO_2$  issu de l'oxydation totale de la matière organique est adsorbé par des pastilles de KOH ce qui crée une dépression dans le flacon. Un manomètre détecte cette dépression et la conversion en DBO est alors possible sachant le volume de l'échantillon, la dilution, et un facteur fourni par le constructeur, qui dépend du volume total utilisé dans le flacon.

#### II.5. Carbone organique total (COT)

La mesure du carbone organique total (COT) a été effectuée en utilisant un analyseur du COT, SHIMAZDZU  $V_{CPH}$ , en deux étapes :

- **Carbone total (CT):** L'échantillon (50  $\mu$ l) à analyser est injecté dans un lit catalytique, constitué de billes de  $Pt/Al_2O_3$  et placé dans un four à 680 °C. Un balayage d'oxygène pur (débit 150 ml/min) permet une combustion totale du carbone sous forme de  $CO_2$ . Le gaz  $CO_2$  formé est détecté par un détecteur infrarouge (IR) qui fournit un signal. Une courbe d'étalonnage présentant l'aire du pic en fonction de la concentration en hydrogénophthalate de potassium (mg/l) permet la détermination de la valeur du carbone total (CT).

- **Carbone inorganique (CI):** Une autre fraction de l'échantillon (35 µl) est injectée dans une solution d'acide phosphorique H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> à 25% qui convertit les hydrogénocarbonates et carbonates en CO<sub>2</sub>. Le gaz formé est entraîné vers le même détecteur. On obtient ainsi la valeur du CI de l'échantillon (mg/l). Le produit utilisé pour l'étalonnage est l'hydrogénocarbonate de sodium. La différence entre CT et CI donne la valeur du COT.

## II.6. Détermination de l'azote total Kjeldahl (NTK)

L'azote total est estimé selon la méthode de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883). Les matières organiques sont dans une première étape, minéralisées avec l'acide sulfurique à chaud et en présence d'un catalyseur de minéralisation (mélange de sélénium, Merck). Le carbone se dégage sous forme de gaz carbonique, l'hydrogène sous forme d'eau et l'azote sous forme de sulfate d'ammonium. L'ammoniaque, est ensuite libérée par addition de la soude (10 N) et elle est recueillie dans de l'acide borique (20 g/l). L'ammoniaque est alors dosée par une solution d'acide sulfurique (0,1 N). Les résultats sont exprimés en milligrammes d'azote par litre selon la formule suivante :

$$NTK(mg/l) = \frac{V_1 * C * 1000 * 14}{V}$$

$V_1$  : Volume en ml de l'acide sulfurique;  $V$  : Volume en ml de la prise d'essai;  $C$  : Normalité de l'acide sulfurique (0,1N).

## II.7. Dosage des minéraux et des métaux lourds

Le dosage des minéraux et des métaux lourds est précédé d'une destruction totale de la matière organique présente dans l'échantillon à analyser. Cette destruction est effectuée par une attaque acide et à haute température (100 °C) utilisant successivement, l'acide chloridrique (37%) et l'acide nitrique (65%) jusqu'à décoloration totale.

Le dosage des ions Fe, Zn, Cu, Ni, Mn, Cr, Cd, Na, Ca, Mg et K est effectué par spectrométrie d'absorption atomique moyennant un appareil A Analyst 200, PerkinElmer.

## II.8. Dosage des hydrocarbures totaux

En se basant sur la nature de l'échantillon testé (liquide ou solide), la détermination de la teneur des hydrocarbures totaux est réalisée selon deux protocoles différents, à savoir l'extraction en phase liquide et celle en phase solide.

### II.8.1. Extraction en phase liquide

Les échantillons des eaux de mer sont soumis à des extractions par le dichlorométhane (DCM) répétées 3 fois. Tout d'abord, 50 ml de l'échantillon sont récupérés dans une ampoule à décanter de 250 ml, auxquels sont ajoutés 50 ml du solvant. Après une forte agitation, on laisse décanter le mélange pendant 15 min. La phase organique située au-dessous est récupérée dans un ballon de 500 ml, pesé à vide ( $m_0$ ), et par la suite séchée par l'évaporateur rotatif (Rotavap) à 45 °C. Après séchage, le ballon sera pesé de nouveau ( $m_1$ ).

### II.8.2. Extraction en phase solide (Soxhlet)

L'extraction en phase solide a été réalisée pour le dosage du contenu total en HC dans les échantillons des sédiments. La technique utilisée au laboratoire est l'extraction par le dispositif Soxhlet.

Le solvant hydrophobe, le dichlorométhane (300 ml), est porté à ébullition, les vapeurs montent jusqu'au réfrigérant où elles se condensent et tombent sur la cartouche en cellulose contenant 5 g du sédiment séché. A ce stade, le solvant extrait les polluants présents dans le sédiment. Lorsque le solvant atteint un certain niveau, un système de siphon provoque le retour du volume total de solvant au contact de la cartouche cellulose vers le ballon qui a été pesé à vide ( $m_0$ ).

La cartouche se remplit de nouveau avec du solvant propre puisque la pollution extraite précédemment reste dans le ballon. L'extraction est terminée lorsque les condensats qui retombent sur la cartouche deviennent clairs. La phase organique ainsi obtenue sera séchée par l'évaporateur rotatif (Rotavap) à 45 °C, et le ballon sera pesé ( $m_1$ ).

Le dosage du contenu total en HC (eaux ou sédiments) est déterminé comme suit :

$$HC (mg/l) = m1 - m0$$

Les extraits obtenus sont analysés par la suite en chromatographie en phase gazeuse associée à la spectroscopie de masse (GC/MS).

## III. Approche moléculaire PCR-SSCP

Une approche de non-cultivabilité, basée sur la technique de la SSCP (Single Standard Confirmation Polymorphism), a été employée afin d'étudier la composition de la communauté microbienne au sein de différents échantillons étudiés.



### **III.1. Préparation des échantillons**

#### **III.1.1. Eaux de mer**

Dans un but de concentration et par conséquent d'augmenter la quantité de la microflore présente à étudier, les échantillons des eaux de mer (1 litre) ont été filtrés à travers un filtre Millipore stérile (0,22 µm de porosité). Ces filtres qui ont retenu les microorganismes ont été congelés à -20 °C. La moitié du filtre congelé a été découpée, à l'aide d'un scalpel, en des petits morceaux qui ont été déposés dans des tubes eppendorf stériles de 2 ml. Des volumes de 385 µl de guanidine thiocyanate 4 M Tris-HCl pH 7,5 et 115 µl de N-Lauryl sarcosine (N-LS) 10% ont été ajoutés dans le tube contenant le filtre découpé.

#### **III.1.2. Sédiments marins**

Une masse de 500 mg de sédiment a été broyée avec un pilon dans un mortier stérile, en ajoutant 3 ml d'une solution de guanidine thiocyanate 4 M Tris-HCl pH 7,5 et 900 µl de N-Lauryl sarcosine (N-LS) 10%.

### **III.2. Extraction des ADNs totaux**

L'extraction des ADNs totaux à partir des échantillons environnementaux (eaux et sédiment marin) débute par la lyse cellulaire en ajoutant 500 µl d'une solution de LS 5% tampon phosphate pH 8 aux échantillons placés dans les tubes eppendorfs stériles de 2 ml et en chauffant le mélange à 95 °C pendant 10 min. Les échantillons sont mis ensuite dans la glace. Un volume de 500 µl d'un mélange de billes MP Bio (Lysing Matrix E) sont ajoutés dans les tubes qui sont par la suite placés dans un vibro-broyeur MP Bio pendant 30 sec. Une masse de 15 mg de polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) sont introduits afin d'éliminer les acides humiques qui sont des inhibiteurs de la réaction PCR dans l'étape suivante. Après des étapes de lavages en utilisant une solution de TENP (Tris-Cl pH8, 50 mM; EDTA pH 8, 20 mM; NaCl 100 mM et PVPP, 1%), l'ADN est précipité par l'isopropanol. La purification de l'ADN est réalisée moyennant une micro-colonne du kit QIAmp (QIAGEN Hilden, Allemagne), en suivant le protocole fourni par le fabricant. Une estimation de la quantité d'ADN est effectuée par un lecteur de microplaque avec spectrophotomètre Nano Quant infinite M200 (Tecan) à 260 nm. L'ADN ainsi extrait et récupéré dans l'eau pure stérile, est conservé à -20 °C.

### III.3. Amplification pour réalisation de la SSCP

Des réactions de PCR pour amplifier des régions variables de l'ARNr 16S (V3), dans le cas des domaines «*Bacteria*» et «*Archaea*» (environ 200 pb), et des régions variables codantes pour des petites sous-unités de l'ARNr 18S (environ 300 pb), dans le cas du domaine «*Eucarya*», ont été réalisées sur les ADNs totaux issus de chaque échantillon des eaux de mer et des sédiments marins. Les amorces (W49F, W104R), (W274F, W275R) et (W16F, W131R) ont été utilisées pour étudier les domaines *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*, respectivement (Tableau 9).

**Tableau 9.** Amorces utilisées pour la PCR-SSCP des domaines *Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*.

Amorces	Séquences (sens 5'-3')	Position dans <i>E. Coli</i>	Cible Gène codant pour
<b>W49F</b>	ACGGTCCAGACTCCTACGGG	F330	ARNr16S <i>Bacteria</i>
<b>W104R</b>	FAM-TTACCGCGGCTGCTGGCAC	R533	ARNr16S <i>Bacteria</i>
<b>W274F</b>	CCCTACGGGGCGCAGCAG	F340	ARNr16S <i>Archaea</i>
<b>W275R</b>	FAM-TTACCGCGGCGGCTG	R519	ARNr16S <i>Archaea</i>
<b>W16F</b>	CTTAATTTGACTCAACACGG	F960	ARNr18S <i>Eucarya</i>
<b>W131R</b>	FAM-GGGCATCACAGACCTGTT	R1195	ARNr18S <i>Eucarya</i>

F: amorce sens; R: amorce anti-sens; FAM: Fluorophores ou Fluorochromes.

Chaque réaction a été réalisée dans des tubes de PCR de 0,2 ml contenant chacun: 1x tampon ADN polymérase Pfu Turbo (MTP™ Taq DNA Polymerase, SIGMA-ALDRICH); 200 µmol/l de chaque dNTP (Promega, Madison, USA); 0,5 µmol/l de chaque amorce; 1,25 U ADN polymérase Pfu Turbo (MTP™ Taq DNA Polymerase, SIGMA-ALDRICH) et 1 µl de l'ADN génomique (ADNs totaux issus de l'échantillon environnemental) à amplifier. Le volume final est ajusté à 50 µl avec q.s.p. d'eau pure stérile. Les programmes de différents PCR réalisées sont détaillés dans les tableaux suivants:

**Tableau 10.** Programme des cycles de la PCR-SSCP pour l'étude des domaines *Bacteria* et *Archaea*.

Nombre de cycles	Etape	Température (°C)		Durée
		<i>Bacteria</i>	<i>Archaea</i>	
1	Dénaturation initiale	94		2 min
25	Dénaturation	94		30 s
	Hybridation	61	65	30 s
	Elongation	72		30 s
1	Elongation finale	72		10 min

**Tableau 11.** Programme des cycles de la PCR-SSCP pour l'étude du domaine *Eucarya*.

Nombre de cycles	Etape	Température (°C)	Durée
1	Dénaturation initiale	94	1 min
30	Dénaturation	94	1 min
	Hybridation	50	1 min
	Elongation	72	1 min
1	Elongation finale	72	10 min

### III.4. SSCP

Les fragments des ADNs obtenus après PCR (1  $\mu$ l) sont mélangés avec du formamide (agent dénaturant) (18  $\mu$ l) et un étalon interne (Genescan-400HD Rox, Applied Biosystems) (1  $\mu$ l). Le mélange est dénaturé par chauffage à 95 °C pendant 5 min, puis il est refroidi rapidement dans l'eau glacée pendant 10 min. L'électrophorèse SSCP a été effectuée sur un analyseur automatique d'ADN, ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). Les tubes capillaires (47\*50  $\mu$ m) étaient automatiquement remplis pour chaque analyse avec un polymère (5,6% polymère Genescan (Applied Biosystems) 10% glycérol et 1\*TBE. Les conditions électrophorétiques étaient de 12KV et 32 °C pendant 30 min. Au cours de la migration, les fragments d'ADN simples brins prennent une conformation secondaire stable par appariement au niveau des zones des séquences complémentaires. Les profils SSCP sont alignés et normalisés avec le logiciel SAFUM, version 4.4 fonctionnant sur Matlab7.4.0 (Chamkha *et al.*, 2008; Mnif *et al.*, 2012).

### IV. Pyroséquençage

Dans le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire IRD de Microbiologie de Marseille (Dr. Bernard Ollivier), la méthode moléculaire de pyroséquençage a été appliquée sur un échantillon de sédiment marin contaminé par des hydrocarbures et provenant du port de pêche de Sfax (PP-01-2013). Les mélanges d'amplicons du gène de l'ARNr 16S ont été générés à partir des amorces bactériennes 341F/815R et séquencés sur un séquenceur 454 GSFLX Titanium (Roche Life Sciences, États-Unis) par le laboratoire de recherche moléculaire MDNA (Texas, États-Unis). Les données de séquences brutes générées par pyroséquençage ont été téléchargées dans QIIME 1.8.0. L'assignation taxonomique a été réalisée selon la base de données GREENGENE (Caporaso *et al.*, 2010; Mei *et al.*, 2016).

## V. Illumina MiSeq

L'étude de la composition de la communauté microbienne au sein de certains échantillons des eaux de mer (CK01-17; CKTem01-17; PC01-17; PCTem01-17; PP01-17 et PPTem01-17), a été réalisée, en utilisant la technique moléculaire Illumina MiSeq. Pour ce faire, le couple d'amorces 515-532U et 909-928U, a été utilisé pour amplifier la région V4-V5 du gène de l'ARNr 16S. Ce couple d'amorces cible à la fois les gènes de l'ARNr 16S des bactéries et des archées. Des séquences d'indexation ont été ajoutés dans la deuxième PCR de 12 cycles et les produits résultants ont été purifiés et chargés sur la cartouche Illumina MiSeq pour le séquençage de lectures appariées de 300 pb suivant les instructions du fabricant (v3 chemistry). Le séquençage a été réalisé au centre du génome et du transcriptome du réseau Genotoul Lifescience à Toulouse, en France ([get.genotoul.fr](http://get.genotoul.fr)). Les données générées par MiSeq ont été analysées avec la version 1.35.0 de Mothur. L'affiliation taxonomique des séquences d'ARNr 16S a été générée en utilisant la base de données SILVA SSURef NR99, version 119 (Venkiteshwaran *et al.*, 2016).

## VI. Composition des milieux de culture

### VI.1. Milieu LB

La composition d'un litre de milieu LB (Luria-Bertani) liquide est: peptone, 10 g ; NaCl 10 g; et extrait de levure, 5 g. Le pH du milieu est ajusté à 7-7,2 avec une solution du NaOH 1M. Pour un milieu LB solide, il s'agit de la même composition que le milieu LB liquide avec l'ajout de l'agar à 18 g/l. Après stérilisation par autoclavage à 121 °C pendant 20 min, le milieu est refroidi jusqu'à environ 50 °C et écoulé dans des boîtes de Petri disposées sous une hotte à flux laminaire (FluFrance, France).

### VI.2. Milieu BN (Bouillon nutritif)

Le milieu BN (Bouillon nutritif) liquide est composé de (pour 1 litre): peptone, 15 g; extrait de levure, 3 g; glucose, 1 g; et NaCl 6 g. Le pH du milieu est ajusté à 7,5 avec une solution du NaOH 1M.

### VI.3. Milieu MH (Muller-Hinton)

La composition du milieu MH (Muller-Hinton) pour un litre est la suivante: extrait de viande, 2 g; hydrolysate de caséine, 17,5 g; et amidon, 1,5 g. Le pH du milieu est ajusté à 7-7,2 avec une solution du NaOH 1M.

#### VI.4. Milieu de base (MB)

La composition d'un litre du milieu minimum est la suivante:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,3 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,3 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,4 g;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,05 g;  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,33 g;  $\text{NaCl}$ , 30 ou 100g; et solution d'oligo-éléments, 1 ml. Le pH du milieu de culture est ajusté à 7-7,2 avec une solution de  $\text{NaOH}$  1M.

La solution d'oligo-éléments est composée de:  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 g;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,19 g;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g;  $\text{ZnCl}_2$ , 0,07 g;  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,036 g;  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,024g; et  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,006 g dans un litre d'eau ultra-pure (Imhoff-Stuckle *et* Pfenning, 1983). Elle est stérilisée par autoclavage à 121 °C pendant 20 min et est stockée à l'abri de la lumière et à 4 °C.

#### VI.5. Milieu proposé par O'Toole

Le milieu proposé par O'Toole (2011), utilisé pour évaluer les activités anti-biofilm et antiadhésive des biosurfactants, est composé de (pour 1 litre): glucose, 2 g; acide casamino, 5 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 7 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 g; et  $\text{MgSO}_4 (7\text{H}_2\text{O})$ , 0,12 g.

### VII. Hydrocarbures, huiles et autres

Les hydrocarbures liquides aliphatiques (Octane, décane et hexadécane), ainsi que les aromatiques monocycliques (BTEX: benzène, toluène, éthylbenzène, *p*-, *m*-, *o*-xylènes) ont été directement ajoutés dans le milieu de culture à une concentration de 0,5% (v/v). D'autres composés monoaromatiques: acide protocatéchique, acide gentisique, acide vanillique, acide syringique, acide gallique, acide caféique, acide ferulique, phénol et tyrosol ont été préparés dans des solutions aqueuses (eau ultra-pure) à 250 mM et testés à une concentration finale de 5 mM. Les composés aromatiques acides ont été neutralisés avec du  $\text{NaOH}$ . Les hydrocarbures polyaromatiques sous formes solide (naphtalène, phénanthrène, fluoranthène et pyrène) ont été solubilisés dans de l'acétate d'éthyle à 100 g/l, puis ajoutés dans les milieux de culture à la concentration finale désirée (200 mg/l). Les hydrocarbures complexes, pétrole brut, mazout, huile de moteur et huile de moteur usée; les huiles végétales, huile d'olive, huile de maïs et huile de friture résiduelle, ainsi que le glycérol ont été ajoutés à une concentration finale de 1% (v/v). Les margines et le lactosérum ont été testés à une concentration de 2% (v/v). Le lait en poudre périmé (LPP) et la mélasse ont été ajoutés dans les milieux de cultures à une concentration finale de 20 g/l.

Le pétrole brut provient de la société pétrolière TPS (Tyna Petroleum Services). Le mazout et l'huile de moteur ont été importés à partir de la compagnie Shell (Sfax, Tunisie). L'huile de friture résiduelle a été collectée à partir des huiles alimentaires domestiques usagées. La margine provient d'un bassin de récupération des margines de la Société de Services des Huileries (SSH) de Agareb, Sfax. Le lait en poudre périmé (MODULAC) provient de la Pharmacie Centrale (Sfax, Tunisie). Le lactosérum a été délivré par la Société AGROMED, Amra, Sfax. La mélasse a été collectée à partir de la Société Tunisienne du Sucre (STS) de Béja. Les composés aromatiques et aliphatiques, ainsi que le glycérol, sont de la marque Sigma Aldrich (98 à 99% de pureté).

Les composés aromatiques, le mazout, l'huile de moteur, les huiles végétales et le lactosérum, ont été stérilisés par filtration (filtre Millipore, porosité 0,22  $\mu\text{m}$ ), et conservés dans des flacons de pénicilline à 4 °C et à l'abri de la lumière. Par contre, le pétrole brut, l'huile de moteur usée, la mélasse, les margines, le lait en poudre périmé ont été stérilisés par autoclavage (121 °C, 20 min).

### **VIII. Cultures par enrichissements**

Des cultures par enrichissements ont été réalisées pour sélectionner des bactéries aérobies, qui sont capables de dégrader des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (naphtalène, phénanthrène, fluoranthène et pyrène) ou de pétrole brut (PB), en présence de différentes concentrations en NaCl (0 à 150 g/l) et à deux températures 37 °C (pour les mésophiles) et 55 °C (pour les thermophiles). Des erlenmeyers (250 ml) contenant 45 ml du milieu de base MB, en présence du composé choisi comme source de carbone et d'énergie (HAPs: 200 mg/l; PB : 1% (v/v)), ont été inoculés avec 5 ml (10%, v/v) de l'échantillon des eaux de mer contaminées par des hydrocarbures provenant du port de pêche de Sfax (Janvier 2013) ou par 0,5 g (1%, m/v) de sédiments contaminés par des hydrocarbures provenant également du port de pêche de Sfax (Janvier 2013). Les cultures ont été incubées dans des shakers à 37 °C et 55°C, sous une agitation de 180 rpm. Pour les enrichissements classés comme étant positifs, suite au suivi de la biomasse (DO 600 nm) et des observations microscopiques, des repiquages successifs (inoculation à 5%, v/v) ont été entrepris dans les mêmes conditions, après 7 jours d'incubation.

### **IX. Isolement des bactéries hydrocarbonoclastes**

Les isolements bactériens ont été réalisés à partir de la dernière culture par enrichissement positive. Des séries de 8 à 10 dilutions successives au  $1/10^{\text{ème}}$  dans de l'eau

physiologique stérile (0,9%, m/v, NaCl) ont été réalisées et servies pour ensemercer par étalement en surface des boîtes de Petri contenant le milieu de base gélosé additionné du substrat qui constitue la source de carbone assimilée par la bactérie recherchée. Les boîtes ont été incubées dans l'étuve à la même température de l'enrichissement correspondant, pendant 2 à 3 jours. Des colonies formées séparées ont été alors prélevées et remises en suspension dans le milieu de culture liquide contenant toujours le substrat cible comme source de carbone. Ce protocole est ainsi répété jusqu'à l'obtention de colonies pures qui sont alors identifiées comme des souches pures, après des vérifications par des observations microscopiques.

## **X. Croissance bactérienne**

### **X.1. Mesure de la densité optique**

La croissance bactérienne est suivie en fonction du temps d'incubation de la culture à 180 rpm, à 37 ou 55 °C, par mesure de la densité optique des cultures au spectrophotomètre UV/ visible (Shimadzu UV 2.0-1650 PC), à une longueur d'onde de 600 nm.

### **X.2. Dénombrement sur milieu solide**

À partir de la culture sur milieu liquide, on pratique des dénombrements des colonies sur milieux LB solides, en fonction de différents temps d'incubation, au moyen de la méthode de dilutions en cascade. Cent microlitres de chaque dilution au  $1/10^{\text{ième}}$  sont ensuite étalés sur des boîtes de Petri contenant le milieu gélosé LB standard qui seront incubées à la température adéquate avant le comptage des colonies. Les résultats sont exprimés en log CFU (Colonie Formant une Unité) par ml, en fonction du temps d'incubation.

## **XI. Conservation des souches bactériennes**

Concernant la conservation de courte durée, des repiquages en stries à partir des cultures en phase exponentielle de croissance, sont réalisées sur des boîtes de Petri contenant le milieu riche (LB). Ces boîtes sont conservées à 4 °C pour une future utilisation. Par ailleurs, la conservation de longue durée est réalisée à partir d'une culture en phase exponentielle de croissance, par congélation à -80 °C en présence du glycérol à 20% (v/v).

## **XII. Caractérisation phénotypique des souches bactériennes**

### **XII.1. Etude morphologique des isolats**

#### **XII.1.1. Observation macroscopique**



Après repiquage et incubation (24 h) sur milieu LB solide en boîte de Petri, des colonies pures subissent une étude de leur forme, leur taille, leur surface, leur transparence, leur consistance et leur couleur.

### **XII.1.2. Observation microscopique**

L'examen microscopique à l'état frais permet de déterminer la morphologie des bactéries, leur mode de groupement et leur mobilité. Ces caractéristiques sont directement observées au microscope optique à contraste de phase, équipé d'un appareil photo (Olympus PM-C35, DX), après dépôt d'une goutte d'une culture bactérienne, en phase exponentielle de croissance, entre lame et lamelle.

### **XII.2. Coloration de Gram**

Une suspension bactérienne est étalée sur une lame en verre propre, puis séchée et fixée à la flamme. La lame est recouverte pendant une minute par le réactif N°1 (2% cristal violet, 20% alcool éthylique et 0,8% oxalate d'ammonium), puis lavée doucement à l'eau. La préparation est ensuite recouverte par le réactif N°2 (1,3% iode, 2% iodure de potassium et 10% polyvinyl pyrrolidone) pendant une minute, et de même lavée doucement à l'eau. Le réactif N°3 (50% alcool absolue et 50% acétone) est ajouté, par la suite, pour la décoloration. Enfin, après recouvrement de la lame par le réactif N°4 (0,25% safarine et 10% alcool) pendant une minute, un lavage doux avec de l'eau pure est réalisé avant séchage de la lame, puis, une observation au microscope (Objectif 100 × à l'huile d'immersion) est effectuée. Les bactéries à Gram positif apparaissent alors violettes et les bactéries à Gram négatif se recolorent en rose.

### **XII.3. Test oxydase**

Le N-diméthyl paraphénylène diamine (PDA) est utilisé comme réactif, généralement imprégné sur des disques (disques oxydases) pour mettre en évidence l'enzyme phénylène diamine oxydase des bactéries, à partir de leur culture sur milieu gélosé. Un de ces disques est placé sur une lame et une colonie sur milieu LB solide y est déposée avec une pipette Pasteur. S'il y a apparition d'une tache violette au bout de 30 secondes, la bactérie est oxydase + et elle possède le cytochrome oxydase. Dans le cas contraire, la bactérie est oxydase - et elle ne possède pas l'enzyme respiratoire (cytochrome oxydase).

#### XII.4. Test catalase

Une goutte de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est déposée sur une lame propre, puis, elle est mise en contact avec une colonie isolée sur milieu LB solide, prélevée directement avec une pipette pasteur boutonnée. L'apparition des bulles indique que la bactérie possède la catalase. Par contre, l'absence des bulles indique que la bactérie ne possède pas l'enzyme.

#### XII.5. Galerie API

Des études biochimiques pour les trois souches bactériennes isolées (FLU5, NAPH6 et CO100) ont été entamées en utilisant les Galeries API 50 CHB et API 20E pour FLU5, API 20NE pour NAPH6, et API Staph pour CO100.

La galerie 50 CHB/E Medium est destinée à l'identification des *Bacillus* et apparentés et des *Bacilles* à Gram négatif appartenant aux *Enterobacteriaceae* et *Vibrionaceae*. Ce test permet l'étude de la fermentation des 49 sucres de la galerie API 50 CHB. La lecture de ces réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture et d'identification, après incubation durant 24 et 48 h à 37 °C. Les microtubes sont inoculés avec la suspension bactérienne préparée, qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de l'API 50 CHB se fait en cherchant dans chaque tube l'acidification produite qui se traduit par le virage au jaune du rouge de phénol contenu dans le milieu. Pour le test esculine (tube n° 25), on observe un virage du rouge au noir.

La galerie API 20E comporte 21 tests biochimiques miniaturisés. Les tests d'assimilation sont inoculés et les bactéries croissent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat déshydraté présent dans le microtube. La galerie API 20E, peut être utilisée en complément de la galerie API 50 CHB. Elle est optionnelle pour *Bacillus* et apparentés, mais indispensable pour *Enterobacteriaceae* et *Vibrionaceae*.

La galerie API 20 NE comportant 20 micro-tubes contenant des substrats déshydratés est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (exp. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.).

La galerie API Staph comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec la suspension bactérienne CO100 réalisée en «API Staph Medium» qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de

ces réactions se fait à l'aide d'un tableau de lecture et d'identification, après incubation durant 24 h et 48 h à 37 °C.

## **XII.6. Détermination des conditions optimales de croissance**

Les conditions optimales de croissance de la souche étudiée sont déterminées en mesurant la vitesse spécifique de croissance (sur un milieu LB) et en faisant varier l'un des paramètres suivants : pH, température et salinité du milieu. La vitesse spécifique maximale de croissance  $\mu_{max}$  (exprimée en  $h^{-1}$ ) est la vitesse mesurée pendant la phase exponentielle de croissance, et qui correspond à la pente de la droite :

$$\text{Log}(DO) = \mu_{max} \times (\text{temps d'incubation}) + \text{Log}(DO t_0)$$

Où  $t_0$  est le temps initial d'incubation.

La cinétique de croissance de la souche bactérienne est suivie par mesure de la densité optique à 600 nm. Le temps de génération correspond au temps nécessaire au dédoublement d'une population microbienne et correspond théoriquement à  $Tg = \text{Ln } 2 / \mu_{max}$ .

### **XII.6.1. Effet du pH sur la croissance**

Le pH optimal de croissance est déterminée par le calcul de la vitesse maximale de croissance pour des cultures réalisées sur un milieu LB à 37 °C, en présence de 30 g/l NaCl et des pH de: 3,2; 4,5; 6; 7,1; 8,5; 9,3; 10,6 et 12 pour la souche FLU5; 2,2; 3,2; 4,3; 5,2; 6,1; 7,1; 8,3; 9,2; 10,5 et 12 pour la souche NAPH6; 2,5; 4,2; 5,1; 6,3; 7,1; 8,6; 10,2 et 11,5 pour la souche PYR2 et 2,7; 4,2; 5,5; 7,2; 8,1; 9,1; 10,6; 12 pour la souche CO100. Les pH sont ajustés soit en ajoutant d'une solution de HCl 0,5 M, soit en ajoutant d'une solution de NaOH 1M. Les inocula (4%, v/v) proviennent des pré-cultures correspondantes réalisées dans les mêmes conditions.

### **XII.6.2. Effet de la température sur la croissance**

La température optimale de croissance est déterminée par le calcul de la vitesse maximale de croissance pour des cultures réalisées sur milieu LB à pH 7, en présence de 30 g/l NaCl et aux températures suivantes: 8, 15, 20, 25, 30, 37, 40 et 55 °C pour la souche FLU5; 10, 20, 25, 30, 37, 45 et 55 °C pour la souche NAPH6; 10, 15, 20, 30, 37, 45, 55 et 60 °C pour la souche PYR2 et 10, 20, 30, 37, 45, 50 et 55 °C pour la souche CO100.

### **XII.6.3. Effet de la concentration en NaCl sur la croissance**

Afin d'étudier l'influence de la salinité sur la croissance de la souche isolée, la vitesse maximale de croissance en présence du milieu LB, à 37 °C et à pH 7, a été mesurée en

fonction de différentes concentrations en NaCl: 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120 et 150 g/l pour la souche FLU5; 0, 10, 30, 50, 60, 70, 80, 100 et 120 g/l pour la souche NAPH6; 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 et 120 g/l pour la souche PYR2 et 0, 10, 30, 60, 80, 100, 120, 150, 200, 250 et 300 g/l, pour la souche CO100,.

### **XII.7. Test de résistance à la chaleur**

Des cultures bactériennes en phase exponentielle de croissance sont incubées successivement à 80, 90 et 100 °C pendant 10 minutes. Chaque culture qui a subi le choc thermique est ensuite repiquée dans le milieu LB frais et inoculée à sa température optimale de croissance. Une éventuelle croissance, vérifiée suite au suivi de la DO à 600 nm, témoigne de l'existence d'une forme de résistance à la chaleur. La présence des spores est confirmée par la visualisation de la culture au microscope optique.

### **XIII. Etude phylogénétique**

L'analyse phylogénétique des souches isolées FLU5, NAPH6, PYR2 et CO100 est réalisée par comparaison de la séquence du gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) avec les séquences déposées dans la banque de gènes (GenBank). Plusieurs étapes sont nécessaires pour cette étude phylogénétique.

#### **XIII.1. Extraction de l'ADN génomique**

La culture bactérienne en phase exponentielle de croissance (10 ml) est centrifugée pendant 5 min à 12000 rpm. Après avoir ôté le surnageant, le culot est resuspendu dans 487 µl du tampon Tris-EDTA (TE) (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) et 40 µl de lysozyme à une concentration de 20 mg/ml, pour détruire les parois cellulaires. Après incubation pendant 1 h à 37 °C, on ajoute 30 µl de dodécylsulfate de sodium (SDS) à une concentration de 10% et 5 µl de protéinase K à 20 mg/ml. Le mélange est incubé 1 h à 50 °C. Par la suite, 100 µl du NaCl (5 M) sont ajoutés avec 800 µl CTAB/NaCl (10% de Cétyle Triméthyle Ammonium Bromide (CTAB) dans une solution NaCl 0,7 M). L'ensemble est mélangé en retournant le tube et incubé 10 min à 65 °C.

Afin de séparer l'ADN des protéines, on ajoute 750 µl du chloroforme/alcool *iso*-amylique dans les proportions 24:1 (v/v), on mélange vigoureusement et on centrifuge pendant 5 min à 14000 rpm. Le surnageant obtenu est transféré dans un tube Eppendorf de 1,5 ml propre et stérile en faisant attention de ne pas prendre l'interface blanche. L'ajout de 300 µl de phénol et de 300 µl de chloroforme/alcool *iso*-amylique (24:1 (v/v)) est suivi d'une

centrifugation 5 min à 14000 rpm. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube. Pour précipiter l'ADN, on ajoute 600 µl d'isopropanol froid et on incube les tubes dans la glace pendant 30 min. Le culot obtenu après centrifugation pendant 10 min à 14000 rpm, est lavé avec 500 µl d'éthanol à 70%. Après avoir recentrifugé 10 min à 14000 rpm, le culot est séché sous vide pour enlever toute trace d'alcool.

Pour dégrader les ARNs, le culot obtenu est resuspendu dans 200 µl de tampon TE (Tris-EDTA) contenant 1 µl RNase (20 mg/ml) et le tube est incubé pendant 1 h à 37 °C. Ensuite on rajoute 300 µl phénol + 300 µl chloroforme/alcool *iso*-amylique (24:1 (v/v)) et on centrifuge pendant 5 min à 14000 rpm. Le surnageant obtenu est précipité avec 600 µl d'isopropanol. Après incubation dans la glace pendant 30 min, on effectue la centrifugation pendant 10 min à 14000 rpm. Le culot obtenu est suspendu dans 20 µl d'eau stérile et l'ADN génomique extrait est conservé à -20 °C.

### **XIII.2. Electrophorèse de l'ADN**

Afin d'analyser l'ADN génomique extrait, on réalise l'électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% (m/v) dans le tampon TAE 1X (4,84 g de Tris base, 1,14 ml d'acide acétique glacial et 0,74 g d'EDTA-Na<sub>2</sub> par litre d'eau) contenant 4 µl/25 ml de bromure d'éthidium (BET).

Le marqueur de taille utilisé est *lambda* Hind III dont la taille de bandes varie de 1000 pb à environ 23000 pb. Cette étape nous permet d'optimiser les dilutions à réaliser de l'ADN génomique pour amplifier le gène de l'ARN ribosomal 16S.

### **XIII.3. Amplification par PCR (Réaction de Polymérisation en Chaîne) du gène codant pour l'ARNr 16 S**

Le principe de cette technique consiste à amplifier une séquence définie d'ADN du génome en le multipliant un grand nombre de fois grâce à une ADN polymérase. Les amorces nucléotidiques universelles Fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') sont utilisées afin d'amplifier le gène de l'ARNr 16S et obtenir un produit PCR de taille approximative de 1,5 kb (Winker *et* Woese, 1991).

#### ➤ *Appareillage :*

Robocycler 96 Accessories (Stratagene).

#### ➤ *Mélange réactionnel :*

Le mélange réactionnel des réactions PCR pour chaque souche est détaillé dans le tableau 12.

Tableau 12. Mélange réactionnel de différentes réactions PCR.

	Souche FLU5	Souche NAPH6	Souche PYR2	Souche CO100
Tampon (TP)	(TOP TAQ) ; 2,5µl	(Bio Basic) ; 2,5µl	(Promega) ; 5 µl	(Dream TAQ) ; 3 µl
dNTPs	(10 mM); 0,5 µl	(10 mM); 0,5 µl	(10 mM); 0,5 µl	(10 mM); 0,5 µl
Amorce Fd1	(10 µM); 0,5 µl	(10 µM); 0,5 µl	(10 µM); 0,5 µl	(10 µM); 0,5 µl
Amorce 1492R	(10 µM); 0,5 µl	(10 µM) ; 0,5 µl	(10 µM) ; 0,5 µl	(10 µM) ; 0,5 µl
Taq DNA polymérase	(TOP TAQ) (5U/µl); 0,25 µl	(Bio Basic) (5U/µl); 0,1 µl	(Promega) (5U/µl); 0,12 µl	(Dream TAQ) (5U/µl); 0,12 µl
ADN	2 µl	3 µl	2 µl	4 µl
MgSO <sub>4</sub>	-	2,5 µl	-	-
MgCl <sub>2</sub>	-	-	2 µl	-
H <sub>2</sub> O distillée stérile	q.s.p 25 µl	q.s.p 25 µl	q.s.p 25 µl	q.s.p 25 µl

➤ PCR :

La réaction d'amplification consiste en une première étape de dénaturation de l'ADN génomique suivie par une succession d'étapes de dénaturation, appariement et élongation, au cours desquelles le fragment d'intérêt est multiplié en un très grand nombre de fois sous l'action de la polymérase. Au cours de l'appariement, les amorces oligonucléotidiques Fd1 et 1492R viennent se fixer spécifiquement au niveau des extrémités du gène codant pour l'ARNr 16S. La Taq DNA polymérase, en présence des quatre dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) va permettre une élongation des amorces fixées. La réaction est terminée par une dernière étape dont le but est d'achever toutes les élongations en cours. Le programme de la PCR est détaillé dans le tableau 13.

Tableau 13. Programme utilisé pour la réaction de la PCR.

Nombre de cycles	Étapes	Température (°C)	Durée
1	Dénaturation initiale	94	2 min
30	Dénaturation	94	30 s
	Hybridation	55	45 s
	Elongation	72	1 min 45 s
1	Etape finale d'élongation	72	10 min

#### XIII.4. Electrophorèse des produits de PCR

Les produits PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (1%, m/v) afin d'estimer leurs tailles et leurs concentrations en comparant les bandes obtenues avec celles du marqueur de taille (DNA Ladder 1 Kb, Promega ; Bandes : 250 pb, 500 pb, 750 pb, 1000 pb, 1500 pb, 2000 pb, 2500 pb, 3000 pb, 3500 pb, 4000 pb, 5000 pb, 6000 pb, 8000 pb et 10000 pb). À pH neutre, les fragments d'ADN sont chargés négativement et migrent vers l'anode.

Le produit PCR (5 µl) est déposé sur le gel, puis soumis à l'action d'un champ électrique de 100 mV pendant 30 min. Grâce à la présence du Bromure d'Ethidium (BET), ce dernier s'intercale entre les bases de l'ADN et émet une fluorescence orange de 254 à 365 nm. Les bandes de migration sont visualisées sous un rayonnement UV à l'aide d'un transilluminateur (Bioblock Scientific).

La purification des produits PCR a été réalisée en utilisant le Kit Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, selon le protocole fourni par le fabricant.

### **XIII.5. Séquençage et analyse phylogénétique**

Les réactions pour séquençage ont été réalisées dans un volume final de 20 µl contenant 2 à 8 µl (100 à 300 ng) du produit de PCR purifié, 2 µl du tampon de l'enzyme séquenase (5X) (Thermo Fisher Scientific), 4 µl du kit thermofisher (Big Dye Terminator v1.1) (contenant : séquenase, dNTP et ddNTP marqués) et de l'eau désionisée. Le programme de la réaction de séquençage comporte 25 cycles : 10 s à 96 °C, 5 s à 50 °C et 4 min à 60 °C. Une fois la réaction de séquençage est terminée, les produits PCR obtenus sont précipités en présence de 3 µl d'acétate de sodium à 3 M (pH = 4,6), 14,5 µl d'eau désionisée et 62,5 µl d'éthanol 95% froid. Après agitation manuelle, les produits sont gardés pendant 15 min à la température ambiante. Ensuite, on centrifuge une heure à 2000 rpm. L'éthanol est enlevé et le culot est rincé de nouveau avec 150 µl d'éthanol 70%. Après une nouvelle centrifugation pendant 30 min à 2000 rpm, l'éthanol est éliminé et la plaque est centrifugée pendant une minute à 700 trs/min. Enfin, le culot est resuspendu dans 20 µl de formamide.

La plaque est déposée ensuite dans le séquenceur automatique à 4 capillaires, ABIprism® 3100 (Appareil Biosystems). Après injection électrocinétique des fragments d'ADN, ces derniers sont soumis à une électrophorèse. La migration des fragments fluorescents à travers une cellule de détection permet au système optique du séquenceur (laser et camera CCD) de collecter la fluorescence portée par chacun de ces fragments et de transmettre ces informations à un ordinateur.

Au terme de la réaction de séquençage, les fichiers seront analysés par le logiciel «Sequencing Analysis» Version 5.1 qui permet de traduire les données brutes en un chromatogramme lisible pour la lecture. Les séquences obtenues sont représentées sous forme d'électrophorégramme où chaque base (A, T, G et C) correspond à un pic de couleur du fluochrome correspondant.

Les séquences obtenues sont importées dans un éditeur de séquences (BioEdit version 7.2.5) (Hall *et al.*, 1999). Les recherches de similitude entre la séquence du gène codant pour



l'ARNr 16S et les séquences disponibles dans une banque de séquences d'ADNs (*GenBank*) se font par l'intermédiaire du programme BLAST disponible sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Une analyse de distance est effectuée en utilisant la méthode du *Neighbor Joining*, avec correction de Jukes *et* Cantor (1969). L'arbre phylogénétique ou dendrogramme montrant la position phylogénétique de la souche étudiée, est généré en utilisant le logiciel Mega version 5 ou version 6 (Tamura *et al.*, 2013).

#### **XIV. Tests sur différentes sources de carbone**

Des cultures sur différents substrats, utilisés comme seules sources de carbone et d'énergie, en présence du 50 ml de milieu de base (à 30 g/l NaCl, pour les souches FLU5, NAPH6 et PYR2, et à 100 g/l pour la souche CO100), à 37 °C et à 180 rpm, sont suivis par mesure de la densité optique à 600 nm et/ou par dénombrement sur milieu LB solide. Les expériences ont été réalisées en double avec une proportion d'inoculum de 3% (v/v). Les substrats testés par la souche FLU5 sont les suivants: BTEX, acides (protocatéchique, gentisique, vanillique, syringique, gallique, caféique, ferulique), phénol, tyrosol, naphtalène, phénanthrène, fluoranthène, pyrène, octane, décane, mazout, huile de moteur, pétrole brut. La croissance de la souche NAPH6 a été suivie sur le naphtalène et le pétrole brut. La dégradation du pyrène par la souche PYR2 a été, également évaluée. Enfin, les potentialités biodégradatives de la souche CO100 sur les HAPs (naphtalène, phénanthrène, fluoranthène et pyrène) et le pétrole brut, ont été testées. Un témoin biologique, contenant l'inoculum bactérien sans la source de carbones étudiés et un témoin chimique, présentant le milieu avec la source de carbone et en l'absence de l'inoculum bactérien, sont utilisés. La vérification de la dégradation du fluoranthène (0, 3, 15 et 30 jours) et du pétrole brut (0, 10 et 20 jours) par la souche FLU5; du naphtalène (0, 3, 5 et 7 jours) et du pétrole brut (0, 10 et 20 jours) par la souche NAPH6; du pyrène par la souche PYR2 (0, 15 et 30 jours) et du pétrole brut (0, 10 et 20 jours) par la souche CO100, est réalisée à l'aide des moyens analytiques comme la chromatographie en phase gazeuse associée à la spectroscopie de masse (GC-MS) ou par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID), comme décrit ci-dessous.

## **XV. Méthodes analytiques: chromatographiques et spectroscopiques**

### **XV.1. Extraction des hydrocarbures**

Les cultures bactériennes contenant la source de carbone à dégrader (HAP ou pétrole brut) et leurs témoins chimiques sont soumises à des extractions par l'acétate d'éthyle (AE) (cas des HAPs) ou le dichlorométhane (DCM) (cas du pétrole brut), répétées 3 fois (v/v), à différents temps d'incubation. Tout d'abord, on récupère les 50 ml de la culture dans une ampoule à décanter de 250 ml, auxquels seront ajoutés 50 ml du solvant. Après une forte agitation, on laisse décanter le mélange pendant 15 min. La phase organique est récupérée dans un ballon de 500 ml, et elle subira un séchage par l'évaporateur rotatif (Rotavap) à 45 °C. Les hydrocarbures résiduels sont dissouts dans le solvant adéquat et seront analysés par chromatographie en phase gazeuse associée à la spectroscopie de masse (GC-MS) ou par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID).

### **XV.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID)**

La chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) est une technique analytique très répandue dans les domaines pétrochimiques et pharmaceutiques. Un FID utilise une flamme qui provient de la combustion de l'hydrogène dans l'air. Au contact de cette flamme, les composés organiques s'oxydent pour former des ions. Ces derniers sont alors collectés par une électrode. Le courant électrique d'ionisation est recueilli par un électromètre. Celui-ci amplifie le signal et transforme le courant en tension qui sera par la suite enregistré en un chromatogramme à l'aide d'un système informatique.

L'appareillage utilisé est composé d'un chromatographe (Agilent Technologies A7890) et d'une colonne HP-5 (longueur : 30 m ; diamètre interne : 0,23 cm ; épaisseur du film : 0,25 µm). Concernant les conditions opératoires, le gaz porteur est l'hélium, utilisé à un débit de 1 ml/min. La température de l'injecteur est fixée à 250 °C. Le programme du gradient de température est comme suit : 4 min à 80 °C, puis la température augmente pour atteindre 160 °C à raison de 8 °C/min et reste stable à 160 °C pendant 2 min. la température passe ensuite de 160 à 300 °C à raison de 20 °C/min pour se stabiliser enfin à 300 °C pendant 5 min.

### **XV.3. Chromatographie en phase gazeuse associée à la spectroscopie de masse (GC-MS)**

La chromatographie en phase gazeuse permet de séparer les constituants d'un mélange qui sera partagé entre une phase mobile (gaz vecteur) et une phase stationnaire liquide non volatile fixée sur un support inerte. Cette étape est suivie de la décomposition de chacun des composés en une répartition caractéristique de fragments dans le spectromètre de masse. Le soluté sera partagé entre le gaz vecteur et le liquide stationnaire pour donner un chromatogramme. La comparaison du temps de rétentions d'un pic en GC ainsi que des fragments en MS, avec ceux stockés dans la banque de données de l'appareil, aboutit à l'identification du produit. Le spectromètre de masse couplé avec un système de chromatographie en phase gazeuse est une association d'une méthode séparative et d'une méthode d'identification qui permet d'étudier des mélanges complexes à l'état de traces.

L'appareillage utilisé est composé d'un chromatographe (Agilent Technologies 6890N/5975) et d'une colonne HP-5 (5% phenyl methyl siloxane) (longueur, 30 m ; diamètre interne, 0,25 cm ; épaisseur du film, 0,25 $\mu$ m). Concernant les conditions opératoires, Le gaz porteur est l'hélium, utilisé à un débit de 1 ml/min. La température de l'injecteur a été fixée à 250 °C. Le programme du gradient de température est comme suit : 2 min à 70 °C, puis la température augmente pour atteindre 230 °C à raison de 20 °C/min. La température passe ensuite de 230 à 300 °C pendant 2 min pour se stabiliser enfin à 300 °C pendant 10 min (Mnif et *al.*, 2009).

### **XV.4. Spectrométries de masse ESI et MALDI-TOF**

La masse moléculaire des composants des tensioactifs a été déterminée par des analyses d'ionisation par électro-nébulisation (ESI) en mode d'ionisation négatif et positif (LC/MSD-TOF, Agilent Technologies, Palo Alto, CA). La tension capillaire était de 4 kV et de 3,5 kV pour les modes d'ionisation positif et négatif, respectivement, avec de l'azote comme gaz de nébulisation et de séchage. La spectrométrie de masse en tandem (4800 Plus MALDI TOF/TOF, ABSciex, Dublin, CA) a été utilisée. Le spectre de masse complète a été acquis dans le réflecteur en mode d'ion positif pour les tensioactifs, en utilisant l'acide dihydroxybenzoïque (DHB) comme matrice. Des fragmentations ultérieures des ions observés ont été obtenues par des analyses MS/MS.

## XV.5. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

La spectrophotométrie d'absorption dans le domaine infrarouge s'applique à des groupements d'atomes (ions, molécules, polymères) qui absorbent le rayonnement électromagnétique dans ce domaine. Elle permet d'étudier les composés organiques et inorganiques à l'état gazeux, liquide ou solide, ce qui explique sa grande diffusion. La spectroscopie infrarouge est basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet *via* la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes (Obinaju et Martin, 2016). L'échantillon (biosurfactant brut) est déposé dans l'incubateur de l'appareil FTIR (FTIR Nicolet 380 Thermo) pour être analysé. L'analyse est réalisée dans un intervalle de longueurs d'ondes comprises entre 500 et 4000  $\text{cm}^{-1}$ . L'identification des groupements chimiques est réalisée sur la base de données de composés organiques *via* internet (*Spectral database for organic compound*), en utilisant le site: [http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi).

## XVI. Biosurfactants produits par les bactéries sélectionnées

### XVI.1. Production, récupération, purification et caractérisation

#### XVI.1.1. Production et récupération des biosurfactants

L'extraction de biosurfactants BS-FLU5 produits par la souche FLU5, a été réalisée après 2 jours d'incubation à 37 °C et 180 rpm en présence de bouillon nutritif (BN), l'huile d'olive (1%, v/v) et l'huile de maïs (1%, v/v); après 3 jours en présence de l'huile de friture résiduelle (1%, v/v) et le glycérol (1%, v/v) et après 4 jours en présence de pétrole brut (1%, v/v), le mazout (1%, v/v), l'huile de moteur (1%, v/v) et l'huile de moteurs usée (1%, v/v). La récupération de biosurfactants bruts BS-NAPH6 produits par la souche NAPH6, en présence de l'huile de friture résiduelle (1%, v/v) et le bouillon nutritif BN, a été réalisée, après 2 jours d'incubation. L'extraction de biosurfactants BS-CO100 produits par la souche CO100, a été effectuée, après 2 jours, en présence de l'huile de friture résiduelle (1%, v/v) et le lait en poudre périmé (20 g/l), et après 3 jours, en présence du bouillon nutritif (BN). La récupération de biosurfactants produits par la souche PYR2 sur le bouillon nutritif (BN), a été réalisée après 4 jours d'incubation. Les cultures ont été réalisées sur un milieu de base, en présence de 30 g/l NaCl, à 37 °C et 180 rpm.

Afin de récupérer les biosurfactants, une centrifugation du milieu de culture, inoculé avec la souche appropriée et additionné par le substrat «inducteur», pendant 20 min à 7500

rpm a été réalisée. Le surnageant obtenu est soumis à une précipitation acide à pH 2 en utilisant une solution de HCl 6 N et incubé à 4 °C pendant une nuit. Par la suite, une extraction volume par volume (répétée 2 fois), en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction, a été réalisée. Après une forte agitation, on laisse décanter le mélange pendant 15 min. La phase organique résultante, située au-dessus, a été rassemblée, concentrée et séchée moyennant un évaporateur rotatif à vide (Büchi Rotavapor R-200), jusqu'à l'obtention d'un résidu visqueux brun jaunâtre qui est considéré comme le biosurfactant brut. Ce dernier, a été incubé par la suite, à 37 °C pendant une nuit, afin d'éliminer les traces de solvant organique et conservé à 4 °C pour des études ultérieures.

#### **XVI.1.2. Purification des biosurfactants par chromatographie sur colonne de gel de silice et par chromatographie sur couche mince (CCM)**

La purification des biosurfactants BS-FLU5, BS-PYR2 et BS-CO100 a été réalisée en utilisant la chromatographie sur colonne de gel de silice, suivie d'une analyse par chromatographie sur couche mince (CCM).

La chromatographie sur colonne est une technique de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif constitué de deux phases: la phase stationnaire (contenant le gel de silice) et la phase mobile (le solvant d'élution utilisé qui est en général un mélange d'au moins de deux solvants, l'un polaire et l'autre apolaire). Cette méthode repose sur le phénomène d'absorption, dont les molécules sont entraînées vers le bas de la colonne à des vitesses variables, selon leur affinité pour l'absorbant et leur solubilité dans l'éluant, les produits apolaires sont élués les premiers.

Dans notre cas, l'échantillon (biosurfactants bruts BS-FLU5, BS-CO100 et BS-PYR2, récupérés dans l'acétate d'éthyle) est déposé sur une colonne de gel de silice (60 Mesh) (Merck, Darmstadt, Allemagne) et élué avec un mélange de chloroforme/ méthanol/ eau (65:25:4, v/v/v). Des fractions de 1 ml sont collectées dans des récipients en verre (de 3 à 5 ml) numérotés et analysées par la suite par chromatographie sur couche mince (CCM) sur des plaques de gel de silice 60 G (Machery-Nagel, Düren, Allemagne) avec le même éluant. Pour cette analyse par CCM, 5 µl de chacun des fractions collectées sont déposés au bas de la plaque (1,5 cm du bord inférieur de la plaque de migration). La plaque est, ensuite, placée dans une cuve contenant la phase mobile. La chromatographie dure le temps de migration de la phase mobile jusqu'au front de solvants (situé à 0,5 cm du bord supérieur de la plaque de silice). Les spots de CCM sont révélés par une lampe UV, avec de l'acide phosphomolibdique spécifique pour les acides gras et avec une solution de ninhydrine spécifique pour les acides

aminés, ce qui nous a permis de rassembler les fractions présentant des similitudes. Seules les fractions montrant la capacité à réduire la tension superficielle sont analysées par spectrométries de masse ESI et MALDI TOF MS/MS.

### **XVI.1.3. Détermination de la Concentration Micellaire Critique (CMC)**

La concentration micellaire critique (CMC) est déterminée en mesurant les tensions de surface des dilutions des biosurfactants bruts BS-FLU5 (synthétisés sur le milieu BN et sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v)); BS-NAPH6 (produit sur l'huile de friture résiduelle, (1%, v/v)); BS-PYR2 (produit sur le milieu BN) et BS-CO100 (produits sur le milieu BN, sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v) et sur le lait en poudre périmé (20 g/l)), dans de l'eau ultra-pure (Milli-Q). Les CMCs des biosurfactants purifiés BS-FLU5, BS-PYR2 BS-CO100, produits sur le bouillon nutritif, ont été également déterminées. La CMC correspond à la plus faible concentration en biosurfactant qui permet la meilleure réduction de la tension de surface. C'est la concentration à laquelle les micelles commencent à se former.

### **XVI.1.4. Etude de la stabilité des biosurfactants**

Des études de stabilité des biosurfactants ont été effectuées en utilisant un volume de 20 ml de surnageants des cultures FLU5 et NAPH6, réalisées sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v), après 3 et 2 jours d'incubation, respectivement; de la culture CO100, réalisée sur le lait en poudre périmé, après 2 jours d'incubation et de la culture PYR2, réalisée sur le milieu BN, après 4 jours d'incubation. Les surnageant utilisées ont été centrifugés pendant 20 min à 4000 rpm et filtrés à travers un papier filtre Whataman. Ces solutions de surnageants ont été exposées par la suite à différents pH (de 2 à 12); à différentes concentrations en NaCl (de 0 à 300 g/l) et à différentes températures (de 4 à 121 °C) pour BS-FLU5 et BS-NAPH6 et (de -20 à 121 °C) pour BS-PYR2 et BS-CO100. Par la suite, la tension de surface a été mesurée immédiatement pour les tests de pH et de la salinité et après des incubations pendant une nuit pour les températures allant de -20 à 70 °C, 1 h pour la température à 100 °C et après un cycle d'autoclavage (20 min) pour la température 121 °C. Le test de déplacement d'huile, a été également déterminé pour évaluer la stabilité des biosurfactants BS-PYR2 et BS-CO100.

### **XVI.1.5. Détermination de la Tension de Surface (TS)**

Un tensiomètre digital (GIBERTINI TSD 132389, Italie) avec un élévateur manuel pour le positionnement du cristallisateur, a été utilisé pour mesurer la tension de surface. La TS est déterminée par mesure de la valeur maximale de la force au moment du contact entre l'échantillon et la lamelle. Vingt millilitres de la culture bactérienne ont été prélevés

et centrifugés à 4000 rpm pendant 20 min. Le surnageant de la culture est filtré à travers un papier filtre standard de type RS (gammage de 77g/m<sup>2</sup> et porosité de 8-11 µm), avant d'effectuer la mesure de la tension de surface.

#### **XVI.1.6. Test de déplacement d'huile**

Ce test est essentiellement basé sur la caractéristique du biosurfactant à changer l'angle de contact à l'interface huile-eau. La pression de surface du biosurfactant est capable de déplacer l'huile. Un volume de 100 µl du pétrole brut est déposé à la surface de 20 ml d'eau distillée contenue dans une boîte de Petri (90 mm de diamètre). Une fine couche d'huile se forme immédiatement. Par la suite, 200 µl de la solution de l'échantillon (surnageant filtré de la culture), sont déposés au centre délicatement, entraînant le déplacement d'huile et la formation d'un halo clair. Le diamètre ainsi formé est mesuré.

#### **XVII. Activité cytotoxique**

La détermination de l'activité cytotoxique se base sur une technique colorimétrique qui permet de mesurer la viabilité cellulaire (Hansen *et al.*, 1989). Dans ce test, la viabilité cellulaire est appréciée par la mesure de l'activité de l'enzyme succinate déshydrogénase (SD) mitochondriale des cellules vivantes. Rappelons que, dans le cycle de Krebs, cette enzyme catalyse la déshydrogénation de l'acide succinique pour former de l'acide fumarique. Cette méthode est basée sur la capacité des cellules vivantes à réduire, par l'intermédiaire de la SD, un sel de tétrazolium de couleur jaune, le Microculture tetrazolium (MTT), en un sel de formazan de couleur bleue, ce qui a pour effet de permettre l'évaluation par colorimétrie de la respiration cellulaire.

Dans notre travail, des cellules rénales humaines HEK (Human Embryon Kidney 293) ont été mises en cultures dans le milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) et se divisent dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> à 37 °C dans une atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules sont à confluence (arrêt de la division cellulaire dû à l'inhibition de contact), elles sont rincées puis trypsinées (sous l'action de la trypsinase). La réaction a lieu pendant 3 minutes en vérifiant sous microscope que les cellules sont décollées. La réaction est stoppée par l'ajout de sérum de fœtale bovine (sigma NA4637) à une concentration finale de 10%. Après centrifugation à 1000 t/min pendant 5 minutes, le culot est suspendu dans le milieu de culture et les cellules sont réensemencées dans les flasques.

Par la suite, ces cellules ont été traitées en présence de biosurfactants bruts BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-PYR2 et BS-CO100, produits sur le milieu BN, à différentes concentrations



allant de 0 jusqu'à 1000  $\mu\text{g/ml}$ , et pendant différentes durées (24 h et 48 h), afin de mesurer leur effet sur la viabilité cellulaire. Après traitement, 10  $\mu\text{l}$  de MTT (5 mg/ml dans du PBS) par puits sont ajoutés, et les cellules sont incubées pendant 8 heures à 37 °C dans une atmosphère à 5% de  $\text{CO}_2$ .

Après élimination du milieu, le précipité de formazan de couleur bleue ainsi formé est dissous dans 100  $\mu\text{l}$  de SDS. Les densités optiques (DO) sont mesurées à 570 nm avec un lecteur de plaques (Multiskan, Labsystem, France). La densité optique mesurée est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Les résultats sont exprimés en pourcentage de survie par rapport aux cellules non traitées (cellules témoins).

## **XVIII. Essais d'applications**

### **XVIII.1. Remobilisation des hydrocarbures contenus dans un sol contaminé par l'huile de moteurs usée**

L'utilisation des tensioactifs d'origine biologique est de plus en plus prometteuse dans les techniques de remobilisation des hydrocarbures contenus dans des sols, vu leur caractère peu toxique et biodégradable. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet de remobilisation en suivant la démarche suivante: Une masse de 250 g d'un sol prélevé à partir du jardin du CBS, a été imprégnée par 50 ml d'huile de moteur usée, bien mélangée, et incubée durant 24 h à 37 °C. Des fractions de 10 g du sol contaminé ont été transférées dans des Erlenmeyers de 250 ml, et ont été soumises aux traitements suivants: addition de 20 ml d'eau ultra-pure (contrôle négatif); 20 ml des surnageants des cultures pures de NAPH6, FLU5, Co-culture NAPH6+FLU5 (1:1) (synthétisées sur l'huile de friture résiduelle, 1% (v/v)), CO100 (synthétisées sur l'huile de friture résiduelle 1% (v/v) et sur le lait en poudre périmé (20 g/l) et PYR2 (synthétisé sur le bouillon nutritif (BN)); 20 ml des solutions de biosurfactants bruts de la souche NAPH6 (BS-NAPH6, HFR) (0,02, m/v), de la souche FLU5 (BS-FLU5) (0,025, m/v, HFR), de la Co-culture NAPH6 et FLU5 (BS-NAPH6+FLU5, HFR) (0,06%, m/v), de la souche CO100 (BS-CO100) (0,075, m/v, LPP), et BS-CO100 (0,05, m/v, HFR) et de la souche PYR2 (BS-PYR2) (0,025%, m/v, BN); 20 ml d'une solution aqueuse de SDS (0,2304%, m/v); 20 ml de Tween 80 (0,0016%, m/v); 20 ml de Tween 20 (0,05%, m/v) et 20 ml de Triton X-100 (0,0155%, m/v). Les différentes solutions des biosurfactants bruts et des surfactants chimiques ont été préparées à la concentration micellaire critique (CMC). Par la suite, les échantillons ont été incubés à 180 rpm pendant 24 h à 30 °C et centrifugés à 6000 rpm pendant 20 min pour la séparation des surnageant. Les masses résiduelles d'huile de

moteurs usée obtenues après extraction (v/v), par l'hexane, des surnageant des solutions ont été déterminées par pesée.

## XVIII.2. Contrôle du biofilm

Une évaluation de l'application de biosurfactants bruts BS-FLU5, BS-PYR2 et BS-CO100, produits sur le bouillon nutritif (BN), dans la prévention (prétraitement) et l'élimination (post-traitement), des biofilms des microorganismes pathogènes, a été réalisée, en utilisant la méthode de coloration au cristal violet. La méthode est basée sur la quantité de colorant adsorbée par les cellules de biofilm et les substances exopolymériques (Coronel-León *et al.*, 2016).

Pour la formation des biofilms, des bactéries à Gram négatif (*Esherchia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurum* ATCC 14028 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883); bactéries à Gram positif (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Résistante à la méthicilline) ATCC 43300 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29216), ainsi que la levure *Candida albicans* ATCC 10231, ont été cultivées, pendant une nuit, dans un milieu de Muller-Hinton. Par la suite, 200 µl des dilutions (1:100) de ces cultures dans le milieu proposé par O'Toole (2011), sont déposées dans les puits de plaques de microtitration de 96 puits à fond plat en polystyrène (Sigma). La plaque est ensuite incubée à 37 °C pendant 20 heures, sans agitation (O'Toole, 2011). Une rangée de la microplaque était occupée par un blanc, correspondant au milieu de culture seule. Les puits sont lavés trois fois avec de l'eau distillée, fixés pendant 15 min avec du méthanol et colorés pendant 20 min avec du cristal violet (1%). Tous les puits sont lavés par la suite avec l'eau distillée puis séchés à l'air libre. Le colorant est remis en solution par 200 µl d'acide acétique (33%, v/v) et les DO sont mesurés à 595 nm moyennant un lecteur de microplaques (Coronel-León *et al.*, 2016). Les puits non traités par le biosurfactant sont considérés comme des témoins biologiques (Milieu de culture + souche bactérienne), alors que les témoins chimiques sont présentés par les puits contenant le milieu de culture et le biosurfactant.

Les pourcentages d'inhibition d'adhésion microbienne ou d'inhibition du biofilm sont calculés en utilisant la formule :

$$\text{Pourcentage d'inhibition d'adhésion / inhibition du biofilm} = [1 - (Ac / Ao)] * 100$$

Où :

- Ac représente l'absorbance du puits avec le biosurfactant à la concentration c
- Ao l'absorbance du puits témoin (absence de biosurfactant).

Pour chaque expérience, chaque suspension bactérienne est inoculée dans 8 puits d'une microplaque de 96 puits à fond plat en polystyrène à 37 °C sans agitation. Tous les résultats sont représentés comme la moyenne de trois expériences indépendantes.

#### **XVIII.2.1. Prétraitement (activité antiadhésive)**

Ce test de prétraitement consiste à évaluer la capacité du biosurfactant, à inhiber la formation des biofilms des microorganismes testés, en ajoutant le tensio-actif biologique avant la formation des biofilms. Pour ce faire, 200 µl des dilutions des biosurfactants (0-4 µg/ml) dissouts dans le tampon phosphate salin (PBS), sont déposées dans les puits des plaques de microtitration de 96 puits et incubées pendant 6 heures à température ambiante (25 °C). Une étape de lavage des plaques (deux fois) avec du PBS est réalisée. Par la suite, les plaques sont inoculées avec 200 µl des cultures des souches étudiées, dans le milieu proposé par O'Toole comme mentionné ci-dessus. Après incubation 20 h à 37 °C sans agitation, un lavage 3 fois avec l'eau distillée est effectué et les biofilms sont quantifiés moyennant la même méthode du cristal violet selon les étapes évoquées précédemment (Coronel-León *et al.*, 2016).

#### **XVIII.2.2. Post-traitement (activité anti-biofilm)**

Ce test consiste à évaluer la capacité de biosurfactant à déstabiliser et perturber les biofilms déjà formés. Dans ce cas, on fait d'abord incubé 200 µl de suspensions bactériennes dans les puits de la microplaque pendant 20 h à 37 °C. Après incubation, les cellules microbiennes non attachées sont éliminées par lavage trois fois avec de l'eau distillée. Ensuite, 200 µl de dilutions (0-4 µg/ml) de biosurfactant sont ajoutés à chaque puits et incubés à 25 °C pendant 6 heures. La quantification a été effectuée comme dans le prétraitement.

#### **XVIII.3. Activité cicatrisante**

L'effet cicatrisant des biosurfactants bruts BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-CO100 et BS-PYR2, produits sur le bouillon nutritif (BN), a été évalué sur des rats mâles de race Wistar ayant subi une plaie mécanique. Ces rats ont été répartis en onze groupes, dont chacun comporte 5 rats (Tableau 14).

**Tableau 14.** Les groupes des rats et les différents traitements cicatrisants.

<b>Groupe I</b>	Traités uniquement par nettoyage au sérum physiologique (Groupe témoin)
<b>Groupe II</b>	Traités par le glycérol 30%
<b>Groupe III</b>	Traités par un cicatrisant synthétique CICAFLORA <sup>®</sup> , utilisé comme contrôle positif
<b>Groupe IV</b>	Traités par BS-NAPH6 à raison de 5 mg/ml dans le glycérol (30%, v/v)
<b>Groupe V</b>	Traités par BS-NAPH6 à raison de 10 mg/ml dans le glycérol (30%, v/v)
<b>Groupe VI</b>	Traités par BS-FLU5 à raison de 5 mg/ml dans le glycérol (30%, v/v)
<b>Groupe VII</b>	Traités par BS-FLU5 à raison de 10 mg/ml dans le glycérol (30%, v/v)
<b>Groupe VIII</b>	Traités par BS-CO100 à raison de 5 mg/ml dans le glycérol (30%, v/v)
<b>Groupe IX</b>	Traités par BS-CO100 à raison de 10 mg/ml dans le glycérol (30%, v/v)
<b>Groupe X</b>	Traités par BS-PYR2 à raison de 5 mg/ml dans le glycérol (30%, v/v)
<b>Groupe XI</b>	Traités par BS-PYR2 à raison de 10 mg/ml dans le glycérol (30%, v/v)

### XVIII.3.1. Réalisation d'une plaie cutanée mécanique

Cette opération consiste à anesthésier l'animal, raser sa partie dorsale, essuyer la zone rasée par l'alcool (éthanol 70%), et réaliser précautionneusement une excision cutanée de 1,5 cm × 1 cm à l'aide de ciseaux fins chirurgicaux (Dipietro *et* Burns, 2003). La plaie est ensuite nettoyée avec un sérum physiologique. Dans notre travail, le gel de biosurfactant ou bien de la crème CICAFLORA<sup>®</sup> a été ensuite appliqué sur les plaies en fonction des traitements envisagés.

### XVIII.3.2. Evaluation de l'effet cicatrisant

- *Photographie des plaies et suivi des superficies*: L'évolution de la plaie a été mise en évidence par des photographies et la reproduction de contour des plaies sur un papier calque.
- *Pourcentage de contraction*: Le pourcentage de contraction des plaies a été calculé selon la formule suivante :

$$\text{Taux de contraction (\%)} = (\text{surface cicatrisée} / \text{superficie de la plaie totale}) * 100$$

## XIX. Détection des gènes responsables de la biodégradation des HAPs et de la production des biosurfactants

### XIX.1. Détection des gènes responsables de la biodégradation des HAPs

La recherche des gènes fonctionnels responsables de la dégradation des HAPs dans les souches pures isolées FLU5, NAPH6, CO100 et PYR2, ainsi que certains échantillons des eaux de mer et des sédiments marins contaminés par des hydrocarbures (PP01-13; PP04-15;

CK01-16; CK04-16; PC09-15; PC07; Sed01-13; Sed04-15; Sed07-16 et Sed09-17), a été réalisée. Deux types d'amorces nommées W398-W399 et W429-W430 ont été utilisés pour l'amplification des gènes codant pour l'enzyme PAH-RHD $\alpha$  (Polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase) (Ding *et al.*, 2010; Wongwongsee *et al.*, 2013) et l'enzyme Naphthalene dioxygenase (Baldwin *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2014) respectivement. Les différentes amorces utilisées ainsi leurs séquences sont présentées dans le tableau 15.

**Tableau 15.** Amorces utilisées pour la réaction PCR spécifique pour amplifier des gènes responsables de la biodégradation des HAPs.

Amorces	Séquences (5'-3')
W398 (PAH-RHD $\alpha$ -396F)	ATTGCGCTTAYCAYGGBTGG
W399 (PAH-RHD $\alpha$ -696R)	ATAGGTGTCTCCAACRAATT
W429 (NAPH-F)	CAAAA(A/G)CACCTGATT(C/T)ATGG
W430 (NAPH-R)	A(C/T)(A/G)CG(A/G)G(C/G)GACTTCTTTCAA

Chaque réaction a été réalisée dans des tubes de PCR contenant chacun: 1x tampon ADN polymérase Red Taq (Sigma-Aldrich); 200  $\mu$ mol/l de chaque dNTP (Promega, Madison, USA); 1  $\mu$ l de chaque amorce: W398 (200 nM), W399 (600 nM), W429 et W430 (300 nM); 1,25 U ADN polymérase Red Taq (Sigma-Aldrich) et 1  $\mu$ l de l'ADN génomique à amplifier. Le volume final est ajusté à 50  $\mu$ l avec q.s.p. d'eau pure stérile. Les cycles des PCR effectués sont détaillés dans les tableaux 16 et 17 suivants:

**Tableau 16.** Programme utilisé pour la réaction de PCR spécifique pour amplifier les gènes codant pour l'enzyme PAH-RHD $\alpha$ .

Nombre de cycles	Étapes	Température (°C)	Durée
1	Dénaturation initiale	94	10 min
5	Pré-amplification	Dénaturation	94
		Hybridation	46
		Elongation	72
30	Amplification	95	1 min
		58,5	1 min
		72	1 min
1	Etape finale d'élongation	72	10 min

**Tableau 17.** Programme utilisé pour la réaction de PCR spécifique pour amplifier les gènes codant pour l'enzyme NAPH-Dioxygenase.

Nombre de cycles	Étapes		Température (°C)	Durée
1	Dénaturation initiale		95	5 min
30	Amplification	Dénaturation	94	1 min
		Hybridation	55	2 min
		Elongation	72	1 min
1	Etape finale d'élongation		72	10 min

Les produits PCR sont analysés ensuite, par un bioanalyseur (Agilent 2100) afin d'estimer leurs tailles et leurs concentrations en comparant les bandes obtenues avec celles d'un marqueur de taille.

## XIX.2. Détection des gènes responsables de production des biosurfactants

La recherche des gènes fonctionnels responsables de la production des biosurfactants et en particulier des lipopeptides a été également réalisée. L'expérience a été menée sur les ADNs génomiques des souches pures: FLU5, CO100 et PYR2, et sur les ADNs génomiques de certains échantillons des eaux et des sédiments marins (PP01-13; PP04-15; CK01-16; CK04-16; PC09-15; PC07; Sed01-13; Sed04-15; Sed07-16 et Sed09-17).

Les amorces As1-F et Ts2-R nommées W419 et W420, respectivement, ont été utilisées pour l'amplification des gènes responsables de production des surfactines et des lichenysines (Tapi *et al.*, 2010). D'autre part, les amorces Am1-F et Tm1-R nommées W421 et W422, respectivement, ont été utilisées pour l'amplification des gènes responsables de la production des iturines (Tapi *et al.*, 2010). Les caractéristiques de différentes amorces utilisées sont présentées dans le tableau 18.

**Tableau 18.** Caractéristiques des amorces spécifiques développées pour la détection des gènes de biosynthèse des surfactines/lichenysines et des iturines (Tapi *et al.*, 2010).

Lipopeptides	Nom des amorces	Séquences (5'-3')	Taille des amorces (pb)	Taille d'amplifion (pb)	Souches origines des amorces	Numéro d'accesion (GenBank)
Surfactines / Lichenysines	As1-F	CGCGGMTACCGVA	19	419, 422, 425, 431	<i>Bacillus subtilis</i> 168	AF233756
	Ts2-R	TYGAGC ATBCCTTTBTWDG AATGTCCGCC	23			
Mycosubstilines (Iturines)	Am1-F	CAKCARGTSAAAA	20	416, 419	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	AF184956
	Tm1-R	TYCGMGG CCDASATCAAARA ADTTATC	20			

Chaque réaction a été réalisée dans des tubes de PCR contenant chacun: 1x tampon ADN polymérase Red Taq (Sigma-Aldrich); 200  $\mu\text{mol/l}$  de chaque dNTP (Promega, Madison, USA); 600 nM de chaque amorce; 1,25 U ADN polymérase Red Taq (Sigma-Aldrich) et 1  $\mu\text{l}$  de l'ADN génomique à amplifier. Le volume final est ajusté à 50  $\mu\text{l}$  avec q.s.p. d'eau pure stérile. Le programme de la PCR est détaillé dans le tableau ci-dessous:

**Tableau 19.** Programme utilisé pour la réaction de PCR spécifique pour amplifier les gènes responsables de la production des surfactines/lichénysine et des iturines.

Nombre de cycles	Étapes		Température (°C)		Durée
			Surfactine/lichénysine	Iturine	
1	Dénaturation initiale		94		3 min
30	Amplification	Dénaturation	94		1 min
		Hybridation	43	45	1 min
		Elongation	72		1 min
1	Etape finale d'élongation		72		10 min

Les produits PCR sont analysés par un bioanalyseur (Agilent 2100) afin d'estimer leurs tailles et leurs concentrations en comparant les bandes obtenues avec celles d'un marqueur de taille. Le séquençage des produits PCR positifs a été réalisé au centre du génome et du transcriptome du réseau Genotoul Lifescience à Toulouse, en France ([get.genotoul.fr](http://get.genotoul.fr)).

## **XX. Production de biosurfactants produits par la souche FLU5, à différentes échelles: « Scale-up »**

La production des biosurfactants à partir de la souche FLU5, en utilisant un milieu économique nommé ME, a été rapportée aux échelles suivantes: Erlenmeyer (1 litre volume final, 250 ml volume utile); Fermenteur semi-pilote (20 litres volume final, 5 litres volume utile) (Biolafitte, France) et fermenteur pilote (100 litres volume final, 60 litres volume utile) (Biotron, Corée). Des pré-cultures de la souche FLU5 sur milieu LB, ont été ajoutées à une concentration de 10% (v/v), au milieu ME stérilisé à 121 °C, pendant 20 minutes, dans l'erenmeyer ou dans les deux fermenteurs.

Les fermenteurs sont équipés d'un agitateur mécanique, d'un diffuseur d'air, de régulateurs de température, de pH et d'oxygène dissous. Les fermentations ont été effectuées à 37 °C avec une vitesse d'agitation de 200 tr/min et une vitesse d'aération de 0,5 vvm. Des échantillons de cultures ont été prélevés régulièrement pour suivre la biomasse (mesure de DO (600 nm), dénombrement sur milieu solide et détermination de la matière volatile en suspension (MVS)) et pour évaluer la production de biosurfactants (mesure de la tension de



surface et test de déplacement d'huile). La pureté de la souche est vérifiée par des observations microscopiques, à chaque prélèvement.

## **XXI. Analyses statistiques**

### **XXI.1. Graph Pad Prism 6.0.**

Les analyses statistiques utilisées pour tester la capacité des souches isolées à produire des biosurfactants; évaluer la cytotoxicité des biosurfactants produits, ainsi que l'application des biosurfactants dans la remobilisation des hydrocarbures, ont été réalisées en utilisant le logiciel Graph Pad Prism 6.0. La significativité des tests statistiques est donnée par les tests «One-Way ANOVA» avec «Tukey's multiple comparisons». Des valeurs de  $p < 0,05$  sont considérées comme statistiquement significatives.

### **XXI.2. Logiciel R**

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant le logiciel R (version 3.2.4) qui est un langage de scripts pour l'analyse des données statistiques et les graphiques (Ihaka *et* Gentleman, 1996).

Le seuil de significativité, c'est-à-dire la valeur de  $p$  ( $p$ -value), de tous les tests statistiques réalisés, a été fixé à 0,05. En d'autres termes, lorsque  $p < 0,05$  on rejette l'hypothèse nulle et on accepte l'hypothèse alternative et *vice versa*.

- ***Comparaison de deux moyennes***

Les tests de Student (paramétrique) et de Wilcox (non-paramétrique) sont des tests de comparaison de moyennes de deux échantillons afin de déterminer si ces derniers proviennent d'une même population. Dans notre étude, ces tests ont été utilisés, pour comparer les paramètres mesurés entre les échantillons pollués et ceux du contrôle.

- ***L'analyse de la variance***

Les tests d'ANOVA (ANalysis Of VAriance) et de Kruskal-Wallis (non paramétrique) sont utilisés pour comparer au moins trois échantillons afin de déterminer s'ils proviennent d'une même population. Ces deux tests sont dits tests globaux. Quand la  $p$ -valeur du test (ANOVA ou Kruskal Wallis) est inférieure à 0,05, il est suivi par le test de Post Hoc (Tukey et Dunn dans notre cas) qui permet de comparer entre les populations deux à deux. Dans notre étude, ANOVA et Post Hoc ont été utilisés, pour comparer les différents paramètres mesurés dans les échantillons d'eaux polluées entre les trois ports et entre les saisons.

- ***Analyse de la corrélation***

La significativité de la corrélation entre les paramètres mesurés dans les échantillons pollués a été évaluée par le coefficient de Spearman (non-paramétrique) et le coefficient de Pearson (paramétrique).

- ***Analyse de la composante principale (PCA)***

L'analyse de la composante principale (PCA) a été utilisée pour rechercher les relations potentielles entre les paramètres étudiés et la possibilité qu'ils partagent des propriétés particulières selon les ports et les échantillons. En d'autres termes, déterminer les groupes d'échantillons qui partagent les mêmes caractéristiques.

# **RESULTATS & DISCUSSION**

---

# Chapitre I

**« Caractérisation physico-chimique des échantillons marins provenant de trois ports de la ville de Sfax, étude de la composition de la communauté microbienne et de sa dynamique »**

---

## I. Introduction générale

L'accélération de l'industrialisation et de l'urbanisation et l'accroissement démographique accru, accompagnés d'une absence quasi-totale de suivi des normes et des règles, dans la zone côtière de Sfax, ont contribué d'une manière significative à la dégradation de la qualité de la vie et de l'environnement, en particulier la partie Sud de littoral (Zaghden *et al.*, 2016). Cette zone, où se concentrent des centaines de locaux des activités de conditionnement et de transformation des produits de mer et de diverses activités industrielles (construction métallique, sablage et fonderie, tannage de cuirs, raffinage d'huiles alimentaires, ateliers traditionnels de fabrication de savon, activités de transformation de phosphates, établissements agro-alimentaires...), n'est pas équipée dans la plupart des cas d'infrastructures adéquates de traitement des eaux résiduaires, contribuant alors à la pollution du milieu marin (COMETE, 2006; Drira *et al.*, 2016; Zaghden *et al.*, 2016).

La première partie de ce chapitre s'intéresse à la caractérisation physico-chimique des échantillons marins provenant de trois ports de la ville Sfax (plaisance ou Chott Kerkennah (CK), commerce et pêche), et prélevés pendant différentes périodes (entre Janvier 2013 et Septembre 2017). Une analyse statistique de ces paramètres physico-chimiques, permettant d'examiner le degré de pollution dans ces ports, a été réalisée.

Les microorganismes jouent un rôle indispensable dans le fonctionnement de tous les écosystèmes, y compris l'écosystème marin, en assurant des fonctions clés telles que la dégradation des matières organiques, la production d'énergie et la dynamique du réseau alimentaire (Won *et al.*, 2017). Les écosystèmes marins côtiers abritent un grand nombre des microorganismes et présentent une hétérogénéité spatio-temporelle substantielle en termes d'abondance, d'activité et de composition microbienne (Jeffries *et al.*, 2016). En effet, les zones maritimes côtières sont des écosystèmes transitionnels et dynamiques complexes caractérisées par des fluctuations permanentes des conditions environnementales, influençant par conséquent, la composition de la communauté microbienne (Won *et al.*, 2017).

C'est dans ce contexte que la 2<sup>ème</sup> partie de ce chapitre, était consacrée pour la découverte de la composition microbienne des différents échantillons étudiés. Dans un premier temps, la technique d'empreinte génétique PCR-SSCP, a été appliquée sur les échantillons marins étudiés afin de déterminer leur diversité microbienne et d'établir des relations entre l'évolution de cette diversité au cours du temps et les conditions environnementales imposées sur ces écosystèmes. Par ailleurs, la méta-analyse de certains échantillons marins (sédiment et eau), en utilisant des techniques de séquençage haut-débit

(Pyroséquençage et Illumina MiSeq), a été réalisée, afin d'explorer la diversité procaryotique dans les échantillons marins contaminés par des hydrocarbures et de définir des consortia microbiens indicateurs de cette contamination.

## II. Caractérisation physico-chimique des biotopes étudiés

Afin d'évaluer la qualité des eaux et des sédiments marins et d'estimer le degré de pollution dans les différents ports étudiés, une détermination d'un certain nombre de paramètres physico-chimiques, a été établie. Une comparaison par rapport à des échantillons des eaux de mer témoins, prélevées à partir des zones présumées lointaines de la pollution pour chaque port, a été réalisée. Les paramètres physico-chimiques testés comportant le pH, la conductivité électrique, la salinité, le dosage de l'azote total (N<sub>tot</sub>), des hydrocarbures totaux (HC<sub>tot</sub>), de quatre éléments minéraux Na, Mg, Ca et K et de sept métaux Cd, Cr, Cu, Zn, Mn Ni et Fe, ont été déterminés pour les différents échantillons (eaux et sédiments). Par ailleurs, la température, l'analyse du carbone (Carbone Organique Total (COT) et Carbone Inorganique (CI)), la détermination de la demande chimique en oxygène (DCO) et de la demande biologique en oxygène (DBO<sub>5</sub>), ont été également déterminés pour les échantillons des eaux de mer.

Les valeurs moyennes des paramètres physico-chimiques mesurées (représentant la moyenne trouvée durant toute l'étude (2013, 2014, 2015, 2016 et 2017) relatifs aux eaux de mer de chaque port, et aux sédiments provenant du port de pêche de Sfax), ont été déterminées et présentées dans les tableaux 20, 21, 22 et 23, ci-dessous. Quelques données bibliographiques ont été également ajoutées.

Le potentiel hydrogène pH est l'un des facteurs les plus importants dans les écosystèmes marins. Il mesure la concentration des protons H<sup>+</sup> contenus dans l'eau. Ce paramètre conditionne un grand nombre d'équilibres physico-chimiques, et dépend de facteurs multiples. Par ailleurs, de nombreuses activités biologiques ne peuvent se produire que dans une gamme étroite de pH (Fragallah *et al.*, 2009). Les valeurs moyennes de pH trouvées au cours de cette étude oscillent entre 7,5 et 8,3 (Tableau 20). Ces valeurs sont proches aux valeurs du pH de l'eau de mer qui est de 8,3 (Chaouay *et al.*, 2016). La majeure partie de la vie biologique en milieu aquatique a un pH approprié allant de 6,5 à 8 (Fragallah *et al.*, 2009). Les eaux superficielles ont, habituellement, des pH élevés en raison du rayonnement solaire. En effet, celui-ci favorise la photosynthèse et accroît la température en surface, deux phénomènes qui réduisent la quantité d'acide carbonique libre et qui font donc augmenter le pH (Patil *et al.*, 2012).

La température de l'eau est un facteur écologique qui entraîne d'importantes répercussions écologiques. Elle influe sur la viscosité, la densité, la solubilité des sels et des gaz dont, entre autres, l'oxygène nécessaire à l'équilibre de la vie aquatique. Elle agit également, sur les réactions chimiques et biochimiques ainsi que sur les activités métaboliques des organismes aquatiques (Chaouay *et al.*, 2016). Les températures enregistrées dans les différents ports varient en fonction des périodes de prélèvements, elles oscillent entre 15 °C et 21 °C en mois de Janvier et Avril et entre 25 °C et 30 °C en mois de Juillet et Septembre. La température de l'eau de mer est affectée par plusieurs facteurs, notamment les conditions météorologiques, les eaux pluviales ainsi que les éventuels rejets d'eaux résiduaire chaudes. Les valeurs trouvées au cours de cette étude indiquent que ce paramètre est influencé par la température ambiante car la couche superficielle est soumise à l'influence directe du climat régional qui est caractérisé par une saison froide et une saison chaude (Zaghden *et al.*, 2016).

En outre, les concentrations en minéraux (Na, Mg, Ca et K) dans les différents échantillons étudiés ont été également déterminées (Tableau 20). Elles sont de l'ordre de: Na [7878,1 ; 10266] mg/l pour les eaux de mer et 6505,7 mg/kg pour les sédiments; Mg [831,8 ; 1002] mg/l pour les eaux de mer et 738,5 g/kg pour les sédiments; Ca [376 ; 401,1] mg/l pour les eaux de mer et 393,2 mg/kg pour les sédiments et K [328,5 ; 373,6] mg/l pour les eaux de mer et 396,4 g/kg pour les sédiments (Tableau 20). Ces valeurs sont proches des proportions moyennes de minéraux mesurées en mer Méditerranée (eaux de surface): Na, 11600 mg/l; Mg, 1290 mg/l; Ca, 416 mg/l et K, 390 mg/l (Klein *et al.*, 1999). Les concentrations en minéraux trouvées dans les différents échantillons marins, reflètent les valeurs de la conductivité électrique (CE) (Tableau 20). En effet, la plupart des matières dissoutes dans l'eau se trouvent sous forme d'ions chargés électriquement. La mesure de la conductivité permet donc d'apprécier le degré de minéralisation d'une eau où chaque ion agit par sa conductivité spécifique (Chaouay *et al.*, 2016). La salinité est quantifiée comme la concentration totale en sels solubles et s'exprime en termes de conductivité électrique. Les valeurs moyennes de salinité enregistrées dans les différents ports sont de l'ordre de: [36,2 - 37] g/l; [36,3 - 38,6] g/l et [37,5 - 40] g/l pour les eaux de mer provenant des ports de plaisance, de commerce et de pêche, respectivement (Tableau 20). Elle est de l'ordre de 39,3 g/kg pour les sédiments (Tableau 20). Notons que la salinité de l'eau de mer a une valeur moyenne de 35 g/l, et plus spécifiquement, la salinité au niveau du méditerrané est de l'ordre de 38 g/l (Christian *et al.*, 2000). Les effluents agricoles, industriels ou domestiques qui



contiennent des sels, peuvent contribuer à l'accroissement de la conductivité et par conséquent la salinité des eaux de mer (Christian *et al.*, 2000).

La détermination de la DCO et de la DBO<sub>5</sub> est l'une des mesures importantes, lors de l'évaluation de la charge polluante des eaux. Ces deux paramètres permettent d'évaluer la quantité en matière organique présente dans l'eau. En effet, la DCO représente la quantité d'oxygène consommée lors des processus de décomposition chimique des matières organiques (Patil *et al.*, 2012). La DBO<sub>5</sub> correspond à la quantité d'oxygène nécessaire aux microorganismes pour la décomposition des matières organiques présentes dans l'eau (Patil *et al.*, 2012). Le rapport entre la DCO et la DBO<sub>5</sub> constitue une mesure indicative de la dégradabilité biochimique des composés présents dans l'eau.

Les valeurs moyennes de DCO enregistrées dans les échantillons des eaux de mer contaminées, oscillent entre  $787 \pm 52$  et  $1010 \pm 140$  mg/l. Elles varient entre  $680 \pm 51$  et  $847 \pm 53$  mg/l dans le cas des échantillons des eaux de mer témoins (Tableau 20). Les rapports DCO/DBO<sub>5</sub> (valeurs moyennes) oscillent entre 3,4 et 4,8 pour les eaux de mer polluées, alors qu'ils sont entre 2,8 et 3,6 pour les échantillons des eaux de mer témoins (Tableau 20). Les échantillons présentent des rapports DCO/DBO<sub>5</sub> supérieurs à 3 (à l'exception des eaux de mer témoins issues du port de plaisance), ce qui prouve une contamination chimique marquée avec une charge organique caractérisée par une biodégradation naturelle très difficile (Drira *et al.*, 2016). Nos résultats sont, relativement, en concordance avec ceux trouvés par Zaghden *et al.*, 2016, qui ont rapporté des valeurs de DCO et DBO<sub>5</sub> élevées (DCO =  $1050 \pm 134,72$  et DBO<sub>5</sub> =  $190 \pm 20,41$ ) pour des eaux de mer provenant des ports de Sfax (commerce et pêche), et des rapports DCO/DBO<sub>5</sub> supérieurs à 3, indiquant une contamination chimique des échantillons avec une charge organique non biodégradable. De même, une étude faite sur des eaux de mer prélevées à partir de la zone côtière Arzew, Algérie, a montré des valeurs en DCO et DBO<sub>5</sub> qui varient entre 460,8 et 4944 mg/l; et 207,57 et 2001,62 mg/l, respectivement, avec un rapport DCO/DBO<sub>5</sub> entre 2,5 et 4, soulignant ainsi une charge organique difficilement biodégradable.

**Tableau 20.** Caractérisation physico-chimique des échantillons marins étudiés (Valeurs moyennes  $\pm$  écart type).

Echantillons	Ports	pH	CE (mS/cm)	Salinité (g/l)	Na (mg/l)	Mg (mg/l)	Ca (mg/l)	K (mg/l)	DCO (mg O <sub>2</sub> /l)	DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /l)	DCO / DBO <sub>5</sub>	Carbone (mg/l)		Ntot (mg/l)
												COT	CI	
Eaux de mer	Plaisance	7,9 $\pm$ 0,2	43,2 $\pm$ 0,9	37 $\pm$ 0,8	8196 $\pm$ 1796	831,8 $\pm$ 178,8	376 $\pm$ 41	360,8 $\pm$ 54,3	787 $\pm$ 52	231 $\pm$ 22	3,4 $\pm$ 0,3	83,7 $\pm$ 15,2	31,5 $\pm$ 6,5	51,2 $\pm$ 7,6
	Plaisance témoin	8,3 $\pm$ 0,2	42,3 $\pm$ 0,5	36,2 $\pm$ 0,4	10266 $\pm$ 630	940 $\pm$ 101,3	401,1 $\pm$ 10,6	368,6 $\pm$ 31,9	680 $\pm$ 51	243 $\pm$ 17	2,8 $\pm$ 0,2	42,4 $\pm$ 6,5	16 $\pm$ 6	31 $\pm$ 4,8
	Commerce	7,6 $\pm$ 0,2	45,1 $\pm$ 0,8	38,6 $\pm$ 0,7	8575 $\pm$ 1163	983,3 $\pm$ 70	381,7 $\pm$ 36,5	373,6 $\pm$ 32,1	898 $\pm$ 61	225 $\pm$ 13	4 $\pm$ 0,4	277,5 $\pm$ 28,5	54,1 $\pm$ 14,6	101,7 $\pm$ 10,1
	Commerce témoin	8,1 $\pm$ 0,2	42,5 $\pm$ 0,8	36,3 $\pm$ 0,7	9508 $\pm$ 626,4	967,1 $\pm$ 112,1	385,7 $\pm$ 22,2	344,2 $\pm$ 42,9	712 $\pm$ 77	230 $\pm$ 29	3,1 $\pm$ 0,2	169,8 $\pm$ 14,8	38,3 $\pm$ 12,9	64,1 $\pm$ 7,4
	Pêche	7,5 $\pm$ 0,2	46,7 $\pm$ 1,2	40 $\pm$ 1	7878,1 $\pm$ 1797,4	999,4 $\pm$ 157,3	388,7 $\pm$ 25,6	367 $\pm$ 31,6	1040 $\pm$ 140	216 $\pm$ 19	4,8 $\pm$ 0,7	331,4 $\pm$ 32,8	91 $\pm$ 29,2	124,6 $\pm$ 11,7
	Pêche témoin	8 $\pm$ 0,2	43,9 $\pm$ 0,5	37,5 $\pm$ 0,4	9280,7 $\pm$ 671,2	1002 $\pm$ 123,2	401 $\pm$ 13,8	328,5 $\pm$ 40,8	847 $\pm$ 53	235 $\pm$ 31	3,6 $\pm$ 0,1	238,4 $\pm$ 32	75,5 $\pm$ 28,1	52 $\pm$ 9
Sédiments	Pêche *	7,7 $\pm$ 0,2	46 $\pm$ 1,5	39,3 $\pm$ 1,3*	6505,6 $\pm$ 1630**	738,5 $\pm$ 134,7**	393,1 $\pm$ 48,27**	396,4 $\pm$ 46,6**	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	8,5 $\pm$ 1,6*

\*: g/kg; \*\*: mg/kg ; Nd: Non déterminé.

CE: Conductivité électrique; COT: Carbone organique total; CI: Carbone inorganique; Ntot: Azote total

Le Carbone Organique Total (COT) est un paramètre significatif qui permet de définir la qualité d'un échantillon et son degré de pollution. Il donne une indication directe sur la charge organique des eaux. Les analyses ont montré des valeurs élevées en carbone organique par rapport au carbone inorganique (Tableau 20). Les valeurs de COT enregistrées sont de l'ordre de 83,7; 277,5 et 331,4 mg/l pour les eaux de mer polluées provenant des ports de plaisance, de commerce et de pêche, respectivement. Ces valeurs diminuent dans le cas des eaux témoins pour atteindre 42,4; 169,8 et 238,4 mg/l, respectivement (Tableau 20). Une étude faite par Eganhouse *et* Sherblom (2001), sur des eaux de mer de surface prélevées à partir du port de Boston, Etats-Unis, a rapporté des valeurs élevées en COT qui varient entre 631 et 1300 mg/l. Cette zone (le port de Boston) reçoit, pendant de nombreuses années, des divers déchets et sous-produits générés par la région métropolitaine de Boston et les communautés environnantes. Les sources multiples de contamination par des composés organiques, comme les hydrocarbures, dans les zones côtières et en particulier les ports (trafic maritime intense, mazout issus des bateaux, rejets d'origine continentale...), contribuent à des niveaux élevés en COT dans les eaux et les sédiments marins (Chuan *et al.*, 2016; Al-Said *et al.*, 2018).

L'azote présent dans les échantillons testés peut avoir un caractère organique ou minéral. L'azote organique est principalement un constituant des protéines, des polypeptides, des acides aminés et de l'urée. L'azote minéral comprend l'ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), les nitrites ( $\text{NO}_2^-$ ) et les nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) (Faragallah *et al.*, 2009). Des valeurs moyennes en azote total de l'ordre de 51,2 ; 101,7 et 124,6 mg/l, ont été enregistrées dans les eaux de mer contaminées provenant des ports de plaisance, de commerce et de pêche, respectivement (Tableau 20). Ces valeurs s'atténuent pour atteindre 31; 64,1 et 52 mg/l dans le cas des échantillons témoins, respectivement (Tableau 20). Une concentration moyenne de l'ordre de 8,53 g/kg a été enregistrée dans les sédiments marins (Tableau 20). Des concentrations en azote total allant de 83 à 164 mg/l et de 1,2 à 5,3 g/kg, ont été enregistrées dans des eaux et des sédiments marins provenant du port de Boston, respectivement (Eganhouse *et* Sherblom, 2001). Par ailleurs, une concentration en azote total de l'ordre de 12,3 g/kg, a été trouvée dans des sédiments marins provenant d'une zone portuaire de Sfax (Zaghden *et al.*, 2017). Il est connu que la flore microbienne a besoin d'éléments minéraux pour sa croissance, en particulier d'azote. Cet élément rentre dans l'édification des constituants cellulaires lors de la multiplication des microorganismes (synthèse d'ADN, protéines, etc...). Cependant, la contamination par l'azote constitue une menace sérieuse pour l'environnement marin en engendrant des phénomènes d'eutrophisation et de prolifération phytoplanktonique. Les environnements marins côtiers sont

affectés par des apports considérables d'azote organique et inorganique (Zonta *et al.*, 2007). Les sources possibles de contamination par l'azote dans les eaux de surface comprennent les effluents industriels, l'évacuation des eaux usées domestiques et l'élimination des déchets solides (Zonta *et al.*, 2007).

Le suivi des concentrations en métaux lourds dans les échantillons marins est particulièrement important en raison de leur persistance dans l'environnement, leurs risques écologiques, et leur potentiel de bioaccumulation (Castillo *et al.*, 2013). Dans ce contexte, les teneurs des sept métaux lourds (Cd, Cr, Cu, Zn, Mn, Ni et Fe) ont été mesurées pour examiner le degré de contamination métallique dans les zones étudiées. Le tableau 21 présente les teneurs moyennes des métaux lourds déterminées pour les différents échantillons des eaux de mer, prélevées à partir de trois ports (plaisance, commerce et pêche). Une étude comparative des teneurs de métaux de notre étude avec celles des autres recherches réalisées dans différentes zones côtières du monde (Palestine, Espagne, Australie et Inde), a été réalisée.

Nous constatons que les concentrations en Cd, Cu et Zn dans les différents échantillons des eaux de mer de trois ports (plaisance, commerce et pêche), sont moins élevées que celles enregistrées dans le port de Gaza, Palestine. Par contre, les concentrations enregistrées en Mg dans les eaux polluées de nos échantillons sont supérieures à celles trouvées dans le port de Gaza. Les concentrations en Ni, enregistrées dans les eaux de mer polluées sont relativement comparables à celles trouvées dans le port de Gaza. Par ailleurs, nous notons que les teneurs en métaux lourds (Cd, Cr, Cu et Ni) mesurées dans les échantillons des eaux de mer polluées de notre étude sont supérieures à celles trouvées dans le Baie de Málaga, Espagne. En revanche, nous remarquons, que les teneurs en Cd, Cr, Cu, Ni et Fe enregistrées dans les eaux polluées provenant de trois ports étudiés, sont supérieures à celles trouvées dans la zone côtière Port Pirie, Australie. Pour le Zn et le Mn, les concentrations enregistrées dans les deux zones côtières sont, relativement, comparables. De plus, nous notons que les concentrations en métaux lourds (Cd, Cr, Cu, Zn, Mn, Ni et Fe) enregistrées dans nos échantillons sont inférieures à celles trouvées dans le Golf de Cambay, Inde.

Nous avons également comparé les teneurs de métaux enregistrées dans les différents échantillons des eaux de mer de notre étude aux normes américaines US-EPA (Agence Américaine de Protection de l'Environnement, 2011) et européennes NQE (Normes de Qualité Environnementale, 2013), relatives à la qualité des eaux de mer. Deux types de valeur seuil ont été pris en considération par ces normes: Concentration continue des critères (CCC) (norme américaine US-EPA) ou valeur moyenne annuelle (MA) (norme européenne NQE), pour

protéger les organismes aquatiques des expositions prolongées à un contaminant et Concentration maximale des critères (CMC) (US-EPA) ou Concentration maximale admissible (CMA) (NQE), destinées à protéger les organismes des effets à court terme correspondant par exemple à un pic de concentration et/ou des rejets intermittents d'une substance.

Pour le Cd, nous constatons que les concentrations enregistrées dans les eaux polluées provenant de trois ports étudiés, dépassent les normes américaines (US-EPA, 2011) et européennes (NQE, 2013) ( $p < 0,05$ ), sauf dans le cas du port de plaisance qui présente des concentrations en Cd proches à la concentration CMC de la norme américaine ( $p > 0,05$ ). Concernant les eaux de mer témoins provenant des ports de plaisance et de commerce, nous notons que les valeurs de Cd, sont compatibles avec les normes américaines et européennes ( $p < 0,05$ ). Les concentrations en Cd dans les eaux témoins du port de pêche, dépassent les concentrations CCC et MA des normes américaines et européennes ( $p < 0,05$ ), mais elles sont proches des concentrations CMC et CMA ( $p > 0,05$ ). Par ailleurs, nous notons que les teneurs en Cr, enregistrées dans les trois ports, répondent aux deux concentrations CMC et CCC des normes américaines ( $p < 0,05$ ). Les concentrations en Cu trouvées dans les échantillons des eaux marines provenant des trois ports de la ville de Sfax (polluées et témoins), sont inférieures à la concentration maximale des critères américains (CMC) ( $p < 0,05$ ). En revanche, les teneurs en Cu enregistrées dans les eaux polluées des ports de commerce et de pêche, dépassent la concentration continue des critères américains (CCC). Pour le Ni, nous notons que les concentrations trouvées excèdent de loin les deux concentrations MA et CMA des normes européennes ( $p < 0,05$ ). De même, ces valeurs trouvés en Ni, sont supérieurs à la concentration continue de critère américain (CCC). Par contre, ils sont inférieurs à la la concentration maximale des critères américains (CMC).

Les métaux lourds sont naturellement présents dans les eaux marines mais en quantités très faibles ou sous forme de traces. Une étude faite par Morley *et al.*, (1997), a rapporté des concentrations de certains métaux lourds (Cd, Cu, Mn, Ni et Fe) enregistrées dans des eaux marines profondes loin de la pollution, à partir de la Méditerranée occidentale: 6,1; 92,1; 79,6; 173,7 et 118,3 ng/l; pour le Cd, Mn, Cu, Fe et Ni, respectivement. Naturellement présents dans la biosphère, les métaux lourds proviennent de l'érosion chimique et mécanique des roches et du lessivage des sols (Lacoue-Labarthe, 2007). Cependant, les contributions d'origine anthropique, issues des rejets domestiques et industriels, des eaux d'écoulement contaminées par les pesticides et les engrais utilisés en agriculture et des activités minières, ont contribué à

l'augmentation des concentrations de métaux lourds dans le milieu marin et en particulier, en zone côtière. Les métaux lourds sont considérés comme des polluants majeurs de la Méditerranée (Lacoue-Labarthe, 2007).

**Tableau 21.** Comparaison des teneurs moyennes des métaux lourds ( $\mu\text{g/l}$ ) enregistrées dans les eaux de mer provenant de trois ports (plaisance, commerce et pêche) de la ville de Sfax, par rapport à d'autres eaux de surface et à différentes normes de qualité des eaux marines.

Ports		Cd	Cr	Cu	Zn	Mn	Ni	Fe	Références
Plaisance		$3 \pm 2$	$5 \pm 4$	$8 \pm 5$	$21 \pm 5$	$79 \pm 17$	$251 \pm 42$	$453 \pm 167$	Cette étude
Plaisance témoin		$0,05 \pm 0,05$	$0,8 \pm 0,7$	$7 \pm 2$	$7 \pm 2$	$31 \pm 7$	$120 \pm 36$	$298 \pm 143$	Cette étude
Commerce		$6 \pm 2$	$15 \pm 8$	$25 \pm 6$	$54 \pm 4$	$145 \pm 23$	$302 \pm 42$	$837 \pm 274$	Cette étude
Commerce témoin		$0,09 \pm 0,07$	$8 \pm 2$	$10 \pm 2$	$15 \pm 5$	$53 \pm 13$	$97 \pm 23$	$362 \pm 86$	Cette étude
Pêche		$3 \pm 2$	$10 \pm 4$	$27 \pm 6$	$58 \pm 4$	$128 \pm 27$	$284 \pm 57$	$892 \pm 312$	Cette étude
Pêche témoin		$1,7 \pm 1,2$	$6 \pm 2$	$5 \pm 3$	$20 \pm 4$	$57 \pm 13$	$92 \pm 21$	$342 \pm 118$	Cette étude
Port de pêche Gaza (Palestine)		$233 \pm 55$	-	$63 \pm 27$	$85 \pm 13$	$67 \pm 6$	$251 \pm 5$	-	Wafi, 2015
Baie de Málaga (Espagne)		0,184	0,75	1,31	-	-	3,91	-	Castillo <i>et al.</i> , 2013
Zone côtière, Port Pirie (Australia)		0,66	0,39	2,36	54	89,6	1,73	212,66	Chakraborty <i>et Owens</i> , 2014
Golf de Cambay (Inde)		$445 \pm 14$	$678 \pm 26$	$3537 \pm 118$	$5014 \pm 163$	$4358 \pm 167$	$695 \pm 128$	$3215 \pm 133$	Srinivasa Reddy <i>et al.</i> , 2005
US-EPA	CCC	0,25	85	18	-	-	52	-	US-EPA, 2011
	CMC	2	586	35,3	-	-	470	-	Castillo <i>et al.</i> , 2013
NQE européennes	MA	0,2	-	-	-	-	8,6	-	Directive 2013/39/UE du Parlement Européen et du conseil du 12 août 2013
	CMA	0,45-1,5	-	-	-	-	34	-	

**US-EPA:** Agence Américaine de Protection de l'Environnement; **CCC:** Concentration Continue des Critères (Chronique); **CMC:** Concentration Maximale des Critères (Aiguë); **NQE:** Normes de Qualité Environnementale (NQE), **MA:** Moyenne Annuelle; **CMA:** Concentration Maximale Admissible.



Le cadmium est un élément peu abondant dans les océans. Toutefois, dans les estuaires ou les ports pollués, des concentrations élevées en Cd, ont été enregistrées (Abouhend *et El-Moselhy*, 2015). Il a été constaté que plus de 90% du cadmium dans les environnements marins est d'origine anthropique. Il est principalement utilisé dans différents secteurs d'activités (industrie des revêtements, fabrication d'alliages, de pigments, de peintures, production d'engrais phosphatés...). Le cadmium est un métal hautement toxique. Il a un caractère cancérigène et occasionne des néphrites, des troubles digestifs, et des altérations osseuses (Richir *et Gobert*, 2016).

Le chrome est un contaminant environnemental important et fait partie des métaux les plus utilisés dans le monde. Il est abondamment produit par les procédés industriels, notamment le chromage, la fabrication de colorants et de pigments, et le tannage du cuir (Ciacci *et al.*, 2012). Le chrome peut se rencontrer dans l'environnement aquatique sous deux états d'oxydation stables: trivalent Cr (III) et hexavalent Cr (VI). La forme oxydée Cr (VI) est considérée comme un danger grave pour la santé en raison de son effet cancérigène. De plus, elle représente la forme métallique soluble prédominante dans les systèmes aquatiques (Velma *et al.*, 2009).

Le cuivre est un oligo-élément essentiel requis par la plupart des organismes aquatiques, bien qu'il devienne toxique à des concentrations élevées. Les algicides et les peintures antisalissure sont considérés comme les principaux contributeurs en cuivre dans les zones portuaires (Denton *et al.*, 2001).

Le zinc est un contaminant environnemental très commun et peut pénétrer dans l'environnement marin à la fois par des processus naturels et anthropiques (rejet d'eaux usées domestiques; centrales au charbon; procédés de fabrication impliquant des métaux, etc...) (Denton *et al.*, 2001).

Le manganèse est un élément naturel et largement répandu dans l'environnement. Il se trouve dans les roches, le sol, l'eau et la nourriture. Ainsi, tous les humains sont exposés au manganèse, qui est un composant normal du corps humain. Sa toxicité est faible par rapport aux autres métaux traces (Stubblefield *et al.*, 1997). Le manganèse dans les eaux de surface peut s'oxyder ou s'adsorber sur les particules de sédiment et se déposer au fond (Abouhend *et El-Moselhy*, 2015).

Le nickel est l'un des plus importants constituants de métaux traces du pétrole brut. Par conséquent, sa présence en forte concentration dans les environnements marins peut indiquer un apport direct de polluants pétroliers (Al-Abdali *et al.*, 1996).

Le fer est parmi les éléments les plus abondants de la croûte terrestre et peut être présent dans les eaux naturelles en quantités variables, en fonction de la géologie de la région et des autres composants chimiques de l'eau. Les sources anthropiques de fer dans le milieu marin sont principalement: les expéditions de produits minéraux provenant de mines de phosphates, les peintures de navires, la corrosion des constructions marines, l'enfouissement et les résidus de construction (Abouhend *et El-Moselhy*, 2015).

Le dosage de ces sept minéraux lourds dans les sédiments marins issus du port de pêche de Sfax, a été également étudié. Les teneurs moyennes enregistrées dans les sédiments marins sont représentées dans le tableau 22. Afin d'évaluer l'état de pollution des sédiments marins du port de pêche de Sfax, une comparaison des concentrations de métaux trouvées dans notre étude, avec celles de sédiments de la côte de Sfax et d'autres régions du monde, a été réalisée (Tableau 22). Nous constatons que les concentrations de Cd, Cr, Cu, Zn, et Fe sont en concordance avec celles trouvées dans une recherche faite dans la même zone d'étude (port de pêche de Sfax) (COMETE, 2006). De plus, nous notons que les teneurs en Cd, Mn et Fe sont comparables avec celles trouvées dans la côte nord de Sfax (Serbaji *et al.*, 2012). Par contre, les teneurs en Cr, Cu et Zn sont plus élevées dans le port de Sfax que dans la côte nord de Sfax (Serbaji *et al.*, 2012). Par ailleurs, les concentrations de métaux enregistrées dans les sédiments provenant du port de pêche de Sfax, sont plus élevées que celles trouvées dans la côte de Sfax (Gargouri *et al.*, 2012) et le plateau de Sfax-Kerkennah (Nedia *et al.*, 2010). D'autre part, les concentrations de métaux trouvées dans notre étude sont plus élevées que celles enregistrées dans les sédiments provenant du port d'Izmir (Turquie) et de la baie de Xiamen Ouest (Chine), à l'exception de Cu, Cr et Ni qui sont plus élevés dans les sédiments du port d'Izmir (Turquie).

En raison de l'absence de directives tunisiennes pour les sédiments (Serbaji *et al.*, 2012), nous avons également comparé les teneurs de métaux trouvées dans les sédiments du port de pêche de Sfax aux normes de la qualité des sédiments marins, SQS (Sediment Quality Standards) (Long *et al.*, 1995). Ces normes sont utilisées comme base pour l'élaboration de recommandations nationales pour la qualité des sédiments au Canada et Floride. Deux niveaux de concentrations ont été pris en considération. Une concentration à laquelle la toxicité pourrait commencer à être observée (ERL) et une autre concentration au-dessus de laquelle des effets indésirables pourraient survenir (ERM) (Long *et al.*, 1995; Castillo *et al.*, 2013)

**Tableau 22.** Comparaison des teneurs moyennes des métaux lourds (mg/kg) enregistrées dans les sédiments du port de pêche de Sfax, par rapport à d'autres sédiments de surface (1-5 cm) et aux normes de qualité des sédiments marins (SQGs).

Sources	Cd	Cr	Cu	Zn	Mn	Ni	Fe	Références	
Port de pêche de Sfax	6,3 ± 1,8	77,7 ± 22,3	144,3 ± 22,2	388,5 ± 94	175,7 ± 55,2	167,7 ± 57,3	18281 ± 1968	Cette étude	
Port de pêche de Sfax	5,7	46	133	445	Nd	Nd	19475	COMETE, 2006	
Côte nord de Sfax	7,75 ± 20,6	56 ± 79,4	19 ± 22,7	106 ± 156,8	132,5 ± 45,9	Nd	15190 ± 4974,4	Serbaji <i>et al.</i> , 2012	
Côte de Sfax	5,9 ± 0,5	45,5 ± 8	16 ± 3,5	58,9 ± 16,5	Nd	13,5 ± 8	Nd	Gargouri <i>et al.</i> , (2010)	
Plateau de Sfax-Kerkennah	2,08 ± 5,6	20,32 ± 36,3	7,87 ± 6,1	79,59 ± 289,8	113,2 ± 1,7	25,35 ± 48,6	8823,56 ± 5,9	Nedia <i>et al.</i> , 2010	
Port d'Izmir (Turquie)	6,2	108	182,4	181,6	Nd	222	5124	Filibeli <i>et Yilmaz</i> , 1995	
Ouest de la baie de Xiamen (Chine)	0,3	75	44	139	Nd	37,4	Nd	Zhang <i>et al.</i> , 2007	
SQGs	ERL	1,2	81	34	150	Nd	20,9	Nd	Castillo <i>et al.</i> , 2013 Long <i>et al.</i> , 1995
	ERM	9,6	370	170	410	Nd	51,6	Nd	

**Nd:** non déterminé.

**SQGs** (Sediment Quality Guidelines): Normes de la qualité des sédiments marins.

**ERL** (Effects range low): Concentration à laquelle la toxicité pourrait commencer à être observée.

**ERM** (Effects range median): Concentration au-dessus de laquelle des effets indésirables pourraient survenir.

En se référant à ces normes, nous constatons que les concentrations de Cd, Cu et Zn sont supérieures aux concentrations ERL ( $p < 0,05$ ), concentrations auxquelles la toxicité pourrait commencer à être observée, et inférieures aux concentrations ERM, concentrations au-dessus de lesquelles des effets indésirables pourraient survenir. Par ailleurs, nous notons que la teneur en Cr répond aux normes SQGs (concentration inférieure à ERL et ERM), ce qui n'est pas le cas pour la concentration en Ni qui les dépasse.

Ces résultats prouvent la contamination métallique de la zone d'étude notamment par le Cd, Cu, Zn et Ni. Des recherches antérieures réalisées sur la côte de Sfax, ont également prouvé cette contamination (COMETE, 2006; Serbaji *et al.*, 2012; Zaghden *et al.*, 2016). Ces métaux lourds provenaient de diverses sources anthropiques, notamment des effluents municipaux et industriels, ou de sources atmosphériques, telles que la combustion de combustibles (Zaghden *et al.*, 2016).

Les zones côtières font partie des environnements les plus sensibles à la contamination par les métaux lourds, en raison des sources de pollution terrestres situées à proximité (Wang *et al.*, 2007). Presque toutes les pratiques industrielles qui produisent des rejets de déchets sont des sources potentielles de métaux lourds dans l'environnement marins (Denton *et al.*, 2001). Les eaux usées domestiques, les boues d'épuration, les eaux de ruissellement urbaines et le lixiviat des sites d'élimination des déchets solides sont également des sources évidentes de métaux lourds dans les rivières, les estuaires et les eaux côtières (Denton *et al.*, 2001). Dans plusieurs cas une contamination par les métaux lourds peut être liée à une contamination par les hydrocarbures pétroliers vu que le pétrole brut et certains de ses dérivés contiennent dans leurs compositions chimiques des composés métalliques (Bertrand *et Mille*, 1989).

Le dosage des hydrocarbures totaux dans les différents échantillons étudiés fait ressortir des teneurs de l'ordre de  $0,4 \pm 0,06$ ;  $0,5 \pm 0,03$  et  $0,65 \pm 0,05$  mg/l, dans les eaux contaminées issues des ports de plaisance, de commerce et de pêche, respectivement (Tableau 23). Ces concentrations s'atténuent dans le cas des échantillons témoins pour atteindre des teneurs de l'ordre de  $0,1 \pm 0,02$ ;  $0,18 \pm 0,02$  et  $0,3 \pm 0,02$  mg/l dans les trois ports, respectivement. Pour les sédiments marins, la teneur moyenne en hydrocarbures enregistrée était de l'ordre de  $4201 \pm 932,4$  mg/kg.

**Tableau 23.** Teneurs en hydrocarbures totaux (Valeurs moyennes  $\pm$  écart-type) enregistrées dans les différents échantillons marins prélevés de trois ports de Sfax.

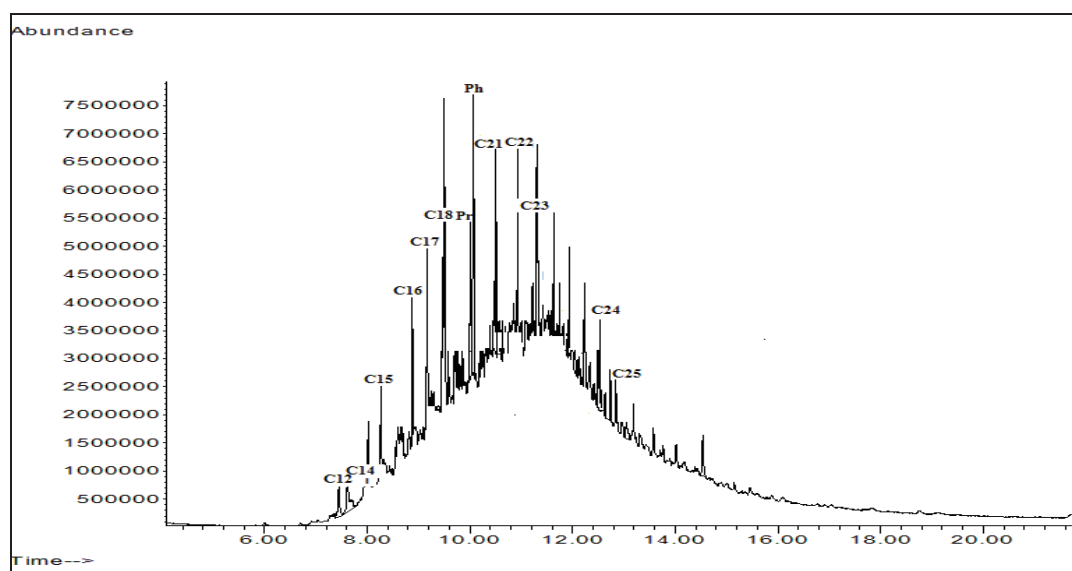
Echantillons	Ports	Teneurs en hydrocarbures
<b>Eaux de mer (mg/l)</b>	Port de plaisance	$0,4 \pm 0,06$
	Port de plaisance <sub>Témoin</sub>	$0,1 \pm 0,02$
	Port de commerce	$0,5 \pm 0,03$
	Port de commerce <sub>Témoin</sub>	$0,18 \pm 0,02$
	Port de pêche	$0,65 \pm 0,05$
	Port de pêche <sub>Témoin</sub>	$0,3 \pm 0,02$
<b>Sédiments (mg/kg)</b>	Port de pêche	$4201,2 \pm 932,4$

L'étude de la contamination par les hydrocarbures des eaux et des sédiments marins côtiers de la région de Sfax, a fait l'objet de nombreuses recherches au cours des dernières décennies (Zaghden *et al.*, 2016). Des recherches antérieures réalisées sur des sédiments provenant des ports de pêche et de commerce de Sfax, ont montré des niveaux élevés d'hydrocarbures de l'ordre de 5480 mg/kg pour le port de pêche et de 200 à 8200 mg/kg pour le port de commerce (COMETE, 2006). De même, une étude faite par Louati *et al.*, 2001, a révélé des teneurs en hydrocarbures totaux entre 1121 et 5217 mg/kg, dans des sédiments

marins prélevés à partir de la côte de Sfax. Par ailleurs, des concentrations importantes en hydrocarbures totaux de l'ordre de 65 mg/l et de 1027 mg/kg, ont été enregistrées dans des échantillons des eaux et des sédiments marins, respectivement, recueillis des ports de pêche et de commerce de la ville de Sfax (Zaghden *et al.*, 2016). L'impact de la contamination par les hydrocarbures, dans la côte de Sfax est devenu important, en particulier dans les zones d'activités portuaires (Zaghden *et al.*, 2007). La région reçoit des hydrocarbures de plusieurs origines, telles que les activités de pêche, le trafic maritime, les rejets des eaux usées municipales et industrielles, en particulier du stockage de pétrole brut et de phosphogypse sur la côte (Zaghden *et al.*, 2005).

En outre, une analyse des hydrocarbures présents dans les différents échantillons par la technique GC-MS, a été réalisée. Il s'est avéré, que les échantillons marins testés, en particulier les échantillons des eaux de mer polluées et les sédiments, présentent une contamination par des hydrocarbures très marquée (Figures 1-8, Annexe II).

Des composés hydrocarbonés présents dans les différents échantillons sont rapportés dans les tableaux 1-5, Annexe III. La figure 22 présente un exemple d'un chromatogramme GC-MS montrant des hydrocarbures contenus dans un échantillon des eaux de mer provenant du port de pêche de Sfax (31-12-2013).



**Figure 22.** Chromatogramme GC-MS montrant des hydrocarbures contenus dans un échantillon des eaux de mer provenant du port de pêche de Sfax (31-12-2013), (Pr : pristane; Ph: phytane; C<sub>12</sub>-C<sub>25</sub> indiquent les *n*-alcanes avec les nombres des atomes de carbone de 12 à 25).

Les données GC-MS indiquent la présence d'une grande variété d'hydrocarbures, y compris essentiellement des *n*-alcanes (C<sub>12</sub>-C<sub>32</sub>), des *n*-alcènes (C<sub>12</sub>-C<sub>23</sub>), des hydrocarbures aromatiques (le phénol, un hydroxybenzène, et le naphthalène et le phénanthrène, deux

hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)), ainsi que des isoprénoïdes (pristane, phytane et squalène) dans la plupart des échantillons étudiés, suggérant une contamination pétrolière des eaux et des sédiments marins de différents ports de la ville de Sfax. Les hydrocarbures pristane (Pr) et phytane (Ph) sont des isoprénoïdes couramment détectés dans les sédiments marins côtiers (Readman *et al.*, 2002). Ils sont souvent considérés comme de bons indicateurs d'une contamination pétrolière (Volkman *et al.*, 1992; Zaghden *et al.*, 2007).

Une étude faite par Zaghden *et al.* (2007), qui s'est intéressée à la distribution des hydrocarbures dans des sédiments marins d'une zone Sud de la Méditerranée située entre la ville de Sfax et les îles de Kerkennah, montre la présence de plusieurs composés hydrocarbonés (hydrocarbures aliphatiques et alicycliques, alcanes, phytane, pristane, HAPs...) au niveau de la zone cible. Il a été rapporté que les taux des hydrocarbures identifiés dans des échantillons de sédiments et des eaux de surface, ainsi que dans des organismes benthiques, collectés à partir des différents sites du côte tunisienne méditerranée (Sfax – Thyna), ont montré des niveaux de contamination importants (Aloulou *et al.*, 2010). Selon les critères de qualité de l'eau de l'Agence Américaine de Protection de l'Environnement (US-EPA, 1987), les polluants pétroliers ayant une concentration de 100 µg/l, peuvent avoir des effets aigus sur certains organismes. Par ailleurs, des concentrations de pétrole aussi faibles que 1 à 10 µg/l peuvent entraîner une perturbation chronique chez des organismes sensibles (par exemple, les larves aquatiques) (US-EPA, 1987; Latimer *et* Quin., 1998).

Dans le but d'explorer la zone d'étude et d'examiner le degré de pollution, une analyse statistique a été menée afin de déterminer les divergences et les convergences entre les échantillons provenant des trois ports (plaisance, commerce et pêche) de la région de Sfax et collectés pendant les trois années 2015, 2016 et 2017. L'influence des différents paramètres physico-chimiques et biologiques sur la distribution des ensembles d'échantillons, a été également déterminée.

Dans un premier volet, les tests de Student et Wilcoxon nous ont permis de comparer le degré de pollution entre les eaux contaminées et les eaux considérées comme témoins, en se basant sur les paramètres physico-chimiques suivants: DCO/DBO<sub>5</sub>, COT, HC<sub>tot</sub> et métaux (Cu, Cd, Ni, Fe, Zn, Mn, Cr).

Nous constatons que les rapports DCO/DBO<sub>5</sub> étaient 1,3 fois plus élevés ( $p < 0,05$ ) dans les échantillons des eaux polluées ( $4,19 \pm 0,74$ ) que dans les eaux témoins ( $3,18 \pm 0,93$ ). Par ailleurs, une différence significative au niveau de la concentration en carbone organique totale (COT), entre les échantillons contaminés ( $231,5 \pm 115$ , mg/l) et les échantillons témoins

( $150,22 \pm 85,95$ , mg/l), a été également, détectée ( $p < 0,05$ ). En moyenne, la teneur en COT dans les eaux polluées était 1,6 fois plus grande que dans les échantillons témoins. De même, la teneur des hydrocarbures totaux (HCtot), était plus élevée dans tous les échantillons contaminés des trois ports étudiés ( $0,5 \pm 0,13$ , mg/l) que dans les échantillons témoins ( $0,19 \pm 0,09$  mg/l) ( $p < 0,05$ ). En moyenne, la concentration des HCtot enregistrée dans les échantillons contaminés était 2,5 fois plus grande que dans les eaux de mer témoins.

Une forte corrélation entre les concentrations de carbone organique totale (COT) et les teneurs en hydrocarbures totaux (HCtot), a été observée. En effet, le COT s'est avéré être fortement et positivement corrélé aux HCtot ( $r = 0,9$ ;  $p < 0,05$ ). Il a été rapporté qu'une forte corrélation entre la concentration d'hydrocarbures totaux (HCtot) et la concentration en COT dans les eaux et les sédiments superficiels marins, était observée (Chuan *et al.*, 2016; Al-Said *et al.*, 2018). En effet, les sources multiples de contamination par les hydrocarbures dans les zones côtières et en particulier les ports (trafic maritime intense, mazout issus des bateaux, rejets d'origine continentale...) contribuent à des niveaux élevés en COT dans les eaux et les sédiments marins (Chuan *et al.*, 2016; Al-Said *et al.*, 2018).

En ce qui concerne les métaux lourds, nous notons des teneurs plus élevées en Fe, Zn, Cu et Mn ( $p < 0,05$ ) dans les échantillons des eaux contaminées que dans les témoins. Pour le Ni, la différence des teneurs enregistrées dans les eaux contaminées et les eaux témoins, issues du port de plaisance, n'était pas significative ( $p > 0,05$ ). Cependant, dans les ports de pêche et de commerce, les échantillons contaminés ont des valeurs de Ni significativement plus élevées que celles des témoins ( $p < 0,05$ ).

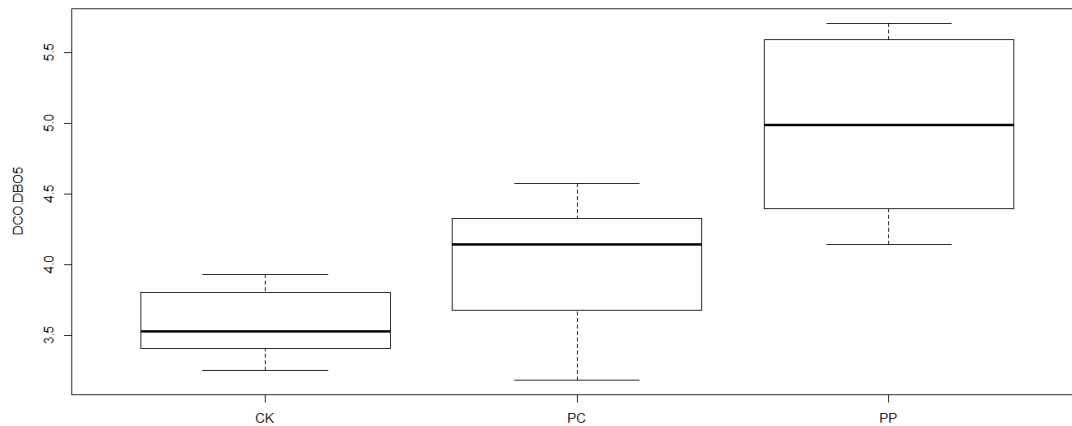
Ces résultats mettent en relief le degré de contamination des échantillons d'eaux issues de trois différents ports. Bien que les échantillons considérés témoins présentent une contamination moins importante que les échantillons pollués, cela n'empêche toutefois pas de dire qu'ils ont été affectés par divers contaminants (DCO/DBO<sub>5</sub> entre 2,8 et 3,6; présence d'une variété des hydrocarbures et des métaux lourds). Ceci peut expliquer le degré de la pollution énorme que souffre le littoral Sud de Sfax. De nombreuses recherches antérieures réalisées sur la côte de Sfax, ont rapporté le niveau de pollution alarmant de ce littoral (Louati *et al.*, 2001; Zaghdien *et al.*, 2005, 2007, 2016; Drira *et al.*, 2016). En effet, les effluents industriels et urbains chargés en polluants sont rejetés dans la mer par divers canaux, notamment les embouchures, sans traitement adéquat ni préalable. Les autorités locales ont opté pour l'installation de stations d'épuration des eaux usées afin de contrôler les flux d'eaux usées déversées dans le littoral. Les stations ont des performances de processus et des



rendements d'élimination différents. L'installation de traitement des eaux usées de Sfax Sud a, par exemple, un taux de prélèvement limité à 30%. L'eau rejetée est toujours chargée par divers contaminants (hydrocarbures, métaux lourds et éléments toxiques) (Zaghden *et al.*, 2016).

Dans un 2<sup>ème</sup> volet, une comparaison du niveau de pollution organique entre les trois ports de la ville de Sfax (plaisance, commerce et pêche), a été également étudiée. Deux paramètres ont été pris en considération; le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> et le taux des HCtot.

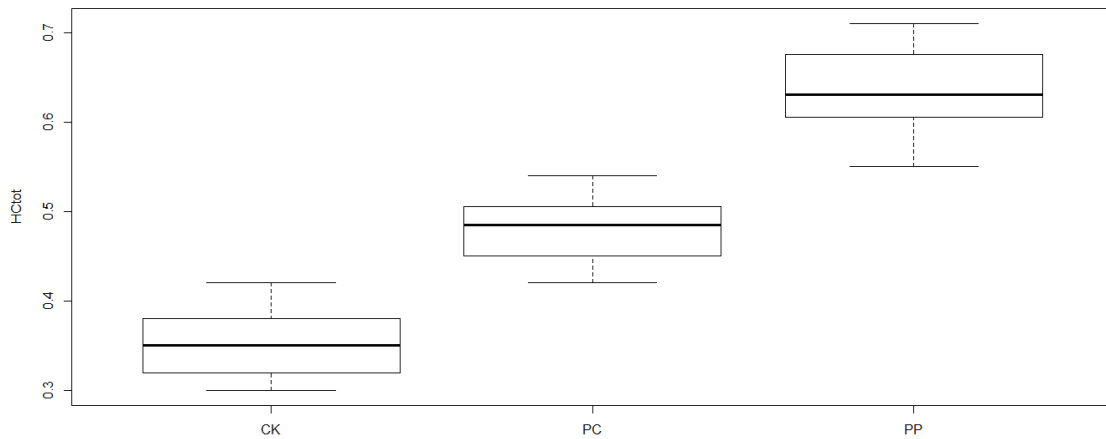
Le test ANOVA montre que le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> et le taux des hydrocarbures totaux (HCtot) sont significativement différents entre les trois ports ( $p < 0,05$ ). En fait, nous notons que le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> avait le plus haut niveau dans le port de pêche, suivi du port de commerce et enfin le port de plaisance (Fig. 23).



**Figure 23.** Les boîtes à moustaches du rapport DCO/DBO<sub>5</sub> dans les trois ports de la ville de Sfax. La boîte (le rectangle) désigne les valeurs comprises entre le premier quartile et le troisième quartile, la ligne à l'intérieur désigne la médiane et les deux traits de part et d'autre du rectangle désignent la valeur minimale et la valeur maximale.

CK: port de plaisance, PC: port de commerce et PP: port de pêche.

De même, les teneurs en hydrocarbures totaux, étaient plus concentrés au niveau du port de pêche, suivi du port de commerce et de port de plaisance (Fig. 24).

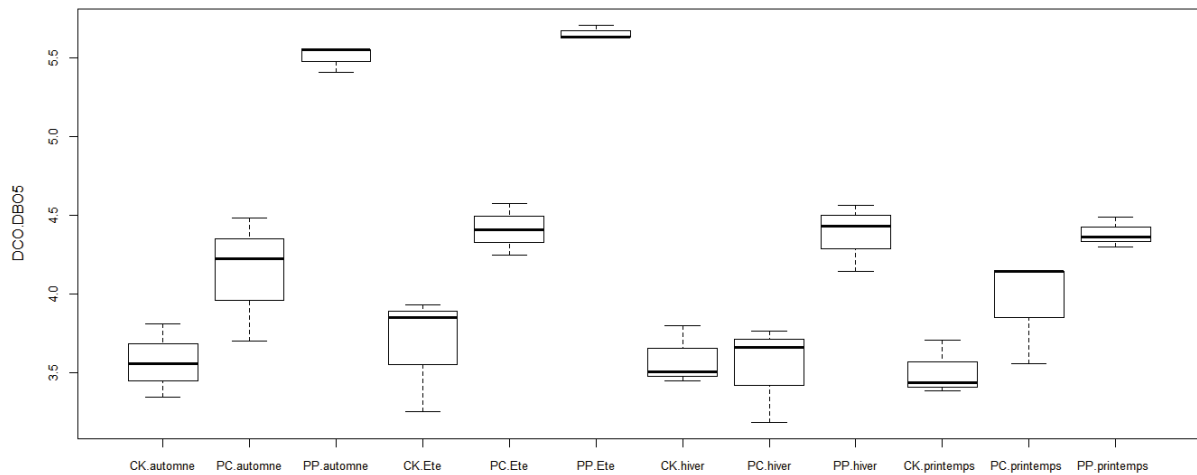


**Figure 24.** Les boîtes à moustaches de la teneur des hydrocarbures totaux (HCtot) dans les trois ports de la ville de Sfax. La boîte (le rectangle) désigne les valeurs comprises entre le premier quartile et le troisième quartile, la ligne à l'intérieur désigne la médiane et les deux traits de part et d'autre du rectangle désignent la valeur minimale et la valeur maximale.

CK: port de plaisance, PC: port de commerce et PP: port de pêche.

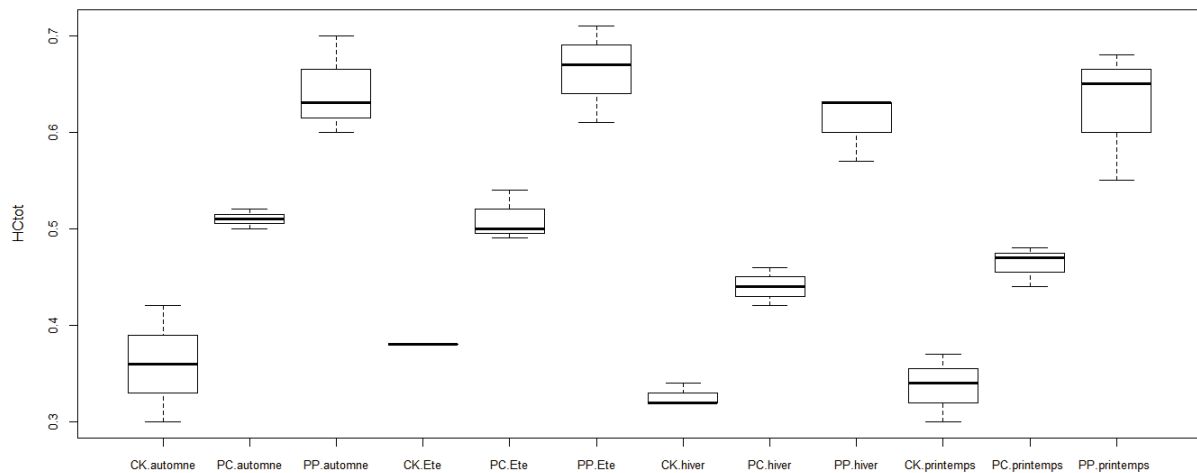
Cette contamination organique plus marquée au niveau des ports de pêche et de commerce, par rapport au port de plaisance, peut être expliquée par le fait que ces deux ports sont plus exposés aux sources de contamination à travers les activités de pêche, de traitement des produits de mer, des activités en relation avec les produits de phosphate et des activités d'entretien mécanique des bateaux, ce qui n'est pas le cas pour le port de plaisance de Sfax.

Afin d'avoir une idée sur la relation entre le degré de pollution et la saison, une étude statistique en utilisant le test ANOVA a été réalisée. Les résultats ont montré, que le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> et que la concentration en HCtot diffèrent significativement en fonction de la saison ( $p < 0,05$ ). En effet, le rapport DCO/DBO<sub>5</sub> est plus élevé en été et en automne qu'en hiver et en printemps. Notons qu'il n'existe pas de différence significative entre le printemps et l'hiver d'une part, et entre l'été et l'automne d'autre part. En ce qui concerne les hydrocarbures totaux (HCtot), il a été constaté qu'en été le taux des hydrocarbures est plus élevé qu'en hiver ( $p < 0,05$ ). En se basant sur les deux paramètres; rapport DCO/DBO<sub>5</sub> et dosage des hydrocarbures totaux (HCtot), nous avons pu conclure que la pollution est plus marquée pendant la saison chaude que la saison froide, et que le port de pêche est le plus pollué suivi du port de commerce et du port de plaisance (Figures 25 et 26).



**Figure 25.** Les boîtes à moustaches du rapport DCO/DBO5 en fonction de différents ports et des saisons. Les rapports DCO/DBO5 sont représentés par des boîtes à moustaches où la boîte (le rectangle) désigne les valeurs comprises entre le premier quartile et le troisième quartile, la ligne à l'intérieur désigne la médiane et les deux traits de part et d'autre du rectangle désignent la valeur minimale et la valeur maximale.

CK: port de plaisance, PC: port de commerce et PP: port de pêche.



**Figure 26.** Les boîtes à moustaches du teneur en hydrocarbures totaux (HCtot) en fonction de différents ports et des saisons. Les teneurs en HCtot sont représentés par des boîtes à moustaches où la boîte (le rectangle) désigne les valeurs comprises entre le premier quartile et le troisième quartile, la ligne à l'intérieur désigne la médiane et les deux traits de part et d'autre du rectangle désignent la valeur minimale et la valeur maximale.

CK: port de plaisance, PC: port de commerce et PP: port de pêche

Ces résultats sont en concordance avec d'autres travaux antérieurs réalisés sur des échantillons d'eaux marines où les concentrations de contaminants organiques étaient plus

élevées en été qu'en hiver (Klages *et* Bornman, 2003; Adeniji *et al.*, 2017). D'autres recherches ont montré que la pollution des eaux de mer est plus marquée dans la saison pluviale. En effet, les précipitations contribuent à l'augmentation du taux de pollution dans les zones côtières par l'apport de contaminants terrestres (Peng, 2015; Al-Agroudy *et al.*, 2017).

Il en découle de ces informations concernant la caractérisation physico-chimique des échantillons marins étudiés, que la zone d'étude souffre d'une contamination métallique et organique très marquée. Cette pollution est essentiellement due aux rejets non traités des établissements de conditionnement et de transformation des produits de mer, des activités d'entretien mécanique des bateaux sur les quais et à l'intérieur du bassin, la décharge de déchets inertes à proximité du port de pêche, les activités de transformation des phosphates, des rejets d'abattoir municipal associés aux rejets des autres activités industrielles telles que la tannerie, les savonneries, la peinture, etc... (COMETE, 2006; Drira *et al.*, 2016). Plus inquiétante encore, est l'insuffisance des mesures et des outils de protection de l'environnement et l'utilisation inadéquate de l'espace, et parfois l'absence de réelle perception des effets dévastateurs que peut avoir une pollution du milieu marin par des polluants organiques et inorganiques sur les activités vitales dans l'environnement (Zaghden *et al.*, 2016). Ces composés sont d'excellents traceurs de la pollution urbaine et industrielle et ils font partie des composés les plus toxiques étant donné leur faible biodégradation. Leur présence nécessite une surveillance régulière, des mesures préventives et une interdiction totale des rejets non conformes aux normes en vigueur tout au long du littoral Sud de Sfax (Zaghden *et al.*, 2007).

### **III. Etude de la biodiversité microbienne des échantillons marins étudiés**

Au début du XXème siècle, la classification des microorganismes reposait sur des critères morphologiques et biochimiques (Rajendhran *et al.*, 2011). A cette époque, les microbiologistes étaient conscients que ces méthodes étaient restrictives et insuffisantes pour distinguer les espèces les unes des autres (Rajendhran *et al.*, 2011). Le développement des approches moléculaires, dans les années 1990, a permis de décrire plus précisément les microorganismes et d'établir un nouveau système de classification fondé sur une comparaison des séquences des gènes codant pour les sous-unités 16S (Domaines *Bacteria* et *Archaea*) et 18S (Domaine *Eucarya*) des ARNs ribosomiaux (Das *et al.*, 2014). Ces outils moléculaires offrent la possibilité d'avoir une vision plus intégrative de l'ensemble des événements se déroulant dans un écosystème donné. Les méthodes moléculaires utilisées dans la présente étude sont: la technique d'empreinte génétique la PCR-SSCP (Single Strand Conformation

Polymorphism) et les techniques de séquençage haut-débit: le pyroséquençage et Illumina MiSeq.

### III.1. Technique d’empreinte génétique «PCR-SSCP»

L’approche moléculaire SSCP a été utilisée pour caractériser la composition et la dynamique de la communauté microbienne dans les différents échantillons marins. Après extraction des ADNs totaux d'un mélange de microorganismes et amplification spécifique par PCR des 3 domaines (*Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*), la technique SSCP permet d'obtenir une empreinte moléculaire des écosystèmes microbiens en séparant les molécules des gènes codants pour des ARNr, en fonction de leurs séquences. Une communauté microbienne complexe est alors représentée sous la forme d'un profil de pics où chaque pic correspond à une séquence, et par une espèce bactérienne, dans le cas des ARNr 16 S (Domaine *Bacteria*) (Chachkhiani *et al.*, 2004; Chamkha *et al.*, 2008). Cette «empreinte moléculaire» permet alors de caractériser, sans mise en culture, la diversité d'une microflore, de comparer des microflores semblables et d'en suivre la dynamique en terme de présence grâce à l'ARNr 16S (Domaine *Bacteria* et *Archaea*) et l’ARNr 18S (Domaine *Eucarya*).

Les profils SSCP réalisés pour les trois domaines du monde microbien (*Bacteria*, *Archaea* et *Eucarya*) au cours de cette étude sont présentés dans les figures 1-16 Annexe IV. Les résultats, montrent une variabilité au niveau de la biodiversité microbienne dans les 93 échantillons analysés. Nous notons la présence des 3 domaines: *Bacteria*, *Eucarya*, et *Archaea*. Une dominance du domaine *Bacteria* (présence des bactéries dans 93 échantillons) suivie du domaine *Eucarya* (présence des microorganismes eucaryotes dans 60 échantillons), a été marquée. En revanche, les archéobactéries n’ont été détectées que dans un nombre restreint des échantillons (5 échantillons) (Fig. 16, Annexe IV).

Par ailleurs, les profils SSCP révèlent que la structure de la communauté microbienne dans les différents échantillons étudiés était visuellement dynamique et non stable. En effet, les profils des gènes codant pour l’ARNr 16S (Domaine *Bacteria* et *Archeaa*) et l’ARNr 18S (Domaine *Eucarya*) bougent au cours du temps et changent d’un échantillon à l’autre, indépendamment de l’année (2013, 2014, 2015, 2016 et 2017), de la saison (Hiver, Printemps, Automne et Été), du site (port de plaisance, port de plaisance et port de pêche) et de degré de pollution (échantillon pollué ou témoin).

Le dendrogramme, ci-dessous, obtenu par le logiciel R, présente le taux de similarité entre les échantillons marins prélevés en 2015, 2016 et 2017, en se basant sur la composition de la communauté bactérienne de chaque échantillon exploré moyennant la technique SSCP

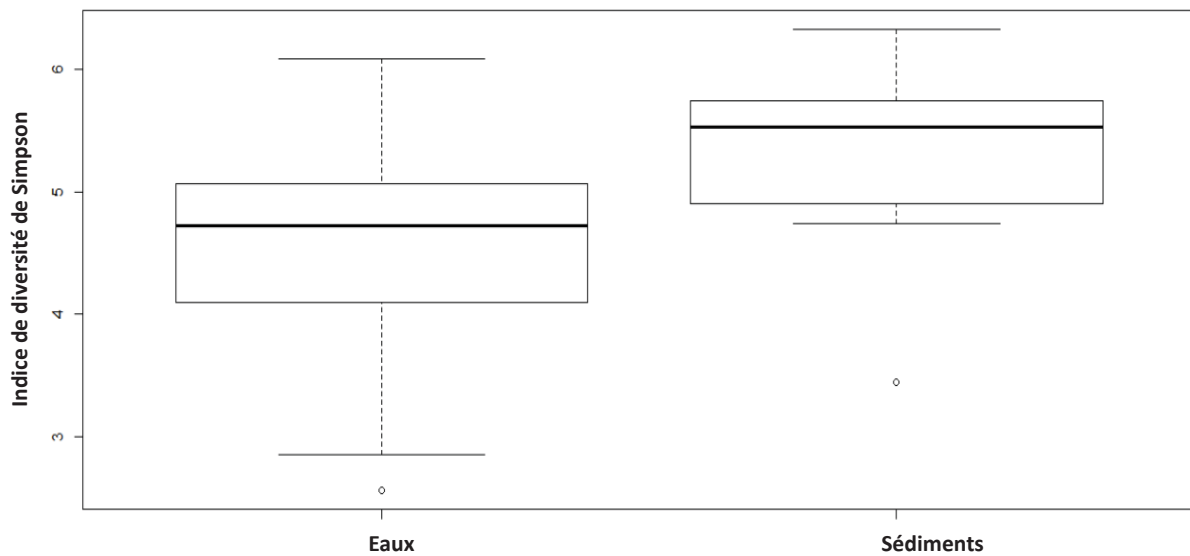
(Fig. 27). À partir de ce dendrogramme, on peut confirmer que les échantillons sont regroupés sans tenir compte de l'année (2015 ou 2016 ou 2017), de la saison (Hiver ou Printemps ou Automne ou Été), du site (Port de plaisance ou de commerce ou de pêche de la ville de Sfax) et de degré de pollution (pollué ou témoin). Par contre, nous notons que la plupart des échantillons de sédiments (10/12 échantillons, soit 83%) sont regroupés ensemble (Fig. 27), ce qui permet de dire que la composition de la communauté bactérienne au niveau de sédiments est plus conservée par rapport à celle des eaux de mer. Ces résultats sont en accordance avec ceux trouvés par Won *et al.*, (2017), qui ont montré que la communauté bactérienne des sédiments, n'a pas beaucoup changé comme celle de la communauté d'eau de mer en fonction de la saison (printemps ou automne) et du lieu (deux sites de prélèvement différentes). Ceci paraît être logique puisque les sédiments sont moins exposés aux changements environnementaux que les eaux de surface, et par la suite, la communauté microbienne peut être plus au moins conservée au niveau de ces écosystèmes (Bianchi, 1973). En effet, soumise à l'action des courants, des vents, des précipitations atmosphériques et des radiations solaires, la couche superficielle de l'eau constitue un milieu particulièrement dynamique. Elle est le siège d'échanges permanents de gaz, d'humidité, de chaleur et de substances chimiques d'origine naturelle ou anthropique entre l'atmosphère et les océans (Liss *et Duce* 1997). Les eaux marines de surface sont considérées comme un environnement particulier pour les microorganismes pouvant contenir des espèces et des groupes inhabituels. Ces différents facteurs peuvent, par conséquent, influencer la composition des communautés microbiennes présentes au niveau de cette interface. L'existence d'au moins deux groupes différents (Groupe I et Groupe II, Fig. 27) peut être due à un autre paramètre qui n'a pas été mesuré (Exemple: courantologie, niveau de marée, sens du vent...).





Par ailleurs, l'indice de biodiversité Simpson (exprimé en log) pour les différents domaines, a été déterminé par l'utilisation de logiciel Safum-Matlab (version 7.4.0) (Tableau 1, Annexe VI). Cet indice évalue à la fois la richesse et l'équitabilité des différentes espèces trouvées dans un échantillon.

La comparaison de la diversité de la communauté bactérienne entre les eaux de mer polluées et les sédiments marins, prélevés en 2015, 2016 et 2017, en se basant sur l'indice de diversité de Simpson (Domaine *Bacteria*), a révélé que les échantillons des sédiments sont relativement plus diversifiés que les eaux marines ( $p < 0,05$ ) (Fig. 28).



**Figure 28.** Les boîtes à moustaches de la diversité bactérienne (Indice de diversité de Simpson) en fonction de la nature de l'échantillon (eau ou sédiment). Les indices de diversité de Simpson sont représentés par des boîtes à moustaches où le rectangle désigne les valeurs comprises entre le premier quartile et le troisième quartile, le trait à l'intérieur désigne la médiane et les deux traits de part et d'autre du rectangle désignent la valeur minimale et la valeur maximale.

Une étude réalisée par Feng *et al.* (2009), sur la composition de la communauté microbienne dans l'estuaire du Chang Jiang et les régions côtières de la mer de Chine orientale, a révélé que la diversité bactérienne dans les échantillons de sédiment était plus grande que celle dans les échantillons des eaux de mer. De même, Jeanbille *et al.* (2016) et Won *et al.* (2017), ont montré que les microorganismes procaryotes et eucaryotes sont beaucoup plus abondants dans le sédiment que dans la colonne d'eau. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les sédiments sont considérés comme un siège d'une accumulation de particules qui se sont déposées sur le fond marin, elles sont généralement riches en matières organiques et en nutriments, ce qui favorise une richesse en biodiversité (Lohrer *et* Hancock, 2004). Des estimations récentes révèlent que les sédiments côtiers abritent les valeurs les plus élevées d'abondance et de diversité microbienne dans les domaines marins, ceci est dû à la

stratification du gradient d'oxydoréduction et à la disponibilité des éléments nutritifs qui façonnent ces communautés (Acosta-González *et* Marqués, 2016).

### III.1.1. Etude statistique des paramètres physico-chimiques et des résultats SSCP

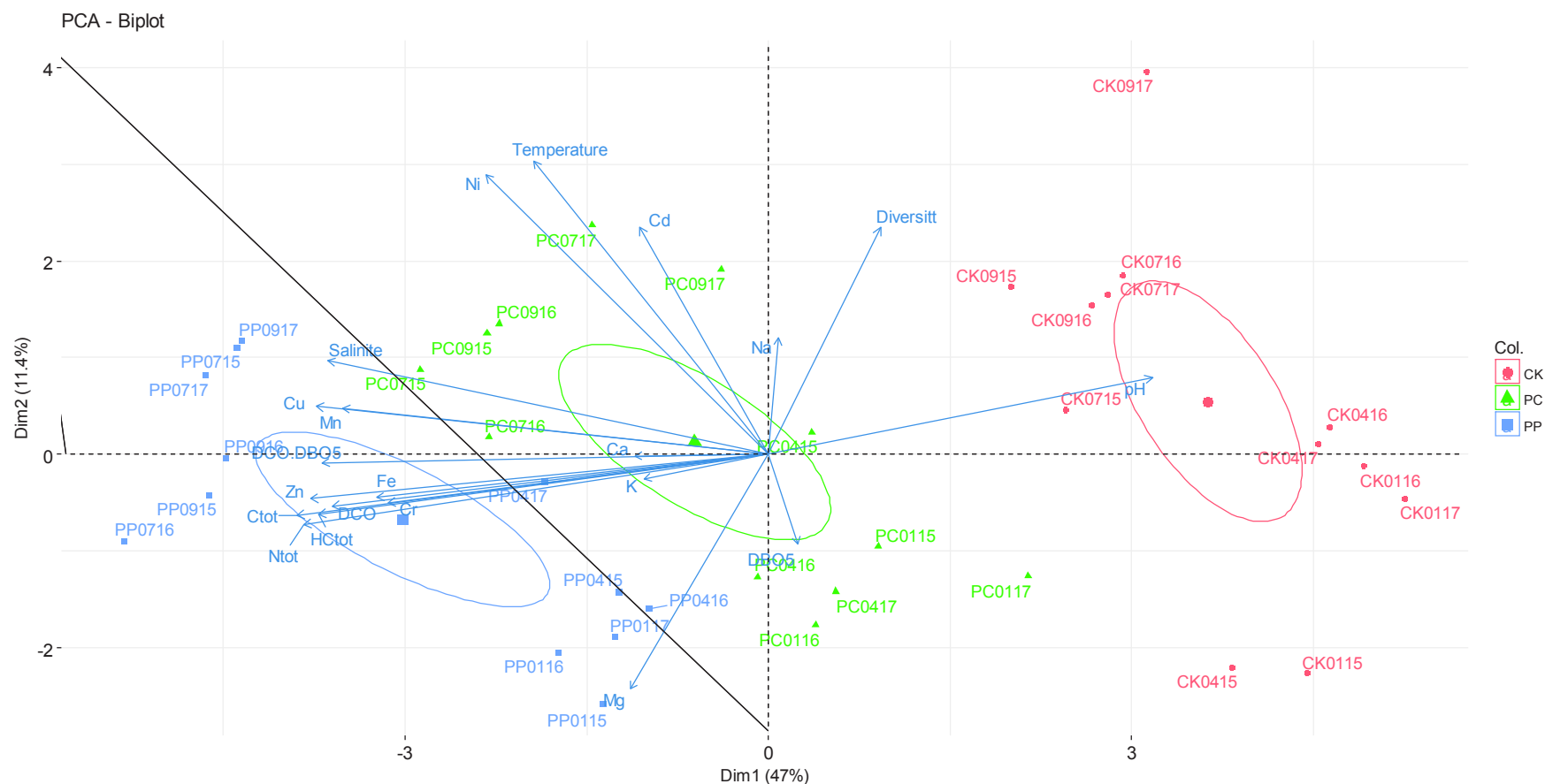
Dans le but d'établir une relation entre les résultats de profils PCR-SSCP du domaine *Bacteria* et les différents paramètres physico-chimiques des échantillons marins et pour mieux évaluer l'effet de ces paramètres sur la composition de la communauté bactérienne, une analyse de redondance (RDA: Redundancy Analysis) a été réalisée, sur 72 échantillons des eaux de mer (pollués et témoins), provenant de trois ports (plaisance, commerce et pêche) de la ville de Sfax et prélevés en 2015, 2016 et 2017. Vingt-et-un paramètres ont été étudiés: Année, degré de pollution (pollué ou témoin), température, salinité, DCO, DBO<sub>5</sub>, DCO/DBO<sub>5</sub>, carbone organique total (COT), hydrocarbures totaux (HCtot), azote total (Ntot), métaux (Fe, Zn, Cu, Ni, Mn, Cr et Cd) et minéraux (Na, Ca, Mg et K). De même, cette analyse (RDA), a été réalisée sur 12 échantillons des sédiments marins provenant du port de pêche de Sfax et prélevés en 2015, 2016 et 2017, pour évaluer l'effet des paramètres: Année, salinité, hydrocarbures totaux (HCtot), azote total (Ntot), métaux (Fe, Zn, Cu, Ni, Mn, Cr et Cd) et minéraux (Na, Ca, Mg et K), sur la composition de la communauté bactérienne au sein de différents échantillons des sédiments.

Les résultats de l'analyse statistique, montrent qu'aucune corrélation n'a été identifiée entre la communauté bactérienne et les paramètres physico-chimiques ( $p > 0,05$ ) (Annexe V). Les paramètres physico-chimiques sont souvent assujettis à des variations aléatoires spatio-temporelles induites par des facteurs naturels et par les activités anthropiques qui modifient les caractéristiques de l'eau et qui affectent par conséquent la biodiversité microbienne de cet écosystème (Massu *et* Landmann, 2011). Les écosystèmes marins côtiers subissent des modifications permanentes des vitesses de production, de l'abondance des organismes et de la structure des communautés (Quéguiner B., 2009). En effet, l'eau est le siège de fluctuations spatio-temporelles importantes, en particulier dans les milieux côtiers et estuariens (Avoine, 1981; Jeffries *et al.*, 2016), qui représentent des zones particulièrement à risque en raison de leur urbanisation et de leur industrialisation importantes. Sous l'effet des fleuves et des marées, la masse d'eau présente en un point donné ne sera pas la même au cours de la journée, du mois et de l'année. Cette variation crée un problème majeur de représentativité de l'échantillon (Amiard-Triquet *et al.*, 1999). Si les eaux et les sédiments marins profonds peuvent être caractérisés par une certaine stabilité physique, chimique et biologique, il n'en n'est pas de même pour les différentes niches écologiques qui constituent le milieu littoral.

L'influence des conditions climatiques amène des ruptures périodiques de l'équilibre physique ou biologique. Les conditions de milieu sont constamment perturbées, soit directement par les phénomènes d'ordre abiotique, soit indirectement par les processus biologiques liés aux variations climatiques. La variation de facteurs tels que la température, la teneur en oxygène dissous, la concentration en matières organiques ou en certains sels nutritifs, ne peut qu'influencer la prolifération des microorganismes dans les milieux naturels (Bianchi, 1973; Acosta-González *et* Marqués, 2016).

Dans une autre mesure, une analyse en composante principale (ACP), des échantillons des eaux marines polluées provenant des trois ports et prélevées durant les années 2015, 2016 et 2017, en fonction de différents paramètres physico-chimiques, et de l'indice de biodiversité Simpson (Diversit) du domaine *Bacteria*, a été réalisée (Fig. 29). Cette analyse révèle la présence de trois groupes bien distingués correspondants aux différents ports: plaisance (en rouge), commerce (en vert) et pêche (en bleu). Ces groupes, représentés par des ellipses dans la figure 29 sont classés en ordre selon le degré de pollution : plaisance, commerce et pêche (du moins pollué vers le plus pollué).

Nous constatons aussi que les flèches, présentant les paramètres physico-chimiques (DCO/DBO<sub>5</sub>, CTot, HCtot, Ntot, Cu, Mn, Fe, Zn, Cr), sont dirigées vers le même point et concentrées au niveau du port de pêche prouvant qu'il est le plus pollué. Il faut savoir que plus la flèche est longue et proche de l'axe plus le paramètre physico-chimique qu'elle exprime est influent. Ceci nous permet de dire, que ces paramètres (DCO/DBO<sub>5</sub>, CTot, HCtot, Ntot, Cu, Mn, Fe, Zn, Cr) sont les plus influençant sur la distribution des échantillons, qui sont séparés selon le degré de pollution (pollution est plus importante au niveau du port de pêche, suivi du port de commerce et enfin le port de plaisance). Notons que l'indice de diversité de Simpson (Diverst), n'est pas un facteur influent dans la distribution de différents échantillons groupes (flèche loin des axes et n'est pas assez longue).



**Figure 29.** Analyse en composantes principales (PCA) montrant la variation entre les différents échantillons des eaux de mer polluées prélevées en 2015, 2016 et 2017 en fonction des paramètres physico-chimiques. Les trois ellipses colorées en rouge, vert et bleu représentent, successivement les ports de plaisance, de commerce et de pêche. Les noms des ports ont été abrégés comme suit: CK (rouge), PC (vert), et PP (bleu), pour les ports de plaisance, de commerce et de pêche, respectivement. Les flèches indiquent la direction de l'augmentation maximale et la force (à travers la longueur) de chaque variable à la distribution globale. Les deux premiers axes principaux ont expliqué 58,4% de la variance.

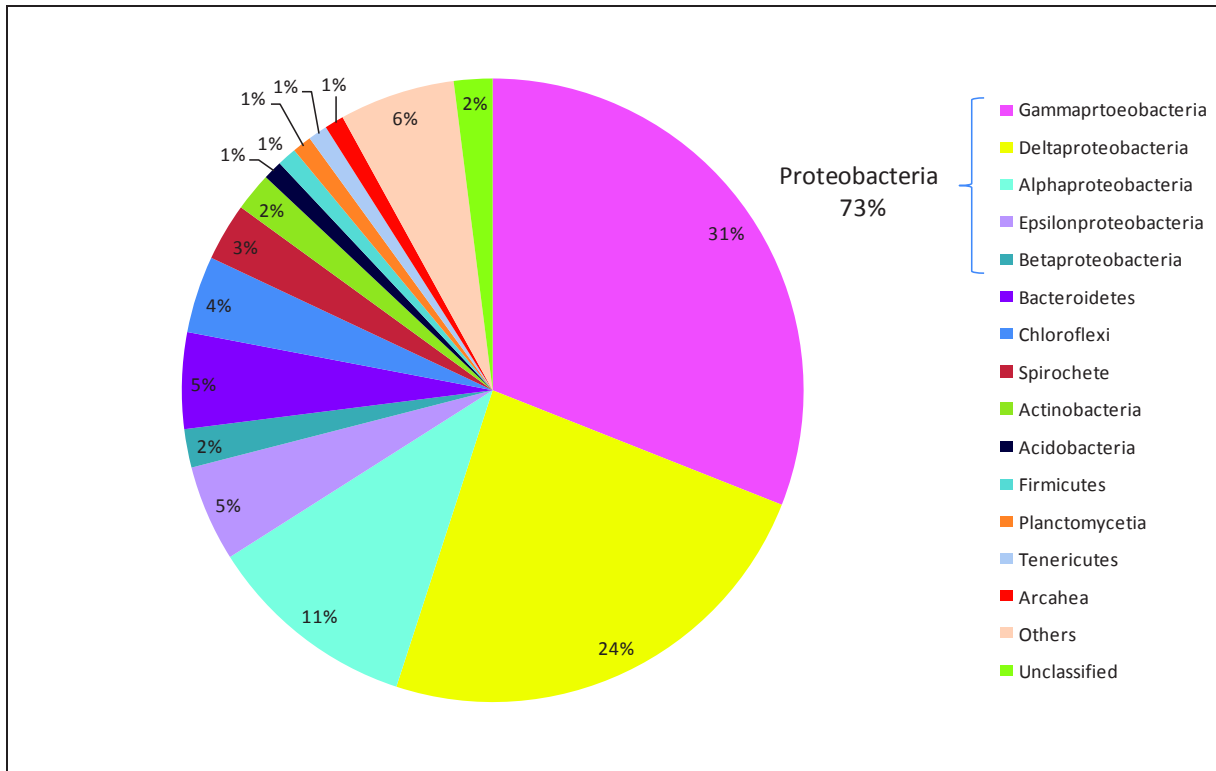
### III.2. Etude de la composition microbienne (*Bacteria* et *Archaea*) de certains échantillons marins étudiés en utilisant des techniques de séquençage haut-débit

Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études sur les communautés microbiennes dans les environnements marins ont été réalisées, en utilisant des approches métagénomiques basées sur le séquençage massif haut-débit, afin d'explorer la diversité et la composition des communautés à partir de diverses régions océaniques du monde (Acosta-González *et* Marqués, 2016; Jeanbille *et al.*, 2016; Won *et al.*, 2017). En effet, le séquençage haut-débit du métagénome microbien apparaît comme un outil puissant d'exploration puisqu'il fournit une description génomique du contenu d'un échantillon (estimation de la biodiversité), il donne l'opportunité à mettre en évidence des organismes non cultivables en laboratoire et il étudie les relations entre tous les membres de l'écosystème dans le temps et l'espace (Ranjard, 2012).

C'est dans ce contexte, une analyse métagénomique de certains échantillons marins de notre étude (sédiment et eaux), en utilisant des techniques de séquençage massif ou NGS (Pyroséquençage et Illumina MiSeq), a été réalisée. Cette méta-analyse a pour but d'explorer la diversité procaryotique dans les échantillons marins contaminés par des hydrocarbures et de définir des consortia microbiens indicateurs de cette contamination.

#### III.2.1. Pyroséquençage

La technique moléculaire de pyroséquençage a été appliquée sur le sédiment marin contaminé par des hydrocarbures et provenant du port de pêche de Sfax (PP-01-13) afin d'avoir une idée sur la phylogénie des espèces microbiennes (*Bacteria* et *Archaea*) présentes dans ce biotope (Fig. 30). Les résultats montrent la dominance du domaine *Bacteria* (97% de séquences) par rapport au domaine *Archaea* (1% de séquences). Un pourcentage de 2% des séquences obtenues ne sont assignés à aucun des phyla connus. Le phylum *Proteobacteria* représente environ 73% de la totalité des séquences (composé des classes de *Gammaproteobacteria* (31%), *Deltaproteobacteria* (24%), *Epsilonproteobacteria* (11%), *Alphaproteobacteria* (5%) et *Betaproteobacteria* (2%)). D'autres phyla sont présents à différentes proportions comme: *Bacteroidetes* (5%), *Chloroflexi* (4%), *Spirochete* (3%), *Actinobacteria* (2%), *Acidobacteria* (1%), *Firmicutes* (1%), *Planctomycetia* (1%) et *Tenericutes* (1%) (Fig. 30).



**Figure 30.** Biodiversité procaryotique du sédiment marin contaminé par des hydrocarbures provenant du port de pêche de Sfax (Décembre 2013) (Phylum/Classe).

Ces résultats sont en concordance avec plusieurs études antérieures analysant la diversité microbienne au sein des sédiments de surface côtiers contaminés par des hydrocarbures. Une dominance du phylum *Proteobacteria*, en particulier des classes *Gamma* et *Delta*, est évidente dans les sédiments marins contaminés par des hydrocarbures (Acosta-González *et* Marqués, 2016; Jeanbille *et al.*, 2016). Une étude faite par Kostka *et al.*, (2011), sur des sédiments marins affectés par le déversement d'hydrocarbures au golf de Mexique, a décrit que la population microbienne était dominée par une communauté active de gammaprotéobactéries, en particulier par des membres de groupes hydrocarbonoclastiques connus comme *Alcanivorax* et *Marinobacter*. Par ailleurs, le phylum *Proteobacteria* constituait plus de 70% des séquences d'ARNr 16S analysés dans les sédiments issus du port de Livourne (Italie), et qui sont dominées par les sous-classes des gammaprotéobactéries et des deltaprotéobactéries (Chiellini *et al.*, 2013). Une image similaire a été obtenue à partir des sédiments d'un bassin de rétention chroniquement pollué par des hydrocarbures dans la lagune de Berre, Marseille (Païssé *et al.*, 2008) et à partir des sédiments affectés par le déversement de pétrole sur la côte nord espagnole (Acosta-González *et al.*, 2016), où la communauté microbienne était dominée par les phyla de *Proteobacteria* et *Bacteroidetes*. Récemment, Jeanbille *et al.*, (2016), ont montré la dominance de *Gammaproteobacteria*

et *Deltaproteobacteria*, qui englobent un grand nombre de souches hydrocarbonoclastes, au sein d'une communauté microbienne présente dans des sédiments marins contaminés par des hydrocarbures le long des côtes de la Méditerranée (golfe du Lion, côte de Vermillion, Corse, lagune de Bizerte et Liban) et de l'océan Atlantique français (golfe de Gascogne et Manche).

Les *Deltaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria*, qui dominent l'échantillon de sédiment étudié, sont très connues pour être les clades dominants dans les sédiments marins et englober un grand nombre de souches capables de dégrader les hydrocarbures (Chiellini *et al.*, 2013). Plusieurs genres connus par leur capacité biodégradative des hydrocarbures ont été détectés dans cette étude: *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Desulfobacter*, *Desulfosarcina*, *Desulfotignum*, *Spirochaeta*, *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Phaeobacter*, *Thiomicrospira*, *Hyphomonas*, *Novosphingobium*, *Parvibaculum*, *Mariprofundus*, etc... Ces microorganismes ont été fréquemment détectés dans des sédiments marins contaminés par des hydrocarbures (Kostka *et al.*, 2011; Acosta-González *et al.*, 2013; Chiellini *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015; Jeanbille *et al.*, 2016).

Par ailleurs, concernant le domaine des archées, nous notons la présence de trois embranchements: *Euryarchaeota* (67%); *Parvarchaeota* (30,7%) et *Crenarchaeota* (2,2%). Au sein de l'embranchement *Euryarchaeota*, les classes des *Halobacteria* (80,3%), *Thermoplasmata* (18,9%) et *Methanomicrobia* (0,7%), ont été identifiées. Les archées de la classe des halobactéries, qui dominaient les communautés archéennes, sont des dégradeurs d'hydrocarbures connus (Al-Mailem *et al.*, 2010). Ces résultats sont en concordance avec ceux trouvés par Jeanbille *et al.*, (2016), qui ont signalé la présence des *Euryarchaeota* et *Crenarchaeota* dans la plupart des sédiments marins contaminés par des hydrocarbures le long des côtes de la Méditerranée. Le phylum *Euryarchaeota* contient essentiellement des classes de *Thermoplasmata*, *Methanomicrobia*, *Halobacteria*, etc... Néanmoins, la présence de phylum *Parvarchaeota* (précédemment connues sous le nom de *Haloarchaea*) dans un nombre restreint des échantillons des sédiments contaminés par des hydrocarbures, a été également notée (Jeanbille *et al.*, 2016). La répartition et les fonctions potentielles des *Parvarchaeota*, sont actuellement inconnues (Jeanbille *et al.*, 2016).

La détection des communautés archéennes dans des sédiments contaminés par les hydrocarbures, a été rapportée dans plusieurs études (Jeanbille *et al.*, 2016; Won *et al.*, 2017). Le groupe des *Halobacteria*, qui sont identifiées comme des dégradeurs des hydrocarbures (Al-Mailem *et al.*, 2010; Tapilatu *et al.*, 2010), était dominant dans les sédiments côtiers contaminés aux HAPs (Jeanbille *et al.*, 2016). Par rapport aux bactéries, les archées sont



beaucoup moins abondantes dans les sédiments de surface, tandis qu'elles peuvent être à part égale dans les sédiments plus profonds (Li *et al.*, 2011; Jeanbille *et al.*, 2016).

La répartition des microorganismes et la minéralisation de la matière organique qu'ils réalisent dans le sédiment, dépendent de la profondeur de cette interface (oxie/anoxie) ainsi que de la disponibilité des autres accepteurs et donneurs d'électrons, qui eux-mêmes sont organisés en gradients selon leurs potentiels d'oxydo-réduction (Thamdrup *et Canfield*, 2000). Ainsi, dans les sédiments marins, les gradients d'accepteurs d'électrons, tels que l'oxygène, les nitrates et les sulfates, déterminent la distribution des groupes bactériens qui les utilisent pour leur métabolisme et leur croissance. La zone supérieure de la colonne sédimentaire oxygène, de quelques millimètres à quelques centimètres d'épaisseur, présente le potentiel énergétique le plus important (Jeanbille, 2015).

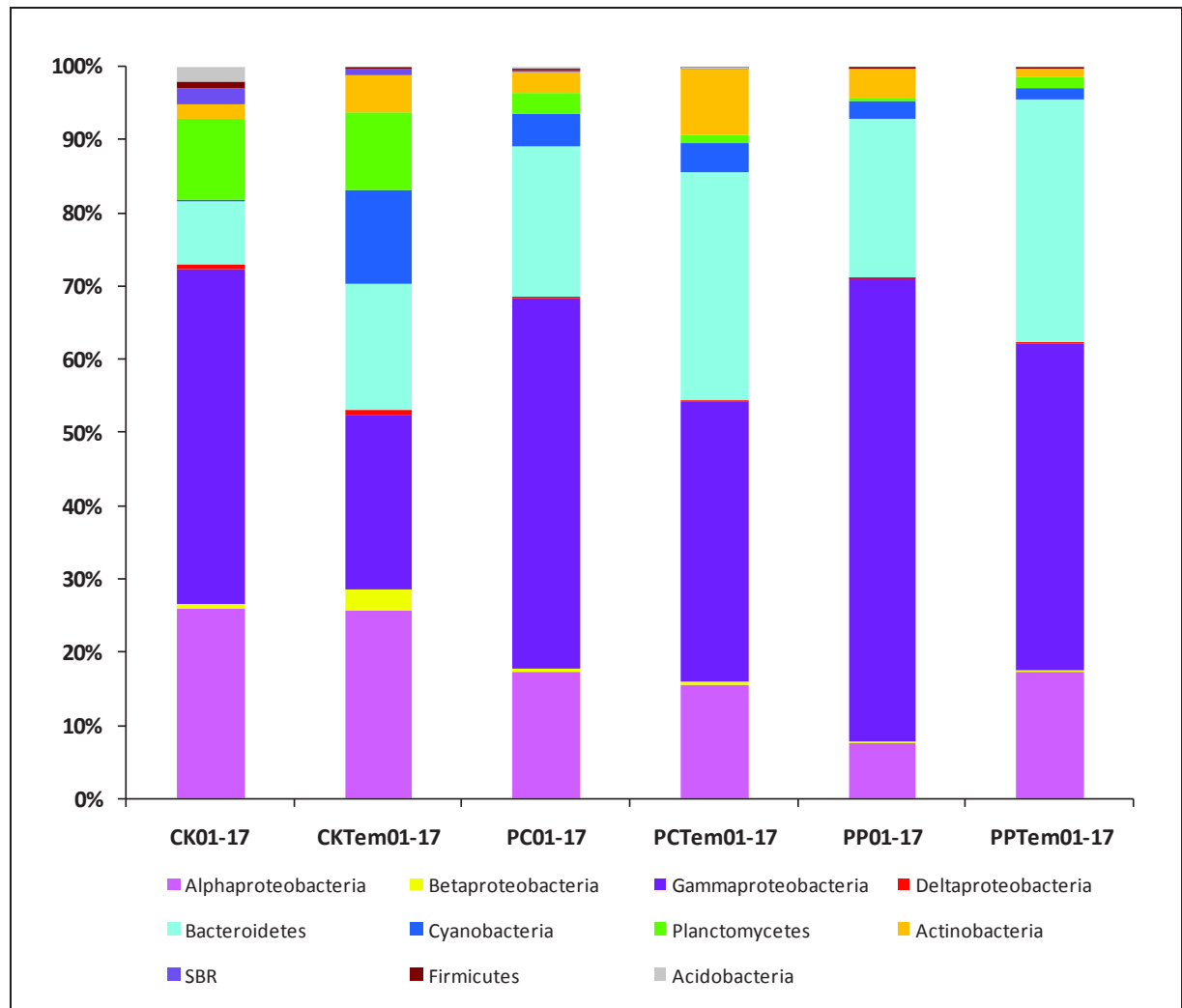
### III.2.2. Illumina MiSeq

L'approche métagénomique (Illumina MiSeq), a été utilisée pour étudier la composition de la biodiversité des procaryotes (*Bacteria* et *Archae*) au niveau de six échantillons des eaux de mer, provenant de trois ports (plaisance, commerce et pêche) de la ville de Sfax: CK01-17; CKTem01-17; PC01-17; PCTem01-17 et PP01-17; PPTem01-17. Rappelons que les résultats antérieurs de la caractérisation physico-chimiques des échantillons marins, ont montré que les échantillons des eaux de mer considérés comme témoins, sont aussi affectés par une pollution organique et métallique. La méta-analyse des différents échantillons des eaux de mer, montre la présence du règne *Bacteria*. Les archées n'ont pas été détectées dans ces échantillons. En milieu marin, les archées sont présentes essentiellement dans les sédiments anaérobies peu profonds ou profonds, dans les sources hydrothermales et dans les environnements fortement salins (DeLong, 1992). Toutefois, plusieurs études ont montré la présence d'archées dans les eaux de surface oxygénées et ont montré leur rôle important dans le cycle biogéochimique (Wuchter *et al.*, 2006). Won *et al.*, 2017, ont rapporté la détection des *Euryarchaeota* dans des eaux de mer contaminées par des hydrocarbures, avec une abondance dans les eaux profondes que celles de surface.

L'abondance relative des différents phyla/classe bactériens identifiés dans les échantillons des eaux de mer, est représentée dans la figure 31. Uniquement les phyla/class présents avec des pourcentages supérieurs à 1% des séquences, ont été pris en considération. Les résultats montrent la dominance du phylum *Proteobacteria* (en particulier les classes des *Gammaproteobacteria* et *Alphaproteobacteria*) suivi de *Bacteroidetes*, dans tous les échantillons des eaux de mer analysés. D'autres phyla (*Cyanobacteria*, *Planctomycete*,

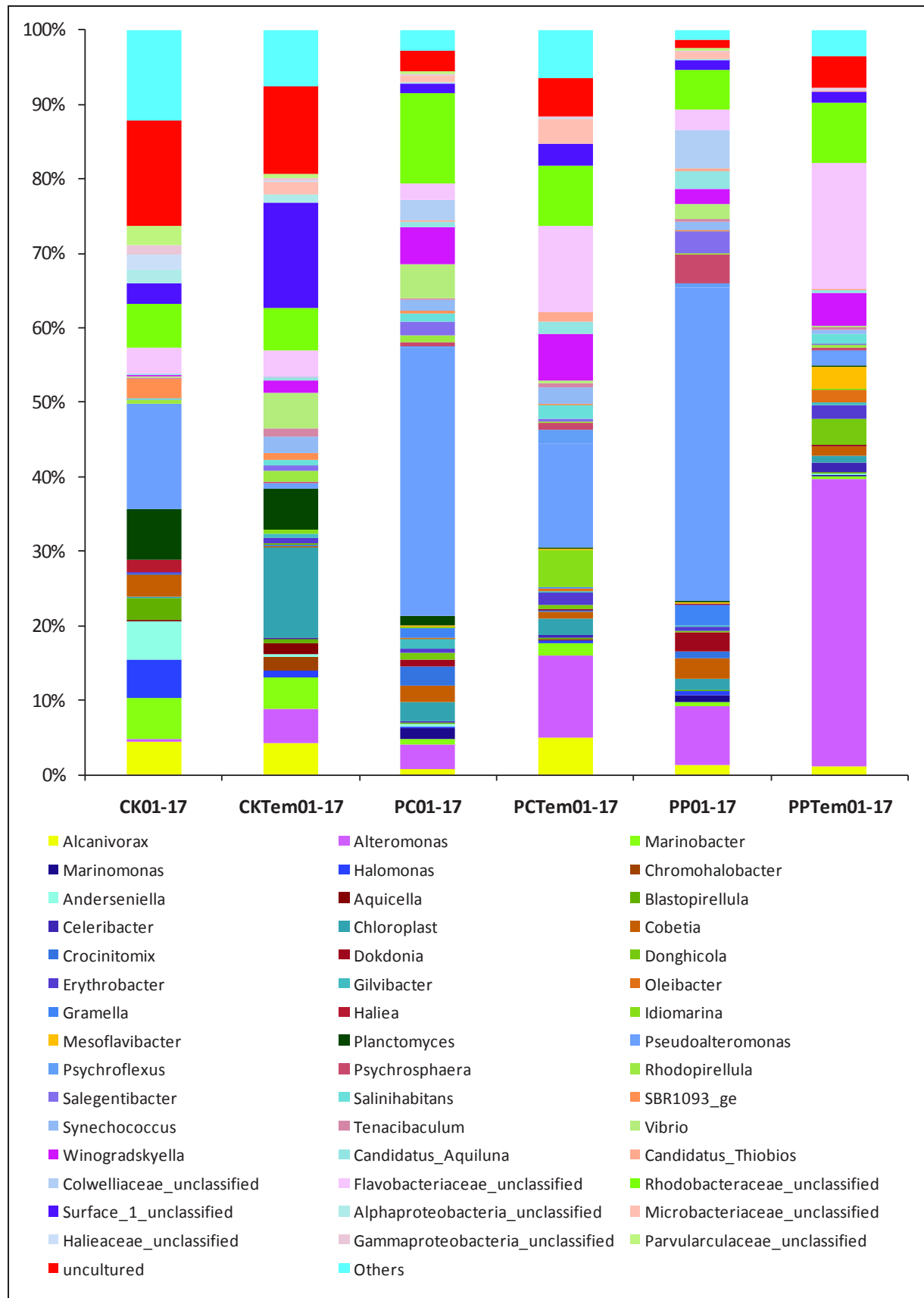
*Actinobacteria*, et autres) ont été également détectés avec des proportions relativement variables dans les différents échantillons des eaux de mer (Fig. 31).

Il a été rapporté que les communautés microbiennes sont extrêmement sensibles aux changements rapides de l'environnement (Jeffries *et al.*, 2016; Won *et al.*, 2017). Les zones côtières et en particulier, les eaux superficielles, sont le siège d'échanges permanents de gaz, d'humidité, de chaleur et de substances chimiques d'origine naturelle ou anthropique entre l'atmosphère, le continent et l'océan (Liss *et Duce* 1997, Jeffries *et al.*, 2016). Ces différents facteurs peuvent, par conséquent, influencer sur la l'abondance et la composition des communautés microbiennes présentes au niveau de cette interface. Ceci explique peut-être la variation au niveau de la composition bactérienne des différents échantillons des eaux de mer étudiés. Néanmoins, la présence des taxons indicateurs de la contamination par des hydrocarbures a été révélée dans les différents échantillons analysés. En effet, la dominance des *Proteobacteria*, un phylum qui englobe un grand nombre des taxons doués des capacités biodégradatives des hydrocarbures, a été notée. La majorité des bactéries hydrocarbonoclastes décrites actuellement appartiennent aux *Proteobacteria*, et en particulier à la classe des *Gammaproteobacteria* (Jeanbille *et al.* 2016). Par ailleurs, les phyla *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Actinobacteria* et *Firmicutes* renferment, également, un grand nombre de souches dégradant les hydrocarbures (Acosta-González *et Marqués*, 2016).



**Figure 31.** Abondance relative des différents phyla/classe présents, dans les échantillons des eaux de mer, avec un pourcentage supérieur à 1% des séquences.

Par ailleurs, l'abondance relative des genres identifiés, dans les différents échantillons étudiés, a été présentée dans la figure 32. Les résultats révèlent la présence d'une variété de genres appartenant à différentes classes, dans les échantillons des eaux de mer. Globalement, nos résultats soulignent la dominance des genres hydrocarbonoclastes, fréquemment décrits dans la littérature pour leurs capacités à dégrader les hydrocarbures: *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Idiomarina*, *Planctomycetes*, *Donghicola*, *Oleibacter*, *Gramella*, *Vibrio*, *Winogradskyella*, etc... (Gauthier *et al.*, 1992; Yakimov *et al.*, 1998; Tan *et al.*, 2009; Teramoto *et al.*, 2011; Mi Jin *et al.*, 2015; Hameed *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017).



**Figure 32.** Abondance relative des différents genres identifiés, (ayant des pourcentages > 1%), dans les échantillons des eaux de mer étudiés.

Les communautés microbiennes présentent des réponses différentes *vis-à-vis* de la contamination du milieu, et les groupes qui réagissent préférentiellement à tel ou tel type de contamination ne sont pas les mêmes.

Won *et al.* (2017), ont montré une réduction et un changement de la communauté microbienne des eaux de mer contaminées, par rapports à celles témoins. Ceci peut être attribué aux impacts complexes des polluants possibles, notamment les particules en suspension, les nutriments, les polluants organiques et les métaux lourds. En revanche, une absence de différence dans la composition des communautés microbiennes des échantillons des sédiments contaminés et témoins, a été marquée (Won *et al.*, 2017). En effet, dans les zones maritimes côtières, y compris les ports, les bactéries sont toujours en contact avec les hydrocarbures, et l'adaptation à cette présence a conduit de très nombreuses espèces à utiliser la source de carbone massive constituée par les hydrocarbures. Cette adaptation de longue date pourrait expliquer l'absence ou la faible différence observée entre les communautés d'environnements contaminés et non contaminés (Jeanbille, 2015).

#### **IV. Conclusion**

Dans la première partie de cette étude, nous nous sommes intéressés à l'évaluation de la pollution des zones portuaires du littoral Sud de Sfax: Ports de plaisance, de commerce et de pêche. La caractérisation physico-chimique des échantillons des eaux de mer provenant des trois ports de la ville de Sfax et de sédiment provenant du port de pêche de Sfax, a montré une contamination organique très marquée: rapports DCO/DBO<sub>5</sub> > 3; teneurs élevées en carbone organique totale (COT), présence d'une variété des composés hydrocarbonés. Une pollution métallique a été également marquée par la présence de teneurs élevées de certains métaux lourds (Cu, Cd, Ni...) dans la plupart des échantillons étudiés. Les échantillons considérés comme témoins sont également affectés par cette pollution. Ceci montre que la zone côtière de Sfax souffre d'une pollution élevée. Les analyses statistiques ont montré que la pollution est plus marquée dans le port de pêche, suivi du port de commerce et du port de plaisance. En fait, le port de plaisance de Sfax est moins exposé aux sources de pollutions engendrées par les activités d'entretien mécanique des bateaux, les activités de pêche, etc... Cette pollution chronique est due, en particulier aux rejets industriels et urbains, à la décharge de déchets inertes à proximité du port de pêche et au transport des produits pétroliers associés à des pratiques de vidange et de nettoyage intempestives de bateaux commerciaux et de pêche. Les différents contaminants contribuent à la figuration de la communauté microbienne existante dans ces environnements anthropisés. Dans ce contexte, différentes approches moléculaires

ont été utilisées pour étudier la communauté microbienne existante dans les échantillons marins. Dans un premier lieu, la technique d’empreinte génétique PCR-SSCP a été utilisée pour déterminer la composition et la dynamique de la communauté microbienne dans les différents échantillons marins étudiés. Les résultats montrent la présence de 3 domaines du monde microbien, avec dominance du domaine *Bacteria*, suivi des *Eucarya* et *Archaea*. Les profils SSCP révèlent que la structure de la communauté microbienne dans les différents échantillons était visuellement dynamique et non stable et bougent au cours du temps indépendamment de l’année (2013, 2014, 2015, 2016 et 2017), de la saison (Hiver, Printemps, Automne et Été), du site (port de plaisance, port de commerce et port de pêche) et du degré de pollution (échantillon pollué ou témoin).

La comparaison de la diversité de la communauté bactérienne entre les eaux de mer polluées et les sédiments marins, en se basant sur l’indice de diversité de Simpson (Domaine *Bacteria*), a révélé que les échantillons des sédiments sont relativement plus diversifiés que les eaux de mer. Les sédiments côtiers abritent les valeurs les plus élevées d’abondance et de diversité microbienne dans les domaines marins, ceci est dû à la stratification du gradient d’oxydoréduction et à la disponibilité des éléments nutritifs qui façonnent ces communautés. Les analyses statistiques (RDA), montrent qu’aucune corrélation n’a été identifiée entre la communauté bactérienne de différents échantillons marins et les paramètres physico-chimiques étudiés. L’eau est le siège de fluctuations spatio-temporelles importantes, en particulier dans les milieux côtiers. Ces fluctuations pouvaient être dues à la variation de la température, de la teneur en oxygène et de la concentration en matière organique. La masse d’eau présente en un point donné ne sera pas la même au cours de la journée, du mois et de l’année. Ceci ne peut qu’influencer la composition et la structure de la communauté microbienne présente dans ces écosystèmes.

Dans un autre volet, des techniques de séquençage haut-débit (pyroséquençage et Illumina MiSeq), ont été également utilisées pour explorer la diversité procaryotique dans les échantillons marins contaminés par les hydrocarbures et pour définir des consortia microbiens indicateurs de cette contamination.

La méta-analyse du sédiment marin contaminé par des hydrocarbures et provenant du port de pêche de Sfax (PP01-13), a révélé la dominance des classes *Deltaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria*. Ces classes sont très connues pour être les clades dominants dans les sédiments marins et englober un grand nombre de souches capables de dégrader les hydrocarbures. Par ailleurs, une dominance des halobactéries, qui dominaient les communautés archéennes, a été également notée. Les halobactéries sont des dégradeurs

d'hydrocarbures connus. Les sédiments côtiers possèdent les valeurs les plus élevées d'abondance et de diversité microbiennes, en raison de la stratification du gradient d'oxydoréduction et de la disponibilité des éléments nutritifs qui façonnent ces communautés. Par ailleurs, la méta-analyse de certains échantillons des eaux de mer (CK01-17; CKTem01-17; PC01-17; PCTem01-17 et PP01-17 ; PPTem01-17), a révélé la dominance du phylum *Proteobacteria* (en particulier les classes de *Gammaproteobacteria* et *Alphaproteobacteria*) suivi de *Bacteroidete*, dans tous les échantillons des eaux de mer analysés. D'autres phyla, tels que *Cyanobacteria*, *Planctomycete* et *Actinobacteria*, ont été également détectés avec des proportions relativement variables dans les différents échantillons des eaux de mer. La composition de la communauté microbienne dans les environnements marins peut être influencée par des changements des conditions environnementales telles que la contamination par des composants pétroliers. Les groupes prédominants mis en évidence ne sont pas toujours les mêmes selon le type de pollution et l'environnement étudié. Toutefois, la dominance des taxons hydrocarbonoclastes, tels que: *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Idiomarina*, *Planctomycetes*, *Donghicola*, *Oleibacter*, *Gramella*, *Vibrio*, *Winogradskyella*, a été révélée dans les différents échantillons analysés.

Cette grande diversité microbienne dans les échantillons contaminés, peut être expliquée par l'adaptation des microorganismes à la pollution chronique. Ces résultats suggèrent que les communautés procaryotiques étaient naturellement bien adaptées à la contamination chronique par les hydrocarbures, ce qui facilite leur résistance à ce stress.



---

## **Chapitre II**

**Isolement, caractérisation et étude des  
potentialités biodégradatives des souches marines  
dégradant des hydrocarbures**

---

## I. Introduction générale

La pollution des écosystèmes marins par les hydrocarbures constitue l'un des problèmes environnementaux majeurs. En effet, les hydrocarbures, et notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), présentent une véritable menace pour l'environnement, à cause de leurs propriétés de persistance prolongée, mutagènes et cancérigènes potentiels (Duran *et Cravo-Laureau*, 2016). Ainsi, leur élimination de l'environnement est devenue un sujet préoccupant. De nombreuses approches chimiques et physiques ont été mises en évidence afin d'immobiliser les hydrocarbures et de les détruire pour réduire leurs impacts sur la santé et sur l'environnement. Ces techniques sont coûteuses et non respectueuses de l'environnement (Azubuike *et al.*, 2016). Cependant, une approche biologique par bioremédiation peut être envisagée. En effet, les travaux menés sur la bioremédiation, ont permis l'isolement et l'identification d'une grande variété de souches capables de métaboliser les hydrocarbures y compris des HAPs (Nikitha *et al.*, 2017). Ces microorganismes ont développé des stratégies pour utiliser ces molécules comme sources de carbone et d'énergie, assurant la détoxification de l'environnement tout en conservant l'intégrité de l'écosystème (Johnsen *et al.*, 2005). Pour cela, l'utilisation de microorganismes pour la biorestauration d'environnements contaminés semblait être une technologie attractive pour la restauration des sites pollués. Les milieux naturels, terrestres et marins, qui sont contaminés par des hydrocarbures, sont considérés comme des biotopes potentiels pour l'isolement des microorganismes pouvant dégrader ces polluants.

Dans de ce contexte, nous nous sommes intéressés dans ce chapitre, à l'isolement et à la caractérisation sur les plans phénotypique et phylogénétique des bactéries marines aérobies dégradant des hydrocarbures, ainsi qu'à l'étude de leurs capacités biodégradatives.

## II. Enrichissements et isolements des souches hydrocarbonoclastes

### II.1. Cultures par enrichissements en présence de différents hydrocarbures

Des séries de cultures par enrichissements bactériens sur milieu de base MB ont été réalisées en présence de chacun des 4 HAPs (naphtalène, phénanthrène, fluoranthène et pyrène) ajoutés à une concentration de 200 mg/l, et sur le pétrole brut (1%, v/v), comme seules sources de carbone et d'énergie, afin d'isoler des souches ayant des capacités biodégradatives sur ces molécules.

Pour ce faire, 5 ml des eaux de mer ou 0,5 g de sédiments, contaminés par des hydrocarbures et provenant du port de pêche de Sfax (Janvier 2013), ont été utilisés comme

inocula pour réaliser des cultures initiales sur le milieu de culture MB (Volume finale = 50 ml), en présence de chacun des 4 composés polyaromatiques (naphtalène, phénanthrène, fluoranthène et pyrène), à différentes concentrations de NaCl (0, 10, 30, 60, 90, 120 et 150 g/l) dans le cas où les eaux de mer sont utilisées comme inocula et en présence de chacun des hydrocarbures phénanthrène, pyrène et pétrole brut, à différentes concentrations de NaCl (0, 10, 30, 50, 80, 100, 120 et 150 g/l) dans le cas où le sédiment marin est utilisé comme inoculum, à deux températures d'incubation (37 °C et 55 °C) et à une agitation de 180 rpm.

La classification d'une culture comme positive est basée sur l'observation microscopique et le suivi de la DO à 600 nm. Le tableau 24 montre le suivi de la croissance des différentes cultures par enrichissement réalisées durant 15 jours, en utilisant les eaux de mer provenant du port de pêche de Sfax comme inoculum.

**Tableau 24.** Résultats de croissance des différentes cultures par enrichissements en utilisant des eaux de mer du port de pêche de Sfax comme inoculum.

Source de carbone (200 mg/l)	Enrichissement (En / En') *	Salinité (g/l)	Croissance (DO max <sub>600 nm</sub> )	
			37 °C	55 °C
Naphtalène	E1 / E1'	0	+ (0,53) (6 j)	+ (0,35) (3 j)
	E2 / E2'	10	+ (0,59) (7 j)	+ (0,31) (2 j)
	E3 / E3'	30	++ (0,84) (5 j)	+ (0,44) (4 j)
	E4 / E4'	60	+ (0,42) (7 j)	+ (0,34) (2 j)
	E5 / E5'	90	+ (0,38) (6 j)	-
	E6 / E6'	120	-	-
	E7 / E7'	150	-	-
Phénanthrène	E8 / E8'	0	+ (0,54) (9 j)	+ (0,48) (10 j)
	E9 / E9'	10	+ (0,51) (7 j)	+ (0,47) (8 j)
	E10 / E10'	30	+ (0,58) (10 j)	+ (0,33) (8 j)
	E11 / E11'	60	+ (0,49) (11 j)	+ (0,27) (9 j)
	E12 / E12'	90	-	-
	E13 / E13'	120	-	-
	E14 / E14'	150	-	-
Fluoranthène	E15 / E15'	0	+ (0,61) (9 j)	+ (0,32) (11 j)
	E16 / E16'	10	+ (0,65) (10 j)	+ (0,31) (8 j)
	E17 / E17'	30	++ (0,87) (8 j)	+ (0,47) (8 j)
	E18 / E18'	60	+ (0,34) (9 j)	+ (0,31) (9 j)
	E19 / E19'	90	-	-
	E20 / E20'	120	-	-
	E21 / E21'	150	-	-
Pyrène	E22 / E22'	0	+ (0,42) (11 j)	+ (0,37) (8 j)
	E23 / E23'	10	+ (0,45) (10 j)	+ (0,34) (9 j)
	E24 / E24'	30	+ (0,57) (9 j)	+ (0,41) (9 j)
	E25 / E25'	60	+ (0,37) (9 j)	+ (0,28) (10 j)
	E26 / E26'	90	-	-
	E27 / E27'	120	-	-
	E28 / E28'	150	-	-

\* En = Enrichissement réalisé à 37 °C; En' = Enrichissement réalisé à 55 °C.

- : pas de croissance ( $DO_{600\text{ nm}} \leq 0,2$ ); + : croissance positive ( $0,2 < DO_{600\text{ nm}} \leq 0,6$ ); ++ : bonne croissance ( $DO_{600\text{ nm}} > 0,6$ ); 0,1 <  $DO_{600\text{ nm}}$  (TB) < 0,2 (TB : témoin biologique).

Il en ressort de ces résultats de cultures par enrichissements sur les 4 HAPs que les consortia bactériens possèdent la meilleure croissance à une température de 37 °C et à une concentration en NaCl de 30 g/l, donc dans les conditions les plus proches de celles de l'environnement naturel. La croissance est plus importante dans le cas d'utilisation du naphtalène et du fluoranthène, comme seules sources de carbone et d'énergie (Tableau 24). La croissance est absente en présence des concentrations en NaCl supérieures ou égales à 90 g/l, à part une seule culture réalisée sur le naphtalène, à 37 °C et en présence de 90 g/l NaCl

montrant une DO<sub>600 nm</sub> max de 0,38, après 4 jours d'incubation à 180 rpm (Tableau 24). De ce fait, la concentration en NaCl de 30 g/l et l'incubation de cultures à 37 °C ont été retenues pour le reste des repiquages successifs afin d'isoler des bactéries marines hydrocarbonclastes.

D'autres enrichissements ont été également réalisés en utilisant un sédiment marin contaminé par des hydrocarbures provenant du port de pêche de Sfax, comme inoculum. Le tableau 25 ci-dessous montre le suivi de la croissance des différentes cultures par enrichissements réalisées sur le phénanthrène, le pyrène et le pétrole brut.

**Tableau 25.** Résultats de la croissance des différentes cultures par enrichissements en utilisant le sédiment provenant du port de pêche comme inoculum.

Source de carbone	Enrichissement Sn / Sn' *	Salinité (g/l)	Croissance (DO max <sub>600 nm</sub> )	
			37 °C	55 °C
Phénanthrène (200 mg/l)	S1 / S1'	0	+ (0,57) (10 j)	+ (0,42) (8 j)
	S2 / S2'	10	+ (0,49) (11 j)	+ (0,44) (8 j)
	S3 / S3'	30	+ (0,56) (9 j)	+ (0,35) (7 j)
	S4 / S4'	50	+ (0,38) (8 j)	+ (0,24) (5 j)
	S5 / S5'	80	-	-
	S6 / S6'	100	-	-
	S7 / S7'	120	-	-
	S8 / S8'	150	-	-
Pyrène (200 mg/l)	S9 / S9'	0	+ (0,67) (11 j)	+ (0,65) (10 j)
	S10 / S10'	10	++ (0,71) (9 j)	+ (0,52) (10 j)
	S11 / S11'	30	++ (0,84) (9 j)	+ (0,56) (11 j)
	S12 / S12'	50	+ (0,55) (10 j)	-
	S13 / S13'	80	-	-
	S14 / S14'	100	-	-
	S15 / S15'	120	-	-
	S16 / S16'	150	-	-
Pétrole brut (1%, v/v)	S17 / S17'	0	++ (0,75) (10 j)	+ (0,43) (10 j)
	S18 / S18'	10	++ (0,82) (8 j)	+ (0,47) (9 j)
	S19 / S19'	30	++ (0,76) (11 j)	+ (0,34) (10 j)
	S20 / S20'	50	++ (0,84) (9 j)	+ (0,26) (7 j)
	S21 / S21'	80	++ (0,77) (9 j)	-
	S22 / S22'	100	++ (0,73) (10 j)	-
	S23 / S23'	120	-	-
	S24 / S24'	150	-	-

\* Sn = Enrichissement réalisé à 37 °C; Sn' = Enrichissement réalisé à 55 °C.

- : pas de croissance (DO<sub>600 nm</sub> ≤ 0,2); + : croissance positive (0,2 < DO<sub>600 nm</sub> ≤ 0,6); ++ : bonne croissance (DO<sub>600 nm</sub> > 0,6); 0,1 < DO<sub>600 nm</sub> (TB) < 0,2 (TB : témoin biologique).

Le tableau 25 montre une croissance micobienne sur le phénanthrène et sur le pyrène, en présence d'une concentration en NaCl entre 0 et 50 g/l, à 37 °C. Une croissance moins importante a été observée en présence d'une concentration entre 0 et 50 g/l NaCl pour le

phénanthrène et entre 0 et 30 g/l pour le pyrène, à 55 °C. La croissance est meilleure dans le cas de l'enrichissement réalisé sur le pyrène en présence de 30 g/l NaCl et à 37 °C ( $DO_{600\text{ nm}} \text{ max} = 0,87$ ). Des études de dégradation microbienne ont montré que l'élimination des HAPs de haut poids moléculaire, ayant quatre cycles aromatiques ou plus, est beaucoup plus difficile que celle des HAPs de bas poids moléculaire. En effet les HAPs de haut poids moléculaire sont thermodynamiquement stables, hydrophobes et ils sont adsorbés sur les particules solides. Le pyrène a été utilisé comme un composé modèle pour étudier la biodégradation des HAPs de haut poids moléculaire, puisqu'il est structurellement similaire à plusieurs HAPs cancérigènes (Kim *et al.*, 2013). De ce fait, l'enrichissement (S11) réalisé sur le pyrène, en présence de 30 g/l NaCl et à 37 °C, a été retenu pour une investigation ultérieure.

Les cultures par enrichissements, effectuées sur le pétrole brut en conditions mésophiles (37 °C), ont montré une croissance appréciable à des concentrations en NaCl allant jusqu'à 100 g/l. Cependant, les enrichissements positifs en conditions thermophiles (55 °C), n'ont pas pu dépasser les 50 g/l NaCl. Vu l'originalité des microorganismes halophiles, nous nous sommes focalisés à réaliser des isolements bactériens à partir de l'enrichissement positif du pétrole brut, à 37 °C et en présence de 100 g/l.

A la lumière de ces résultats, les quatre enrichissements positifs E3, E17, S11 et S22 ont été choisis pour faire des isolements des bactéries marines hydrocarbonoclastes. Le tableau 26 ci-dessous récapitule les différents enrichissements retenus.

**Tableau 26.** Les différents enrichissements choisis

Enrichissement	Inoculum utilisé	Source de carbone	NaCl (g/l)	Température (°C)
E3	Eaux de mer	Naphtalène	30	37
E17		Fluoranthène	30	37
S11	Sédiment marin	Pyrène	30	37
S22		Pétrole brut	100	37

Ces enrichissements ont été utilisés pour réaliser des séries de repiquages successifs (quatre fois), pendant 7 jours (pour l'enrichissement E3) et 15 jours (pour les enrichissements E17, S11 et S22), jusqu'à l'obtention des consortia microbiens adaptés, dégradant efficacement les hydrocarbures étudiés. Ils ont été suivis, par la suite, pour faire l'isolement des souches marines ayant des potentialités biodégradatives des hydrocarbures.

Le pétrole est un mélange complexe de différents hydrocarbures, notamment des aliphatiques (linéaires ou ramifiés), des cycloalcanes, des mono et polyaromatiques, des asphaltènes et des résines. La plupart de ces composés sont stables, toxiques et cancérigènes.

Les hydrocarbures se distinguent par leur sensibilité aux attaques microbiennes et se dégradent généralement dans l'ordre de sensibilité décroissant suivant: *n*-alcanes > alcanes ramifiés > hydrocarbures aromatiques de faible poids moléculaire > alcanes cycliques > hydrocarbures polyaromatiques. Bien que la dégradation d'un nombre de ces composés peut être relativement facile, dans les sols, les eaux douces et dans les habitats marins à faible salinité, leur sort est plus difficile dans des conditions de salinité modérée à élevée (3 à 30% de sel) (Fatherpure, 2014). La solubilité des hydrocarbures diminue avec l'augmentation de la salinité du milieu, d'où une diminution de la biodisponibilité pour la biodégradation. La salinité élevée limite non seulement l'accès microbien aux hydrocarbures mais également la disponibilité de l'oxygène, puisque sa solubilité diminue au fur et à mesure que la concentration en sel augmente (Mcgenity, 2010). De plus, les fortes concentrations en sel ont tendance à dénaturer les protéines, c'est-à-dire à casser la structure tertiaire des protéines qui est essentielle à l'activité enzymatique (Fatherpure, 2014). Néanmoins, les microorganismes capables de croître dans de telles conditions possèdent des mécanismes physiologiques pouvant les protéger de ces fluctuations et permettant leur adaptation à la pression osmotique exercée par la salinité élevée du milieu (Singh *et al.*, 2017). Ces microorganismes, peuvent être des agents dépolluants, susceptibles de dégrader des hydrocarbures, en présence des concentrations élevées en sel. C'est dans ce contexte, que nous nous sommes intéressés à isoler des bactéries marines douées des capacités biodégradatives des hydrocarbures, en particulier des HAPs, en présence des concentrations en NaCl élevées (30 et 100 g/l).

## II.2. Isolement des souches bactériennes hydrocarbonoclastes

Plusieurs colonies bactériennes ont été isolées à partir de différents enrichissements réalisés: 10 colonies pour l'enrichissement E3, 7 colonies pour l'enrichissement E17, 8 colonies pour l'enrichissement S11 et 10 colonies pour l'enrichissement S22. Ces colonies ont été remises en suspension dans le milieu de culture liquide MB contenant le substrat cible comme source de carbone et d'énergie (Tableau 27). Seules les cultures montrant des croissances appréciables ont été retenues pour le reste d'étude.



**Tableau 27.** Résultats de croissance des colonies isolées à partir des enrichissements positifs, à 37 °C et 180 rpm.

Enrichissement	Clones	Croissance (DO max <sub>600 nm</sub> )
E3 Naphtalène (30 g/l NaCl, 37 °C)	C1	+ 0,23 (4 j)
	C2	-
	C3	+ (0,43) (4 j)
	C4	+ (0,31) (5 j)
	C5	-
	C6	++ (0,71) (2 j)
	C7	+ (0,26) (4 j)
	C8	-
	C9	-
	C10	-
E17 Fluoranthène (30 g/l NaCl, 37 °C)	C1	+ (0,33) (5 j)
	C2	+ (0,45) (4 j)
	C3	+ (0,37) (5 j)
	C4	-
	C5	++ (0,64) (3 j)
	C6	+ (0,53) (6 j)
	C7	-
S11 Pyrène (30 g/l NaCl, 37 °C)	C1	-
	C2	++ (0,76) (6 j)
	C3	+ (0,26) (8 j)
	C4	-
	C5	+ (0,32) (8 j)
	C6	-
	C7	-
	C8	+ (0,44) (7 j)
S22 Pétrole brut (100 g/l NaCl, 37 °C)	C1	++ (0,68) (5 j)
	C2	+ (0,43) (7 j)
	C3	-
	C4	+ (0,32) (9 j)
	C5	-
	C6	-
	C7	+ (0,37) (7 j)
	C8	-
	C9	-
	C10	-

- : pas de croissance ( $DO_{600\text{ nm}} \leq 0,2$ ); + : croissance positive ( $0,2 < DO_{600\text{ nm}} \leq 0,6$ ); ++ : bonne croissance ( $DO_{600\text{ nm}} > 0,6$ ).

Les deux isolats C6 et C5 ont été retenus à partir des enrichissements E3 et E17 sur la base d'une nette croissance sur le naphtalène et le fluoranthène, respectivement, utilisés comme seules sources de carbone et d'énergie. Ces deux clones C6 et C5, ont été nommés NAPH6 et FLU5, respectivement.

Pour les enrichissements S11 et S22, deux clones C2 et C1 ont été sélectionnés en se basant sur leur croissance importante sur le pyrène et le pétrole brut, respectivement. Ces isolats C2 et C1 ont été appelés PYR2 et CO100, respectivement.

La pureté des isolats a été vérifiée suite à des observations microscopiques qui sont effectués régulièrement avant chaque inoculation.

### III. Caractérisation des souches hydrocarbonoclastes sélectionnées

#### III.1. Caractérisation de la souche FLU5

##### III.1.1. Caractérisation phénotypique

Sur un milieu LB solide, les colonies de la souche FLU5 se présentent sous forme arrondie, à bords irréguliers et d'un diamètre de 3 à 5 mm, après 24 h d'incubation à 37 °C. Leur couleur est blanche-crèmeuse et leur aspect est lisse. L'observation microscopique, réalisée sur des cultures liquides en phase exponentielle de croissance, montre que la souche FLU5 se présente sous forme de bacilles mobiles sporulants, isolés ou en double. La souche FLU5 est une bactérie Gram (+) (Fig. 33), catalase (+) et oxydase (+).



**Figure 33:** Observation microscopique de la souche FLU5 après coloration de Gram (Microscope optique, grossissement X 100).

Nous avons utilisé la galerie API 50 CHB qui sert pour l'identification des *Bacillus* et ses apparentés, par l'étude du métabolisme des hydrates de carbone (Tableau 28). Nous avons associé également la galerie API 20 NE pour l'étude biochimique de quelques activités enzymatiques de la souche FLU5 (Tableau 29).

**Tableau 28.** Résultats des tests de la galerie API 50 CHB réalisés avec la souche FLU5.

Glycérol	Erythritol	D-Arabinose	L-Arabinose	D-Ribose	D-xylose	L-xylose	Adonitol	β Méthyl xyloside	Galactose
+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
D-Glucose	D-Fructose	D-Mannose	L-Sorbose	L-Rhmannose	Dulcitol	Inositol	D-Mannitol	D-Sorbitol	Méthyl-αD-Mannopyranoside
+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
Méthyl-αD-Glucopyranoside	N-Acétylglucosamine	Amygdaline	Arbutine	Esculine	Salicine	D-Cellobiose	D-Maltose	D-Lactose	D-Melibiose
+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Saccharose	D-Trehalose	Inuline	D-Mélezitose	D-Raffinose	Amidon	Glycogène	Xylitol	β-Gentiobiose	D-Turanose
+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
D-Lyxose	D-Tagatose	D-Fucose	L-Fucose	D-Arabitol	L-Arabitol	Gluconate	2-Cétoglucuronate	5-Céetoglucuronate	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	

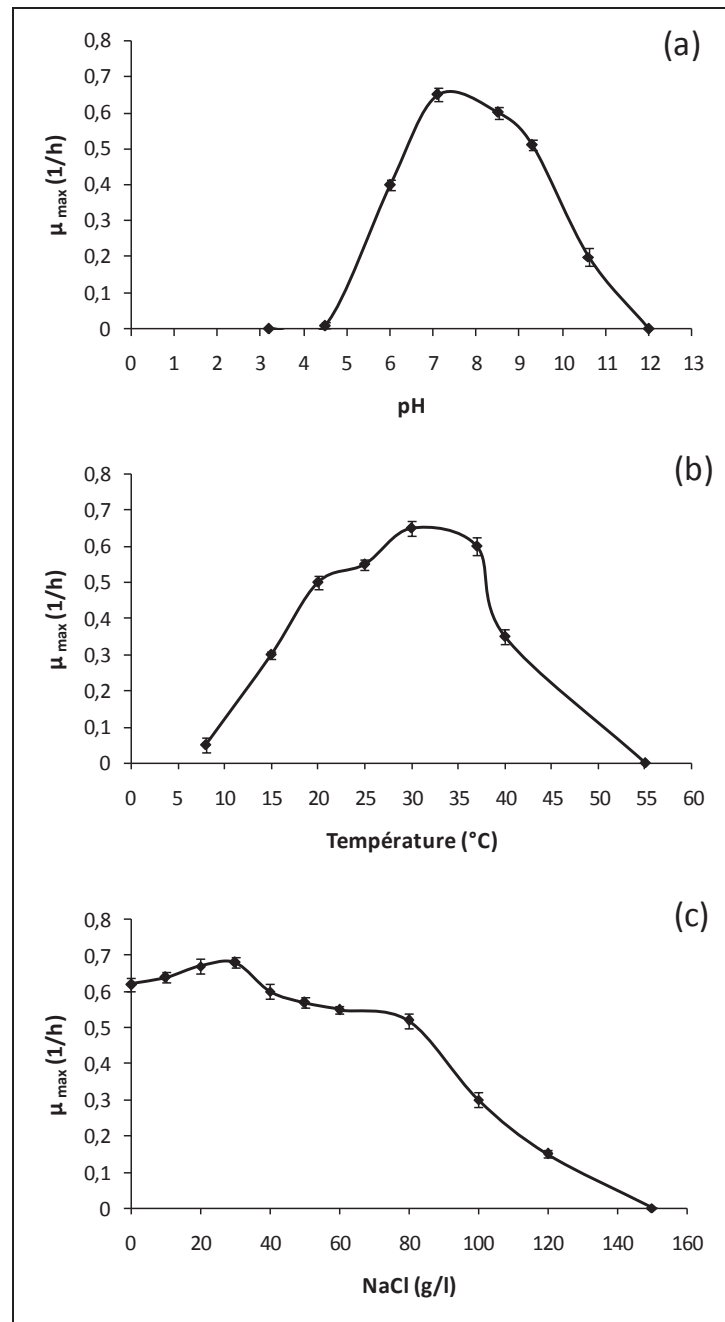
**Tableau 29.** Résultats des tests de la galerie API 20E réalisés avec la souche FLU5.

OPNG	ADH	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU
-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+

- : Test négatif ; + : Test positif

Bien que les tests biochimiques constituent une approche classique pour l'identification des bactéries, il n'en demeure pas moins qu'ils sont particulièrement utiles pour la détermination de certaines espèces de bactéries. Grâce à ces tests, il est possible de connaître certaines caractéristiques de métabolisme des bactéries isolées. Les résultats des tests biochimiques des galeries API 50 CHB et API 20E, sont présentés dans les tableaux 28 et 29. Le logiciel spécifique du fournisseur «Biomérieux» montre que la souche FLU5 est membre du genre *Bacillus*, avec 85% comme pourcentage d'acceptation.

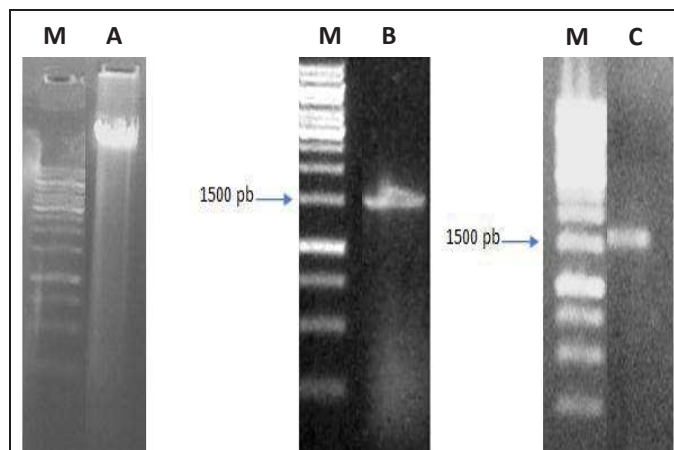
La souche FLU5 se développe sur une gamme de pH entre 6 et 10,6, avec un optimum de croissance à pH neutre 7,1 (Fig 34a). Elle est capable de croître en présence des températures allant de 8 jusqu'à 40 °C avec un optimum à 30 °C (Fig. 34 b). La plage de concentration en NaCl pour la croissance de FLU5 se situe entre 0 et 120 g/l, avec une croissance optimale à 0-30 g/l NaCl. A une concentration de 150 g/l, la souche FLU5 est incapable de croître (Fig. 34c).



**Figure 34.** Etude de la croissance de la souche FLU5 en fonction du pH (a), de la température (b) et de la concentration en NaCl (c).  $\mu_{\max}$ : Taux de croissance maximum

### III.1.2. Caractérisation phylogénétique de la souche FLU5

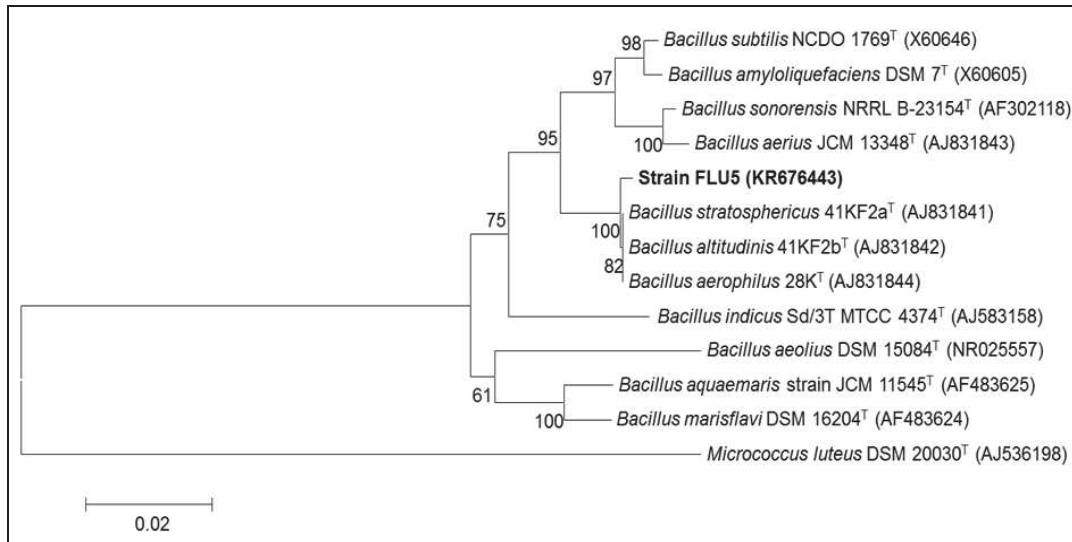
La figure 35 représente les électrophorèses sur gels d'agarose de l'ADN génomique de la souche FLU5, du produit PCR du gène codant pour l'ARNr 16S et du produit de PCR purifié, respectivement.



**Figure 35.** Electrophorèse sur gel d'agarose (1%, m/v).

**(A):** ADN génomique de la souche FLU5; **(B):** Produit PCR du gène de l'ARNr 16S de la souche FLU5; **(C):** Produit PCR purifié.  
**(M):** Marqueur de taille 1 Kb DNA Ladder (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 pb).

La séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche FLU5 constituée de 1478 nucléotides a été déterminée et déposée dans la base de données de nucléotides (*GenBank*) sous le numéro d'accès KR676443. Cette séquence (Annexe VI.1) a été comparée avec les séquences disponibles dans «*GenBank*». L'arbre phylogénétique obtenu suite à la comparaison avec des séquences d'ARNr 16S relatives à des souches types des espèces proches, et après analyses des distances par la méthode de Neighbor-Joining (Jukes *et al.*, 1969), montre que la souche FLU5 est membre de la famille des *Bacillaceae*, ordre des *Bacillales*, classe des *Bacilli* et phylum des *Firmicutes* (Fig. 36). Cette souche est étroitement liée aux membres du genre *Bacillus*, en particulier à l'espèce *Bacillus stratosphericus* (Souche type: 41KF2a<sup>T</sup>) (Shivaji *et al.*, 2006), avec une similarité de séquence de l'ARNr 16S de 99,66% (Fig. 36).



**Figure 36.** Arbre phylogénétique basé sur 1478 nucléotides de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche FLU5, montrant sa position phylogénétique parmi les espèces apparentées du genre *Bacillus*. *Micrococcus luteus* DSM 20030<sup>T</sup> est utilisé en tant que out group. Les pourcentages *Bootstrap* sont donnés au niveau des nœuds. Les numéros d'accès (*Genbank*) sont donnés entre parenthèses. Barre d'échelle, 2 substitutions pour 100 nucléotides.

D'après la comparaison des caractéristiques phénotypiques de la souche FLU5 avec celles d'autres souches types proches appartenant au genre *Bacillus*, nous notons des fortes similarités entre ces souches (Palmisano *et al.*, 2001; Shivaji *et al.*, 2006) (Tableau 30).

Les organismes appartenant à l'espèce *B. stratosphericus* sont largement répandus dans le monde et ont été isolés fréquemment à partir de différents biotopes, tels que: les environnements marins (Siddikee *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2010, Lima *et al.*, 2013, Hentati *et al.*, 2016), le sol (Bezza *et Nkhalambayausi Chirwa*, 2016), les sédiments estuariens (Zhang *et al.*, 2012), le cérumen humain (Gerchman *et al.*, 2012), les aliments riches en matières grasses (Gricajeva *et al.*, 2016), les effluents d'huile de palme et d'huile de cuisson usées (Mohd zin *et al.*, 2017) et les résidus miniers (Durairaj *et al.*, 2018). A noter que *B. stratosphericus* a été isolée à l'origine à partir de tubes cryogéniques utilisés pour collecter des échantillons d'air à haute altitude (Shivaji *et al.*, 2006).

**Tableau 30.** Caractéristiques phénotypiques de la souche FLU5 et d'autres souches types proches appartenant au genre *Bacillus*.

Caractéristiques	Souche FLU5	<i>Bacillus stratosphericus</i> <sup>a</sup> 41KF2a <sup>T</sup>	<i>Bacillus aerius</i> <sup>a</sup> 24K <sup>T</sup>	<i>Bacillus aerophilus</i> <sup>a</sup> 28K <sup>T</sup>	<i>Bacillus altitudinis</i> <sup>a</sup> 41KF2b <sup>T</sup>	<i>Bacillus sonorensis</i> <sup>a, b</sup> L87-10 <sup>T</sup>
<b>Morphologie</b>	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles
<b>Mobilité</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Gram</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Oxydase</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Catalase</b>	+	+	+	+	+	+
<b>NaCl</b>						
11,6% (m/v)	+	+	+	+	-	-
12% (m/v)	+	+	-	-	-	-
17,4% (m/v)	-	+	-	-	-	-
<b>pH</b>	6-10,6	6-10	6-10	6-10	5-8	5,5-10
<b>Température (°C)</b>	8-40	8-37	8-37	8-37	8-45	15-55
<b>Assimilation de:</b>						
D-glucose	+	+	+	+	+	+
D-arabinose	+	+	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+	nd	+
D-maltose	+	+	+	+	nd	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	+
<b>Origine</b>	Eaux de mer provenant du port de pêche de Sfax, Tunisie.	Tubes cryogéniques utilisés pour collecter des échantillons d'air, Inde.	Tubes cryogéniques utilisés pour collecter des échantillons d'air, Inde	Tubes cryogéniques utilisés pour collecter des échantillons d'air, Inde	Tubes cryogéniques utilisés pour collecter des échantillons d'air, Inde.	Sol désertique, Sonoran Desert, Arizona, États-Unis

+: positif; -: négatif; nd: non déterminé

<sup>a</sup>: Shivaji *et al.*, 2006

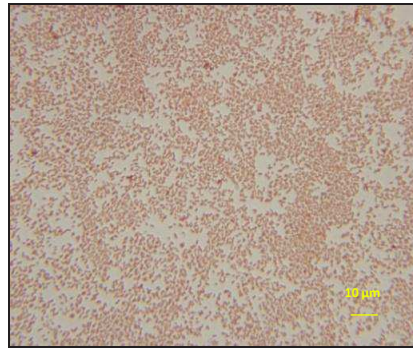
<sup>b</sup>: Palmisano *et al.*, 2001.

## III.2. Caractérisation de la souche NAPH6

### III.2.1. Caractérisation phénotypique

La souche NAPH6 se présente sous forme de colonies transparentes, lisses, avec des bords irréguliers, et d'un diamètre compris entre 2 et 4 mm, après 24h d'incubation sur un milieu LB solide à 37 °C. La souche NAPH6 est une bactérie aérobie, à Gram négatif (Fig. 37), oxydase +, catalase +, non sporulée, et se présente sous forme de bacilles mobiles, isolés et en double.





**Figure 37.** Observation microscopique de la souche NAPH6 après coloration de Gram (Microscope optique à contraste de phase, Grossissement X 100).

Cette souche étant une bactérie aérobie, se présentant sous forme de bacilles, la galerie API 20 NE, qui est utilisée dans l'identification des bacilles Gram (-), non entérobactéries, a été appliquée pour réaliser des études biochimiques et étudier la capacité de cette souche à métaboliser certains composés organiques.

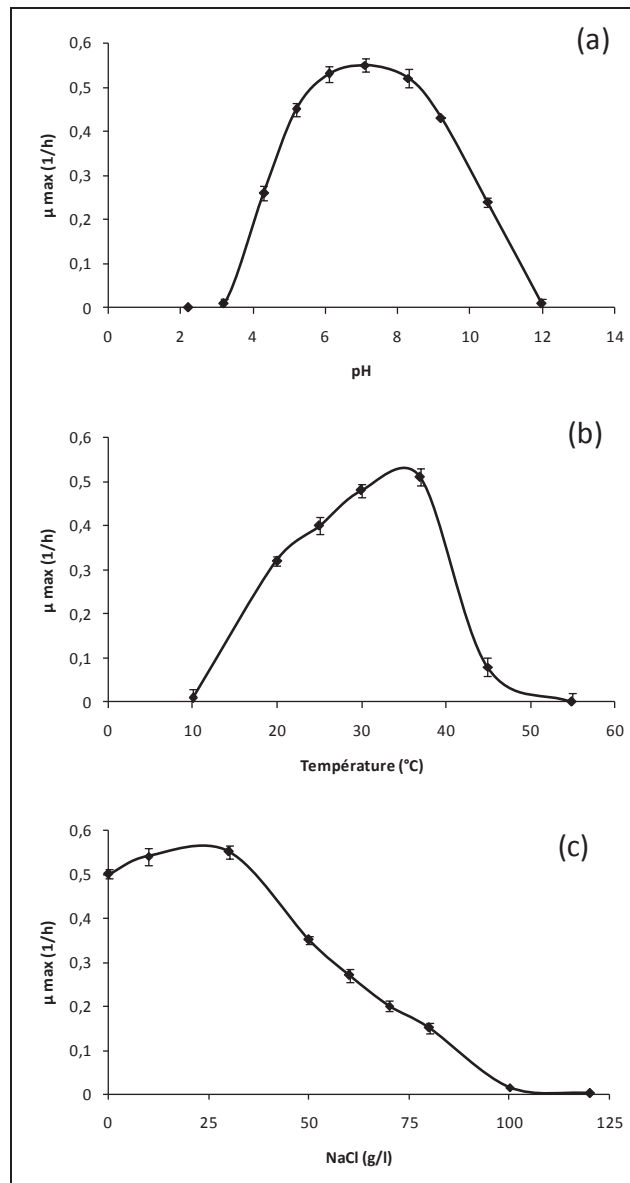
Les résultats des tests biochimiques de la galerie API 20 NE, sur la souche NAPH6, sont présentés dans le tableau 31.

**Tableau 31.** Résultats des tests biochimiques de la galerie API 20 NE appliqués sur la souche NAPH6.

Tests	Substrats	Résultats	
		24 h	48 h
NO <sub>3</sub>	Potassium nitrate	-	+
TRP	L-Tryptophane	-	
GLU	D-glucose	-	
ADH	L-arginine	+	+
URE	Urée	-	+
ESC	Esculine citrate de fer	-	-
GEL	Gélatine (origine borine)	+	+
PNG	4-nitrophényl-β D-galactopyranoside	-	-
GLU	D-glucose	+	+
ARA	L-arabinose	-	-
MNE	D-mannose	-	-
MAN	D-mannitol	+	+
MAG	N-acétyl-glucosamine	-	+
MAL	D-maltose	-	+
GNT	Potassium gluconate	+	+
CAP	Acide caprique	+	+
ADI	Acide adipique	+	+
MLT	Acide malique	+	+
CIT	Trisodium citrate	+	-
PAC	Acide phénylacétique	-	+

Le logiciel spécifique du fournisseur «Biomérieux» montre que la souche NAPH6 est affiliée à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*, avec un pourcentage d'acceptation de 99,1%.

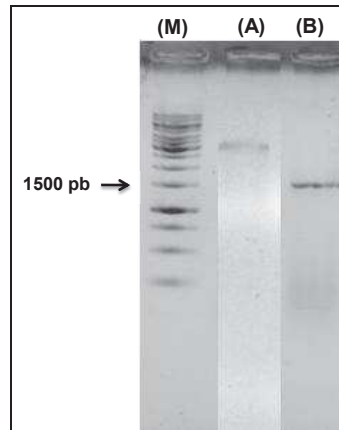
La gamme de pH de la croissance de la souche NAPH6 se situe entre pH 5,1 et pH 10,2, avec une croissance optimale à pH 7. Pas de croissance à pH 4,1 et pH 12 (Fig 38a). La souche NAPH6 est capable de croître entre 20 et 45 °C, avec un optimum à 37° C (Fig. 38b). La concentration du NaCl pour la croissance est de 0 à 100 g/l, avec un optimum de 10 à 30 g/l (Fig. 38c).



**Figure 38.** Etude de la croissance de la souche NAPH6 en fonction du pH (a), de la température (b) et de la concentration en NaCl (c).

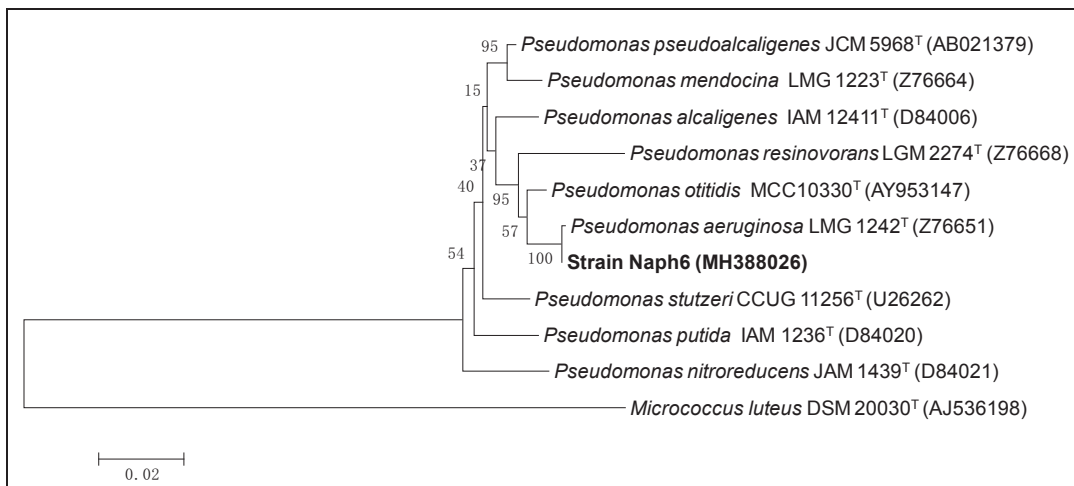
### III.2.2. Caractérisation phylogénétique de la souche NAPH6

Après avoir procédé à l'extraction de l'ADN génomique de la souche NAPH6, le gène codant pour l'ARNr 16S a été amplifié par PCR. La figure 39 représente les profils d'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN génomique de la souche NAPH6 et du produit PCR purifié du gène codant pour l'ARNr 16S.



**Figure 39.** (A): ADN génomique de la souche NAPH6; (B): Produit PCR purifié du gène de l'ARNr 16S de la souche NAPH6.  
(M): Marqueur de taille 1 Kb DNA Ladder (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 pb).

La séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche NAPH6 composée de 1469 nucléotides, a été déterminée et déposée dans la base des données de nucléotides «*GenBank*» sous le numéro d'accès MH388026 (Annexe VI.2). Les analyses phylogénétiques montrent que la souche NAPH6 est affiliée au genre *Pseudomonas*, et que l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* (Souche type : LMG 1242<sup>T</sup>) (Moore *et al.*, 1996), est l'espèce la plus proche (similarité de l'ARNr 16S de 99,86%) (Fig. 40).



**Figure 40.** Arbre phylogénétique basé sur 1469 nucléotides de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche NAPH6, montrant sa position phylogénétique parmi les espèces apparentées du genre *Pseudomonas*. *Micrococcus luteus* DSM 20030<sup>T</sup> est utilisé en tant que out group. Les pourcentages *Bootstrap* sont donnés au niveau des nœuds. Les numéros d'accès (*Genbank*) sont donnés entre parenthèses. Barre d'échelle, 2 substitutions pour 100 nucléotides.

Une comparaison des caractéristiques phénotypiques de la souche NAPH6 avec celles des autres souches types proches appartenant au genre *Pseudomonas* a été réalisée (Tableau 32).

**Tableau 32.** Caractéristiques phénotypiques de la souche NAPH6 et comparaison avec ceux d'autres souches types proches appartenant au genre *Pseudomonas*.

Caractéristiques	Souche NAPH6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 <sup>T</sup>	<i>Pseudomonas stutzeri</i> ATCC 17588 <sup>T</sup>	<i>Pseudomonas putida</i> KCTC 1751 <sup>T</sup>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KACC 10304 <sup>T</sup>
<b>Morphologie</b>	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles
<b>Mobilité</b>	+	+	+	+	+
<b>Gram</b>	-	-	-	-	-
<b>Oxydase</b>	+	+	+	+	+
<b>Catalase</b>	+	+	+	+	+
<b>Tolérance de NaCl</b>					
6% (m/v)	+	-	-	nd	nd
10% (m/v)	+	-	-	nd	nd
<b>Température (°C)</b>					
4	-	-	-	+	-
45	+	+	+	-	nd
<b>Assimilation de:</b>					
N-Acetylglucosamine	+	+	-	-	-
D-glucose	+	+	+	+	-
D-Mannitol	+	+	-	-	-
Mannose	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	+	-	-

+: positif; -: négatif; nd: non déterminé.

Les données ont été compilées à partir de Clark *et al.*, 2006 et Xiao *et al.*, 2009.

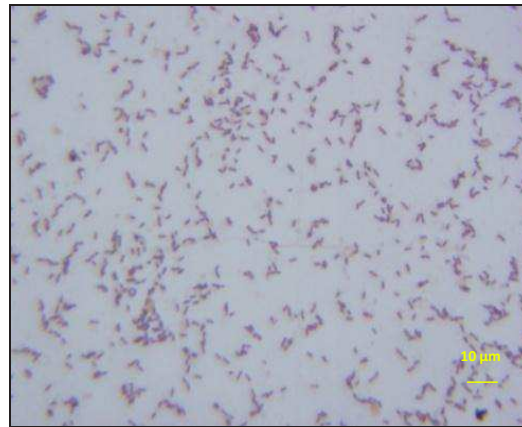
Des caractéristiques phénotypiques de la souche NAPH6 et d'autres souches types proches appartenant au genre *Pseudomonas*, présentent des fortes similarités (Tableau 32). Sur la base des caractéristiques phénotypiques et phylogénétiques, la souche NAPH6 est affiliée à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*. La souche NAPH6 montre une plage de tolérance de concentrations en NaCl (0-100 g/l) plus large que celle de la souche type de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145<sup>T</sup> (Tableau 32). Ceci pourrait être expliqué par des formes d'adaptation de certaines souches microbiennes face aux conditions environnementales des biotopes d'origine. Dans ce contexte, la souche Asph2 de *Pseudomonas aeruginosa* isolée à partir des eaux polluées par des hydrocarbures, montre sa capacité à se développer à une concentration en NaCl de 100 g/l (Ali *et al.*, 2012). Une autre souche GS-33 de *Pseudomonas aeruginosa*, isolée à partir des eaux de mer provenant d'un port situé sur la côte Sud-ouest du Gujarat, en Inde, était capable de tolérer une concentration en NaCl de 90 g/l (Patil *et al.*, 2016). En outre, la souche BUR11 de *Pseudomonas aeruginosa*

isolée à partir d'un champ agricole à Burdwan, Inde, montre sa capacité à se développer sur une large plage de salinité jusqu'à 80 g/l NaCl (Pailan *et* Saha, 2015).

### III.3. Caractérisation de la souche PYR2

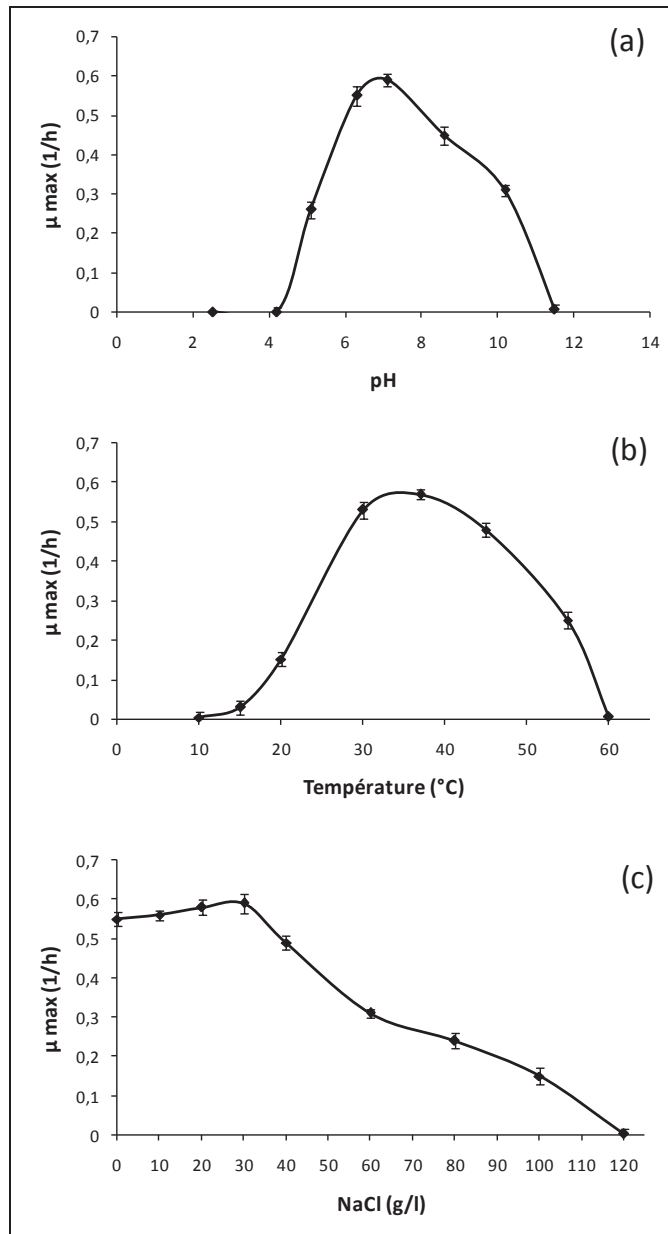
#### III.3.1. Caractérisation phénotypique

Sur milieu LB solide, les colonies de la souche PYR2 se présentent sous forme arrondie, d'un diamètre de 2 à 5 mm, après 24 h d'incubation à 37 °C. Leur couleur est blanche-crèmeuse et leur aspect est lisse. L'observation microscopique, réalisée sur des cultures liquides en phase exponentielle de croissance, montre que la souche PYR2 se présente sous forme de bacilles mobiles, isolés ou en double. La souche PYR2 est Gram (+) (Fig.41), catalase (+) et oxydase (+).



**Figure 41.** Observation microscopique de la souche PYR2 après coloration de Gram (Microscope optique, grossissement X 100).

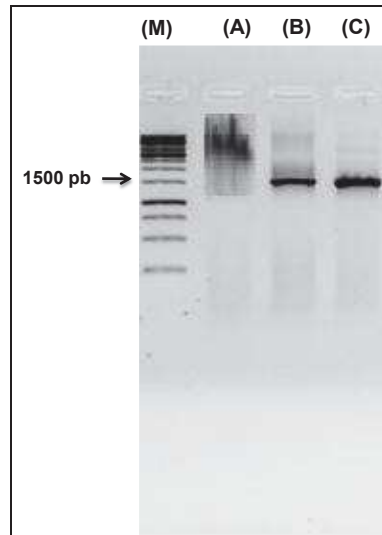
La souche PYR2 se développe sur une gamme de pH entre 5,6 et 10,6, avec un optimum de croissance à pH neutre de 7,1 (Fig. 42a). Elle est capable de croître sur une plage de température allant de 15 à 55 °C, avec un optimum à 37 °C (Fig. 42b). La concentration en NaCl pour la croissance de la souche PYR2 se situe entre 0 et 100 g/l, avec une croissance optimale à 0-30 g/l NaCl. L'absence de croissance est observée à une concentration en NaCl de 120 g/l (Fig. 42c).



**Figure 42.** Etude de la croissance de la souche PYR2 en fonction du pH (a), de la température (b) et de la concentration en NaCl (c).

### III.3.2. Caractérisation phylogénétique de la souche PYR2

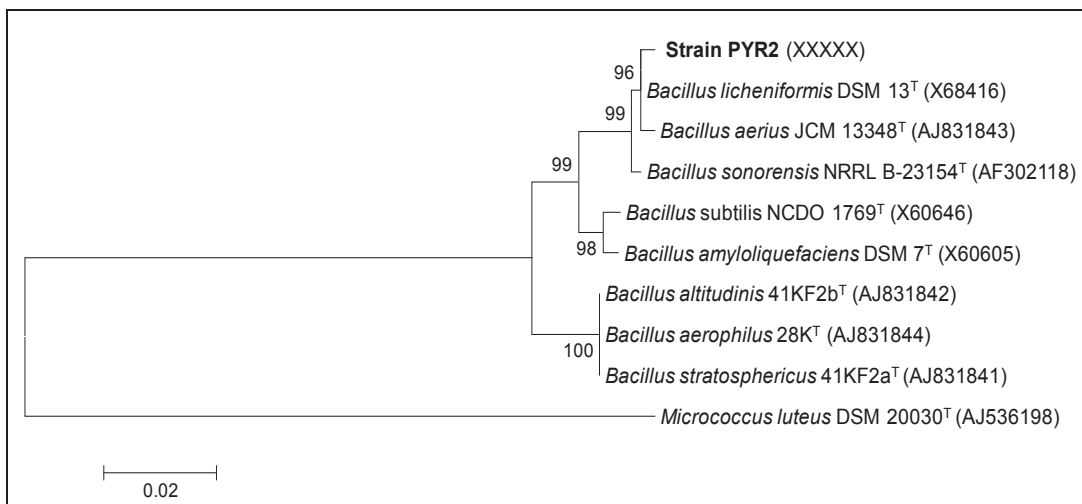
La figure 43 représente les électrophorèses sur gels d'agarose de l'ADN génomique de la souche PYR2, du produit PCR du gène codant pour l'ARNr 16S et du produit de PCR purifié, respectivement.



**Figure 43.** (A): ADN génomique de la souche PYR2; (B): Produit PCR du gène de l'ARNr 16S de la souche PYR2; (C): Produit PCR purifié.

(M): Marqueur de taille 1 Kb DNA Ladder (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 pb).

La séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche PYR2, de 1322 nucléotides a été déterminée. Les analyses phylogénétiques ont révélé que la souche PYR2 est membre de la famille des *Bacillaceae*, ordre des *Bacillales*, classe des *Bacilli* et phylum des *Firmicutes*. Cette souche est étroitement liée aux membres du genre *Bacillus*, en particulier à l'espèce *Bacillus licheniformis* (Souche type: DSM 13<sup>T</sup>) (Ludwig *et al.*, 1992), avec une similarité de séquence de 99% (Fig. 44).



**Figure 44.** Arbre phylogénétique basé sur 1322 nucléotides de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche PYR2, montrant sa position phylogénétique parmi les espèces apparentées du genre *Bacillus*. *Micrococcus luteus* DSM 20030<sup>T</sup> est utilisé en tant que out group. Les pourcentages Bootstrap sont donnés au niveau des nœuds. Les numéros d'accès (*GenBank*) sont donnés entre parenthèses. Barre d'échelle, 2 substitutions pour 100 nucléotides.



La comparaison des caractères phénotypiques de la souche PYR2 avec ceux de la souche type de *Bacillus licheniformis* montre une forte similarité (Tableau 33). Ainsi, sur la base des caractéristiques phénotypiques et phylogénétiques étudiées, la souche PYR2 appartient à l'espèce *Bacillus licheniformis*.

**Tableau 33.** Caractéristiques phénotypiques de la souche PYR2 et comparaison avec ceux d'autres souches types proches appartenant au genre *Bacillus*.

Caractéristiques	Souche PYR2	<i>Bacillus licheniformis</i> <sup>a, b</sup> NRRL NRS 1264 <sup>T</sup>	<i>Bacillus aerius</i> <sup>b</sup> 24K <sup>T</sup>	<i>Bacillus sonorensis</i> <sup>c</sup> NRRL B- 14393 <sup>T</sup>	<i>Bacillus subtilis</i> <sup>d</sup> NRRL NRS- 744 <sup>T</sup>
<b>Morphologie</b>	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles	Bacilles
<b>Mobilité</b>	+	+	+	+	+
<b>Gram</b>	+	+	+	+	+
<b>Oxydase</b>	+	+	+	+	+
<b>Catalase</b>	+	+	+	+	+
<b>Tolérance de NaCl</b>					
5% (m/v)	+	+	+	-	+
10% (m/v)	+	+	+	-	+
<b>Croissance à pH à 5,7</b>	+	+	-	-	+
<b>Température (°C) de croissance</b>	15-55	15-55	8-37	15-55	10-50
<b>Origine</b>	Sédiments marins provenant du port de pêche de Sfax, Tunisie.	Sol Novozymes Biotech, Etats-Unis	Tubes cryogéniques utilisés pour collecter des échantillons d'air de haute altitude, Inde	Sol provenant du désert Sonoran, Arizona, Etats-Unis	Sol Mojave, désert, Etats-Unis

+: positif; -: négatif.

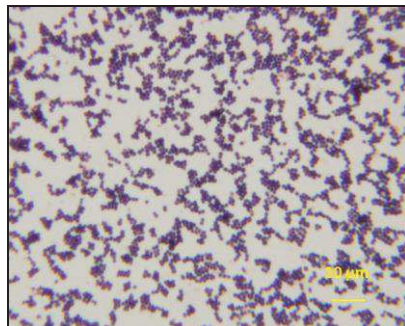
<sup>a</sup>: Rey *et al.*, 2004 ; <sup>b</sup>: Shivaji *et al.*, 2006; <sup>c</sup>: Palmisano *et al.*, 2001 et <sup>d</sup>: Roberts *et al.*, 1994.

### III.4. Caractérisation de la souche CO100

#### III.4.1. Caractérisation phénotypique

Sur milieu LB solide, les colonies de la souche CO100 sont arrondies et régulières de diamètre de 0,5 à 1 mm, après 24 h d'incubation à 37 °C. Leur couleur est crèmeuse et leur aspect est lisse. Sur milieu LB liquide, la souche CO100 se présente sous forme de coques

immobiles, isolés, en double et en amas. La souche bactérienne CO100 est une bactérie aérobie, Gram (+) (Fig. 45), catalase (+) et oxydase (-).



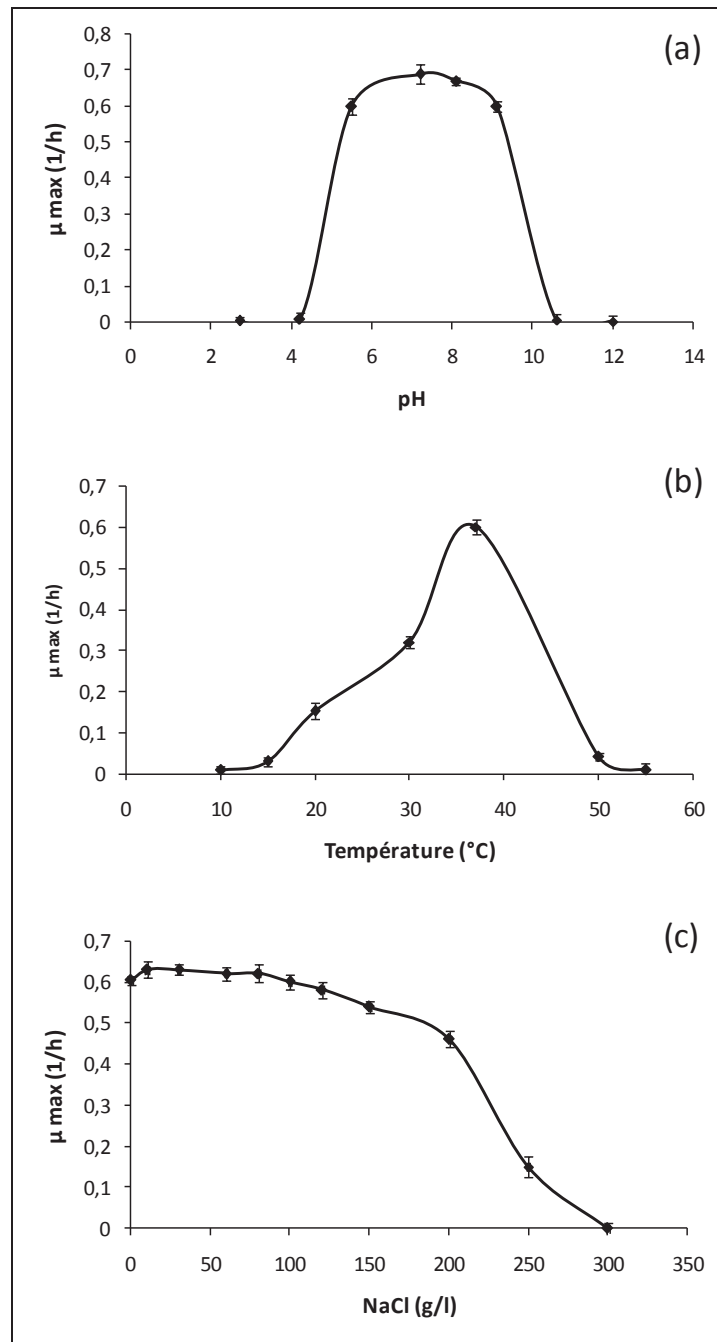
**Figure 45.** Observation microscopique après coloration de Gram de la souche CO100 (Microscope optique, grossissement  $\times 100$ ).

La souche CO100 étant une bactérie aérobie, Gram +, catalase +, oxydase - et se présente sous forme de coques, la galerie API Staph, qui est utilisée dans l'identification des *Staphylococcus* et apparentés, a été employée pour réaliser des études biochimiques de la souche CO100 et étudier sa capacité à métaboliser certains composés organiques (Tableau 34). Selon le logiciel API «Biomérieux», la souche CO100 appartient au genre de *Staphylococcus*, avec 97% d'acceptation.

**Tableau 34.** Résultats des tests de la galerie API Staph réalisés avec la souche CO100.

Tests	Substrats	Résultats
GLU	D-glucose	+
FRU	D-fructose	+
MNE	D-mannose	+
MAL	D-maltose	+
LAC	D-Lactose	-
TRE	D-trehalose	-
MAN	D-mannitol	-
XLT	Xylitol	-
MEL	D-melibiose	-
NIT	Nitrate de potassium	+
PAL	$\beta$ -naphthyl phosphate	+
VP	Pyruvate de sodium	+
RAF	D-raffinose	-
XYL	D-xylose	-
SAC	D-saccharose (sucrose)	+
MDG	Méthyl- $\alpha$ Dglucopyranoside	-
NAG	N-acetyl-glucosamine	-
ADH	L-arginine	+
URE	Urée	-

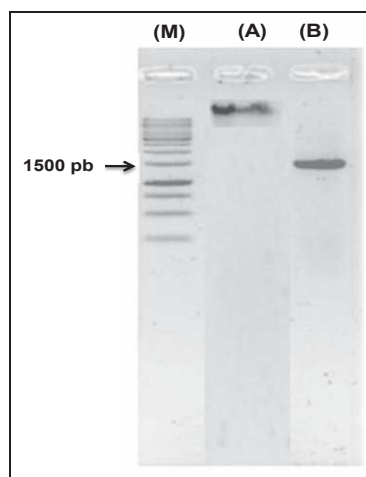
Par ailleurs, la souche CO100 est en mesure de se développer sur une gamme de pH entre 5,5-9, avec un optimum de croissance à un pH de 7,2. Aucune croissance n'est observée au-dessous du pH 4,2 et au-dessus de pH 10,5 (Fig. 46a). En outre, la souche CO100 montre qu'elle est capable de croître sur une plage de température de 15-50 °C, avec un optimum de croissance à 37 °C. Cependant, une absence de croissance est rapportée à 10 et 55 °C (Fig. 46b). La souche CO100 se développe entre 0 et 250 g/l NaCl, avec un optimum de croissance entre 0 et 100 g/l NaCl. La souche est incapable de croître en présence de 300 g/l NaCl (Fig. 46c). Il s'agit donc d'une souche fortement halotolérante. La résistance des microorganismes appartenant au genre *Staphylococcus* aux conditions salines, a été montrée. Une souche HPSSN35C de *Staphylococcus arlettae* extrêmement halotolérante a été isolée à partir d'un sol salin de la plage de Dwarka, en Inde. Elle a présenté une croissance sur une large gamme de NaCl variant de 0 à 6 M (Nanjani *et* Soni, 2013). Une autre souche CH1-8 de *Staphylococcus xylosus* isolée à partir de poissons fermentés collectés dans la province de Chumporna, Thailand, a montré son potentiel de croître à une concentration en NaCl de 20% (m/v) (Namwong *et* Tanasupawat, 2014)



**Figure 46.** Etude de la croissance de la souche CO100 en fonction du pH (a), de la température (b) et de la concentration en NaCl (c).

### III.4.2. Caractérisation phylogénétique de la souche CO100

La figure 47 représente les profils d'électrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN génomique de la souche CO100 et du produit PCR purifié du gène codant pour l'ARNr 16S.



**Figure 47.** (A): ADN génomique de la souche CO100; (B): Produit PCR purifié du gène de l'ARNr 16S de la souche CO100.

(M): Marqueur de taille 1 Kb DNA Ladder (250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 pb).

Le séquençage du gène de l'ARNr 16S de la souche CO100, en se basant sur 750 nucléotides, montre qu'elle appartient au genre *Staphylococcus*.

Dans les milieux marins exposés à des pollutions chroniques d'hydrocarbures (comme les ports), de nombreux microorganismes hydrocarbonoclastes composent la communauté microbienne indigène (Won *et al.*, 2017). Les organismes les mieux adaptés pour la bioremédiation sont souvent les espèces indigènes d'un habitat pollué particulier. Les microorganismes indigènes peuvent survivre et se multiplier en présence de substances toxiques, en présentant de larges capacités de biodégradation. Bien que certaines souches microbiennes aient été sélectionnées pour leur capacité de bioremédiation, elles sont généralement moins efficaces que les populations natives (Ortmann *et Lu*, 2015). Les souches FLU5, NAPH6, PYR2 et CO100, isolées à partir des environnements marin pollués par des hydrocarbures, semblent être alors comme de bonnes candidates pour la biodégradation des composés hydrocarbonés.

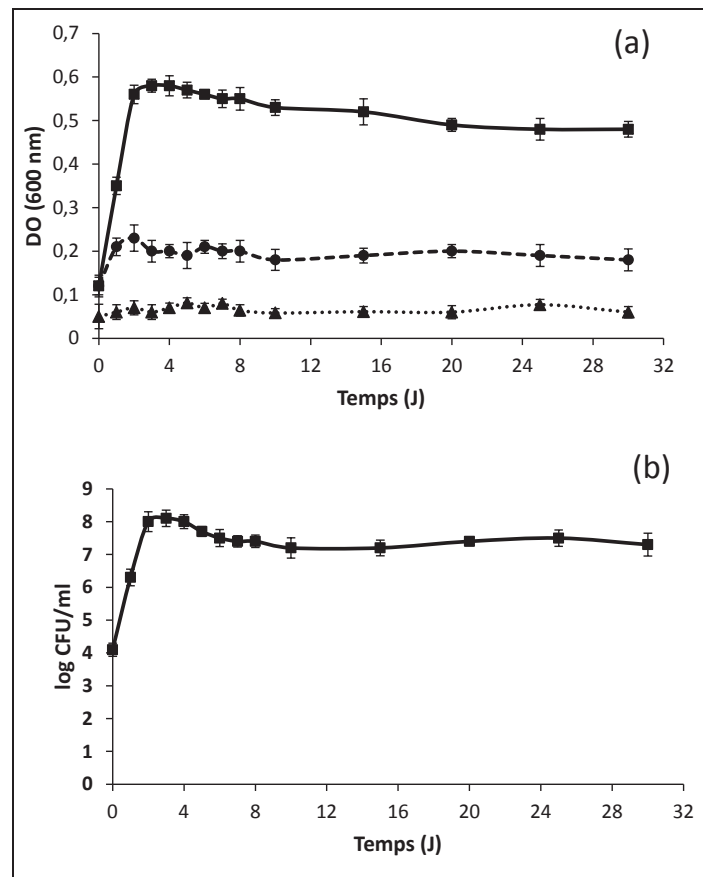
## IV. Etude des potentialités biodégradatives des souches marines isolées sur des hydrocarbures

### IV.1. Etude des potentialités biodégradatives de la souche FLU5

#### IV.1.1. Biodégradation du fluoranthène

Une étude de la cinétique de croissance de la souche FLU5 sur le fluoranthène (100 mg/l), utilisé comme seule source de carbone et d'énergie, en présence de milieu de base à 30

g/l de NaCl a été réalisée. Des cultures bactériennes réalisées à 37 °C et à 180 rpm, ont été suivies au cours du temps par mesure de la densité optique à 600 nm. Une comparaison par rapport à des témoins biologique ne contenant pas le fluoranthène et chimique ne contenant pas l'inoculum, a été effectuée (Fig. 48 a). Le dénombrement sur milieu LB solide a été également réalisé afin de confirmer la croissance de la souche FLU5 sur le fluoranthène (Fig. 48 b).

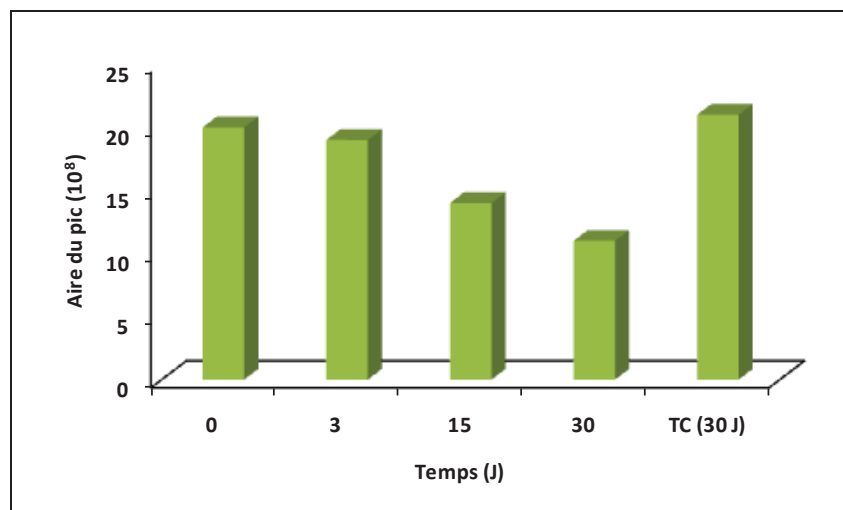


**Figure 48.** Etude de la cinétique de croissance de la souche FLU5 sur milieu de base contenant 100 mg/l du fluoranthène (■), à 37 °C et à 180 rpm, par suivi de la DO (600 nm) (a) et par des dénombrements sur milieu solide (CFU/ml) (b). Témoin biologique (●), Témoin chimique (▲).

Les résultats obtenus montrent que la souche FLU5 possède une croissance importante sur le fluoranthène ( $DO_{600\text{ nm}} \text{ max} = 0,58$ ), après 3 jours d'incubation, par rapport au témoin biologique ( $DO_{600\text{ nm}} \text{ max} = 0,23$ ) (Fig. 48). La souche FLU5 est capable donc d'utiliser le fluoranthène comme seule source de carbone et d'énergie.

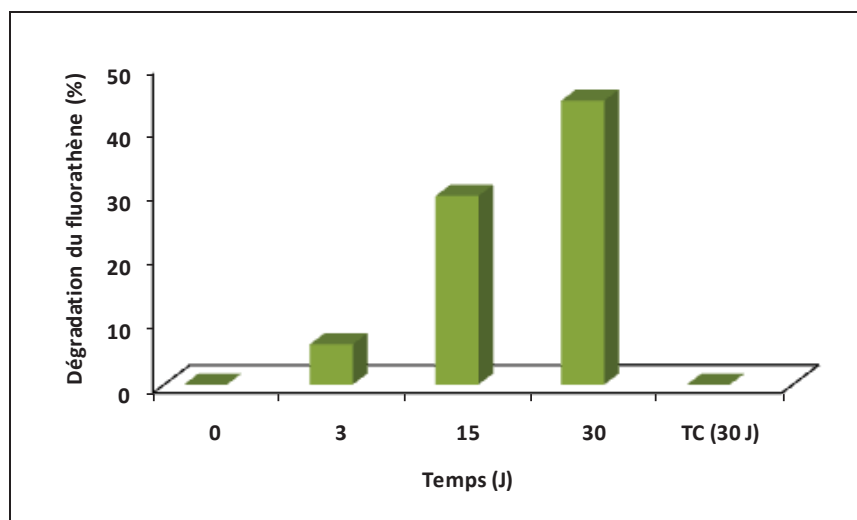
Afin de confirmer la biodégradation du fluoranthène, des analyses par chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse (GC-MS) ont été réalisées à différents temps d'incubation de la culture de la souche FLU5, au bout de 0, 3, 15 et 30 jours, en présence du fluoranthène (100 mg/l), en comparaison avec un témoin chimique incubé dans les mêmes conditions. Les chromatogrammes de GC-MS montrent que la souche FLU5 est

active sur la fluoranthène. Ceci est confirmé par la diminution des aires des pics de fluoranthène, au cours d'incubation de la culture FLU5 (Fig. 49).



**Figure 49.** Evolution des aires des pics du fluoranthène au cours de la biodégradation par la souche FLU5 à 37 °C et 180 rpm.

La souche FLU5 est capable de dégrader presque 30 et 45% du fluoranthène (100 mg/l) en présence de 30 g/l NaCl, après 15 et 30 jours d'incubation, respectivement (Fig. 50).



**Figure 50.** Pourcentage de dégradation du fluoranthène (100 mg/l) par la souche FLU5, en fonction de différents temps d'incubation, à 37 °C et 180 rpm.

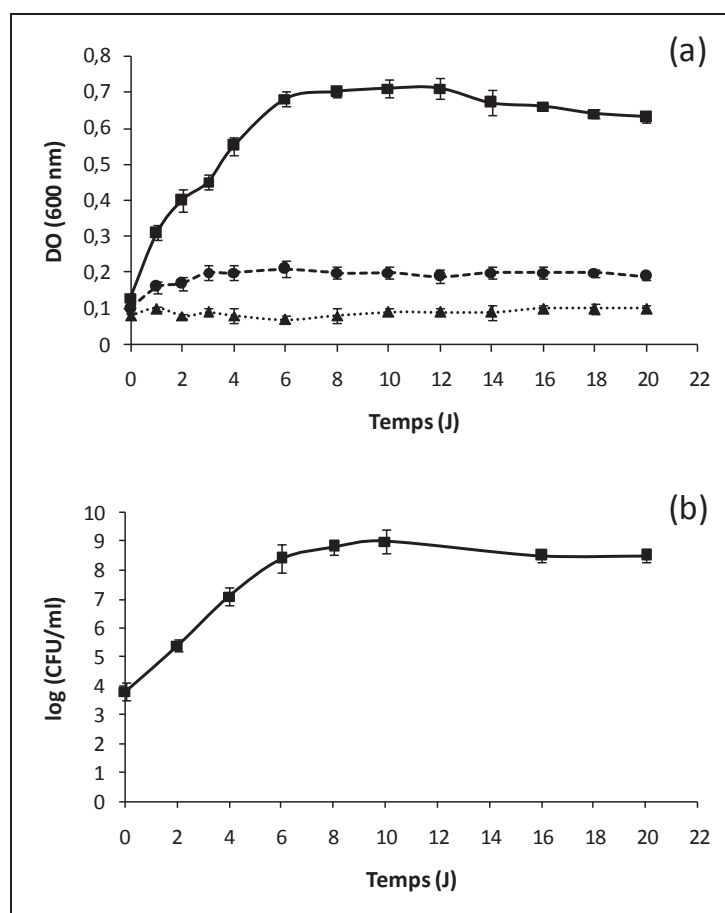
En comparant ces résultats avec d'autres études dans le même contexte, on peut conclure que la souche FLU5 a un potentiel de biodégradation intéressant sur le fluoranthène. En effet, une étude sur une souche B-2 de *Pasteurella* ssp., isolée à partir d'une boue activée, montre que cet isolat a le pouvoir de dégrader 40% du fluoranthène au bout de 30 jours d'incubation, mais seulement en présence d'une concentration de 20 mg/l (Šepič *et al.*, 1998). Une autre souche FA1 de *Herbaspirillum chlorophenolicum*, isolée d'une boue activée, était



capable de dégrader 13,7% de fluoranthène à une concentration initiale de 20 mg/l, après 30 jours d'incubation (Xu *et al.*, 2011). Par ailleurs, la souche NA2 de *Bacillus thuringiensis*, isolée d'un site contaminé par le pétrole, peut dégrader près de 30% du fluoranthène, à une concentration initiale de 50 mg/l, au bout de 12 jours d'incubation (Maiti *et al.*, 2012).

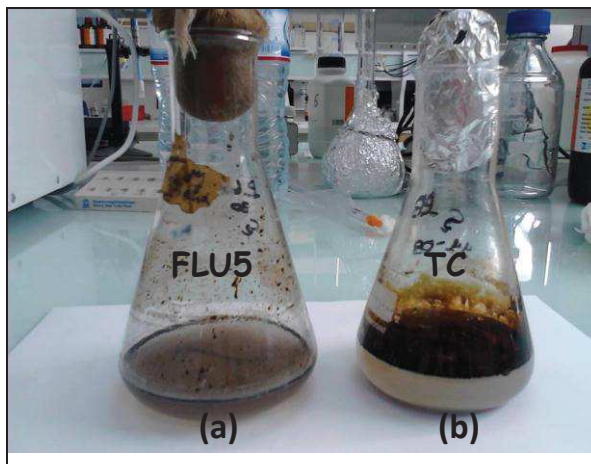
#### IV.1.2. Biodégradation du pétrole brut par la souche FLU5

Une étude de la cinétique de croissance de la souche FLU5 sur le pétrole brut (1%, v/v), utilisé comme seule source de carbone et d'énergie, en présence de milieu de base à 30 g/l, à 37 °C et 180 rpm, a été également réalisée. Les résultats montrent que la souche FLU5 est capable de croître sur le pétrole brut, avec des  $DO_{600\text{ nm}}$  max de entre 0,68 et 0,71, au bout de 6 et 10 jours (Fig. 51 a). Des dénombrements sur milieu solide LB ont été également réalisés afin de confirmer la croissance sur ce substrat complexe. Les résultats de dénombrements sont corrélés avec ceux de la DO 600 nm et le nombre le plus élevé des colonies bactériennes est obtenu après 6 et 10 jours d'incubation ( $\log(\text{CFU/ml}) = 8,4$  et 9, respectivement) (Fig. 51 b).



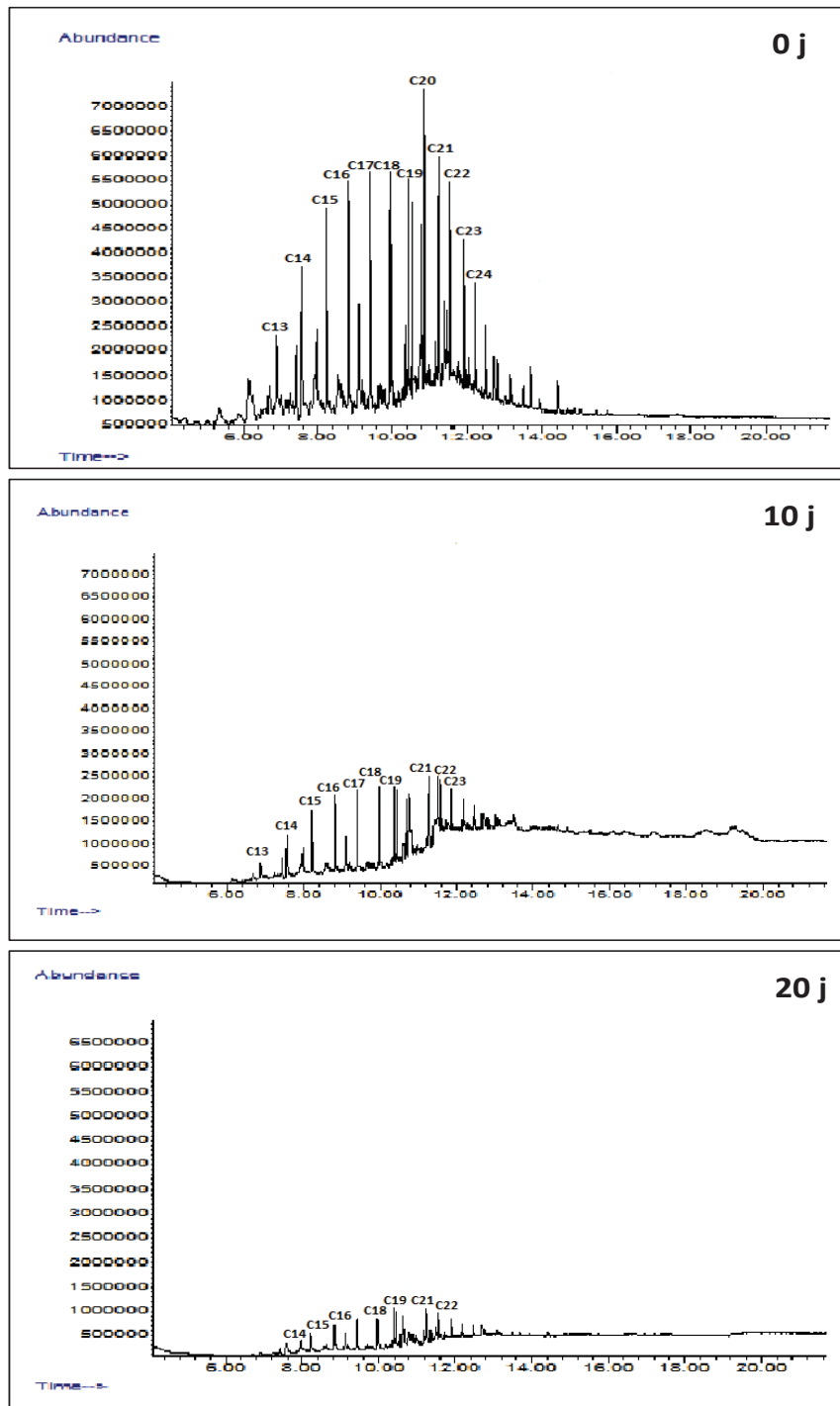
**Figure 51.** Etude de la cinétique de croissance de la souche FLU5 sur milieu de base contenant le pétrole brut (1%, v/v) (■), à 37 °C et à 180 rpm, par suivi de la DO (600 nm) (a) et par des dénombrements sur milieu solide (CFU/ml) (b). Témoin biologique (●), Témoin chimique (▲).

La figure 52 montre la fragmentation de la couche du pétrole brut (PB) et sa disparition progressive par la souche FLU5, par rapport au témoin chimique.



**Figure 52.** Biodégradation du PB (1%, v/v) par la souche FLU5 (a), à 30 g/l NaCl et à 37 °C, après 9 j d'incubation, en comparaison avec un témoin chimique (TC) (b).

Des analyses GC-MS, ont été également réalisées pour étudier la dégradation du pétrole brut (1%, v/v) par la souche FLU5 (Fig. 53). Les résultats obtenus montrent que la souche FLU5 est capable de métaboliser 94,5% de la fraction aliphatique présente dans le pétrole brut (1%, v/v) dans un milieu de base à 30 g/l NaCl, après 20 j d'incubation, à 37 °C. Ce résultat a été confirmé par la diminution ou la disparition totale des pics correspondants aux différents alcanes de C<sub>13</sub>-C<sub>24</sub> (Fig. 53).



**Figure 53.** Chromatogrammes (GC-MS) au cours de la biodégradation de la fraction aliphatique du pétrole brut (1%, v/v) par la souche FLU5, en présence de 30 g/l à 37 °C et 180 rpm, en fonction du temps (0, 10 et 20 jours).

$C_{13}$ - $C_{24}$  indiquent les *n*-alcanes avec le nombre d'atomes de carbone de 13 à 24.

La recherche des microorganismes qui dégradent les hydrocarbures, suscite un intérêt considérable, en raison de la toxicité et la faible biodisponibilité de ces composés. Les bactéries à Gram positif telles que *Bacillus* sp. peuvent être utilisées en tant que candidates puissantes pour éliminer ces molécules hydrocarbonées (Chen *et al.*, 2017). Par exemple, la

souche ACE4 de *B. cereus*, isolée à partir d'un pipeline transnational dans le nord de l'Inde, qui transporte des produits pétroliers tels que le kérosène, l'essence et le diesel, a montré sa capacité de dégrader la quasi-totalité des *n*-alcane ( $C_{10}$  à  $C_{20}$ ) présents dans le diesel (1%) en 30 jours (Rajasekar *et al.*, 2007). Dans une autre étude, une souche DRDU1 de *B. cereus*, isolée à partir des huiles de moteurs usées, en Inde, a dégradé 71% du diesel et 64% du pétrole brut en 4 semaines (Borah *et Yadav*, 2014).

#### IV.1.3. Croissance de la souche FLU5 sur d'autres substrats carbonés

La capacité de la souche FLU5 à croître sur une variété de sources de carbone, en présence de 30 g/l de NaCl et à 37 °C, a été étudiée durant 10 jours (Tableau 35).

**Tableau 35.** Croissance de la souche FLU5 sur différentes source de carbone à 37 °C et à 180 rpm

Source de carbone	Croissance (DO <sub>600 nm max</sub> )
Benzène (0,5%, v/v)	+ (0,38); (2 j)
Toluène (0,5%, v/v)	+ (0,42); (2 j)
Ethylbenzène (0,5%, v/v)	+ (0,39); (3 j)
<i>p</i> -xylène (0,5%, v/v)	+ (0,40); (3 j)
<i>m</i> -xylène (0,5%, v/v)	+ (0,36); (1 j)
<i>o</i> -xylène (0,5%, v/v)	+ (0,39); (2 j)
Acide protocatéchique (5 Mm)	+ (0,72); (4 j)
Acide gentisique (5 Mm)	+ (0,61); (3 j)
Acide vanillique (5 Mm)	-
Acide syringique (5 Mm)	-
Acide gallique (5 Mm)	++ (1,20); (2 j)
Tyrosol (5 Mm)	++ (0,88); (2 j)
Phénol (5 Mm)	+ (0,41); (3 j)
Acide caféique (5 Mm)	++ (0,77); (2 j)
Acide férulique (5 Mm)	-
Naphthalène (200 mg/l)	+ (0,38); (3 j)
Phenanthrène (200 mg/l)	+ (0,39); (5 j)
Pyrène (200 mg/l)	+ (0,40); (6 j)
Octane (1%, v/v)	+ (0,35); (3 j)
Décane (1%, v/v)	-
Mazout (1%, v/v)	+ (0,45); (2 j)
Huile de moteur (1%, v/v)	+ (0,51); (3 j)
Pétrole brut (1%, v/v)	+ (0,71); (8 j)
Huile d'olive (1%, v/v)	++ (1,93); (2 j)
Glycérol (1%, v/v)	++ (0,81); (3 j)

-: DO<sub>600 nm max</sub> < 0,2 (Pas de croissance)

+: DO<sub>600 nm max</sub>: 0,3-0,75 (Croissance positive)

++: DO<sub>600 nm max</sub> > 0,75 (Croissance importante)

La souche FLU5 est capable de se développer sur les hydrocarbures BTEX (benzène, toluène, éthylbenzène et *o*-, *m*- et *p*-xylènes). Concernant les dérivés benzoïques testés, la souche FLU5 possède la capacité de dégrader, l'acide protocatéchique, l'acide gentisique et l'acide gallique. Par contre, elle n'est pas capable de croître sur l'acide vanillique et l'acide syringique. Sur les dérivés cinnamiques testés, la souche FLU5 est capable de croître sur l'acide caféique, mais pas sur l'acide férulique. La souche FLU5 montre également une meilleure croissance sur le tyrosol, un antioxydant phénolique naturel, par rapport au phénol, un composé aromatique toxique. De plus, la souche FLU5 est capable de croître sur l'octane, un *n*-alcane ayant 8 atomes de carbone, mais non sur le décane, un *n*-alcane ayant 10 atomes de carbone. En plus du fluoranthène, la souche FLU5 est capable de croître sur le naphthalène, le phénanthrène et le pyrène, des HAPs constitués de 2, 3 et 4 noyaux aromatiques, respectivement. Concernant les hydrocarbures complexes, le pétrole brut et le mazout et l'huile de moteur, ont été métabolisés par la souche FLU5. En outre, la souche FLU5 a montré une croissance importante sur l'huile d'olive et sur le glycérol (Tableau 35).

De nombreuses études ont rapporté l'implication des bactéries du genre *Bacillus* dans la biodégradation des hydrocarbures, y compris des HAPs (Da Cunha *et al.*, 2006). En revanche, à notre connaissance, notre étude démontre pour la première fois des capacités biodégradatives des hydrocarbures par une souche affiliée à l'espèce *Bacillus stratosphericus* (Hentati *et al.*, 2016). Récemment, Bezza *et Nkhalambayausi Chirwa*, (2016), ont rapporté la capacité d'un consortium de différentes espèces, y compris *Bacillus stratosphericus*, à dégrader des HAPs et à produire des biosurfactants. En outre, Lima *et al.* (2013), ont signalé la présence de cytochrome P450 dans le génome de la souche LAMA 585 de *B. stratosphericus* suggérant ainsi, sa capacité à métaboliser des composés récalcitrants, tels que le naphthalène et le benzopyrène.

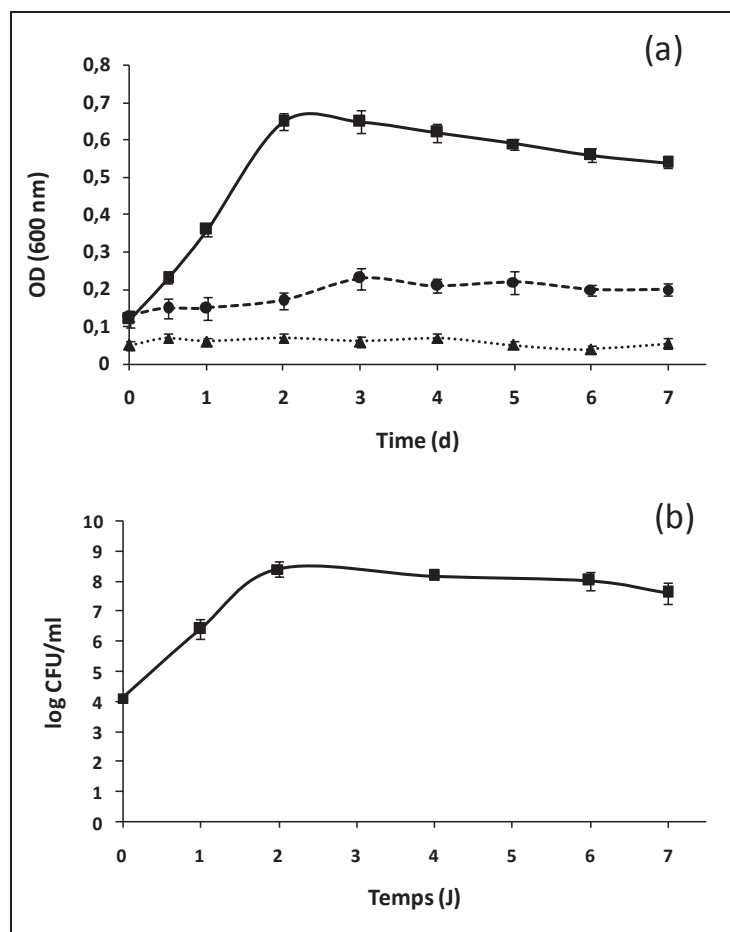
Plusieurs recherches ont mis en évidence le potentiel prometteur de l'utilisation des microorganismes appartenant au genre *Bacillus* et isolés à partir des environnements marins, dans les processus de biodégradation des hydrocarbures. Quatre isolats bactériens marins appartenant aux espèces *B. subtilis*, *B. mojavensis*, *B. fusiformis* et *B. cereus*, isolés à partir des eaux de surface côtières et des sédiments de l'océan Pacifique, ont montré leur aptitude à dégrader des hydrocarbures BTX (benzène, toluène et xylène) (Wang *et al.*, 2008). De plus, des souches de *B. cereus* isolées à partir des eaux de mer polluées par des hydrocarbures au Liban, ont été décrites pour leur capacité à dégrader des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques (Maliji *et al.*, 2013). Une étude sur la diversité et l'abondance des bactéries

dégradant des hydrocarbures dans des eaux de mer de l'île de Xiamen, en Chine, a révélé la présence d'une bactérie appartenant à l'espèce *Bacillus stratosphericus* (Wang *et al.*, 2010).

## IV.2. Etude des potentialités biodégradatives de la souche NAPH6

### IV.2.1. Biodégradation du naphthalène

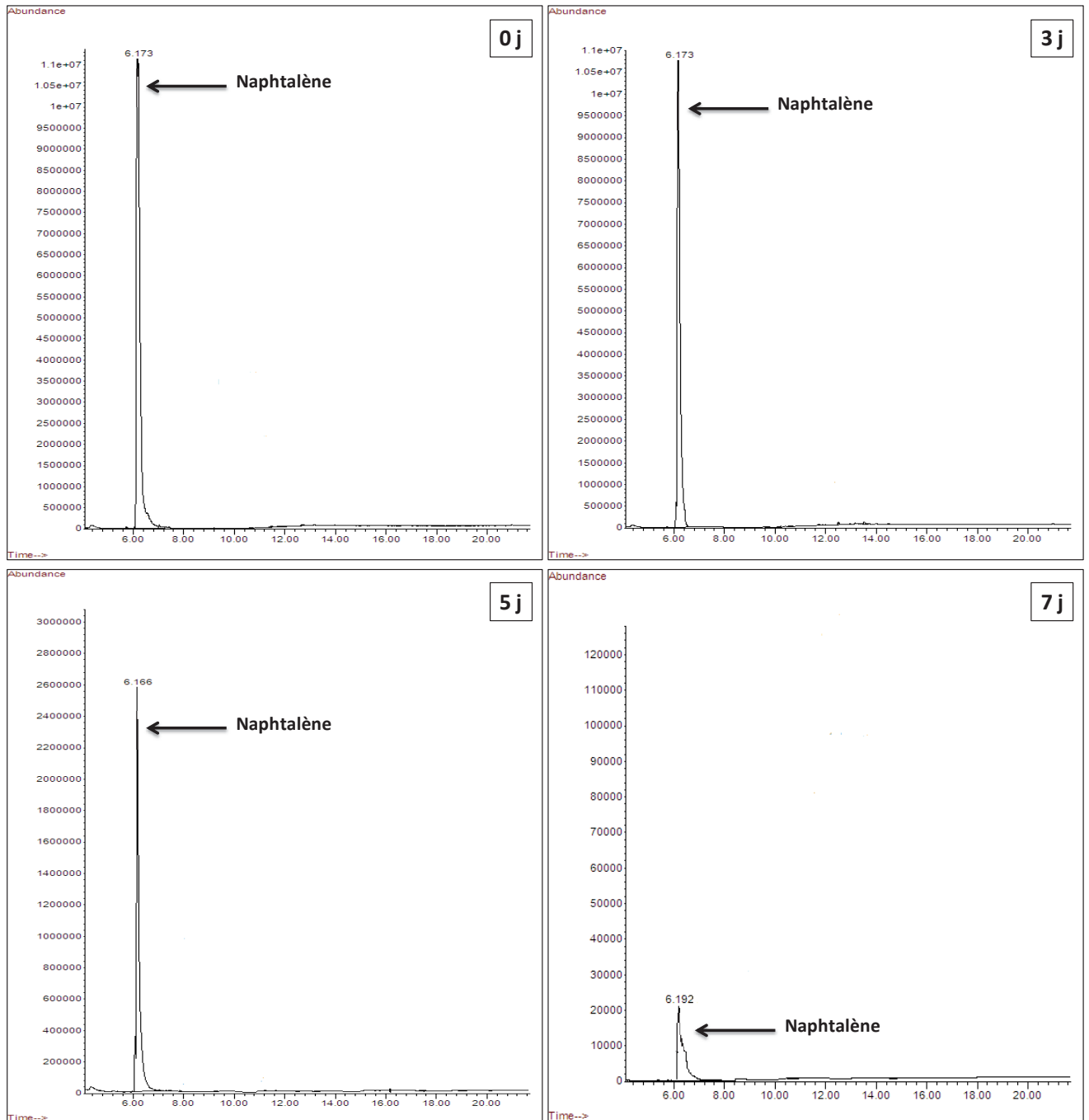
Une étude de la cinétique de croissance de la souche NAPH6 sur le naphthalène (200 mg/l), comme source de carbone et d'énergie, en présence de milieu de base à 30 g/l NaCl, à 37 °C et 180 rpm, a été réalisée au cours du temps par mesure de la densité optique à 600 nm et par dénombrement sur milieu solide. Une comparaison par rapport à des témoins biologiques et chimiques, a été effectuée (Fig. 54).



**Figure 54.** Etude de la cinétique de croissance de la souche NAPH6 sur milieu de base contenant 200 mg/l du naphthalène (■), à 37 °C et à 180 rpm, par suivi de la DO (600 nm) (a) et par des dénombrements sur milieu solide (CFU/ml) (b) Témoin biologique (●) et Témoin chimique (▲).

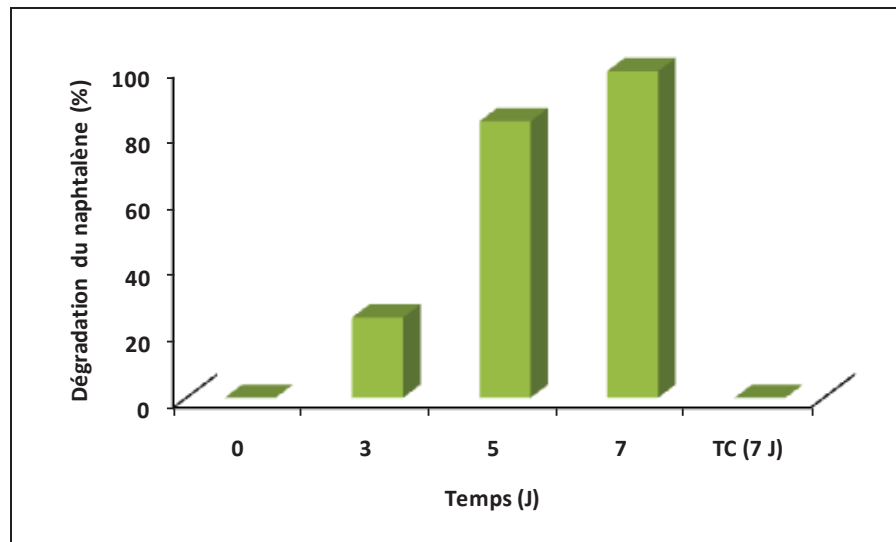
La souche NAPH6 possède une forte croissance sur le naphthalène ( $DO_{600\text{ nm}} \text{ max} = 0,65$ ;  $\log(\text{CFU/ml}) = 8,4$ ) par rapport au témoin biologique ( $DO_{600\text{ nm}} \text{ max} = 0,23$ ), il est, donc, possible de conclure que la souche NAPH6 est capable d'utiliser le naphthalène comme seule source de carbone et d'énergie (Fig.54).

Les chromatogrammes de GC-MS montrent également que la souche NAPH6 est capable de dégrader le naphthalène. Ceci est confirmé par la diminution de la concentration du naphthalène, au cours d'incubation de la culture (Fig. 55).



**Figure 55.** Chromatogrammes GC-MS au cours de la biodégradation du naphthalène (200 mg/l) par la souche NAPH6, à 37 °C et à 180 rpm, pendant 7 jours.

La souche NAPH6 dégrade presque totalement (99%) les 200 mg/l du naphthalène (Tr = 6,2 min) au bout de 7 jours d'incubation (Fig. 56).



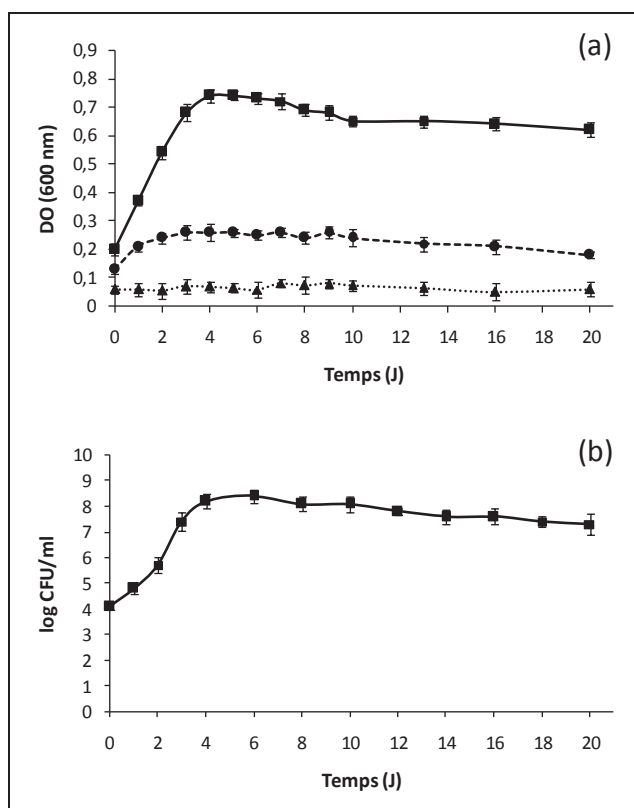
**Figure 56.** Biodégradation du naphthalène (200 mg/l) par la souche NAPH6, en fonction de différents temps d'incubation, à 37 °C et 180 rpm.

Nos résultats sont en concordance avec des travaux antérieurs qui ont étudié l'aptitude de certains *Pseudomonas* à métaboliser le naphthalène. La souche PTCC 1707 de *P. aeruginosa* a pu dégrader 94% de 20 mg/l de naphthalène, après 8 jours d'incubation dans un bioréacteur contenant des eaux polluées par le naphthalène (Karimi *et al.*, 2015). De plus, il a été aussi montré que *Pseudomonas lecoglossida* PB1 et *Pseudomonas* sp. PB2, isolés à partir d'un sol prélevé d'un ancien site industriel, contaminé par des polluants organiques et inorganiques, en Inde, étaient capables de métaboliser 26% et 40% du naphthalène à une concentration initiale de 123 ppm, respectivement, au bout de 14 jours (Nwinyi *et al.*, 2016). Par ailleurs, une bactérie endophyte *Pseudomonas monteilii* P3, isolée à partir des tissus des plantes (*Conyza canadensis* et *Trifolium pretense* L.) développées sur un sol contaminé par des hydrocarbures, Chine, a montré sa capacité à éliminer 95,3% du naphthalène à une concentration initiale de 100 mg/l, au bout de 7 jours d'incubation (Zhu *et al.*, 2016).

#### IV.2.2. Biodégradation du pétrole brut par la souche NAPH6

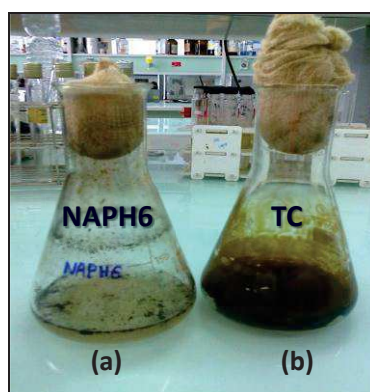
La cinétique de croissance de la souche NAPH6 sur le pétrole brut (1%, v/v), utilisé comme source de carbone et d'énergie, en présence de 30 g/l, à 37 °C et 180 rpm, a été également étudiée. Les résultats montrent que la souche NAPH6 est capable de croître sur le pétrole brut, avec une  $DO_{600\text{ nm}}$  max de 0,71 (Fig. 57 a) et un log (CFU/ml) de 8,1 (Fig. 57 b), après 10 jours d'incubation.





**Figure 57.** Etude de la cinétique de croissance de la souche NAPH6 sur milieu de base contenant du pétrole brut (1%, v/v) (■), à 37 °C et à 180 rpm, par suivi de la DO (600 nm) (a) et par dénombrements sur milieu solide (CFU/ml) (b). Témoin biologique (●), Témoin chimique (▲).

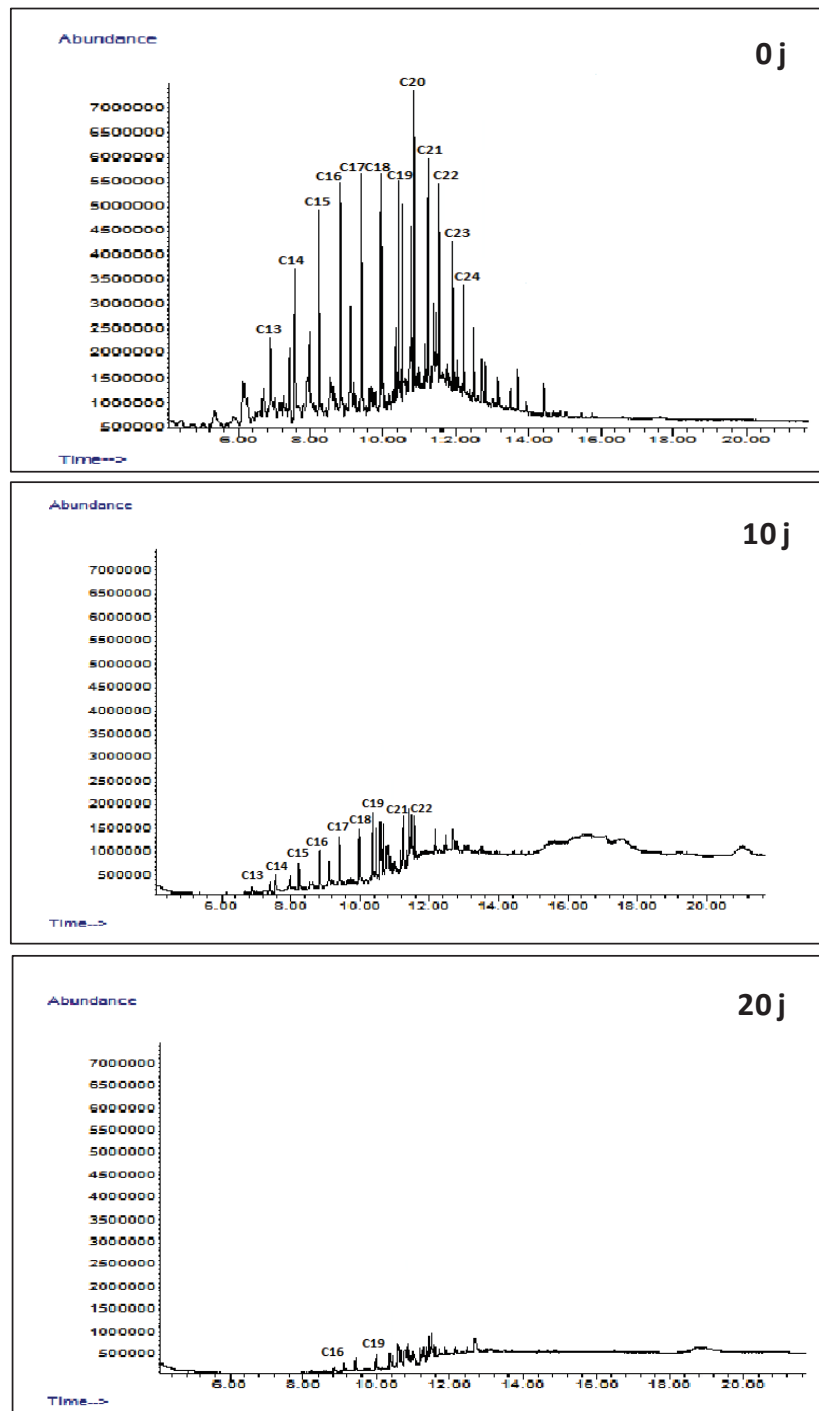
La figure 58 montre le potentiel intéressant de la souche NAPH6 à fragmenter la couche du pétrole brut, par rapport au témoin chimique.



**Figure 58.** Biodégradation du PB (1%, v/v) par la souche NAPH6 (a), à 30 g/l NaCl et à 37 °C, après 8 j d'incubation, en comparaison avec un témoin chimique (TC) (b).

Des analyses GC-MS, ont été réalisées pour évaluer la dégradation du pétrole brut par la souche NAPH6. Cette dernière est capable de métaboliser 96,2% de la fraction aliphatique présente dans le pétrole brut (1%, v/v) dans un milieu MB à 30 g/l NaCl, après 20 j

d'incubation à 37 °C. Ce résultat a été confirmé par la diminution ou la disparition totale des pics correspondants aux différents alcanes de C<sub>13</sub> au C<sub>24</sub> (Fig. 59).



**Figure 59.** Chromatogrammes (GC-MS) au cours de la biodégradation de la fraction aliphatique du pétrole brut (1%, v/v) par la souche NAPH6, en présence de 30 g/l, à 37 °C et 180 rpm, en fonction du temps (0, 10 et 20 jours).

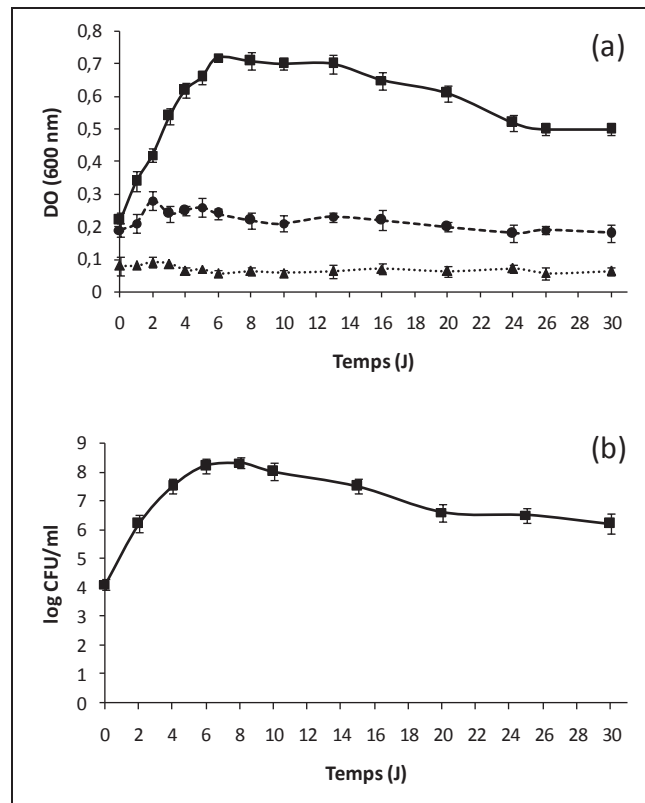
*C<sub>13</sub>-C<sub>24</sub> indiquent les n-alcanes avec le nombre d'atomes de carbone de 13 à 24.*

De nombreuses recherches ont mis en évidence le potentiel prometteur de l'utilisation du genre *Pseudomonas* dans les processus de biodégradation des hydrocarbures. A titre

d'exemple, la souche *Pseudomonas aeruginosa* W10, isolée à partir d'un sol contaminé par des huiles industrielles (Kairouane, Tunisie), a montré des capacités biodégradatives marquantes sur une large gamme des hydrocarbures tels que le naphthalène, le phénanthrène, le fluoranthène, le pyrène, le pétrole brut, le mazout, l'huile de moteurs usée, etc... (Chebbi *et al.*, 2017b). Mnif *et al.* (2011), ont isolé une souche C450 de *Pseudomonas aeruginosa*, à partir des eaux de production d'un champ pétrolier tunisien, capable de dégrader 98,2% de pétrole brut (1%, v/v), en 20 jours. En outre, un isolat bactérien, identifié comme étant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 était capable de dégrader le naphthalène et le phénanthrène (Qi *et al.*, 2014). Une autre souche KD6 de *Pseudomonas putida*, isolée à partir de déchets de raffinerie de pétrole, joue un rôle important dans la dégradation des HAPs mixtes (naphthalène, phénanthrène et pyrène) (Dutta *et al.*, 2017). Deux autres souches *Pseudomonas balearica* LS401, isolée à partir d'un sédiment marin pollué (Barcelone, Espagne) et *Pseudomonas balearica* st101, isolée à partir d'un port de raffinerie de pétrole (Etats-Unis), ont montré leur capacité à croître sur le naphthalène et le phénanthrène, respectivement (Salvà-Serra *et al.*, 2017). Moyennant la technique moléculaire de pyroséquençage appliquée sur des sédiments contaminés par des hydrocarbures et prélevés à partir d'un lac situé près d'une raffinerie de pétrole en Roumanie, une dominance apparente des microorganismes affiliés au *Pseudomonas* et ayant un potentiel de dégrader le naphthalène et d'autres HAPs, a été mise en évidence (Wald *et al.*, 2015).

### IV.3. Etude des potentialités biodégradatives du pyrène par la souche PYR2

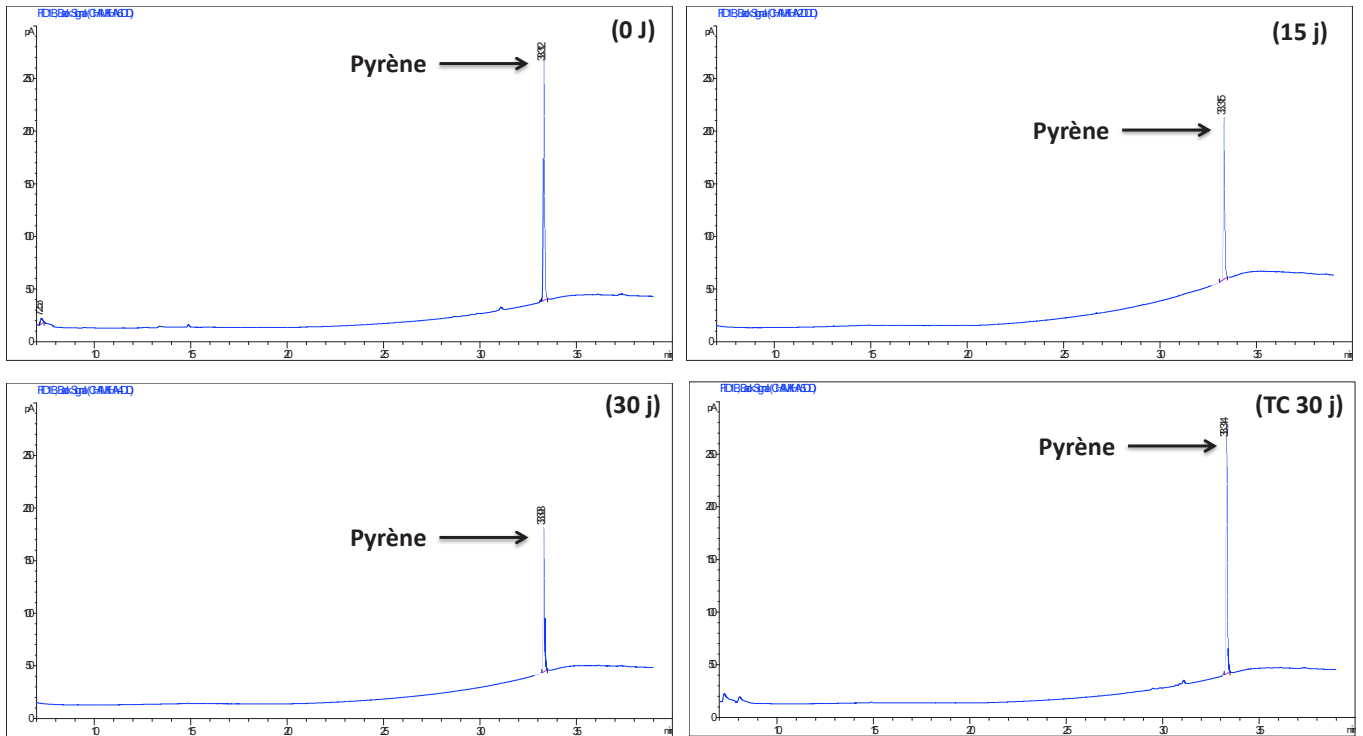
Une étude de la cinétique de croissance de la souche PYR2 sur le pyrène (200 mg/l), utilisé comme seule source de carbone et d'énergie, en présence de 30 g/l de NaCl et en comparaison avec des témoins biologiques et chimiques, a été réalisée. Des cultures bactériennes incubées à 37 °C et à 180 rpm, ont été suivies au cours du temps par mesure de la DO à 600 nm et par dénombrements sur milieu LB solide (Fig 60).



**Figure 60.** Etude de la cinétique de croissance de la souche PYR2 sur milieu de base contenant 200 mg/l du pyrène (■), à 37 °C et 180 rpm, par suivi de la DO (600 nm) (a) et par dénombrements sur milieu solide (CFU/ml) (b). Témoin biologique (●), Témoin chimique (▲).

Les résultats obtenus montrent que la souche PYR2 possède une croissance importante sur le pyrène ( $DO_{600\text{ nm}} \text{ max} = 0,72$ );  $\log(\text{CFU/ml}) = 8,3$ ), par rapport au témoin biologique ( $DO_{600\text{ nm}} \text{ max} = 0,28$ ) (Fig. 60). La dégradation du pyrène (200 mg/l) a été étudiée également par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID), à différentes périodes d'incubation de la culture PYR2 (0, 15 et 30 jours), et en comparaison avec un témoin chimique incubé dans les mêmes conditions. Les chromatogrammes de GC-FID montrent que la souche PYR2 est active sur le pyrène ( $Tr = 33,3$ ). Ceci est confirmé par la diminution des aires de pics de pyrène, au cours d'incubation de la culture PYR2 (Fig. 61).

La souche PYR2 de *Bacillus licheniformis* dégrade 34,5% et 42,1% du pyrène (200 mg/l) en présence de 30 g/l NaCl, après 15 et 30 jours d'incubation, respectivement.



**Figure 61.** Chromatogrammes GC-FID au cours de la biodégradation du pyrène (200 mg/l) par la souche PYR2, à 37 °C et à 180 rpm, pendant 30 jours.

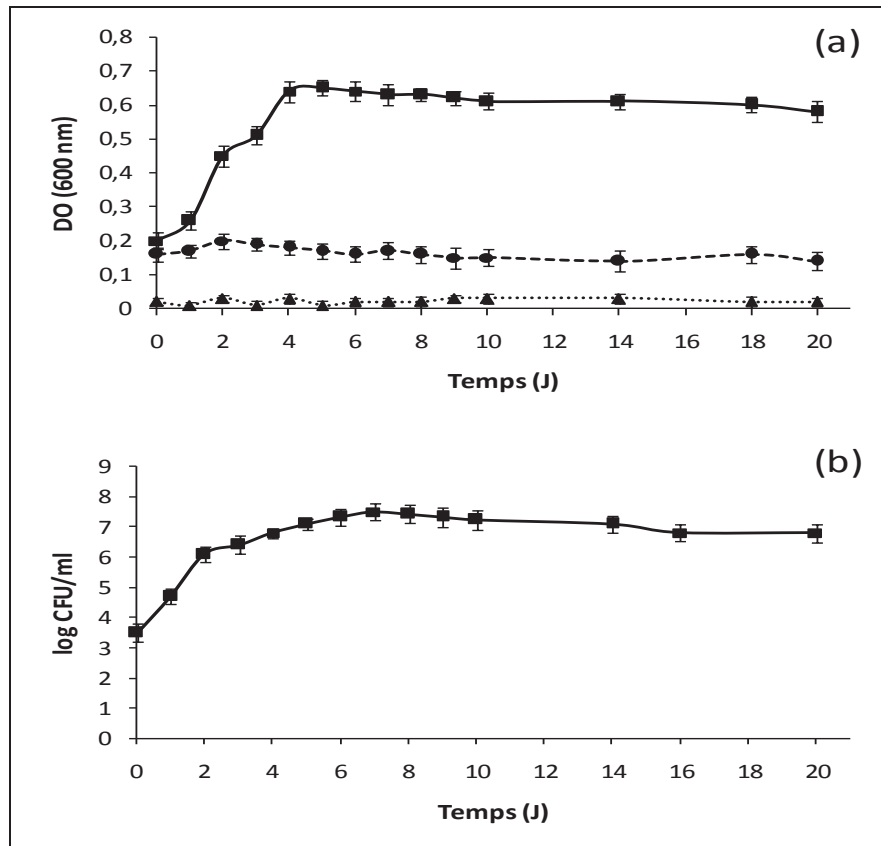
L'espèce *Bacillus licheniformis* a été impliquée dans plusieurs études de biodégradation des hydrocarbures incluant les HAPs. Dans ce contexte, un isolat bactérien, identifié comme étant *Bacillus licheniformis* DHT, isolé à partir d'un sol contaminé par des hydrocarbures, a été décrit pour son potentiel intéressant à dégrader une large gamme des hydrocarbures comme le pétrole brut, le mazout, des alcanes (décane, hexadécane...), et certains HAPs (naphtalène, phénanthrène et pyrène) (Kumar *et al.*, 2007). Il a été aussi montré qu'une souche BMIT5ii de *Bacillus licheniformis*, isolée à partir d'un sol contaminé par des HAPs prélevé d'un atelier d'automobile situé en Inde, joue un rôle important dans l'élimination de naphtalène (Bahuguna *et al.*, 2015). En outre, deux souches Y-1 et KC710973 appartenant à l'espèce *Bacillus licheniformis* et isolées à partir des sols pollués par des hydrocarbures, étaient capables de métaboliser le pétrole brut (Liu *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2016). Récemment, une étude sur *Bacillus licheniformis* ATHE9, isolée d'un sol pollué par des hydrocarbures provenant d'une raffinerie en Iran, a montré que cette souche était capable de dégrader l'acenaphtylène, l'acénaphène et l'indéno(1,2,3-cd)pyrène (Eskandari *et al.*, 2017).

#### IV.4. Etude de potentialités biodégradatives de la souche CO100

##### IV.4.1. Biodégradation du pétrole brut

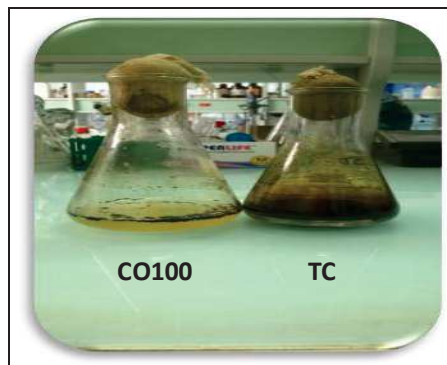
L'étude de la cinétique de croissance de la souche CO100 sur le pétrole brut (1%, v/v), utilisé comme source de carbone et d'énergie, en présence de milieu de base à 100 g/l NaCl,

à 37 °C et 180 rpm, a été réalisée. La souche CO100 montre son aptitude à croître sur ce substrat complexe (DO<sub>600 nm</sub> max = 0,65; log (CFU/ml) = 7,5), par rapport au témoin biologique (DO<sub>600 nm</sub> max = 0,2) (Fig. 62).



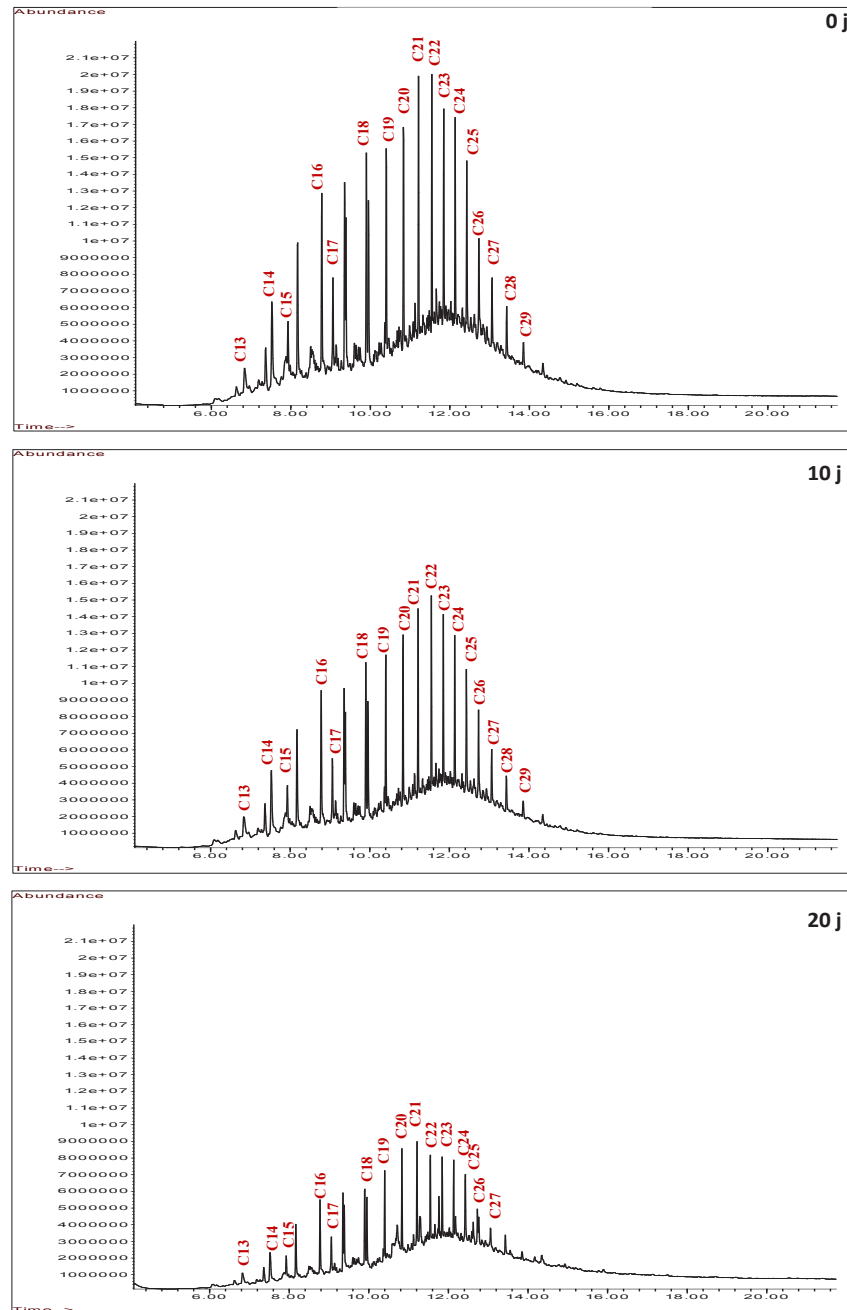
**Figure 62.** Suivi de la croissance de la souche CO100 sur milieu de base contenant du pétrole brut (1%, v/v) (■), en présence de 100 g/l NaCl à 37 °C et 180 rpm, par suivi de la DO (600 nm) (a) et par dénombrements sur milieu solide (CFU/ml) (b). Témoin biologique (●), Témoin chimique (▲).

En outre, la biodégradation du pétrole brut par la souche CO100 est observée par la fragmentation de la couche du pétrole et sa disparition progressive par rapport à celle du témoin chimique (Fig. 63).



**Figure 63.** Biodégradation du pétrole brut (1%, v/v), par la souche CO100, en présence de 100 g/l NaCl, à 37 °C et à 180 rpm, en comparaison avec un témoin chimique (TC).

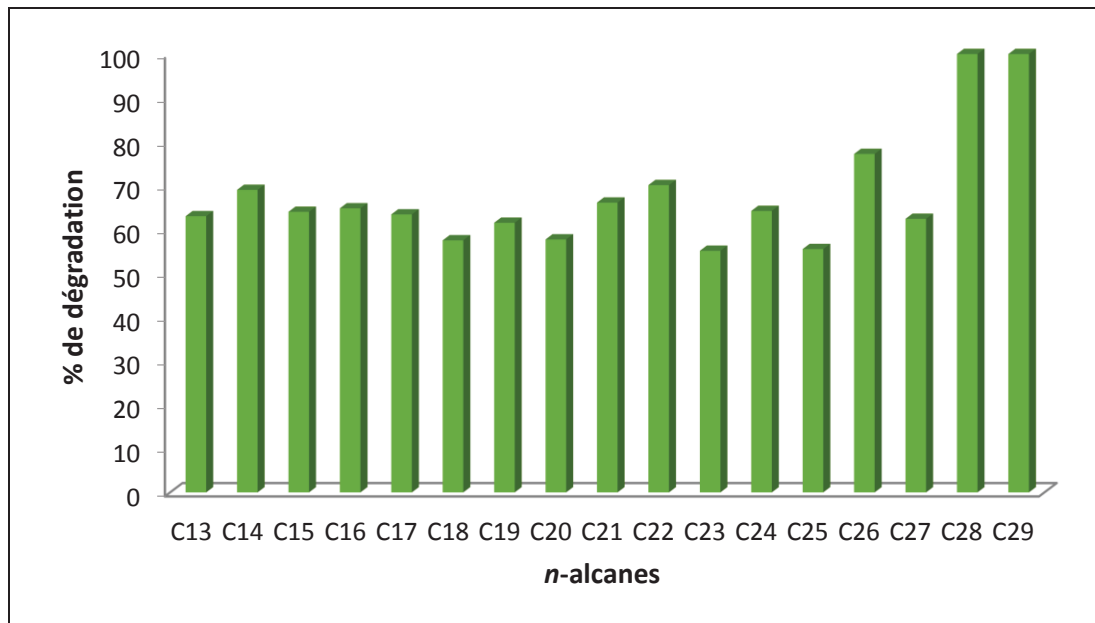
Les analyses GC-MS montrent que la souche CO100 est capable de dégrader 72% des hydrocarbures aliphatiques présents dans le pétrole brut (1%, v/v) dans un milieu de base MB à 100 g/l NaCl, après 20 j d'incubation à 37 °C. Ce résultat a été confirmé par la diminution ou la disparition totale des pics correspondants aux différents alcanes de C<sub>13</sub>-C<sub>29</sub> (Fig. 64).



**Figure 64.** Chromatogrammes (GC-MS) au cours de la biodégradation de la fraction aliphatique du pétrole brut (1%, v/v) par la souche CO100, en présence de 100 g/l, à 37 °C et 180 rpm, en fonction du temps (0, 10 et 20 jours).

*C<sub>13</sub>-C<sub>29</sub> indiquent les n-alcanes avec le nombre d'atomes de carbone de 13 à 29.*

La figure 65 ci-dessous présente le taux de la dégradation détaillée des *n*-alcanes présents (du C<sub>13</sub> jusqu'au C<sub>29</sub>).

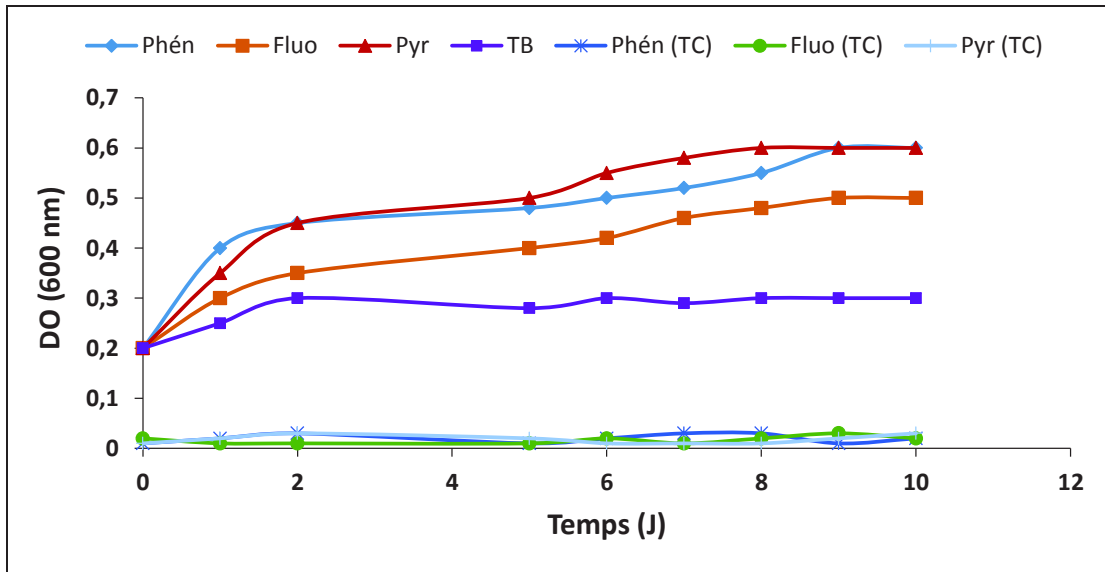


**Figure 65:** Taux de dégradation des *n*-alcanes par la souche CO100, en présence de 100 g/l NaCl, après 20 j d'incubation à 37 °C et 180 rpm.

#### IV.4.2. Etude des potentialités biodégradatives des HAPs par la souche CO100

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont présents dans de nombreux environnements salins (Fadherpure *et al.*, 2014). La recherche des nouvelles bactéries hydrocarbonoclastes qui supportent des concentrations élevées en sel afin d'éliminer ces composés toxiques de l'environnement, présente un intérêt très important dans la bioremédiation. Pour ce faire, une étude de la cinétique de croissance de la souche CO100 sur le phénanthrène (100 mg/l), le fluoranthène (100 mg/l), et le pyrène (100 mg/l), comme sources de carbone et d'énergie, en présence de 100 g/l de NaCl, à 37 °C et 180 rpm a été réalisée. Une comparaison par rapport à des témoins biologiques, ne contenant pas les différentes sources de carbones, et des témoins chimiques, ne contenant pas l'inoculum, ont été effectués. Les résultats obtenus montrent que la souche CO100 est capable de croître sur ces différents substrats (Fig. 66).





**Figure 66.** Suivi de la croissance de la souche CO100 par mesure de la DO à 600 nm sur le phénanthrène (100 mg/l), le fluoranthène (100 mg/l) et le pyrène (100 mg/l), en présence de 100 g/l NaCl, en l'absence de l'extrait de levure, à 37 °C et à 180 rpm.

(Phén: Phénanthrène; Fluo: Fluoranthène; Pyr: Pyrène; TB: Témoin biologique et TC: Témoin chimique).

L'isolement des microorganismes appartenant au genre *Staphylococcus* et doués de potentialités biodégradatives des hydrocarbures, à partir des environnements marins, a été étudié. Dans ce contexte, la souche str. MN-005 de *Staphylococcus* sp. isolée à partir de sédiments marins contaminés par des hydrocarbures, a montré un potentiel de dégrader le naphthalène (Zhuang *et al.*, 2003). De plus, des souches hydrocarbonoclastes de *Staphylococcus* ont été identifiées dans un consortium microbien, isolé à partir des zones côtières polluées par des hydrocarbures au Japon (Chaerun *et al.*, 2004).

Il a été rapporté que les fortes salinités constituent une barrière naturelle pour la dégradation des hydrocarbures (Bertrand *et al.*, 1993). En effet, l'application des technologies microbiennes pour traiter des environnements salins ou hypersalins, est limitée en raison des effets néfastes de la forte concentration en sel sur la vie microbienne, notamment l'intégrité de la membrane cellulaire, la dénaturation des enzymes, la faible solubilité de l'oxygène et la dessiccation (Fatherpure *et al.*, 2014). Néanmoins, la recherche des microorganismes halophiles ou halotolérants susceptibles de métaboliser les hydrocarbures, s'est significativement développée, pendant ces dernières décennies. Ces microorganismes développent différents mécanismes pour leur adaptation à la pression osmotique exercée par la salinité élevée du milieu (Singh *et al.*, 2017). Par conséquent, l'utilisation des organismes qui tolèrent des concentrations élevées en sel, dans la biorestauration d'environnements salins

sans dilution coûteuse du sol et de l'eau chargés en sel, pourrait être une alternative prometteuse dans la bioremédiation (Fatherpure *et al.*, 2014). Dans ce contexte, plusieurs microorganismes (bactéries, champignons et archées) ont été isolés à partir de différents environnements et ont montré une grande capacité à dégrader divers hydrocarbures, en présence des concentrations élevées en NaCl (Fatherpure *et al.*, 2014). Dans une étude antérieure au Laboratoire LBPE, Mnif *et al.* (2009), ont isolé une souche C2SS100 de *Halomonas* sp., à partir des eaux de production d'un champ pétrolier tunisien, qui était capable de dégrader le pétrole brut en présence de 100 g/l NaCl. Des études ont précédemment mis en évidence l'implication du genre *Staphylococcus* dans des processus de biodégradations des hydrocarbures (Zhuang *et al.*, 2003; Chaerun *et al.*, 2004; Eddouaouda *et al.*, 2012). Néanmoins, rares sont les travaux qui portent sur la dégradation de ces polluants en présence des concentrations élevées en NaCl par des souches *Staphylococcus*. Une concentration en NaCl de 15% a été tolérée par des souches de *Bacillus* et de *Staphylococcus* utilisées dans des fermentations en batch de 1 m<sup>3</sup> pour nettoyer des eaux usées industrielles contaminées par des hydrocarbures (Patzelt, 2005).

## V. Détection des gènes responsables de la biodégradation des HAPs

La recherche des gènes fonctionnels responsables de la dégradation des HAPs dans les souches pures FLU5, NAPH6, PYR2 et CO100, ainsi que dans certains échantillons d'eaux de mer et des sédiments contaminés par des hydrocarbures (PP01-13; PP04-15; CK01-16; CK04-16; PC09-15; PC07; Sed01-13; Sed04-15; Sed07-16 et Sed09-17), a été réalisée. Deux couples d'amorces PAH-RHD $\alpha$ -396F / PAH-RHD $\alpha$ -696R et NAPH-F / NAPH-R, ont été choisis pour l'amplification des gènes codant pour l'enzyme PAH-RHD $\alpha$  (Polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase) et l'enzyme Naphthalene dioxygenase, respectivement. En effet PAH-RHD $\alpha$  a été décrite comme une enzyme responsable de la biodégradation aérobie des HAPs chez les bactéries à Gram- et à Gram+ (Ding *et al.*, 2010, Wongwongsee *et al.*, 2013). De même, le gène de la naphthalène dioxygénase présente un intérêt particulier en tant que marqueur de la dégradation des HAPs (Powel *et al.*, 2010).

Les analyses des produits de PCR, en utilisant un bioanalyseur (Agilent 2100), montrent l'absence des amplifications. Ces résultats peuvent être expliqués, d'un part, par le fait que les bactéries hydrocarbonoclastes existantes dans ces échantillons ainsi les souches pures testées ne renferment pas les gènes codants pour ces enzymes. D'autre part, l'amplification de ces

gènes nécessitent, peut être, une optimisation des conditions opératoires de PCR (température d'hybridation, temps d'élongation, concentration des ADNs et des amorces...).

## VI. Conclusion

Les environnements marins contaminés par les hydrocarbures, y compris les zones portuaires, sont considérés comme des biotopes prometteurs pour isoler des microorganismes doués des potentialités biodégradatives intéressantes. Ainsi, quatre souches bactériennes aérobies: FLU5 de *Bacillus stratosphericus*, PYR2 de *Bacillus licheniformis*; NAPH6 de *Pseudomonas aeruginosa* et CO100 de *Staphylococcus* sp, ont été isolées à partir des échantillons marins contaminés par des hydrocarbures, provenant du port de pêche de Sfax.

Ces souches ont montré des capacités puissantes à dégrader une large gamme des hydrocarbures, en particulier des HAPs, des contaminants prioritaires des écosystèmes marins à cause de leur caractère récalcitrant et leur activité mutagène et/ou cancérigène. La biodégradation des hydrocarbures par ces souches isolées, a été réalisée dans un milieu de base MB, sans l'ajout d'un facteur de croissance, comme l'extrait de levure, en présence de 30 ou 100 g/l NaCl. La capacité de ces souches à métaboliser ces contaminants en présence des concentrations élevées en sel, pourraient ajouter des avantages pour ses utilisations en bioremédiation des environnements salins contaminés par des hydrocarbures, sans besoin de dilution coûteuse du sol ou de l'eau chargés en sel.

Une partie de ces travaux décrits, liée à la souche FLU5, a été valorisée par une publication internationale, intitulée « Biodegradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Bacillus stratosphericus* from Mediterranean seawater of the Sfax fishing harbour, Tunisia », dans la revue « *Environmental Sciences and Pollution Research* ». 23 (2016) 15088-15100.

Environ Sci Pollut Res (2016) 23:15088–15100  
DOI 10.1007/s11356-016-6648-7



RESEARCH ARTICLE

## **Biodegradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Bacillus stratosphericus* from Mediterranean seawater of the Sfax fishing harbour, Tunisia**

Dorra Hentati<sup>1</sup> · Alif Chebbi<sup>1</sup> · Slim Loukil<sup>1</sup> · Sonia Kchaou<sup>1</sup> · Jean-Jacques Godon<sup>2</sup> · Sami Sayadi<sup>1</sup> · Mohamed Chamkha<sup>1</sup>

Received: 18 January 2016 / Accepted: 5 April 2016 / Published online: 16 April 2016  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

---

# **Chapitre III**

## **Biosurfactants: Production, caractérisation & essais d'applications.**

---

## I. Introduction générale

Depuis plusieurs années, et grâce à l'essor de la biotechnologie, les scientifiques se sont intéressés à des surfactants produits par des microorganismes appelés tensioactifs biologiques ou biosurfactants. Ce sont des molécules composées d'un domaine hydrophile et d'un autre hydrophobe qui leur permettent d'exister de manière préférentielle à l'interface entre des milieux polaires et non polaires, ce qui réduit la tension superficielle de l'interface (Banat *et al.*, 2014b). Les biosurfactants possèdent les mêmes propriétés tensioactives que leurs homologues chimiques, mais ont l'avantage d'être biodégradables, non ou faiblement toxiques et sont également efficaces même à des températures, pH et salinités extrêmes (Banat *et al.*, 2014b). Les biosurfactants ont de nombreuses applications potentielles couvrant des domaines très variés tels que l'agroalimentaire, la cosmétique, la pharmaceutique, la médecine, l'agriculture, les détergents, la fabrication de textiles, le traitement des métaux, l'industrie pétrolière et la bioremédiation de sites contaminés par les hydrocarbures, grâce à leur capacité d'émulsification et de solubilisation, etc... (Santos *et al.*, 2016).

La source de carbone est un des paramètres le plus influent de la production des biotensioactifs. Ainsi, le succès de l'utilisation et de la production des biotensioactifs passe nécessairement par une diminution des coûts de production. Cette diminution pourra être atteinte grâce à la valorisation de substrats de croissance de produits à faible coût. Banat *et al.* (2014b), indiquent qu'il est possible d'utiliser des déchets et des co-produits agricoles, d'une part pour diminuer les coûts de production, et d'autre part pour réduire les quantités des déchets à traiter générés par diverses entreprises.

Dans de ce chapitre, notre étude a porté sur la production des biosurfactants par les souches bactériennes hydrocarbonoclastes isolées précédemment: FLU5 de *Bacillus stratosphericus*, NAPH6 de *Pseudomonas aeruginosa*, CO100 de *Staphylococcus* sp. et PYR2 de *Bacillus licheniformis*, en utilisant des substrats bon marché, la caractérisation de ces agents tensioactifs, ainsi que la réalisation de quelques essais d'application (Remobilisation des hydrocarbures, activité anti-biofilm, activité anti-adhésive, activité cicatrisante).

## II. Evaluation de la production des biosurfactants par les souches FLU5, NAPH6, CO100 et PYR2 sur différentes sources de carbone

La production des biosurfactants par les souches isolées FLU5, NAPH6, CO100 et PYR2 a été réalisée sur différents substrats, testés comme seules sources de carbone

et d'énergie, en utilisant le milieu de base (MB) et en présence de 30 g/l NaCl. Les cultures bactériennes ont été incubées à 37 °C et à 180 rpm et ont été suivies au cours du temps par mesure de la densité optique à 600 nm, pendant 10 jours. Vu la turbidité occasionnée par le milieu contenant le lait en poudre périmé (LPP) comme substrat, la méthode de dénombrement bactérien a été utilisée pour énumérer les colonies bactériennes, exprimée en CFU/ml. Pour mettre en évidence une éventuelle production de biosurfactants, la mesure de la tension de surface (TS) et le test de déplacement d'huile, ont été effectués au cours de la croissance des souches: FLU5 (Tableau 36), NAPH6 (Tableau 37), CO100 (Tableau 38) et PYR2 (Tableau 39), sur différentes sources de carbone.

Les résultats montrent que la croissance bactérienne des souches FLU5, NAPH6, CO100 et PYR2 se diffère selon la source de carbone utilisée. La souche FLU5 présente une croissance importante sur le bouillon nutritif (BN) ( $DO_{\max} = 2,27$ ), ainsi que sur les huiles végétales, l'huile d'olive ( $DO_{\max} = 1,93$ ), l'huile de friture résiduelle ( $DO_{\max} = 1,87$ ), et l'huile de maïs ( $DO_{\max} = 1,86$ ). La croissance diminue sur le glycérol, le pétrole brut, l'huile de moteur usée, l'huile de moteur et le mazout ( $DO_{\max}$  entre 0,45 et 0,81) (Tableau 36).

De même pour la souche NAPH6, une croissance importante sur le bouillon nutritif (BN) ( $DO_{\max} = 2,8$ ), ainsi que sur les huiles végétales: l'huile de friture résiduelle ( $DO_{\max} = 2,1$ ), l'huile de maïs ( $DO_{\max} = 1,94$ ) et l'huile d'olive ( $DO_{\max} = 1,88$ ), a été marquée. La croissance diminue ensuite sur le glycérol, le pétrole brut, et l'huile de moteur usée (de 0,87 à 0,53). Enfin, les  $DO_{\max}$  sont plus faibles, successivement, pour les substrats: mazout, hexadécane (C16), et huile de moteur ( $DO_{\max}$  entre 0,41 et 0,48) (Tableau 37).

La souche CO100 présente une croissance importante sur le milieu BN ( $DO_{\max} = 5,6$ ), la margine ( $DO_{\max} = 4,2$ ), l'huile de friture résiduelle ( $DO_{\max} = 2,1$ ) et la mélasse ( $DO_{\max} = 2,6$ ). Une croissance importante sur le lait en poudre périmé a été également montrée ( $CFU = 3,98 \cdot 10^7$ ). La croissance est plus faible, sur le lactosérum, l'huile de moteur usée et le glycérol ( $DO_{\max}$  de 0,9 à 1,79) (Tableau 38).

Pour la souche PYR2, nous constatons qu'elle présente une bonne croissance sur le milieu BN ( $DO_{\max} = 6$ ) et l'huile de friture résiduelle ( $DO_{\max} = 4,1$ ). Une croissance convenable est notée sur le glycérol, la mélasse et la margine ( $DO_{\max}$  de 1,16 à 2,3). Enfin, les  $DO_{\max}$  sont plus faibles, successivement, dans le cas des substrats: lactosérum ( $DO_{\max} = 0,5$ ) et huile de moteur usée ( $DO_{\max} = 1$ ) (Tableau 39).

**Tableau 36.** Evaluation de la production de biosurfactants par la souche FLU5 sur différentes sources de carbone, en présence de 30 g/l NaCl, à 37 °C et à 180 rpm, pendant 10 jours.

Sources de carbone	DO <sub>max</sub> (600 nm)	TS <sub>i</sub> (mN/m)	TS <sub>f</sub> (mN/m)	RTS (mN/m)	TDH (cm)	Quantité (g/l)
Bouillon nutritif (BN)	2,27 ± 0,18 <sup>a</sup> (2 j)	68 ± 2	35 ± 0,6 <sup>a</sup>	33 ± 2,5 <sup>a</sup>	7,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,4 ± 0,1 <sup>a</sup>
Huile d'olive (1%, v/v)	1,93 ± 0,24 <sup>a</sup> (2 j)	63 ± 0,7 <sup>b</sup>	34 ± 0,7 <sup>a</sup>	29 ± 0,1 <sup>a</sup>	8,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,1 <sup>a</sup>
Huile de maïs (1%, v/v)	1,86 ± 0,22 <sup>a</sup> (2 j)	63 ± 0,7 <sup>b</sup>	35 ± 1,2 <sup>a</sup>	28 ± 1,9 <sup>a</sup>	8,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>
Huile de friture résiduelle (1%, v/v)	1,87 ± 0,21 <sup>a</sup> (4 j)	64 ± 0,9 <sup>b</sup>	36 ± 1,3 <sup>a</sup>	28 ± 0,9 <sup>a</sup>	8,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	1,9 ± 0,1 <sup>a</sup>
Glycérol (1%, v/v)	0,81 ± 0,16 <sup>c</sup> (2 j)	65 ± 0,7 <sup>d</sup>	45 ± 1,4 <sup>a</sup>	20 ± 1,4 <sup>a</sup>	4 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,3 ± 0,1 <sup>d</sup>
Pétrole brut (1%, v/v)	0,71 ± 0,07 <sup>d</sup> (6 j)	58 ± 0,9 <sup>a</sup>	40 ± 2 <sup>a</sup>	18 ± 1,6 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,23 ± 0,02
Huile de moteur (1%, v/v)	0,51 ± 0,08 (4 j)	60 ± 0,9 <sup>a</sup>	42 ± 0,8 <sup>a</sup>	18 ± 0,5 <sup>a</sup>	4 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,15 ± 0,01
Mazout (1%, v/v)	0,45 ± 0,07 (4 j)	59 ± 1,3 <sup>a</sup>	46 ± 0,7 <sup>a</sup>	13 ± 2 <sup>d</sup>	4,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,13 ± 0,02
Huile de moteur usée (1%, v/v)	0,55 ± 0,04 (5 j)	59 ± 1,3 <sup>a</sup>	46 ± 1,1 <sup>a</sup>	13 ± 2,1 <sup>d</sup>	4,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,12 ± 0,13
Témoin biologique	0,12 ± 0,03 (2 j)	70 ± 2	63 ± 1,3	7 ± 1,3	0,6 ± 0,1	0

**DO<sub>max</sub> (600 nm):** Densité Optique maximale à 600 nm; **TS:** Tension de Surface; **TS<sub>i</sub>:** Tension de Surface initiale; **TS<sub>f</sub>:** Tension de surface finale; **RTS:** Réduction de la Tension de Surface; **TDH:** Test de déplacement d'huile, en mesurant le diamètre d'halo formé (cm) suite au déplacement de la couche de pétrole.

**Tableau 37.** Evaluation de la production de biosurfactant par la souche NAP6 sur différentes sources de carbone, en présence de 30 g/l NaCl, à 37 °C et à 180 rpm, pendant 10 jours.

Sources de carbone	DO <sub>max</sub> (600 nm)	TS <sub>i</sub> (mN/m)	TS <sub>f</sub> (mN/m)	RTS (mN/m)	TDH (cm)
Bouillon nutritif (BN)	2,8 ± 0,2 <sup>a</sup> (2 j)	67 ± 2	30 ± 1 <sup>a</sup>	37 ± 2 <sup>a</sup>	8,7 ± 0,05 <sup>a</sup>
Huile d'olive (1%, v/v)	1,88 ± 0,2 <sup>a</sup> (2 j)	65 ± 0,66	31 ± 1,33 <sup>a</sup>	34 ± 2 <sup>a</sup>	8,7 ± 0,06 <sup>a</sup>
Huile de friture résiduelle (1%, v/v)	2,1 ± 0,13 <sup>a</sup> (2 j)	63 ± 0,71 <sup>d</sup>	31 ± 1,66 <sup>a</sup>	32 ± 1,24 <sup>a</sup>	8,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
Huile de maïs (1%, v/v)	1,94 ± 0,1 <sup>a</sup> (2 j)	62 ± 0,66 <sup>d</sup>	31 ± 1,53 <sup>a</sup>	31 ± 0,86 <sup>a</sup>	8,7 ± 0,04 <sup>a</sup>
Huile de moteur usée (1%, v/v)	0,53 ± 0,04 <sup>d</sup> (4 j)	58 ± 1 <sup>c</sup>	41 ± 1,33 <sup>a</sup>	17 ± 0,66 <sup>a</sup>	5,2 ± 0,2 <sup>a</sup>
Pétrole brut (1%, v/v)	0,74 ± 0,05 <sup>b</sup> (4 j)	58 ± 0,33 <sup>c</sup>	43 ± 0,53 <sup>a</sup>	15 ± 0,86 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,13 <sup>a</sup>
Mazout (1%, v/v)	0,48 ± 0,02 (3 j)	60 ± 0,68 <sup>d</sup>	46 ± 1,33 <sup>a</sup>	14 ± 2,12 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,06 <sup>a</sup>
Hexadécane (C16) (1%, v/v)	0,43 ± 0,01 (3 j)	62 ± 1,31 <sup>d</sup>	49 ± 0,68 <sup>a</sup>	13 ± 0,66 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,06 <sup>a</sup>
Huile de moteur (1%, v/v)	0,41 ± 0,02 (5 j)	62 ± 0,66 <sup>d</sup>	51 ± 0,73 <sup>a</sup>	11 ± 0,71 <sup>c</sup>	2,4 ± 0,2 <sup>a</sup>
Glycérol (1%, v/v)	0,87 ± 0,04 <sup>a</sup> (2 j)	65 ± 0,62	55 ± 1,6 <sup>a</sup>	10 ± 1,02 <sup>c</sup>	2,3 ± 0,2 <sup>a</sup>
Témoin biologique	0,23 ± 0,05 (2 j)	70 ± 0,62	65 ± 0,66	5 ± 1,28	1 ± 0,2

**DO<sub>max</sub> (600 nm):** Densité Optique maximale à 600 nm; **TS:** Tension de Surface; **TS<sub>i</sub>:** Tension de Surface initiale; **TS<sub>f</sub>:** Tension de surface finale; **RTS:** Réduction de la Tension de Surface; **TDH:** Test de déplacement d'huile, en mesurant le diamètre d'halo formé (cm) suite au déplacement de la couche de pétrole.



**Tableau 38.** Evaluation de la production de biosurfactants par la souche CO100 sur différentes sources de carbone, en présence de 30 g/l NaCl, à 37 °C et à 180 rpm, pendant 10 jours.

Sources de carbone	DO <sub>max</sub> (600 nm)	TS <sub>i</sub> (mN/m)	TS <sub>f</sub> (mN/m)	RTS (mN/m)	TDH (cm)
Huile de friture résiduelle (1%, v/v)	2,1 ± 0,2 <sup>a</sup> (6 j)	64 ± 1,4	30 ± 1,2 <sup>a</sup>	34 ± 1,3 <sup>a</sup>	8,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
Bouillon nutritif (BN)	5,6 ± 0,2 <sup>a</sup> (3 j)	67 ± 0,7	36 ± 1,5 <sup>a</sup>	31 ± 0,9 <sup>a</sup>	6 ± 0,1 <sup>a</sup>
Lait en poudre périmé (CFU/ml) (20 g/l)	3,98 10 <sup>7</sup> ± 0,1 <sup>a</sup> (5 j)	58 ± 1,1 <sup>c</sup>	31 ± 1,5 <sup>a</sup>	27 ± 2,1 <sup>a</sup>	8,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
Mélasses (20 g/l)	2,6 ± 0,3 <sup>a</sup> (2 j)	65 ± 2,3	45,6 ± 0,9 <sup>a</sup>	19,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	2,5 ± 0,1 <sup>a</sup>
Huile de moteur usée (1%, v/v)	1,05 ± 0,09 <sup>c</sup> (1 j)	59 ± 1,5 <sup>d</sup>	45,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	13,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	3,6 ± 0,2 <sup>a</sup>
Glycérol (1%, v/v)	1,8 ± 0,1 <sup>a</sup> (2 j)	64,5 ± 0,7	51,5 ± 0,5 <sup>a</sup>	13 ± 1 <sup>a</sup>	2 ± 0,1 <sup>a</sup>
Margine (2%, v/v)	4,2 ± 0,2 <sup>a</sup> (3 j)	59,7 ± 0,2 <sup>d</sup>	48,8 ± 1,7 <sup>a</sup>	10,9 ± 0,9 <sup>c</sup>	1,6 ± 0,1 <sup>a</sup>
Lactosérum (2%, v/v)	0,9 ± 0,05 <sup>d</sup> (4 j)	60,5 ± 2,2 <sup>c</sup>	52 ± 1,3 <sup>a</sup>	8,5 ± 1,8 <sup>d</sup>	1 ± 0,1 <sup>a</sup>
Témoin biologique: DO	0,21 ± 0,04 (3 j)	67,8 ± 1,3	60,3 ± 1,7	7,5 ± 0,6	0,3 ± 0,1
CFU/ml	6,1 10 <sup>2</sup> ± 0,14 (3 j)				

**DO<sub>max</sub> (600 nm):** Densité Optique maximale à 600 nm; **TS:** Tension de Surface; **TS<sub>i</sub>:** Tension de Surface initiale; **TS<sub>f</sub>:** Tension de surface finale; **RTS:** Réduction de la Tension de Surface; **TDH:** Test de déplacement d'huile, en mesurant le diamètre d'halo formé (cm) suite au déplacement de la couche de pétrole.

**Tableau 39.** Evaluation de la production de biosurfactants par la souche PYR2 sur différentes sources de carbone, en présence de 30 g/l NaCl, à 37 °C et à 180 rpm, pendant 10 jours.

Sources de carbone	DO <sub>max</sub> (600 nm)	TS <sub>i</sub> (mN/m)	TS <sub>f</sub> (mN/m)	RTS (mN/m)	TDH (cm)
Bouillon nutritif (BN)	6 ± 0,2 <sup>a</sup> (5 j)	66,5 ± 1,2	27,4 ± 1,33 <sup>a</sup>	39,1 ± 1,2 <sup>a</sup>	8,5 ± 0,1 <sup>a</sup>
Huile de friture résiduelle (HFR) (1%, v/v)	4,1 ± 0,05 <sup>a</sup> (7 j)	64 ± 2,3	46,1 ± 0,5 <sup>a</sup>	17,9 ± 2 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,1 <sup>a</sup>
Glycérol (1%, v/v)	2,3 ± 0,2 <sup>a</sup> (2 j)	65 ± 0,8	51,7 ± 0,9 <sup>a</sup>	13,3 ± 0,9 <sup>a</sup>	2 ± 0,1 <sup>a</sup>
Lait en poudre périmé (LPP) (CFU/ml) (20 g/l)	2,87 10 <sup>6</sup> ± 0,24 <sup>a</sup> (4 j)	60 ± 0,7 <sup>d</sup>	47,3 ± 1,2 <sup>a</sup>	12,7 ± 1,0 <sup>a</sup>	3 ± 0,1 <sup>a</sup>
Mélasses (20 g/l)	2,3 ± 0,1 <sup>a</sup> (2 j)	66 ± 1,1	55,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	10,6 ± 0,7 <sup>c</sup>	1,5 ± 0,2 <sup>a</sup>
Lactosérum (2%, v/v)	1,2 ± 0,2 <sup>a</sup> (j 2)	60,5 ± 0,9 <sup>d</sup>	50,2 ± 1,8 <sup>a</sup>	10,3 ± 1,2 <sup>c</sup>	1,3 ± 0,1 <sup>a</sup>
Margine (2%, v/v)	0,5 ± 0,04 <sup>a</sup> (2 j)	61 ± 0,4 <sup>d</sup>	51,7 ± 0,9 <sup>a</sup>	9,3 ± 1,8 <sup>c</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>a</sup>
Huile de moteur usée (HMU) (1%, v/v)	1 ± 0,3 <sup>a</sup> (j 3)	60,2 ± 0,7 <sup>d</sup>	51,4 ± 0,7 <sup>a</sup>	8,8 ± 0,3 <sup>d</sup>	1,5 ± 0,1 <sup>a</sup>
Témoin biologique : DO	0,24 ± 0,03 (2 j)	68,9 ± 1,3	62,5 ± 0,8	6,4 ± 1,1	0,2 ± 0,1
CFU/ml	4,3 10 <sup>2</sup> ± 0,33 (2 j)				

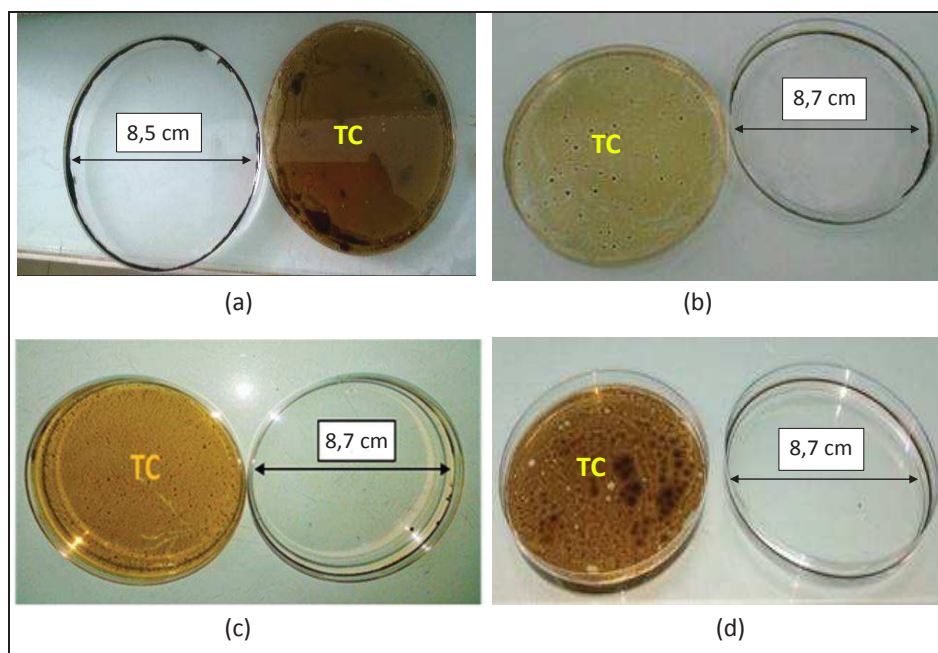
**DO<sub>max</sub> (600 nm):** Densité Optique maximale à 600 nm; **TS:** Tension de Surface; **TS<sub>i</sub>:** Tension de Surface initiale; **TS<sub>f</sub>:** Tension de surface finale; **RTS:** Réduction de la Tension de Surface; **TDH:** Test de déplacement d'huile, en mesurant le diamètre d'halo formé (cm) suite au déplacement de la couche de pétrole.

Les données ont été analysées en utilisant une analyse de variance ANOVA; <sup>a, b, c, d</sup>: les différentes lettres au niveau de la même colonne sont statistiquement différents (p < 0,05).

Pour mettre en évidence la production de biosurfactants, la réduction de la tension de surface (TS) est utilisée comme premier critère (Mnif *et al.*, 2011). Dans le cas de la souche FLU5, les mesures de la tension de surface (TS) montrent une réduction importante pour les cultures contenant le bouillon nutritif (BN), l'huile d'olive, l'huile de maïs et l'huile de friture résiduelle (RTS varie entre 28 et 33 mN/m) (Tableau 36). De même pour la souche NAPH6, une diminution importante de la tension de surface a été marquée en présence des huiles végétales (huile d'olive, huile de maïs et huile de friture résiduelle) (RTS varie entre 31 et 34 mN/m) (Tableau 37). La réduction de la TS est plus faible en présence de pétrole brut, du mazout, de l'hexadécane, de l'huile de moteur, de l'huile de moteur usée, et du glycérol pour les deux souches FLU5 (RTS entre 13 et 20 mN/m) et NAPH6 (RTS entre 10 et 17 mN/m).

Les mesures de la TS pour la souche CO100 montrent une réduction très importante pour les cultures contenant l'huile de friture résiduelle (34 mN/m), le milieu riche BN (31 mN/m) et le lait en poudre périmé (27 mN/m) (Tableau 38). Pour la souche PYR2, les résultats montrent que la réduction de la TS est meilleure en présence du milieu de culture riche BN (39,1 mN/m) (Tableau 39). La réduction de la TS est plus faible en présence du lactosérum, de la margine, de l'huile de moteur usée, la mélasse, et du glycérol pour les deux souches CO100 (RTS entre 8,5 et 19,4 mN/m) et PYR2 (RTS entre 8,8 et 13,3 mN/m).

Le test de déplacement d'huile est un test utilisé également pour montrer la sécrétion de biosurfactants par les souches étudiées (Sriram *et al.*, 2011). Dans le cas de la souche FLU5, la formation d'un halo est remarquable pour les cultures contenant l'huile d'olive (8,7 cm), l'huile de maïs (8,7 cm), l'huile de friture résiduelle (8,5 cm) (Fig. 67a) et sur le bouillon nutritif (NB) (7,2 cm) (Tableau 36). Pour le reste des substrats, le halo formé est compris entre 3,5 et 4,5 cm (Tableau 36). Pour la souche NAPH6, le déplacement de la couche de pétrole entraîne la formation d'un halo de diamètre 8,7 cm dans le cas des cultures sur l'huile d'olive, l'huile de maïs et l'huile de friture résiduelle (Tableau 37, Fig 67b). Pour les autres substrats le diamètre de la zone claire varie entre 2,3 et 5,2 cm (Tableau 37). Concernant la souche CO100, nous remarquons la formation d'un halo suite au déplacement de la couche de pétrole de diamètre 8,7 cm dans le cas de l'huile de friture résiduelle et du lait en poudre périmé (Tableau 38; Fig. 67c). Le diamètre d'halo varie entre 1 et 6 cm pour le reste des sources de carbone. Dans le cas de la souche PYR2, la formation d'un halo est remarquable dans le cas de la culture sur le bouillon nutritif (BN), avec un diamètre de l'ordre de 8,7 cm (Fig. 67d). Pour le reste des substrats, le halo formé est compris entre 1,3 et 4,5 cm (Tableau 39). Nous remarquons bien que ces résultats de test de déplacement d'huile sont en concordance avec les résultats de la tension de surface.



**Figure 67:** Test de déplacement d'huile réalisé avec les surnageants de: la culture FLU5 sur l'huile de friture résiduelle, après 3 jours (a), de la culture NAPH6 sur l'huile de friture résiduelle, après 2 jours (b), de la culture CO100 sur le lait en poudre périmé, après 2 jours (c) et de la culture PYR2 sur le milieu BN, après 4 jours (d). TC : Témoin chimique.

La réduction de la tension de surface ainsi que le déplacement de la couche de pétrole pourraient être expliqués par la synthèse, par les souches marines FLU5, NAPH6, CO100 et PYR2, des agents tensioactifs ou des biosurfactants.

Les biosurfactants présentent les avantages de biodégradabilité, de faible degré de toxicité, et d'utilisation dans diverses applications. Cependant, leurs coûts élevés de production soulignent la nécessité d'optimiser le processus de production pour permettre une éventuelle application à l'échelle industrielle (Banat *et al.*, 2014b).

Les biosurfactants peuvent être produits sur des ressources agricoles et de déchets renouvelables qui peuvent diminuer de façon significative le coût de production (Makkar *et al.*, 2011). Le substrat peut représenter jusqu'à 50% des coûts de production totaux d'où l'importance du choix des sources de carbone alternatives peu coûteuses (De Almeida *et al.*, 2016). Cette dernière caractéristique rend possible la production à bon marché de biosurfactants et permet d'utiliser des déchets comme substrats et de réduire ainsi leur effet polluant en même temps (Banat *et al.*, 2014b). Des substrats alternatifs de faible coût ont été suggérés pour la production économique de biosurfactants (Santos *et al.*, 2016). Parmi les substrats alternatifs proposés, l'huile de friture résiduelle, en raison de sa composition, de sa disponibilité facile et de ses avantages économiques, pourrait être utilisée comme un substrat bon marché pour la production de biosurfactants. Une quantité importante des huiles et des

graisses est utilisée dans la plupart des industries alimentaires, ce qui entraîne la production d'une grande masse d'huiles résiduelles (Haba *et al.*, 2000). L'élimination de ces déchets est à l'origine des grands problèmes, ce qui explique l'intérêt de l'utilisation des huiles de friture résiduelles pour la transformation bactérienne (Hasanizadeh *et al.*, 2017). Ces huiles pourraient être également utilisées, de manière rentable, dans des applications biotechnologiques qui concernent l'industrie pétrolière, avec des spécifications minimales de pureté des produits ou métabolites issus des microorganismes, pour la restauration des sites contaminés par les hydrocarbures et dans la récupération du pétrole brut (Sadouk *et al.*, 2008).

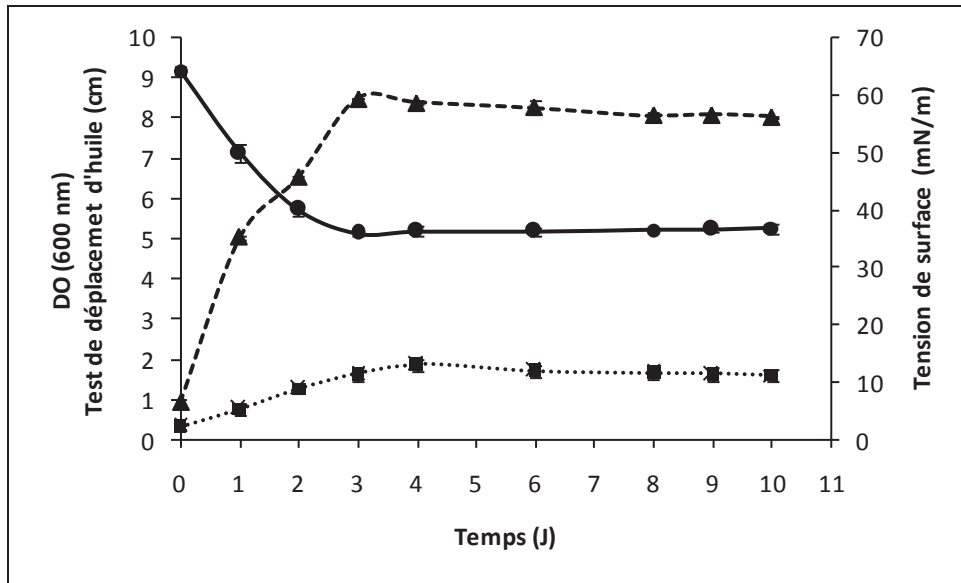
De même, dans le cadre de la valorisation des déchets de l'industrie laitière et les produits invendus ou périmés, le lait en poudre périmé peut être utilisé comme étant une bonne source de carbone en raison de sa composition riche en protéines, glucides..., et de son faible coût (Charpiot, 2012).

A la lumière des résultats obtenus, les souches FLU5, NAPH6 et CO100, ont montré leur capacité intéressante de produire des agents tensioactifs, en utilisant l'huile de friture résiduelle comme source de carbone. La souche CO100 montre aussi son aptitude à utiliser le lait en poudre périmé comme substrat alternatif pour produire des biosurfactants. Par ailleurs, la souche PYR2 a montré une production importante des biosurfactants sur le bouillon nutritif (BN).

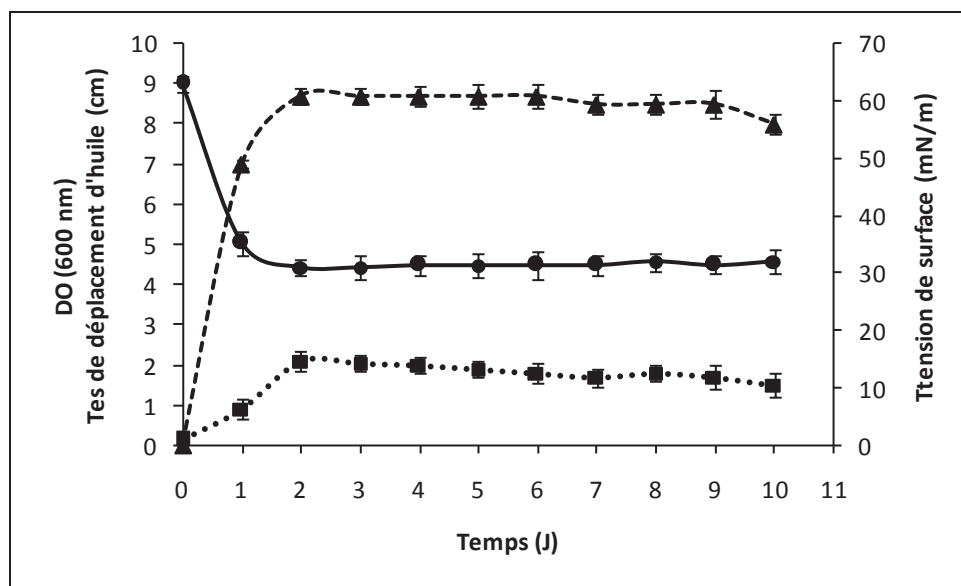
Dans la suite de ce travail, nous allons suivre la production des biosurfactants en utilisant l'huile de friture résiduelle pour les souches FLU5, NAPH6 et CO100, le lait en poudre périmé pour la souche CO100 et le bouillon nutritif (BN) pour la souche PYR2.

### **III. Production des biosurfactants par les souches sélectionnées**

La récupération des biosurfactants bruts produits par les deux souches FLU5 et NAPH6, en présence de l'huile de friture résiduelle (1%, v/v), a été réalisée après 3 j d'incubation à 37 °C pour FLU5, avec une réduction de la tension de surface de 64 à 36 mN/m (Fig. 68), et après 2 j d'incubation à 37 °C pour NAPH6, avec une diminution de la tension de surface de 63 à 31 mN/m (Fig. 69). La tension de surface reste stable pendant la phase stationnaire dans le cas de deux souches. L'essai de déplacement a montré également la formation d'un halo de diamètre important (8,7 cm) pour les deux souches. La quantité de biosurfactants bruts, récupérée est de l'ordre de 1,88 g/l pour la souche FLU5 et de 2 g/l pour la souche NAPH6.

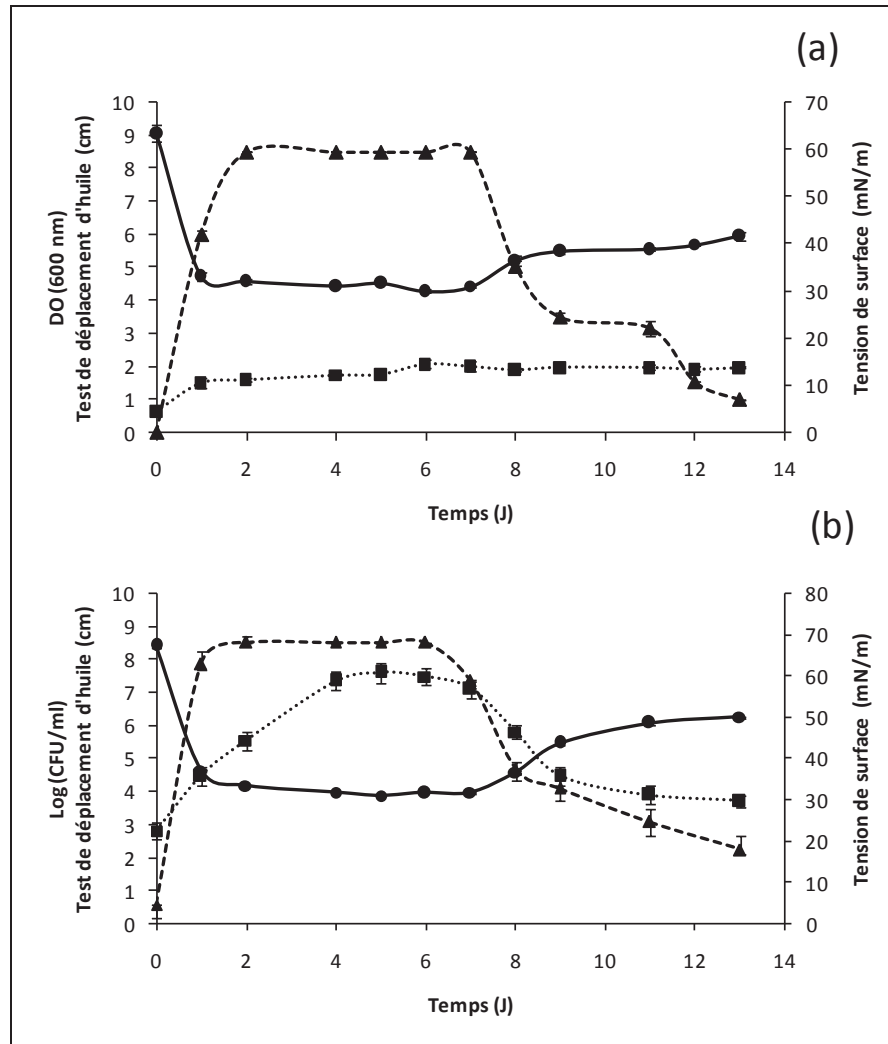


**Figure 68.** Evaluation de la croissance (DO à 600 nm) (■), de la tension de surface (●) et du déplacement d'huile (▲) suite à des cultures de la souche FLU5 sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v), à 37 °C et 180 rpm.



**Figure 69.** Evaluation de la croissance (DO à 600 nm) (■), de la tension de surface (●) et du déplacement d'huile (▲) suite à des cultures de la souche NAPH6 sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v), à 37 °C et 180 rpm.

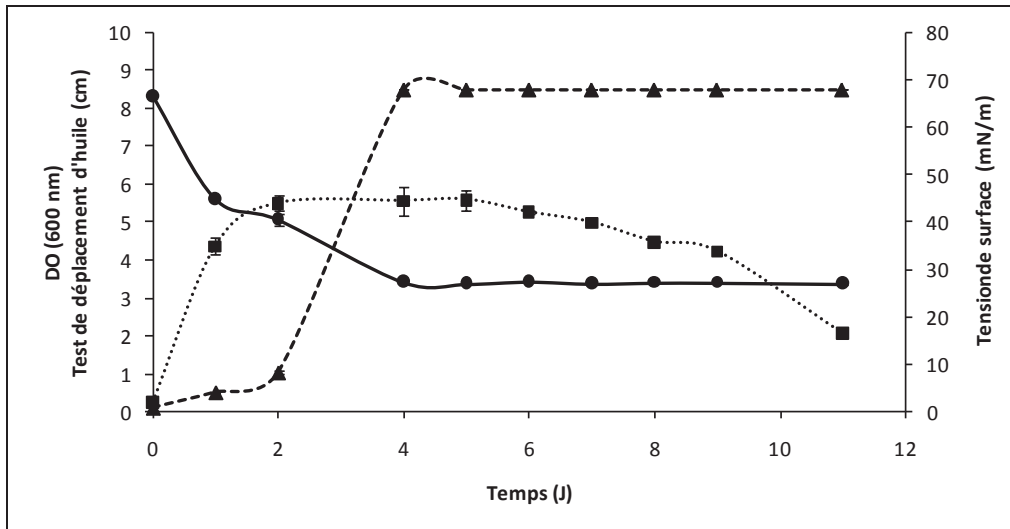
La récupération des biosurfactants produits par la souche CO100 sur l'huile de friture résiduelle et sur le lait en poudre périmé a été réalisée après 2 jours d'incubation, à 37 °C. La tension de surface est réduite à 32 mN/m et à 33 mN/m, sur l'huile de friture résiduelle (Fig.70a) et sur le lait en poudre périmé, respectivement (Fig. 70b). Le diamètre d'halo formé lors du test de déplacement d'huile est de l'ordre de 8,7 cm pour les deux substrats utilisés (Fig. 70). La quantité des biosurfactants bruts récupérée est de l'ordre de 0,5 g/l dans le cas du lait en poudre périmé et de 1,5 g/l dans le cas de l'huile de friture résiduelle.



**Figure 70.** Evaluation de la croissance (DO à 600 nm; log (CFU/ml)) (■), de la tension de surface (●) et du déplacement d'huile (▲) suite à des cultures de la souche CO100 sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v) (a) et sur le lait en poudre périmé (20 g/l) (b), à 37 °C et 180 rpm.

Nous remarquons que la tension de surface diminue fortement après deux jours d'incubation, se stabilise, puis elle s'augmente à partir du 8<sup>ème</sup> jour, et ceci en présence de deux substrats utilisés (huile de friture résiduelle et lait en poudre périmé) (Fig. 70). Une nette corrélation inverse existe avec le test de déplacement d'huile. La raison de cette augmentation de la tension de surface, pourrait être due à la dégradation des biosurfactants dans les milieux de culture ou à l'utilisation des biosurfactants comme substrat pour la survie cellulaire (Patowary *et al.*, 2017).

La récupération des biosurfactants produits par la souche PYR2 sur le bouillon nutritif a été réalisée après 4 jours d'incubation, à 37 °C. La tension de surface est réduite de 67 à 27,4 mN/m (Fig. 71). Le diamètre d'halo formé lors du test de déplacement d'huile est de l'ordre de 8,7 cm (Fig. 71). La quantité des biosurfactants bruts récupérée est de l'ordre de 1,8 g/l.



**Figure 71.** Evaluation de la croissance (DO à 600 nm) (■), de la tension de surface (●) et du déplacement d'huile (▲) suite à des cultures de la souche PYR2 sur le bouillon nutritif (BN), à 37 °C et 180 rpm.

Il a été mentionné que les substrats hydrophobes, y compris les hydrocarbures et les huiles végétales, pouvaient induire la synthèse de surfactants biologiques (Vijaya *et al.*, 2013). La production des biosurfactants en utilisant les huiles de friture résiduelles, fait l'objet d'une attention considérable au cours des dernières années (Hasanizadeh *et al.*, 2017). Dans ce contexte, Haba *et al.* (2008), ont rapporté l'aptitude de la souche D de *Pseudomonas aeruginosa*, à produire 1,4 g/l des rhamnolipides à partir des huiles de friture usagées. Une autre souche 47T2 de *Pseudomonas aeruginosa* a été décrite pour son potentiel à synthétiser 2,26 g/l des rhamnolipides, en utilisant l'huile de noix de coco usagée, comme substrat (George *et al.*, 2013). La production des glycolipides par la souche bactérienne 16 LM. USTHB de *Rhodococcus erythropolis*, en utilisant l'huile de friture résiduelle comme source de carbone, a été également, rapportée (Sadouk *et al.*, 2008). En outre, la souche CCT 2487 de *Bacillus pumilus* a montré un potentiel important à produire des biosurfactants, à partir des huiles de friture résiduelles (Juliana Guerra *et Crispinhumberto*, 2013). Récemment, la souche SdK644 de *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* a été décrite pour sa capacité à produire des biosurfactants de l'ordre de 4,93 g/l, à partir des huiles de friture résiduelles (Zenati *et al.*, 2018). Par ailleurs, une concentration de biosurfactant de nature lipopeptidique de l'ordre de 2,1 g/l, a été rapportée pour la souche 1E de *Staphylococcus sp.*, cultivée sur un milieu LB contenant de l'huile d'olive (Eddouaouda *et al.*, 2012). Une étude récente par Chebbi *et al.*, 2018, a montré la capacité de la souche SH6 de *Staphylococcus capitis*, à produire des lipopeptides, avec des quantités de l'ordre de 50 mg/l et 100 mg/l, en utilisant des huiles de moteur usées et du pétrole brut, comme sources de carbone, respectivement.



Ces recherches, mettent en relief, les potentialités intéressantes des souches isolées FLU5, NAPH6 et CO100, à produire des biosurfactants. Toutefois, l'optimisation des milieux de culture afin d'améliorer le rendement de production de ces agents tensioactifs, est envisagée.

Le bouillon nutritif (BN) utilisé comme milieu de culture pour la production des agents tensioactifs par la souche PYR2, est un milieu riche contenant de l'extrait de levure et de la peptone. Ceci pourrait expliquer la production importante des biosurfactants par la souche PYR2. Une recherche récente a rapporté que la production des biosurfactants par les souches *Pseudomonas poae* BA1, *Acinetobacter bouvetii* BP18, *Bacillus thuringiensis* BG3 et *Stenotrophomonas rhizophila* BG32 en présence du milieu riche BN, était plus importante par rapport au milieu minimum (Bushnell-Haas broth (BHB)), contenant des hydrocarbures comme source de carbone (Ali khan *et al.*, 2017). Néanmoins, la recherche d'une source de carbone alternative et moins chère, pour la production des agents tensioactifs par la souche PYR2 est envisagée, dans le but de réduire le coût de production de ces biomolécules.

#### **IV. Identifications de biosurfactants produits par les souches étudiées**

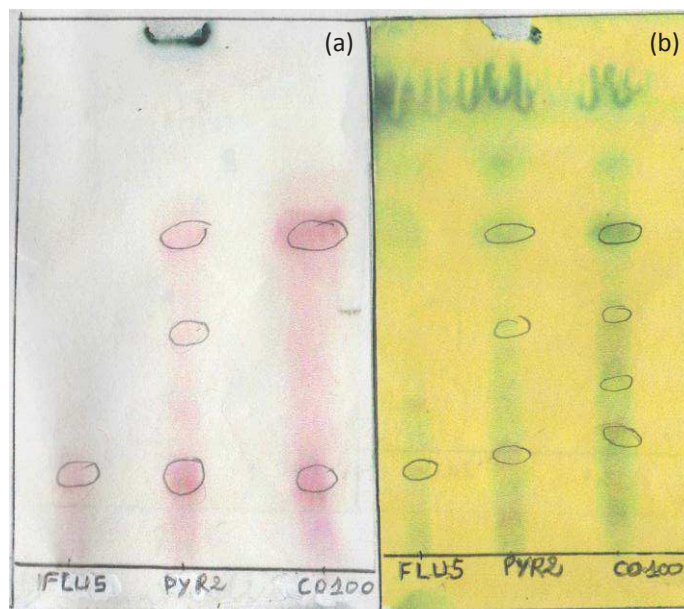
Les biosurfactants bruts BS-FLU5, BS-CO100 et BS-PYR2, produits sur le bouillon nutritif (BN) ont été purifiés et identifiés en utilisant les spectroscopies de masse ESI et MALDI-TOF MS/MS. L'identification de biosurfactant brut produit par la souche NAPH6, a été réalisée par la spectroscopie infrarouge FTIR.

Les huiles végétales, y inclus les huiles de friture résiduelles, sont généralement constitués d'un mélange de molécules hydrophobes (corps gras, lipides...). Pour identifier avec une bonne efficacité, la nature des biosurfactants, il vaut mieux travailler avec la source de carbone la plus pure possible. Les composés hydrophobes, peuvent être piégés lors des procédures d'extraction des biosurfactants, diminuant ainsi l'efficacité de purification. Selon les résultats antérieurs, les souches FLU5, CO100 et PYR2, ont montré des potentialités intéressantes à produire des biosurfactant sur le bouillon nutritif BN, un milieu de culture composés des nutriments (peptone, extrait de levure et glucose) solubles dans l'eau. Par ailleurs, les quantités des tensioactifs produits par les souches étudiés, sont relativement considérables. C'est pour ces raisons, que le bouillon nutritif, a été choisi, comme un substrat convenable, pour faire la production des biosurfactants à purifier et à identifier.

Dans un premier temps, les biosurfactants bruts BS-FLU5, BS-CO100 et BS-PYR2, ont été caractérisés par chromatographie sur couche mince (CCM). La pulvérisation de la plaque en utilisant une solution de ninhydrine, a révélé la présence des tâches de couleur rose, ce qui



prouve la présence des groupements amines dans les différents biosurfactants étudiés (Fig. 72a). De plus, des tâches de couleur bleu-verte, ont été aussi révélées après pulvérisation de la plaque par une solution d'acide phosphomolybdique, ce qui montre la présence des composés des acides gras dans les trois biosurfactants (Fig. 72b). Ces résultats sont en faveur donc de la nature lipopeptidique des biosurfactants BS-FLU5, BS-CO100 et BS-PYR2.



**Figure 72.** Chromatographie sur couche mince (CCM), sur des plaques de gel de silice 60 G des biosurfactants bruts BS-FLU5, BS-PYR2 et BS-CO100. Révélation par une solution de ninhydrine (a) et par une solution d'acide phosphomolybdique (b).

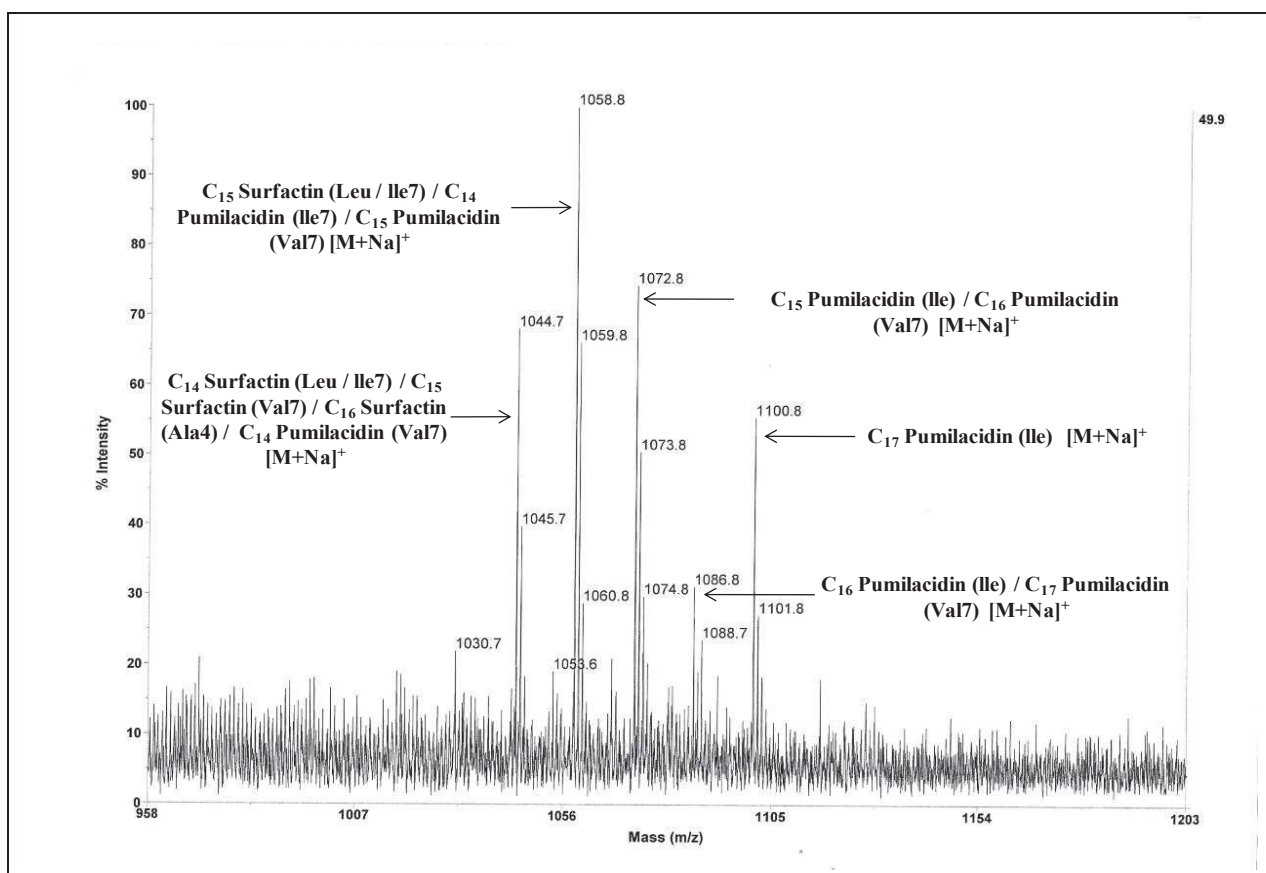
#### IV.1. Purification de BS-FLU5, BS-CO100 et BS-PYR2

Les extraits tensioactifs produits par chacune des souches FLU5, PYR2 et CO100 étant susceptibles de contenir plusieurs molécules, leur séparation a été entreprise par fractionnement à l'aide d'une colonne de gel de silice (60). De nombreuses fractions de 1 ml ont été recueillies: 38 fractions pour BS-FLU5, 20 fractions pour BS-PYR2 et 25 fractions pour BS-CO100. Chacune de ces fractions ont été soumises par la suite, à une analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) afin de rassembler les fractions qui ont le même aspect, après révélation par une lampe UV, par une solution de ninhydrine et par une solution d'acide phosphomolybdique. Seules les fractions montrant la présence de groupements amines, des acides gras et l'aptitude à réduire la tension de surface ont été retenues. Pour le biosurfactant BS-FLU5, dix sous-fractions, ayant des polarités différentes ont été obtenues mais seulement une sous-fraction capable de diminuer la tension de surface de l'eau de 72 mN/m à 27 mN/m a été choisie pour être analysée. Pour le biosurfactant BS-PYR2, une seule sous-fraction parmi six a été sélectionnée pour être analysée, pour la raison de sa capacité à

réduire la tension de surface de 72 mN/m à 26,5 mN/m. Concernant le biosurfactant BS-CO100, huit sous-fractions ont été collectées mais seulement deux sous-fractions capables de diminuer la tension de surface de l'eau de 72 mN/m à 28 mN/m, ont été retenues. Ces sous-fractions ont été par la suite analysées par les spectrométries de masse ESI et MALDI-TOF MS/MS, afin d'identifier leurs structures chimiques.

#### IV.2. Identification des biosurfactants produits par la souche FLU5 de *Bacillus stratosphericus*

Le spectre de masse ESI des biosurfactants purifiés produits par la souche FLU5 (Fig. 73), montre la présence des pics avec des valeurs m/z comprises entre 1044 et 1100 Da, définis comme étant membres de la famille des lipopeptides (Pecci *et al.*, 2010).



**Figure 73.** Spectre de masse ESI des lipopeptides purifiés produits par la souche *Bacillus stratosphericus* FLU5.

En comparant ces masses avec des masses rapportées dans la littérature, ce groupe de pics pourrait être attribué à des lipopeptides et en particulier à des isomères de la surfactine et de la pumulacidine (Pecci *et al.*, 2010; Ben Ayed *et al.*, 2015; Jemil *et al.*, 2017). Le spectre de masse rapporté dans la figure 73 révèle la présence de cinq grands pics  $[M + Na]^+$ , à m/z 1044,7; 1058,8; 1072,8; 1086,8 et 1100,8 Da qui diffèrent les uns des autres par m/z 14. Le

pic à  $m/z$  1044,7 correspond à la surfactine avec une longueur de chaîne d'acide gras (AG) de 14 à 16 atomes de carbone, ou à la pumilacidine C14. Le pic à  $m/z$  1058,8 est affecté à la surfactine C15 ou à la pumilacidine C14 ou C15. Le pic à  $m/z$  1072,8 correspond à la pumilacidine C15 ou C16. Le pic à  $m/z$  1086,8 est identifié comme étant la pumilacidine C16 ou C17. Le dernier pic à  $m/z$  1100,8 correspond à la pumilacidine dont la chaîne d'acide gras comporte 17 carbones.

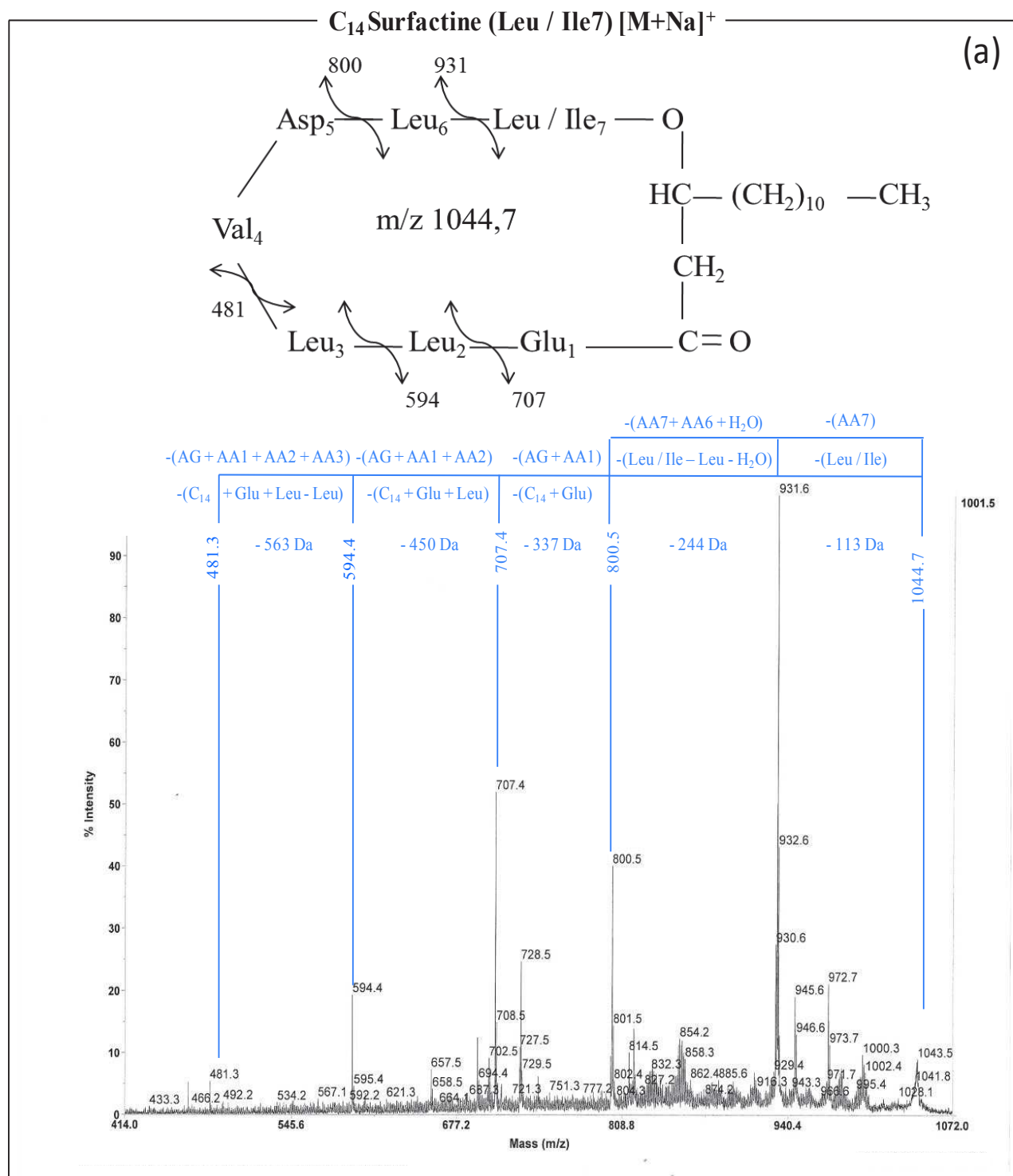
Afin de déterminer plus précisément la structure chimique de certains lipopeptides produits par la souche FLU5, une analyse par spectrométrie de masse en tandem (MS-MS) a été réalisée pour les différents pics à  $m/z$  1044,7, 1058,8, 1072,8 et 1086,8 Da (Fig. 74).

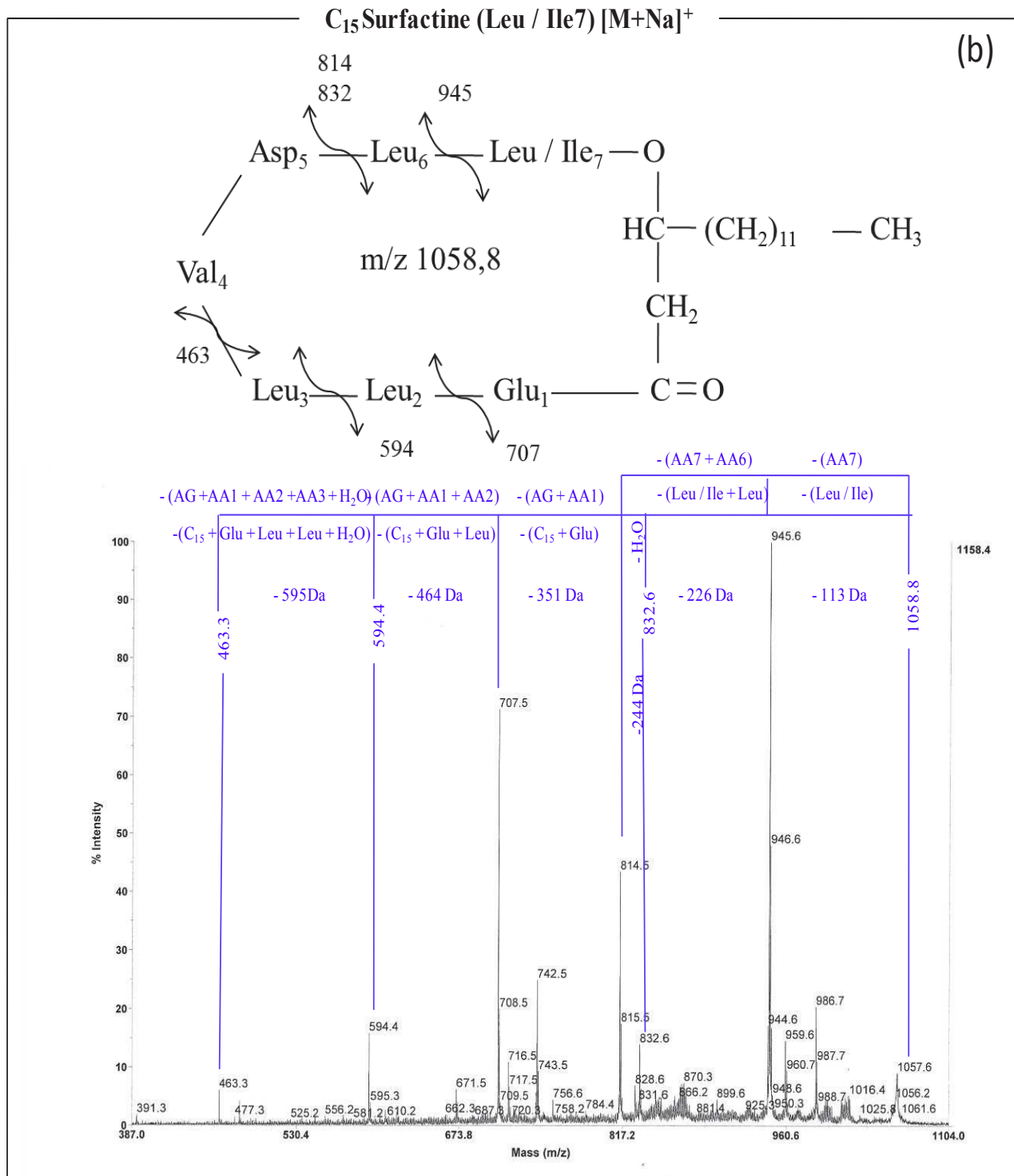
Le profil de fragmentation du pic 1044,7 Da illustré dans la figure 74a, a conduit à l'apparition de deux séries d'ions dérivant de l'ouverture initiale du cycle lactone. La première série contient des ions fils à partir de la fragmentation de la fraction peptidique de l'extrémité C-terminale à  $m/z$  931,6 et 800,5, correspondant, respectivement aux pertes des résidus Leu/Ile (-113 Da) et Leu/Ile-Leu-H<sub>2</sub>O (-244 Da) à partir de l'ion parental  $m/z$  1044,7. Par conséquent, le résidu d'acide aminé en position 7 est un Leu ou Ile. La seconde série renferme des ions fils à partir de la perte de la chaîne d'acide gras et des acides aminés de l'extrémité N-terminale de la chaîne peptidique à  $m/z$  707,4; 594,4 et 481,3, correspondant, respectivement, à la perte de la chaîne  $\beta$ -hydroxy acides gras C14-Glu (-337 Da), de la chaîne latérale  $\beta$ -hydroxy acides gras C14 -Glu-Leu (-450 Da) et de la chaîne  $\beta$ -hydroxy acides gras C14-Glu-Leu-Leu (-563 Da), à partir de l'ion précurseur  $m/z$  1044,7. Les résultats obtenus indiquent que le pic à  $m/z$  1044,7 est sans ambiguïté une surfactine, avec une chaîne d'acide gras de 14 atomes de carbone, et un résidu Leu ou Ile à la position 7.

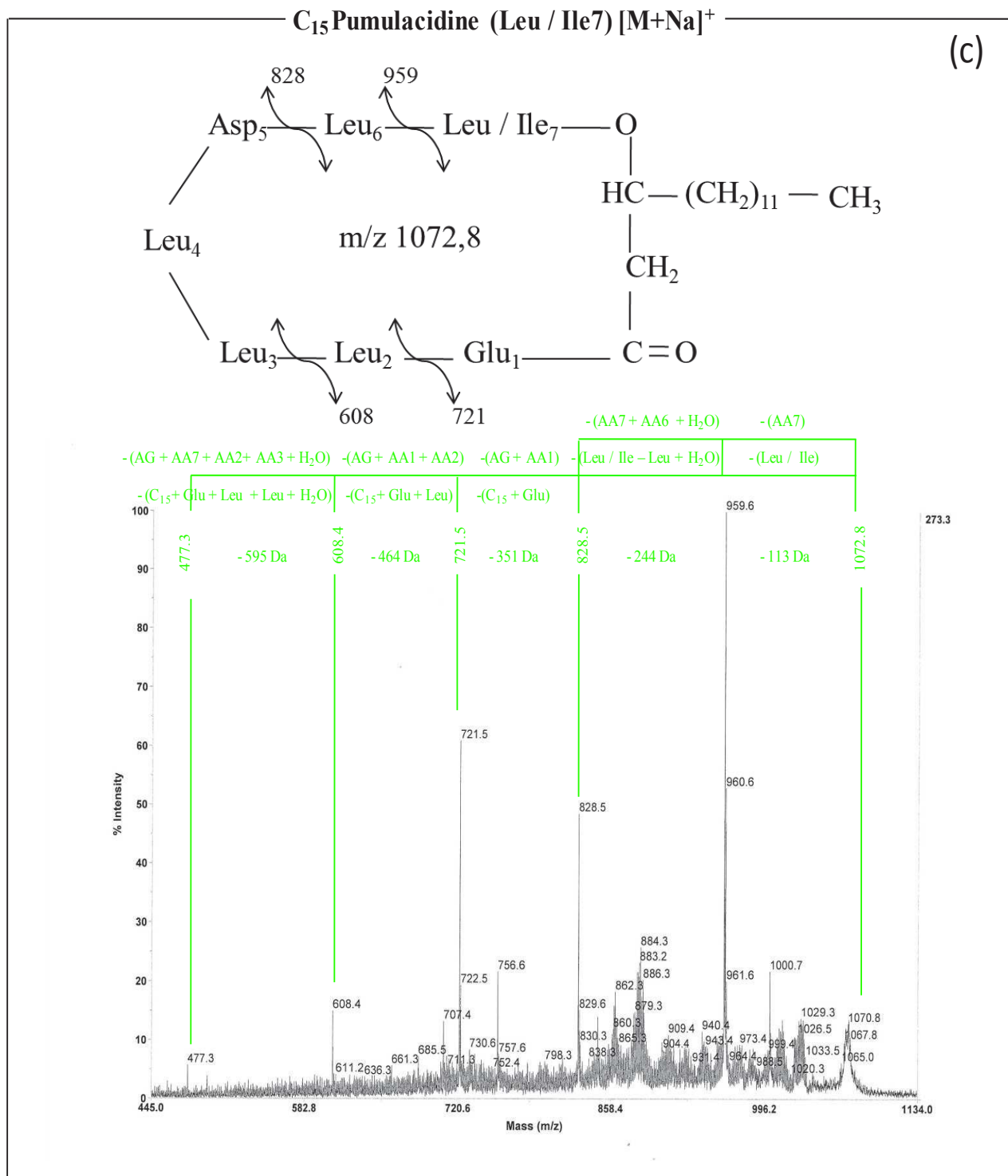
Le même modèle de fragmentation a été observé avec le pic  $m/z$  1072,8 (Fig. 74c). La fragmentation a entraîné l'apparition d'ions produits à  $m/z$  959,6 et 828,5 correspondant respectivement, aux pertes consécutives des résidus Leu/Ile (-113 Da) et Leu/Ile-Leu-H<sub>2</sub>O (-244 Da). Par conséquent, le résidu d'acide aminé en position 7 est une Leu ou Ile. D'autres pics ont été observés à  $m/z$  721,5; 608,4 et 477,3, correspondant respectivement aux pertes de la chaîne  $\beta$ -hydroxy acide gras C15-Glu (-351 Da), la chaîne  $\beta$ -hydroxy acide gras C15-Glu-Leu (-464 Da) et la chaîne  $\beta$ -hydroxy acide gras C15-Glu-Leu-Leu-H<sub>2</sub>O (-595 Da) à partir de l'ion précurseur  $m/z$  1072,8 (Fig. 74c). Les résultats obtenus indiquent que le pic à  $m/z$  1072,8 est sans ambiguïté une pumilacidine, avec une chaîne d'acide gras de 15 carbones, et un résidu Leu ou Ile en position 7.

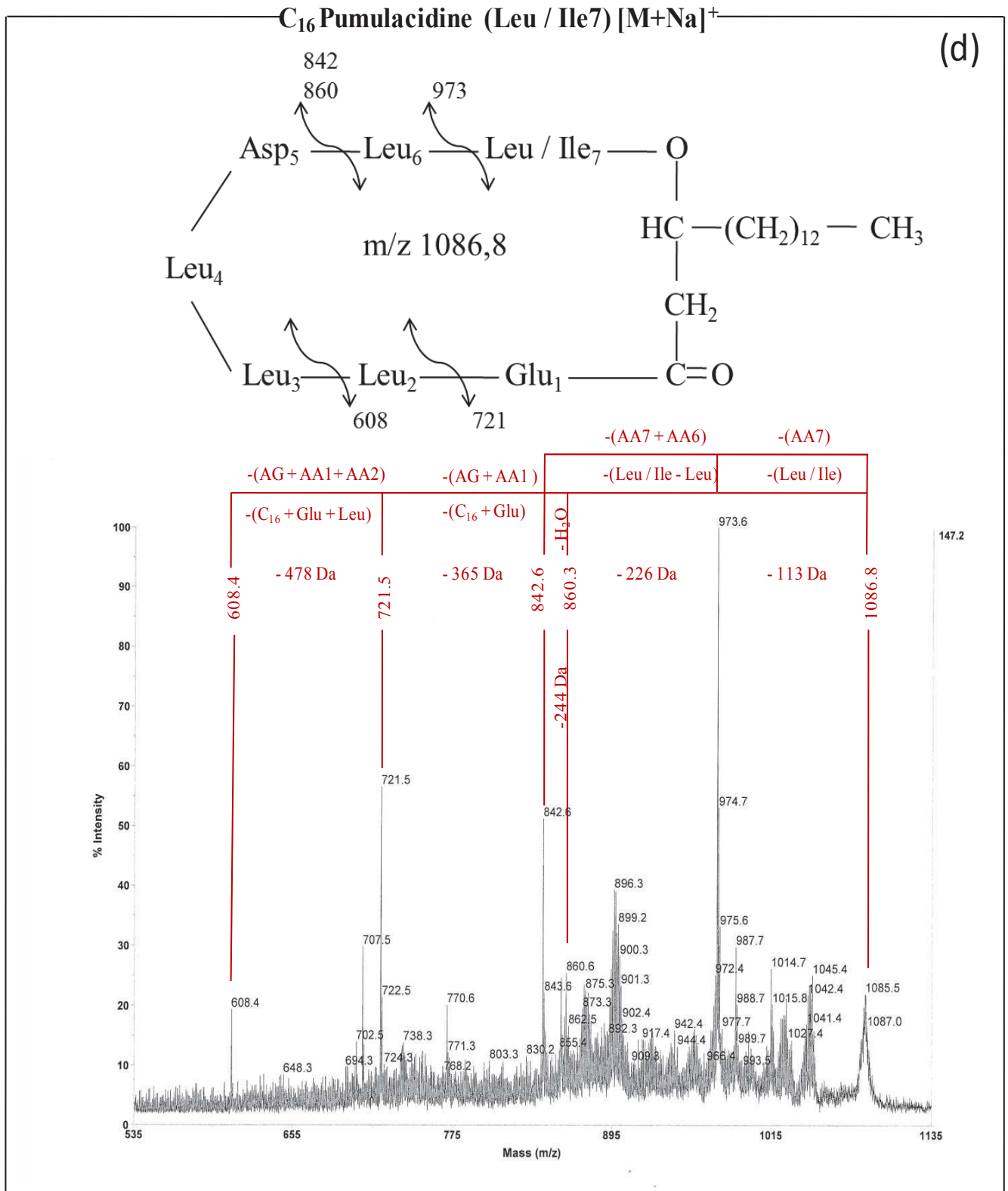
D'une manière similaire, les analyses MALDI-TOF MS/MS des pics 1058,8 (Fig. 74b) et 1086,8 (Fig. 74d) indiquent qu'il s'agit de la surfactine (Leu/Ile) avec une chaîne d'acide

gras de 15 carbones et de pumilacidine (Leu/Ile) avec une chaîne d'acide gras de 16 atomes de carbone, respectivement. Ces résultats de fragmentation des ions parents  $m/z$  1044,7; 1058,8; 1072,8 et 1086,8 sont en accord avec ceux de Pecci *et al.* (2010), Branquinho, (2014) et Jemil *et al.* (2017).









**Figure 74.** Spectres de masse MALDI-TOF MS/MS de lipopeptides produits par *Bacillus startosphaericus* FLU5: m/z = 1044,7 (a); 1058,8 (b); 1072,8 (c) et 1086,8 (d) (AA : acide aminé; AG: Acide Gras); Ile: isoleucine; Leu: leucine; Glu: acide glutamique; Val: valine).

De nombreuses études ont été rapportées sur l'implication des bactéries appartenant au genre *Bacillus* dans la synthèse des lipopeptides, mais une seule recherche faite par Santanu

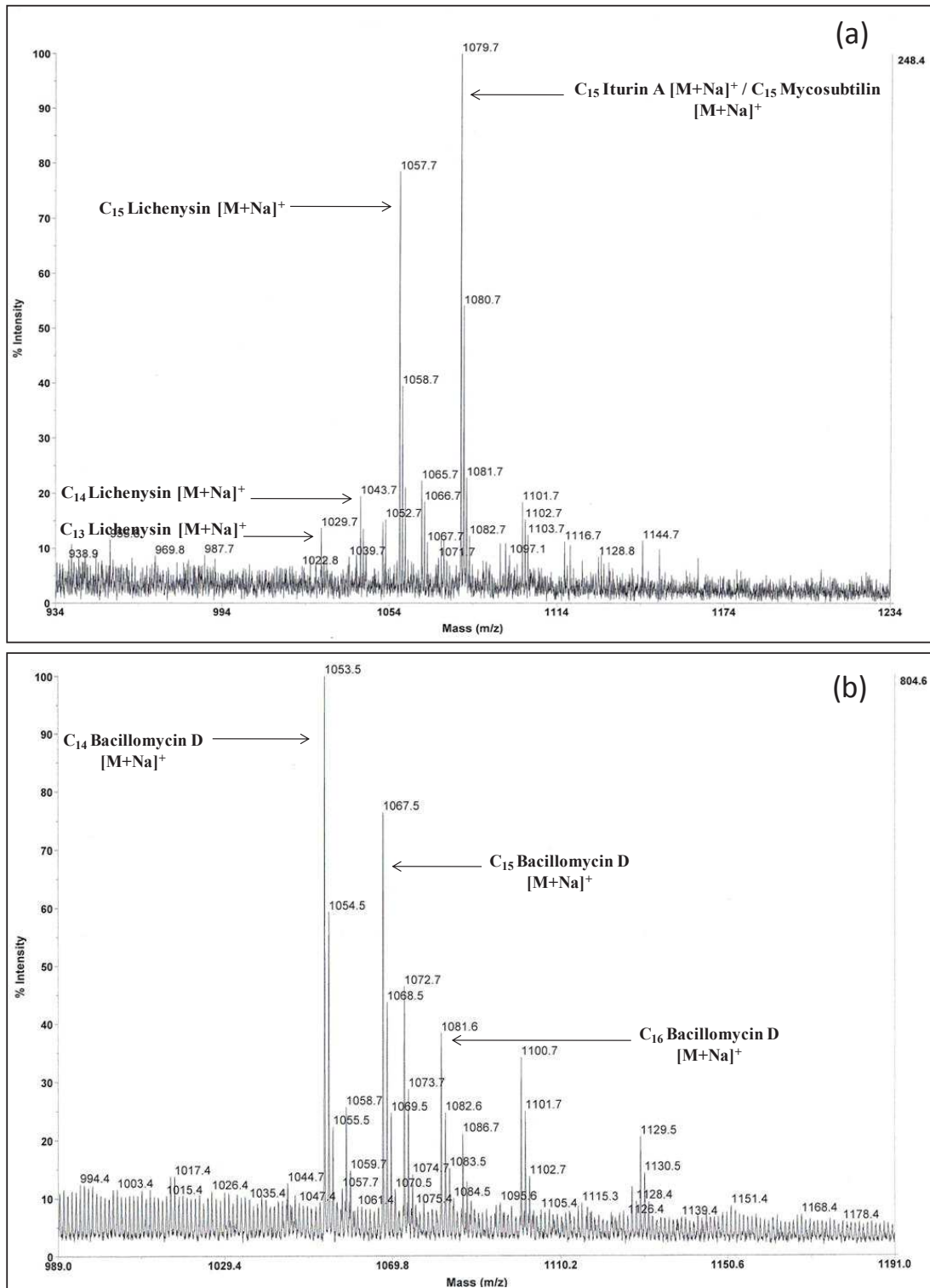


*et al.*, (2017), a étudié la production des lipopeptides par l'espèce *B. stratosphericus*. Cette souche nommée A15 isolée à partir des sols contaminés par des hydrocarbures, en Inde, a été choisie, sur la base de sa capacité à produire des agents tensioactifs, utilisant la graisse de poisson *Catla catla* comme source de carbone. Par ailleurs, Bezza *et* Nkhalambayausi Chirwa, (2016), ont rapporté la capacité d'un consortium microbien de différentes espèces (*Bacillus stratosphericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, et *Pseudomonas aeruginosa*), à produire des agents tensioactifs de nature lipopeptiques, sur la base des analyses FTIR.

### IV.3. Identification des biosurfactants produits par la souche CO100 de *Staphylococcus* sp.

Les biosurfactants bruts produits par la souche CO100 sur le milieu BN ont été également purifiés. Deux fractions ayant une réaction positive avec le ninhydrine et l'acide phosphomolibdique et montrant une diminution de la tension de surface à 28 mN/m ont été analysées par la spectrométrie de masse ESI/MS. La figure 75 présente les spectres de masse ESI/MS obtenus des biosurfactants purifiés BS-CO100. Elle montre la présence des pics avec des valeurs  $m/z$  comprises entre 1029 et 1081 Da. En comparant ces masses avec des masses mentionnées dans la littérature, ce groupe de pics pourrait être attribué à des lipopeptides et en particulier à des lichenysines et des iturines (Coronel-León *et al.*, 2015; Jemil *et al.*, 2017). Le spectre de masse rapporté dans la figure 75a, correspondant à la 1<sup>ère</sup> fraction, révèle la présence de trois pics  $[M + Na]^+$ , à  $m/z$  1029,7; 1043,7 et 1057,7 Da qui diffèrent les uns des autres par  $m/z$  14. Le pic à  $m/z$  1029,7 correspond à la lichenysine C13, le pic à  $m/z$  1043,7 est affecté à la lichenysine C14 et le pic à  $m/z$  1057,7 correspond à la lichenysine C15. En outre, un autre pic à  $m/z$  1079,7 a été également révélé. Ce pic correspond à l'iturine A ou à la mycosubtiline avec une longueur de chaîne d'acides gras de 15 atomes de carbone. La 2<sup>ème</sup> fraction révèle la présence de 3 autres pics  $[M + Na]^+$ , à  $m/z$  1053,5; 1067,5 et 1081,6, qui diffèrent, également, les uns des autres par  $m/z$  14 (Fig. 75b). Ces pics correspondent à la bacillomycine D C14, bacillomycine D C15 et bacillomycine D C16, respectivement (Coronel-León *et al.*, 2015; Jemil *et al.*, 2017).



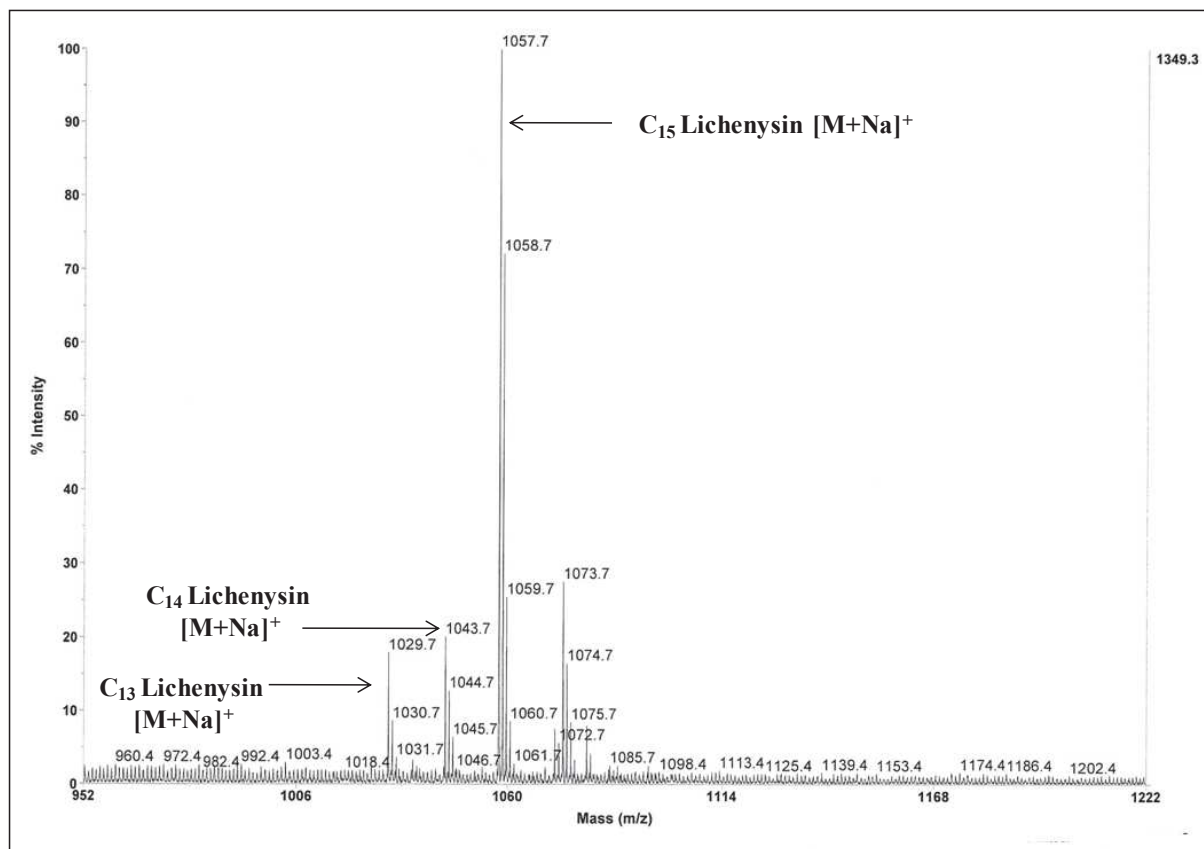


**Figure 75.** Spectres de masse ESI des lipopeptides purifiés produits par la souche CO100. (a) et (b): deux sous-fractions ayant des polarités différentes, choisies après analyse par CCM.

Les travaux qui portent sur les biosurfactants produits par le genre *Staphylococcus*, sont relativement rares par rapport à ceux des genres *Bacillus* et *Pseudomonas*. Nous avons montré récemment, la capacité d'une souche SH6 de *Staphylococcus capitis*, isolée à partir de l'usine de transformation du phosphate de Sfax et dégradant des mercaptans et des hydrocarbures, à synthétiser des biosurfactants de nature lipopeptidique, en utilisant le mazout ou l'huile de moteur usées, comme sources de carbone (Chebbi *et al.*, 2018). De même, une étude antérieure au Laboratoire LBPE, a rapporté la production des lipopeptides par la souche 1E de *Staphylococcus hoemolyticus*, isolée d'un sol algérien contaminé par du pétrole brut, en utilisant l'huile d'olive comme source de carbone (Eddouaouda *et al.*, 2012). La production des biosurfactants de nature glycopidique par une souche marine SBPS 15 de *Staphylococcus saprophyticus*, isolée à partir des sédiments marins contaminés par des hydrocarbures, en Inde, a été également rapportée (Mani *et al.*, 2016).

#### **IV.4. Identification des biosurfactants produits par la souche PYR2 de *Bacillus licheniformis***

La purification des biosurfactants produits par la souche PYR2 de *Bacillus licheniformis* montre la présence d'une sous-fraction ayant une réaction positive avec le ninhydrine et l'acide phosphomolibdique. La mesure de la tension de surface de cette fraction montre qu'elle est capable de réduire la tension superficielle de l'eau de 72 à 26,5 mN/m. L'analyse par la spectrométrie de masse ESI/MS conduit à la détection des pics avec des valeurs m/z comprises entre 1029 et 1057 Da (Fig. 76). D'après des recherches antérieures, on peut conclure que ce groupe de pics pourrait être attribué à des lipopeptides et en particulier à des lichenysines (Coronel-León *et al.*, 2015). Le spectre de masse rapporté dans la figure 76 révèle la présence de trois pics  $[M + Na]^+$ , à m/z 1029,7; 1043,7 et 1057,7 Da qui diffèrent les uns des autres par m/z 14. Ces pics correspondent à la lichenysine C13, la lichenysine C14 et la lichenysine C15, respectivement.



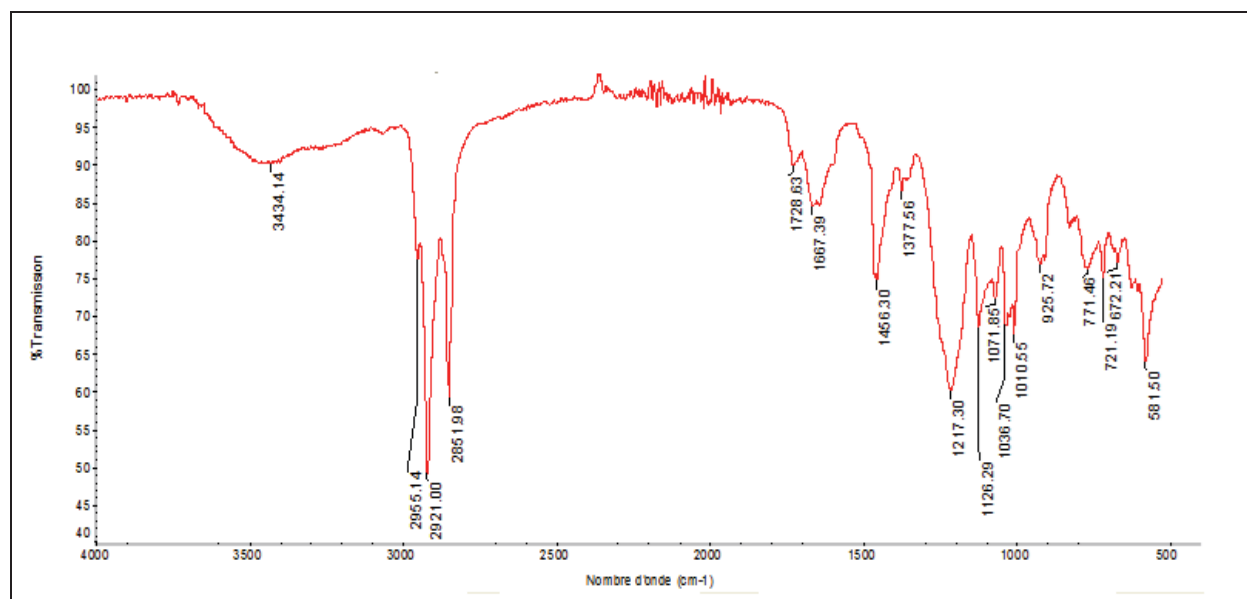
**Figure 76.** Spectre de masse ESI des lipopeptides purifiés produits par la souche PYR2 de *Bacillus licheniformis*.

La production des lichenysines par des bactéries affiliées à l'espèce *Bacillus licheniformis* a été démontrée par plusieurs études. En effet, la souche CAN55 de *Bacillus licheniformis* a été décrite par sa capacité à synthétiser 1,6 g/l des lichenysines, en utilisant le bouillon nutritif NB, aditionné par 2% glycérol (v/v) (Chebbi *et al.*, 2017b). Par ailleurs, la souche R2 de *Bacillus licheniformis* est capable de synthétiser 1,1 g/l de lichenysines, sur un milieu minnum contenant du glucose comme source de carbone (Joshi *et al.*, 2015). L'aptitude de la souche AL1 de *Bacillus licheniformis* à produire 3,2 g/l des lichenysines, dans un milieu optimisé en utilisant la mélasse comme source de carbone, a été, également, rapportée (Coronel-León *et al.*, 2015). Une étude par Madslie *et al.* (2013), a montré la synthèse de lichenysines par 53 souches de *Bacillus licheniformis*.

#### **IV.5. Identification des biosurfactants produits par la souche NAPH6 de *Pseudomonas aeruginosa***

Les espèces affiliées au *Pseudomonas aeruginosa* sont connues par leur capacité à synthétiser des agents tensioactifs appartenant, le plus souvent, à la classe des glycolipides et en particulier aux rhamnolipides (Xia *et al.*, 2012). La spectroscopie FTIR a été appliquée

pour identifier la structure moléculaire du biosurfactant BS-NAPH6 produit sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v), après 3 jours d'incubation, à 37 °C et à 180 rpm. Le spectre FTIR (Fig. 77), montre la présence d'une vibration à 3434  $\text{cm}^{-1}$  indiquant la présence d'une liaison (-OH) (des groupes hydroxyles libres d'anneau rhamnose). Les vibrations à 2921  $\text{cm}^{-1}$ , 2851  $\text{cm}^{-1}$  et 1456  $\text{cm}^{-1}$  sont associées aux vibrations symétriques de la liaison (-CH) pour les groupements (-CH<sub>2</sub>) et (-CH<sub>3</sub>) pour les chaînes aliphatiques saturées (alcane). Des groupes ester carbonyle sont prédits par les vibrations à 1728  $\text{cm}^{-1}$  et 1667  $\text{cm}^{-1}$ . La présence de la bande à 1667  $\text{cm}^{-1}$  est très probablement due à une contamination polypeptidique résultant de débris cellulaires co-précipités avec le biosurfactant au cours du processus d'extraction (Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2014). Ces résultats sont en faveur de la nature rhamnolipidique du biosurfactant en question (chaîne aliphatique + rhamnose), ce qui est en accord avec des recherches antérieures sur *Pseudomonas aeruginosa* (Aparna *et al.*, 2012; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2014). Néanmoins, il serait intéressant de purifier le biosurfactant BS-NAPH6, afin de mettre en évidence son éventuelle structure rhamnolipidique, moyennant d'autres techniques comme MALDI-TOF/MS et la LC-MS.



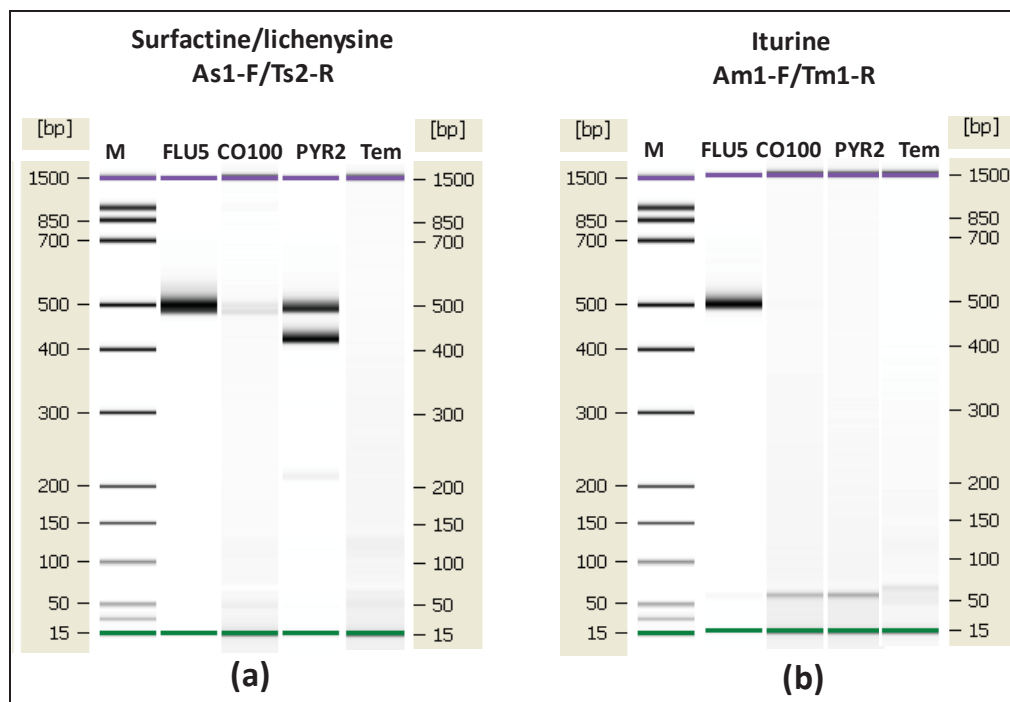
**Figure 77.** Spectre FTIR du biosurfactant brut BS-NAPH6 produit par la souche NAPH6 sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v), à 37 °C et 180 rpm.

## V. Détection des gènes responsables de la production des biosurfactants

Les analyses antérieures de spectrométrie de masse ESI, montrent que les biosurfactants produits par la souche la souche FLU5 de *Bacillus stratosphericus* appartiennent à la famille des surfactines. Les biosurfactants produits par la souche PYR2 de *Bacillus licheniformis* appartiennent à la famille des lichenysines. La souche CO100 de *Staphylococcus* sp. produit

des iturines et des lichenysines. La recherche des gènes fonctionnels responsables de la production de ces lipopeptides chez les trois souches FLU5, CO100 et PYR2 a été entamée (Fig. 78). Le couple d'amorces As1-F/Ts2-R a été utilisé pour l'amplification des gènes responsables de la synthèse des surfactines et des lichenysines. La recherche des gènes responsables de la production des iturines, a été réalisée en utilisant le couple d'amorces Am1-F/Tm1-R (Tapi *et al.*, 2010).

La figure 78, présente l'ensemble des fragments PCR obtenus avec les ADNs génomiques des souches FLU5, CO100 et PYR2 en utilisant les deux couples d'amorces As1-F/Ts2-R (Fig. 78a) et Am1-F/Tm1-R (Fig. 78b). Les résultats sont dits positifs lorsque la taille et l'intensité des bandes obtenues après amplification par PCR sont similaires à celles décrites pour chacun des couples d'amorces.



**Figure 78.** Visualisation des produits de PCR à l'aide d'un bioanalyseur (Agilent 2100).

**(a):** PCR réalisé moyennant le couple d'amorces As1F/Ts2-R, pour la détection des gènes codant les synthétases de la surfactine/lichenysine, **(b):** PCR réalisé moyennant le couple d'amorces Am1F/Tm1-R, pour la détection des gènes codant les synthétases de l'iturine (mycosubtiline).

L'analyse des résultats montre que les tailles des amplicons obtenus par le couple d'amorce As1-F/Ts2-R, dans le cas des souches FLU5 et PYR2, sont proches de celles attendues. En effet, la PCR réalisée par le couple d'amorces As1-F/Ts2-R génère des fragments spécifiques de tailles environ de 487 pb, qui pourraient correspondre aux gènes

codant les synthétases de la surfactine/lichenysine chez les souches FLU5 de *Bacillus stratosphericus* et PYR2 de *Bacillus licheniformis*.

Par ailleurs, la figure 78b, montre la présence d'une bande de taille 486 pb pour la souche FLU5, en utilisant le couple d'amorces Am1-F/Tm1-R. Ce fragment pourrait correspondre au gène codant les synthétases des iturines chez la souche FLU5 de *Bacillus stratosphericus*. Etant donné que les résultats ESI/MS montrent que la souche FLU5 produit des surfactines, l'apparence de cette bande pourrait être expliquée par la présence des gènes responsables de la production des iturines mais qui sont inactifs ou qu'elle produit également des iturines et qui n'ont pas été détectées par ESI/MS.

Concernant la souche CO100, nous notons l'absence des amplicons en utilisant les deux amorces testées. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les couples d'amorces utilisés ne sont pas spécifiques pour l'amplification des gènes codants pour les synthétases de cette souche, qui est affiliée au genre *Staphylococcus*. En effet, ces amorces ont été déterminées en se basant sur les séquences nucléotidiques du gène codant pour la synthétase, à partir des souches *Bacillus subtilis*.

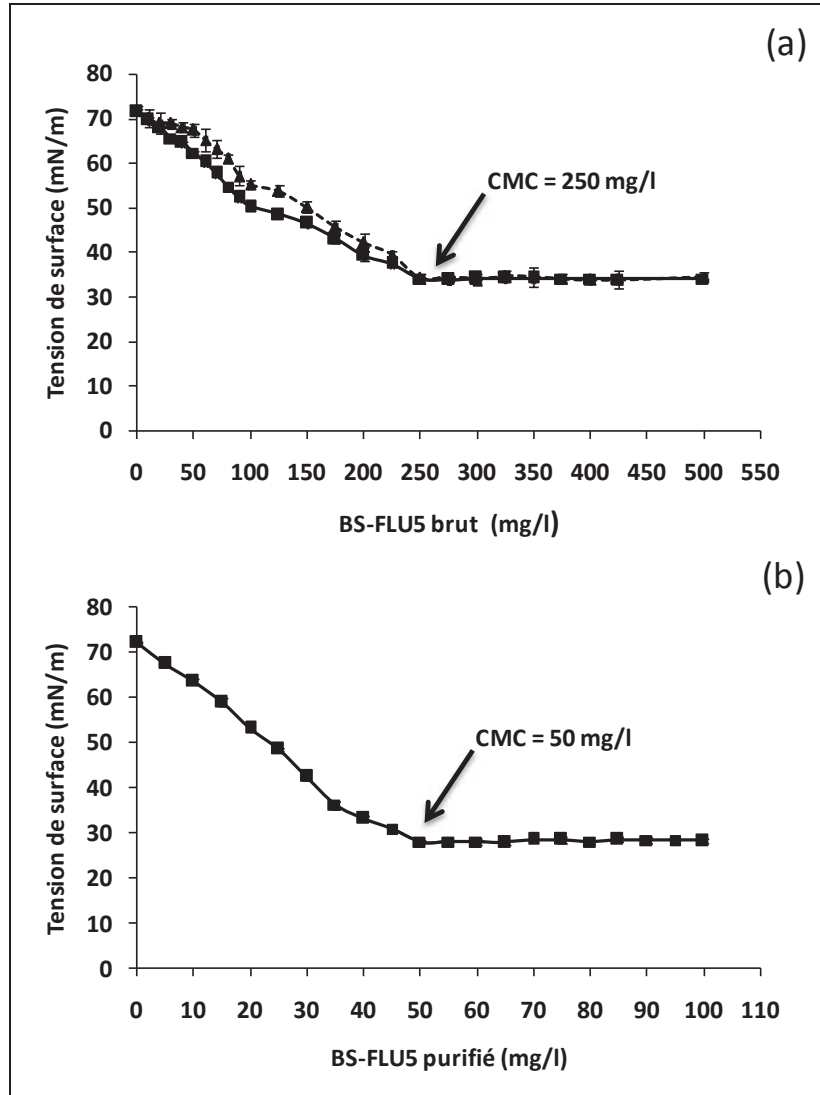
Afin de confirmer que les fragments amplifiés correspondent bien aux gènes codant pour les synthétases, les produits PCR positifs ont été séquencés. Les analyses préliminaires des résultats de séquençage montrent la présence de plusieurs séquences codantes pour des synthétases, pour chaque souche. Ces résultats peuvent être expliqués par la présence de plusieurs copies de ces gènes synthétases. L'utilisation des amorces dégénérées favorisent la génération de plusieurs séquences qui se ressemblent beaucoup. Le séquençage du génome complet des souches isolées, nous pourrait donner les clusters de biosynthèse des synthétases.

## VI. Détermination de la concentration micellaire critique (CMC)

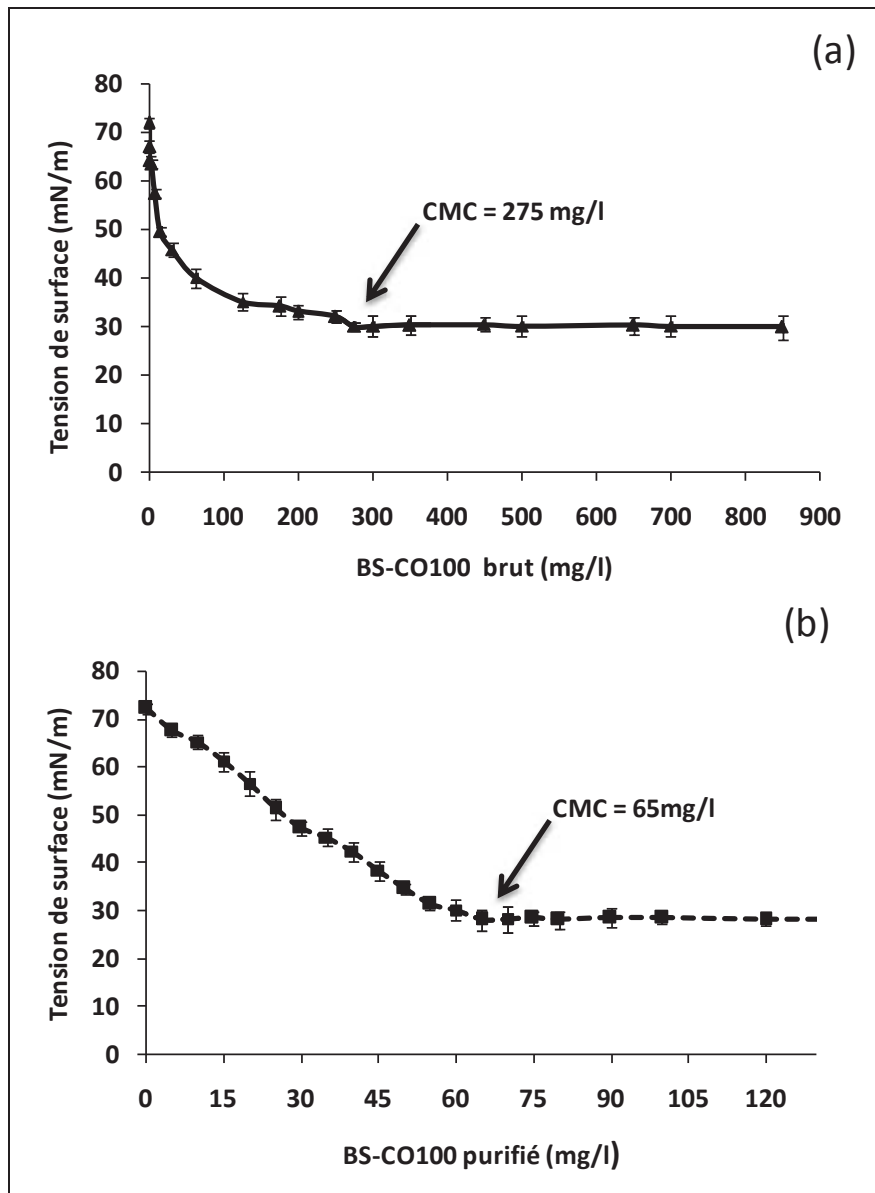
La concentration micellaire critique (CMC) est un paramètre important lors de l'évaluation de l'activité d'un agent tensioactif. Elle est définie comme étant la concentration en tensioactif dans un milieu au-dessus de laquelle les micelles se forment spontanément (Silva *et al.*, 2010).

Les figures 79, 80 et 81 présentent les CMCs des biosurfactants BS-FLU5, BS-CO100 et BS-PYR2 bruts et purifiés, produits sur le bouillon nutritif (BN). Les tensions de surface diminuent en fonction des concentrations croissantes en biosurfactants pour atteindre des valeurs minimales de 34 mN/m, 30 mN/m et 29 mN/m, à partir de 250 mg/l, 275 mg/l et 250 mg/l, pour les biosurfactants bruts BS-FLU5 (Fig. 79a), BS-CO100 (Fig.80a) et BS-PYR2 (Fig. 81a) bruts, respectivement. Ces concentrations (CMCs) diminuent davantage dans le cas

des biosurfactants purifiés, pour atteindre 50 mg/l pour BS-FLU5 (Fig. 79b), avec une tension de surface de l'ordre de 28 mN/m, 65 mg/l pour BS-CO100 (Fig. 80b), avec une tension de surface de 28 mN/m et 25 mg/l pour BS-PYR2 (Fig. 81b), avec une tension de surface de 27 mN/m.

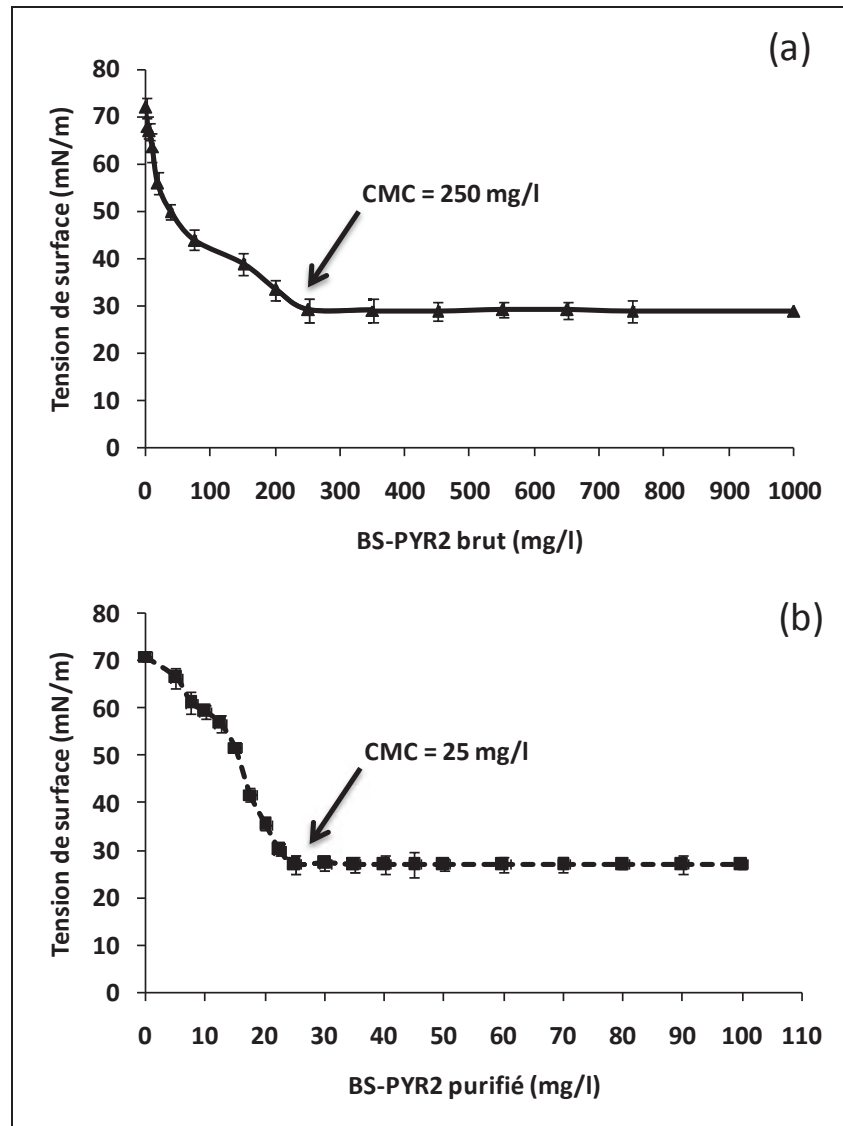


**Figure 79.** Détermination des CMCs des biosurfactants BS-FLU5 bruts (a) produits sur le milieu BN, (■), après 2 jours d'incubation et sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v) (▲), après 3 jours d'incubation et BS-FLU5 purifiés (b) produits sur le milieu BN, à 37 °C et 180 rpm.



**Figure 80.** Détermination des CMCs des biosurfactants BS-CO100 bruts (a) et purifiés (b) produits par la souche CO100 sur le milieu BN, après 3 jours d'incubation, à 37 °C et 180 rpm.





**Figure 81.** Détermination des CMCs des biosurfactants BS-PYR2 bruts (a) et purifiés (b) produits par la souche PYR2 sur le milieu BN, après 4 jours d'incubation, à 37 °C et 180 rpm.

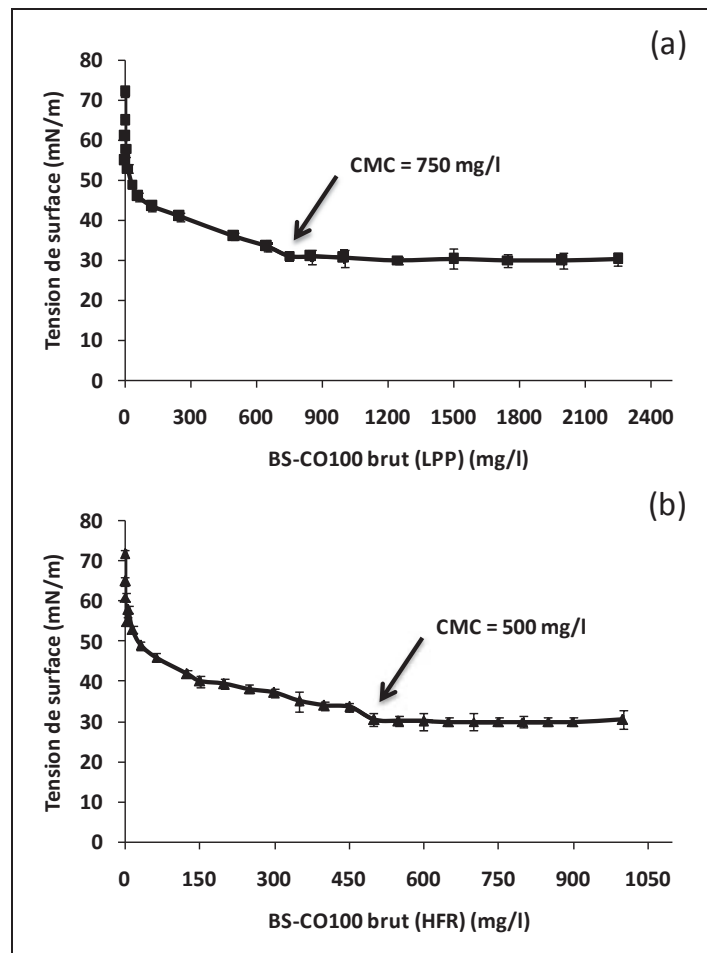
Parmi les critères demandés pour classer un agent tensioactif comme puissant, est d'avoir une faible valeur de CMC (Sriram *et al.*, 2011). La valeur de la CMC reflète le degré de pureté d'un tensioactif. Elle se diminue à mesure que le degré de la purification augmente (Mukherjee *et al.*, 2009). Cela peut expliquer la différence entre les valeurs de CMCs des biosurfactants bruts et purifiés. Les valeurs des CMCs obtenues sont relativement, comparables à celles des tensioactifs synthétiques: Triton X-100, Brij 35, Brij 30, Tween 20 et Tween 80, qui ont des valeurs de CMCs entre 16 et 110 mg/l (Whang *et al.*, 2008). En revanche, les CMCs trouvées sont significativement plus faibles que celles des tensioactifs chimiques: Tetradecyltriméthylammonium bromide (TTAB), citrikléen et dodécylsulfonate de sodium (1000-2300 mg/l) (Whang *et al.*, 2008). En outre, nos résultats sont en accord avec ceux trouvés dans la littérature. Dans ce contexte, une étude a montré la capacité notable

d'une surfactine produite par *Bacillus cereus* NK1 à diminuer la tension superficielle de l'eau de 72 mN/m jusqu'à 30 mN/m, avec une valeur de CMC de 45 mg/l (Sriram *et al.*, 2011). En plus, les lipopeptides produits par la souche ZG0427 de *Bacillus* sp. montrent une réduction significative de la tension de surface de l'eau de 72 mN/m jusqu'à 24,6 mN/m, à une CMC de 50 mg/l (Zhou *et al.*, 2015). En outre, la souche TT42 de *Bacillus licheniformis*, a été décrite pour son aptitude à produire des lichenysines capables de réduire la tension de surface de l'eau de 72 à 27 mN/m, avec une valeur de CMC de 22 mg/l (Suthar *et Nerurkar*, 2016).

La source de carbone est un facteur important influençant la structure de biosurfactant produit et par la suite ses propriétés physico-chimiques et ses activités biologiques, telles que la concentration micellaire critique et la capacité à réduire la tension superficielle (Singh *et al.*, 2014). Les CMCs des biosurfactants BS-FLU5 et BS-CO100, ont été déterminées, après culture de ces deux souches en présence d'autres sources de carbone: l'huile de friture résiduelle (1%, v/v) pour la souche FLU5 (Fig 79a) et le lait en poudre périmé (20 g/l) et l'huile de friture résiduelle (1%, v/v), pour la souche CO100 (Fig 82). La CMC de BS-FLU5 produit sur l'huile de friture résiduelle est égale à celle de BS-FLU5 produit sur le bouillon nutritif BN, avec une valeur de l'ordre de 250 mg/m (Fig. 79a). Bien que les deux produits de BS-FLU5 aient des valeurs similaires de CMC, la tension superficielle de BS-FLU5 produit sur l'huile de friture résiduelle est relativement supérieure à celle de BS-FLU5 produit sur le bouillon nutritif, en présence des faibles concentrations du biosurfactant (Fig. 79a). Ces résultats sont en accord avec l'étude réalisée par Liu *et al.*, 2015, qui ont rapporté que les isomères de la surfactine produits par la souche BS-37 de *Bacillus subtilis*, sur deux milieux différents, milieu Luria-Bertani (LB) et milieu contenant du glucose, possèdent la même valeur de CMC (20 mg/l), mais la tension de surface des surfactines produites sur milieu LB était inférieure à celle des surfactines produites sur le milieu contenant du glucose, à faible concentration en biosurfactant.

Dans le cas de la souche CO100, les CMCs obtenues, en utilisant différentes sources de carbone, étaient différentes (Fig. 82). Elles sont de l'ordre de 500 mg/l et 750 mg/l, pour des cultures de CO100 réalisées sur l'huile de friture résiduelle et sur le lait en poudre périmé, respectivement. En revanche, la CMC de BS-CO100 brut était de 275 mg/l suite à la culture de la souche CO100 sur le bouillon nutritif (Fig. 80). Il a été rapporté que la source de carbone influe sur la composition chimique des biosurfactants, et par conséquent sur ses propriétés tensioactives. Singh *et al.*, (2014), ont montré qu'en présence du dextrose, du saccharose et du glycérol, utilisés comme sources de carbone, la souche AR2 de *Bacillus amylofaciens* produit des lipopeptides sous forme d'un mélange de surfactine, d'iturine et de

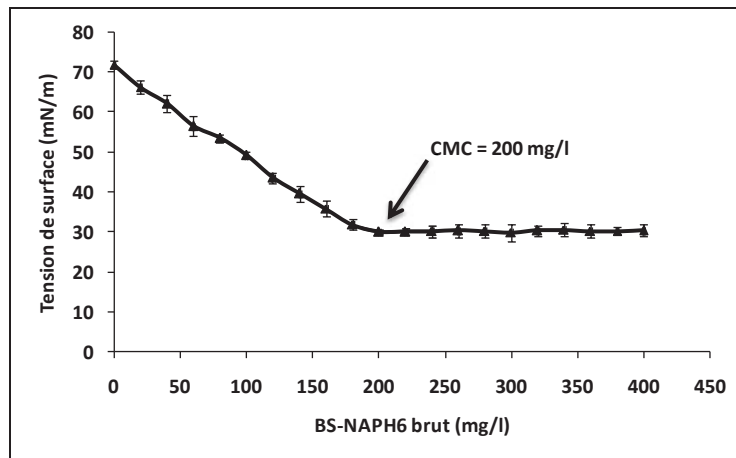
fengycine. Cependant, en présence de maltose, de lactose et de sorbitol, seule l'iturine a été produite. Les propriétés tensioactives de ces lipopeptides ont été également influencées en fonction du substrat utilisé. En effet, les valeurs des CMCs ont été comprises entre 80 et 110 mg/l, avec des tensions de surface de l'ordre de 30 et 37 mN/m. Ces résultats suggèrent que la source de carbone fournie pour la croissance et la production de biosurfactants influence non seulement le rendement mais aussi la structure de biosurfactant et ses caractéristiques.



**Figure 82.** Détermination des CMCs des biosurfactants BS-CO100 bruts produits par la souche CO100 sur le lait en poudre périmé (LPP) (20 g/l) (a) et sur l'huile de friture résiduelle (HFR) (1%, v/v) (b), après 2 jours d'incubation, à 37 °C et à 180 rpm.

La tension de surface de biosurfactant brut BS-NAPH6, produit par la souche NAPH6 de *Pseudomonas aeruginosa*, sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v), après 2 jours d'incubation, à 37 °C et à 180 rpm, diminue en fonction de la concentration du biosurfactant pour atteindre une valeur minimale de 30 mN/m, à une concentration en BS-NAPH6 supérieure ou égale à 200 mg/l (Fig. 83). Les propriétés tensioactives du biosurfactant produit par la souche NAPH6 sont, relativement, en concordance ou plus efficaces que celles de certains autres agents tensioactifs microbiens similaires rapportés dans la littérature, en raison

de la grande capacité à réduire la tension de surface, ainsi que la faible valeur de CMC. En effet, les rhamnolipides produits par la souche UCP0992 de *Pseudomonas aeruginosa* ont montré l'aptitude à réduire la tension de surface jusqu'à 27,4 mN/m avec une valeur de CMC de 700 mg/l (Silva *et al.*, 2010). En outre, il a été montré précédemment que la souche W10 de *Pseudomonas aeruginosa* pourrait produire des rhamnolipides capables de diminuer la tension de surface à 32,3 mN/m avec une valeur de CMC de 400 mg/l (Chebbi *et al.*, 2017b). En revanche, la CMC des rhamnolipides produits par la souche SP4 de la même espèce est de l'ordre de 200 mg/l, avec le potentiel de réduire la tension de surface à 29 mN/m (Pornsunthorntawee *et al.*, 2008).



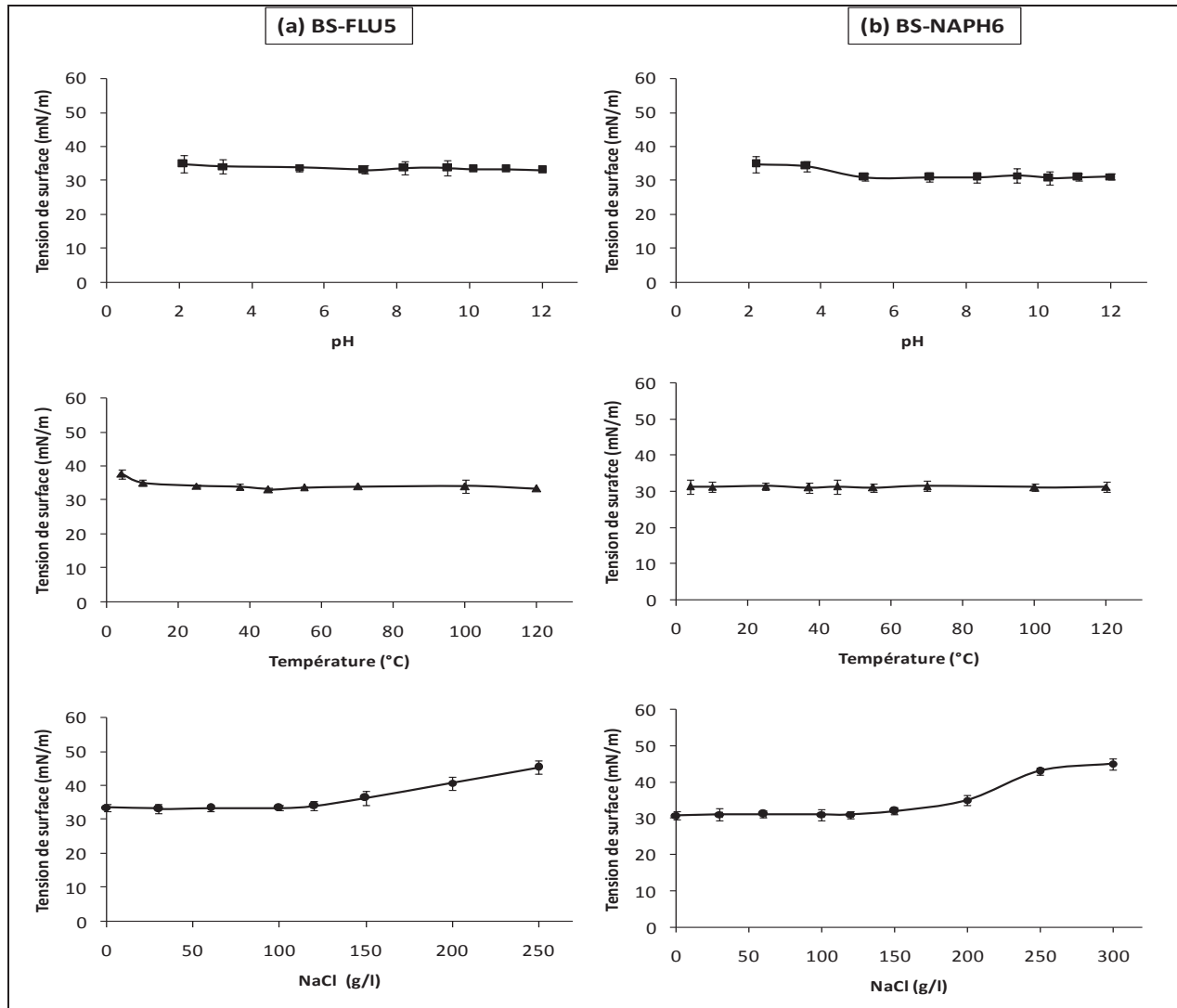
**Figure 83.** Détermination de la CMC des biosurfactants BS-NAPH6 bruts produits par la souche NAPH6 sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v), après 2 jours d'incubation, à 37 °C et à 180 rpm.

## VII. Etude de la stabilité *vis-à-vis* du pH, de la salinité et de la température

La stabilité des biosurfactants BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-CO100 et BS-PYR2, *vis-à-vis* des facteurs environnementaux (pH, température et salinité) a été évaluée (Fig. 84 et 85), en utilisant les surnageants des cultures FLU5 (3 jours d'incubation), NAPH6 et CO100 (2 jours d'incubation), réalisées sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v) et PYR2, réalisée sur le milieu BN, après 4 jours d'incubations.

La stabilité des biosurfactants BS-FLU5 et BS-NAPH6 à différents pH de (2,1 à 12) a été testée. La tension de surface de BS-FLU5 reste presque constante (34 mN/m) dans cette large gamme de pH (2,1-12) (Fig. 84a). Dans le cas de BS-NAPH6, la tension de surface reste stable (30 mN/m) à des pHs compris entre 5,2 et 12, avec une légère augmentation de TS à des pH acides (2,2 et 3,6) (TS = 34 mN/m) (Fig. 84b). Par ailleurs, l'étude de la stabilité thermique de BS-FLU5 et de BS-NAPH6 montre que ces produits conservent presque les mêmes tensions de surface pour des températures allant de 4 à 121 °C (Fig. 84). En outre, la

tension de surface des biosurfactants produits par la souche FLU5 et la souche NAPH6 reste quasiment constante, en présence d'une fourchette de concentration en NaCl allant de 0 à 120 g/l (TS = 34 mN/m), pour BS-FLU5 et de 0 à 150 g/l (TS = 30 mN/m), pour BS-NAPH6. Nous notons une augmentation de la TS de BS-FLU5 et de BS-NAPH6, au-delà de 150 et de 200 g/l NaCl, respectivement (Fig. 84).

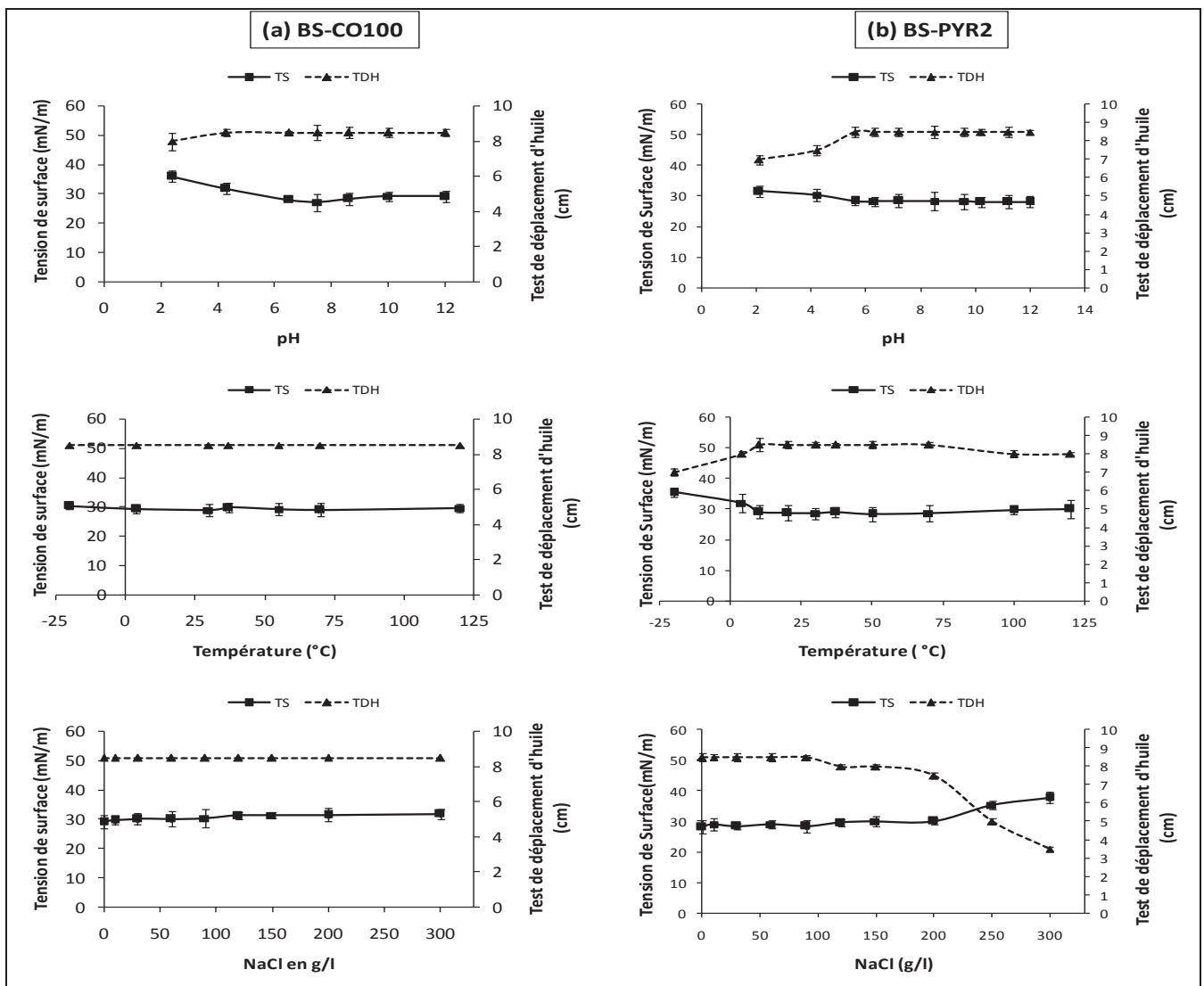


**Figure 84.** Etude de l'effet du pH, de la température et de la salinité sur la stabilité des biosurfactants BS-FLU5 (a) et BS-NAPH6 (b) moyennant l'évaluation de la tension de surface.

De même pour les biosurfactants produits par les souches CO100 et PYR2, nous remarquons que le biosurfactant BS-CO100 maintient environ les mêmes tensions de surface de pH 4,3 jusqu'à pH 12 (à pH = 4,3; TS = 31,8 mN/m; à pH = 12; TS = 29,2 mN/m) et les mêmes valeurs pour le test de déplacement d'huile (TDH = 8,7 cm) (Fig. 85a). Une légère augmentation de la tension de surface accompagnée d'une diminution de l'halo formé, sont observées à pH = 2,4 (TS = 36,1 mN/m) et TDH = 8 cm) (Fig. 85a). Le biosurfactant BS-

PYR2 est stable pour des valeurs de pH allant de 5,6 à 12 (TS est de l'ordre de 28 mN/m; TDH = 8,7 cm), avec une légère augmentation à des pH acides (à pH = 2,3; TS = 31,6 mN/m et TDH = 7 cm; à pH = 4,2; TS = 30,3 mN/m et TDH = 7,5 cm) (Fig. 85b).

Les propriétés tensioactives des biosurfactants BS-CO100 et BS-PYR2, demeurent stables à des températures allant de -20 à 121 °C pour BS-CO100 (TS est de l'ordre de 30 mN/m et TDH = 8,7 cm) et de 10 à 121°C pour BS-PYR2 (TS entre 28 et 30 mN/m et TDH = 8,7 cm) (Fig. 85). En outre, la tension de surface et le test de déplacement d'huile montrent que l'activité du biosurfactant BS-CO100 n'a pas été influencée pour des concentrations en NaCl allant de 0 jusqu'à 300 g/l. Pour le biosurfactant BS-PYR2, les propriétés tensioactives sont stables à des concentrations en NaCl allant de 0 à 200 g/l (TS = 30 mN/m), avec une augmentation de la tension de surface à partir de 250 g/l (TS = 35 mN/m).



**Figure 85.** Etude de l'effet du pH, de la température et de la salinité sur la stabilité des biosurfactants BS-CO100 (a) et BS-PYR2 (b), moyennant l'évaluation de la tension de surface (TS) et le test de déplacement d'huile (TDH).

Les résultats de la grande stabilité des quatre biosurfactants BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-CO100 et BS-PYR2 *vis à vis* de la température, la salinité et du pH, sont, relativement, en concordance ou même plus efficaces que ceux de certains autres biosurfactants similaires rapportés dans la littérature.

A titre d'exemple, les lipopeptides produits par la souche ICA56 de *Bacillus subtilis* maintiennent leurs propriétés tensioactives *vis-à-vis* d'une large gamme de pH (2-12), de température (0-75 °C) et de salinité (0-20%, m/v) (de França *et al.*, 2015). Les rhamnolipides produits par la souche W10 de *Pseudomonas aeruginosa* montrent, également, qu'ils sont dotés d'une stabilité remarquable *vis-à-vis* de pH (2-12), de température (0-100 °C) et de différentes concentrations en NaCl (0-150 g/l). D'autres études ont rapporté que l'activité de certains lipopeptides et rhamnolipides est affectée dans des conditions acides. Une recherche par Abdel-Mawgoud *et al.* (2008), a montré que les lipopeptides produits par la souche BS5 de *Bacillus subtilis* n'ont pas, pratiquement, d'activité de surface à des valeurs de pH compris entre 2 et 4 et que l'activité de surface a été détectée à partir de pH 5. De même, l'activité des rhamnolipides synthétisés par la souche UCP0992 de *Pseudomonas aeruginosa* est affectée à pH inférieur à 4 (Silva *et al.*, 2010). Ceci peut être expliqué par le fait que certains biosurfactants ont la tendance à précipiter à faible pH, ce qui génère la faible activité de ces tensioactifs à pH acides (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008; Chebbi *et al.*, 2017b).

Les bactéries marines FLU5, NAPH6, PYR2 et CO100 ont été isolées à partir de l'environnement marin, par conséquent, la stabilité sous différentes concentrations en NaCl peut être attendue en raison de l'adaptation physiologique de la bactérie et de ses métabolites à des conditions de salinité élevée (Vilela *et al.*, 2014). Cependant, les fortes concentrations en sel peuvent considérablement réduire la taille et la forme de la micelle, affectant alors les propriétés fonctionnelles des tensioactifs (de França *et al.*, 2015).

La stabilité élevée de différents biosurfactants étudiés *vis-à-vis* des hautes températures, est très demandée dans le cas d'application des surfactants biologiques dans des produits cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques, où le chauffage est appliqué pour obtenir la stérilité (Khopade *et al.*, 2012). Par ailleurs, la stabilité des biosurfactants *vis-à-vis* de la salinité et du pH est un critère bien recherché pour des applications biotechnologiques, comme en bioremédiation, par exemple.

### **VIII. Etude de la cytotoxicité des biosurfactants étudiés**

De nos jours, il existe un grand intérêt concernant la toxicité et la sécurité des agents tensioactifs biologiques utilisés. Dans ce contexte, la viabilité cellulaire a été évaluée après



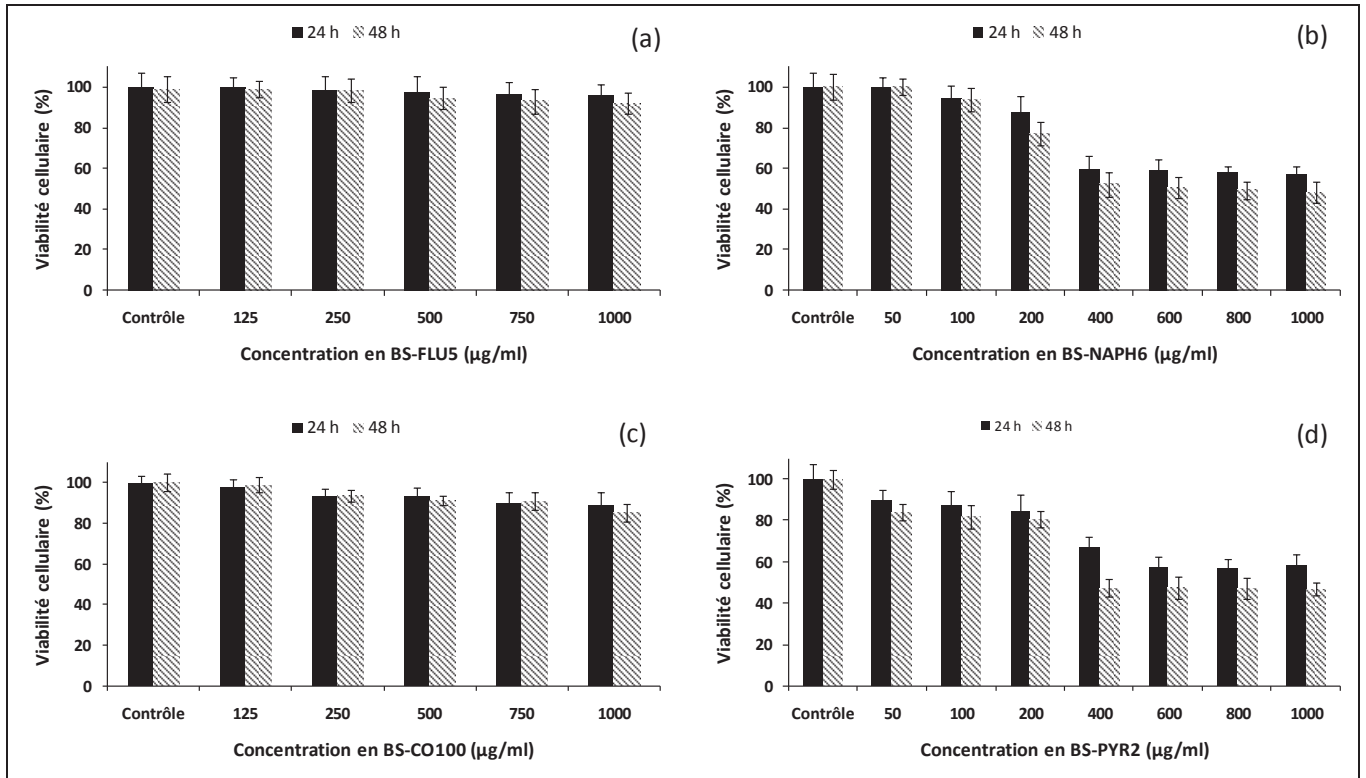
traitement des cellules humaines HEK-293 avec différentes concentrations en biosurfactants BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-CO100 et BS-PYR2 (0-1000 µg/ml), durant 24 h et 48 h. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport aux cellules témoins non traitées (Fig. 86). Au bout de 24 h de traitement, la viabilité cellulaire était de l'ordre de 96% et 88,64% pour 1000 µg/ml (concentration maximale), de BS-FLU5 et BS-CO100 respectivement, alors qu'une viabilité cellulaire de 100% était enregistrée pour le contrôle (Fig. 86 a et c). Au fur et à mesure que le temps d'incubation augmentait, la viabilité cellulaire était légèrement réduite. Après 48 h d'incubation, il a été observé que la viabilité cellulaire dans le contrôle était de 99%, alors que dans le cas de 1000 µg/ml, la viabilité était réduite à 92% pour BS-FLU5 et à 85,2% pour BS-CO100 (Fig. 86 a et c). Dans le cas des biosurfactants BS-NAPH6 et BS-PYR2, le taux de viabilité cellulaire était supérieur à 80% à des concentrations inférieures ou égales à 200 µg/ml, après 48 h d'incubation (Fig. 86 b et d). Conformément à l'ISO 10993-5, 2009, lorsque la viabilité cellulaire présente plus de 80%, le produit testé peut être considéré comme non toxique (ISO Report, 2009). Nous pouvons conclure, donc, que les biosurfactants BS-FLU5 et BS-CO100 ne présentent pas d'effet toxique, jusqu'à 1000 µg/ml. Les biosurfactants BS-NAPH6 et BS-PYR2 n'ont pas d'effet toxique, à des concentrations inférieures ou égales à 200 µg/ml.

Dans ce contexte, les lipopeptides PE1 et PE2 produits par la souche B7 de *Paenibacillus ehimensis*, ont montré une cytotoxicité négligeable (viabilité cellulaire > 95%), sur des cellules HEK293, à des concentrations allant de 1 µg/ml à 128 µg/ml (Huang *et al.*, 2013). Une autre étude, a décrit la faible réponse cytotoxique des rhamnolipides contre des cellules fibroblastiques à des concentrations de 10, 20 et 30 mg/l (Shen *et al.*, 2016). Récemment, Patowary *et al.*, (2017), ont montré que les rhamnolipides produits par la souche PG1 de *Pseudomonas aeruginosa*, ont un effet de cytotoxicité négligeable sur la lignée cellulaire L292 de fibroblastes de souris jusqu'à une concentration de 250 mg/l. En revanche, l'évaluation de la cytotoxicité des mono-rhamnolipides et des di-rhamnolipides contre deux lignées cellulaires (HK-2 et hépatocytes primaires), montre un effet cytotoxique notable à des concentrations de l'ordre de 10 mg/l (dans le cas des mono-rhamnolipides) et de l'ordre de 20 mg/ml (dans le cas des di-rhamnolipides) (Jiang *et al.*, 2014).

Des rhamnolipides ont été approuvés par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux FDA (Food and Drug Administration) pour une utilisation dans des cultures légumineuses et fruitières, grâce à leur faible toxicité et leur non-mutagénicité, chez les mammifères (Shen *et al.*, 2016). Par ailleurs, plusieurs études, ont montré la non-toxicité des lipopeptides (Surfactine C), par administration orale chez des rats, à des concentrations



élevées (2,5 et 5 g/l), suggérant, ainsi la possibilité d'utiliser ces biomolécules comme des additifs alimentaires (la dose testée est largement supérieure à la dose la plus élevée recommandée par l'Organisation pour l'alimentation et l'agriculture / Organisation Mondiale de la Santé) (Hwang *et al.*, 2008; Sahnoun *et al.*, 2015). Par conséquent, ces résultats pourraient encourager l'utilisation de ces produits biologiques BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-CO100 et BS-PYR2 dans des applications cosmétiques, pharmaceutiques et alimentaires.



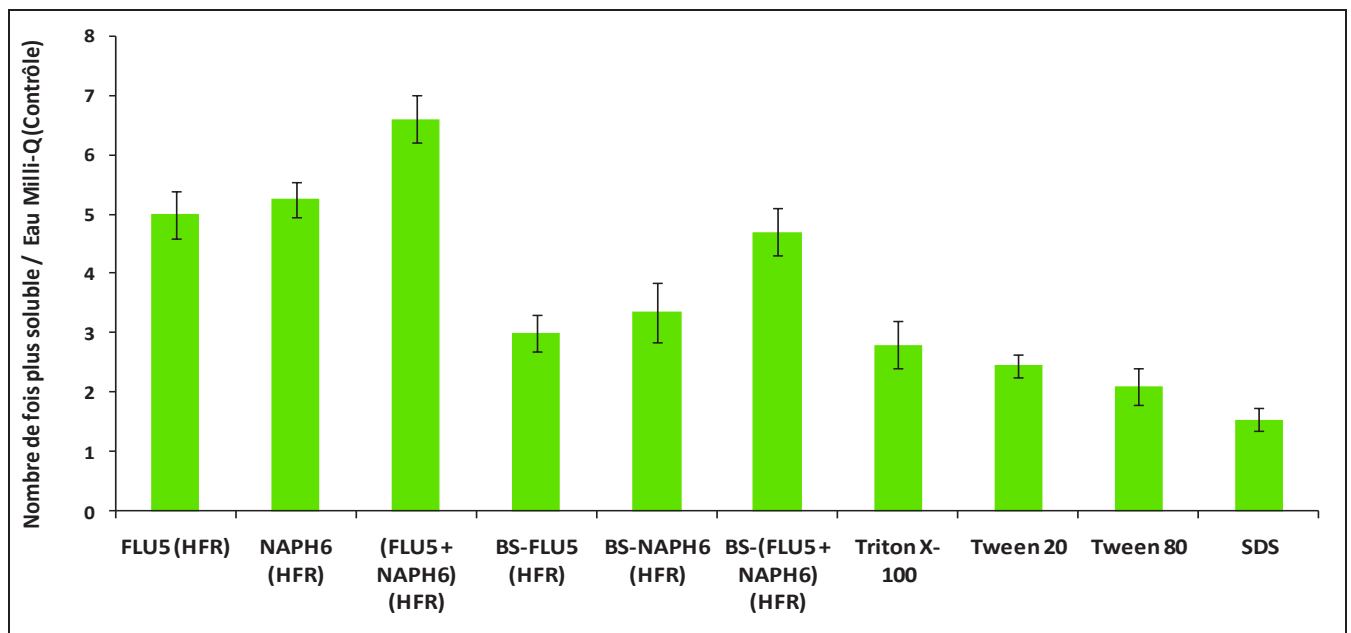
**Figure 86.** Evaluation de la cytotoxicité de différentes doses des biosurfactants BS-FLU5 (a), BS-NAH6 (b), BS-CO100 (c) et BS-PYR2 (d), contre des cellules humaines HEK-293. Les résultats sont exprimés en termes de pourcentage de viabilité cellulaire, après deux temps d'incubation (24 et 48 h). Les valeurs indiquées sont la moyenne de trois répétitions  $\pm$  écart type.

## IX. Essais d'application

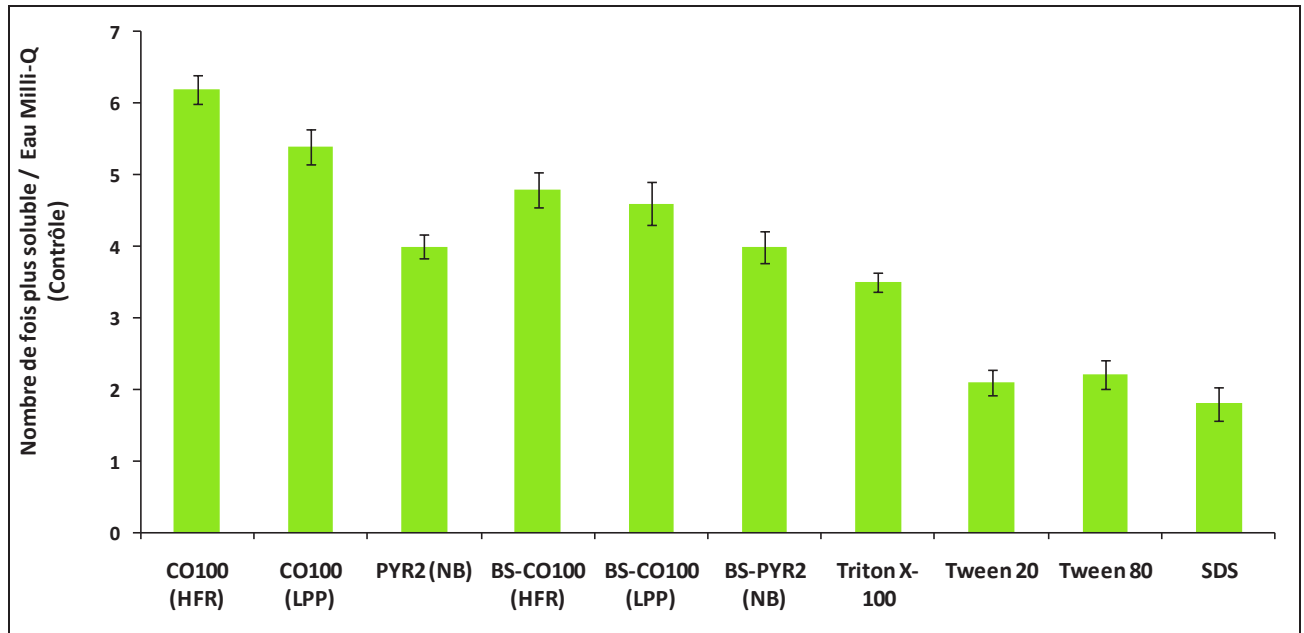
### IX.1. Remobilisation des hydrocarbures contenus dans des sols contaminés par l'huile de moteur usée

Les hydrocarbures sont des polluants organiques, peu biodégradables et souvent associés à un caractère toxique et cancérigène (en particulier les HAPs). Ils sont des composés rémanents, hydrophobes et ils tendent donc à s'adsorber fortement sur la matière organique du sol (Duran *et Cravo-Laureau*, 2016). L'utilisation des surfactants biologiques dans la restauration des sites contaminés, semble être une stratégie prometteuse qui favorise la

biodisponibilité des produits hydrophobes (Banat *et al.*, 2014). Les biosurfactants présentent de nombreux avantages par rapport à leurs équivalents chimiques, du fait qu'ils sont respectueux de l'environnement, biodégradables, moins toxiques et non dangereux. De ce fait, nous nous sommes intéressés à étudier les effets des solutions de: surnageants de la culture FLU5, de la culture NAPH6 et de la co-culture (FLU5+NAPH6) sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v); biosurfactants bruts BS-FLU5, BS-NAPH6 et BS-(FLU5+NAPH6) synthétisés sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v) (Fig. 87); surnageants des cultures CO100 sur l'huile de friture résiduelle et sur le lait en poudre périmé (20 g/l), surnagent de la culture PYR2 sur le bouillon nutritif (BN) et biosurfactants bruts BS-CO100, synthétisés sur le lait en poudre périmé (20 g/l), BS-CO100, synthétisés sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v) et BS-PYR2, synthétisé sur le bouillon nutritif BN (Fig.88), sur la solubilisation des hydrocarbures présents dans un sol contaminé par l'huile de moteurs usée. Une comparaison a été réalisée dans les mêmes conditions, avec des surfactants chimiques (Triton X-100, Tween 20, Tween 80 et SDS).



**Figure 87.** Effets de surnageants de la culture FLU5, de la culture NAPH6, de la co-culture (FLU5 + NAPH6), des biosurfactants bruts BS-FLU5, BS-NAPH6, et BS-(FLU5 + NAPH6), ainsi que des surfactants chimiques (Triton X-100, Tween 20, Tween 80 et SDS), sur la remobilisation des hydrocarbures contenus dans un sol contaminé par l'huile de moteurs usée.



**Figure 88.** Effet des surnageants des cultures CO100 et PYR2, des biosurfactants bruts BS-CO100 et BS-PYR2, ainsi que des surfactants chimiques (Triton X 100, Tween 20, Tween 80 et SDS) sur la remobilisation des hydrocarbures contenus dans un sol contaminé par l'huile de moteur usée.

Les résultats obtenus montrent un effet de remobilisation des hydrocarbures contenus dans le sol pollué par des hydrocarbures, par les tensioactifs que ce soient biologiques ou chimiques. La comparaison entre les effets de remobilisation des: biosurfactants biologiques bruts (BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-(FLU5+NAPH6), BS-CO100 et BS-PYR2), des surnageants des cultures (FLU5, NAPH6, (FLU5+NAPH6), CO100 et PYR2) et des surfactants chimiques (Tween 20, Tween 80, Triton X-100 et SDS), a été évaluée en utilisant des analyses statistiques, ANOVA et test de Tukey.

Nous constatons que la solubilisation des hydrocarbures obtenue avec les biosurfactants bruts BS-FLU5 est plus importante que celle obtenue avec les tensioactifs Tween 80 et SDS ( $p < 0,05$ ), ce qui n'est pas le cas avec les surfactants Tween 20 et Triton X-100 ( $p > 0,05$ ). Par ailleurs, nous notons un effet de remobilisation plus important provoqué par les tensioactifs biologiques bruts BS-NAPH6, BS-(FLU5+NAPH6), BS-CO100 et BS-PYR2, par rapport aux tensioactifs chimiques (Tween 20, Tween 80, Triton X-100 et SDS) ( $p < 0,05$ ) (Fig. 87 et 88). L'effet de remobilisation des hydrocarbures est encore plus accentué dans le cas d'application des surnageants des cultures FLU5, NAPH6, co-culture (FLU5+NAPH6), CO100 et PYR2, en comparaison avec les biosurfactants bruts ou les surfactants synthétiques ( $p < 0,05$ ) (Fig. 87 et 88).

Les biosurfactants, des molécules amphiphiles douées d'une activité interfaciale, ont l'aptitude d'augmenter la solubilisation des composés hydrophobes en réduisant les tensions

superficielles, ce qui entraîne une biodisponibilité accrue et une mobilité des contaminants (Banat *et al.*, 2000). Chebbi *et al.* (2017b) ont rapporté que l'application de biosurfactant brut BSW10 produit par la souche W10 de *Pseudomonas aeruginosa*, dans la remobilisation des hydrocarbures présents dans un sol contaminé par le pétrole brut, s'est montré plus efficace que le tensioactif synthétique SDS. De même, les biosurfactants SH6BS1 et SH6BS2, produits par la souche SH6 de *Staphylococcus capitis*, sur le pétrole brut et sur l'huile de moteurs usée, respectivement, ont montré un effet de remobilisation des hydrocarbures contaminant le sol, plus marqué que le tensioactif chimique SDS (Chebbi *et al.*, 2018). D'autres études antérieures, ont montré la capacité des surnageants des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992 et de *Pseudomonas* sp. 2B, qui sont capables de produire des rhamnolipides, à éliminer des contaminants hydrophobes adsorbés dans un sol pollué par des hydrocarbures (Silva *et al.*, 2010; Anjum *et al.*, 2016). Par ailleurs, le surnageant de la culture de *Bacillus subtilis* ICA56, contenant des biosurfactants, possède un potentiel intéressant de remobilisation des hydrocarbures à partir des sols contaminés par le pétrole brut et par l'huile de moteur, par rapport à certains surfactants chimiques (SDS et Triton X-100) (de França *et al.*, 2015).

L'application des surnageants ou des cultures entières est une démarche économique et rentable qui présente un rendement intéressant par rapport aux surfactants chimiques et biologiques testés à leurs CMCs, puisqu'on évite le recours aux étapes d'extraction des biosurfactants. Des applications potentielles dans l'industrie pétrolière (récupération du pétrole, bioremédiation,...) nécessitent des spécifications de pureté plus faibles, de sorte que les cultures entières des souches étudiées FLU5, NAPH6, CO100 et PYR2 pourraient être utilisées en présence des substrats de bon marché comme source de carbone, tout en éliminant les étapes de purification qui représentent près de 60% du coût total de production (Silva *et al.*, 2010).

## IX.2. Contrôle des biofilms microbiens

Les biofilms sont souvent considérés comme une source de problèmes tant dans le domaine médical que dans l'industrie ou même l'environnement (Banat *et al.*, 2014a). Ils sont responsables à plusieurs infections nosocomiales, ils causent une altération des qualités organoleptiques des produits alimentaires, et ils sont à l'origine d'un certain nombre de dégradations (bâtiments, corrosion pouvant mener à la perforation de la coque des bateaux...) (Wahl *et al.*, 2012). L'utilisation des tensioactifs biologiques, pour lutter contre ces problèmes, ont reçu, durant les dernières années, une attention particulière, vu le caractère biodégradable,

la faible cytotoxicité et les activités anti-microbiennes et antibiotiques que possèdent ces biomolécules (Banat *et al.*, 2014a).

Dans ce contexte, l'évaluation de l'application de biosurfactants bruts produits par les souches FLU5, CO100 et PYR2 dans la prévention (pré-traitement) et l'élimination (post-traitement), des biofilms des microorganismes pathogènes, a été réalisée. En effet, le test de pré-traitement consiste à évaluer la capacité du biosurfactant, à inhiber la formation des biofilms des microorganismes, en ajoutant ce tensio-actif biologique avant la formation des biofilms (activité anti-adhésive). Par contre, le test de post-traitement consiste à évaluer la capacité de biosurfactant à déstabiliser et perturber les biofilms déjà formés (activité anti-biofilm). Ces tests ont été effectués sur une surface de polystyrène (plaque de microtitration, 96 puits), en utilisant différentes concentrations (0-4 µg/ml) des biosurfactants bruts BS-FLU5 BS-CO100 et BS-PYR2. Les résultats obtenus montrent que les biosurfactants testés sont dotés des activités anti-adhésive et anti-biofilm intéressantes contre la formation des biofilms d'une variété des microorganismes testés: bactéries à gram négatif (*Escherchia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurum* ATCC 14028 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883); bactéries à Gram positif (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Résistante à la méthicilline) ATCC 43300 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29216), ainsi que la levure *Candida albicans* ATCC 10231. (Tableau 40-42). Nous remarquons que les effets anti-adhésifs et anti-biofilms augmentent, avec la concentration de biosurfactant. Pour les lipopeptides BS-FLU5, l'effet anti-adhésif le plus important a été observé contre les biofilms des microorganismes pathogènes *E. coli* et *C. albicans*, avec des pourcentages d'inhibition de l'ordre de 69,6 et 63,9%, respectivement, en présence de la concentration la plus élevée (4 µg/ml) (Tableau 40a). De même dans le cas de post-traitement, des pourcentages anti-biofilms de 68,2 et 61,4%, ont été obtenus contre *C. albicans* et *E. coli*, respectivement (Tableau 40b). Concernant les biosurfactants produits par la souche CO100, les activités anti-adhésives les plus élevées ont été observées contre *C. albicans*, *S. aureus* et *B.cereus* (74,9; 66,8 et 62,7%, respectivement). Par contre, ils présentent des activités anti-biofilm importantes contre *S. aerus*, *P. aeruginosa* et *B. cereus* (70,3; 66,2 et 61,4%, respectivement) (Tableau 41). Les lipopeptides BS-PYR2 ont des activités anti- adhésives de 70,31 et 63% contre *S. typhimurum* et *E.coli*, respectivement. Des activités anti-biofilm de l'ordre de 61,1 et 56,3%, contre les microorganismes *S. aerus* et *P. aeruginosa* ont été notées dans le cas des lipopeptides BS-PYR2 (Tableau 42).

**Tableau 40.** Pourcentages de l'inhibition (pré-traitement) et de la perturbation (post-traitement) de la formation des biofilms microbiens sur la surface de polystyrène (plaque de microtitration, 96 puits), par BS-FLU5.

Bios. (µg/ml)	<i>Escherchia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella typhimurum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
<b>Pré-traitement (Activité anti-adhésive)</b>								
<b>4</b>	69,6 ± 2,1	51,2 ± 1,3	43,8 ± 0,8	44,8 ± 1,1	59 ± 1,8	38,54 ± 1,5	35,11 ± 1,2	63,9 ± 1,3
<b>2</b>	64,3 ± 1,4	50,5 ± 1,8	38,2 ± 2,2	42,3 ± 1,9	52,1 ± 2,1	35,5 ± 2,2	33,65 ± 1,4	60,6 ± 0,7
<b>1</b>	57,8 ± 1,3	46,4 ± 0,7	35,6 ± 1,2	37,2 ± 1,7	44,9 ± 1,7	31,23 ± 1,4	30,44 ± 1,7	57 ± 2,1
<b>0,5</b>	52,8 ± 0,8	42,6 ± 0,6	32,6 ± 1,2	31,4 ± 1,5	43,1 ± 1,2	27,47 ± 1,3	28,74 ± 2,1	51,5 ± 1,5
<b>0,25</b>	43,8 ± 1,2	36,9 ± 1,2	27,9 ± 1,3	26,6 ± 1,9	40,2 ± 2,3	20,85 ± 0,7	21,36 ± 2,4	45,5 ± 1,3
<b>0,125</b>	41,5 ± 1,7	28,3 ± 2,6	22,9 ± 1,66	23,5 ± 0,44	35,6 ± 2,47	15,64 ± 0,69	18,41 ± 0,43	45,4 ± 1,64
<b>0,062</b>	37 ± 2,4	25,7 ± 1,4	18,7 ± 1,3	19,8 ± 0,8	30,1 ± 2,2	13,97 ± 2,5	15,1 ± 1,2	42,5 ± 1,5
<b>0,031</b>	33,1 ± 1,1	22,1 ± 1,6	16,7 ± 2,1	16,4 ± 1,0	22,9 ± 1,8	11,5 ± 1,4	12,61 ± 2,3	35,4 ± 1,2
<b>0,015</b>	29,8 ± 2,3	18,9 ± 1,0	15 ± 2,1	10,6 ± 0,6	17,6 ± 2,3	8,54 ± 1,5	10,3 ± 1,2	31,5 ± 2,3
<b>Contrôle</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Post-traitement (Activité anti-biofilm)</b>								
<b>4</b>	61,4 ± 1,1	56,8 ± 1,3	53,4 ± 0,8	50,6 ± 1,7	35 ± 2,4	41,2 ± 1,2	44,3 ± 2,2	68,2 ± 1,8
<b>2</b>	54,7 ± 1,5	53,3 ± 1,2	50,9 ± 1,4	46,8 ± 1,5	33,5 ± 1,3	40,2 ± 1,3	42,7 ± 1,6	62,1 ± 1,7
<b>1</b>	50,8 ± 0,5	50,5 ± 0,6	45,4 ± 1,3	43,4 ± 1,8	31,5 ± 1,5	40,1 ± 2,1	39,3 ± 1,1	51,3 ± 1,2
<b>0,5</b>	50,1 ± 0,9	46,2 ± 0,5	38,4 ± 1,2	36,1 ± 1,9	26,2 ± 1,2	37,3 ± 2,0	38,4 ± 1,7	46,3 ± 1,4
<b>0,25</b>	44,6 ± 1,3	40,6 ± 1,1	36,7 ± 1,5	31,7 ± 2,2	23,3 ± 1,7	30,5 ± 0,9	35,7 ± 0,4	41,1 ± 0,6
<b>0,125</b>	40,9 ± 1,6	37,3 ± 1,7	32,5 ± 1,4	27,7 ± 2,4	20,2 ± 1,2	22,1 ± 1,2	28,36 ± 1,2	34,8 ± 0,9
<b>0,062</b>	35,3 ± 1,8	34,6 ± 0,3	26,8 ± 2,1	23,1 ± 0,7	15,9 ± 0,6	16,5 ± 1,7	14,74 ± 2,3	29,9 ± 1,1
<b>0,031</b>	33,1 ± 2,3	33,1 ± 2,2	20,5 ± 1,3	22,8 ± 0,7	13,1 ± 2,5	12,3 ± 1,9	11,4 ± 1,5	21,4 ± 1,7
<b>0,015</b>	23,2 ± 2,1	30,8 ± 2,6	19,4 ± 1,3	20,6 ± 1,5	10,7 ± 2,6	9,8 ± 1,5	7,6 ± 3,1	12,9 ± 1,4
<b>Contrôle</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tableau 41.** Pourcentages de l'inhibition (pré-traitement) et de la perturbation (post-traitement) de la formation des biofilms microbiens sur la surface de polystyrène (plaque de microtitration, 96 puits), par BS-CO100.

Bios. (µg/ml)	<i>Escherchia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella typhimurum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
<b>Pré-traitement (Activité anti-adhésive)</b>								
<b>4</b>	54,2 ± 0,3	45,3 ± 2,2	62,7 ± 2,1	47,5 ± 1,6	51 ± 1,3	66,8 ± 0,4	36,5 ± 1,8	74,9 ± 1,6
<b>2</b>	50 ± 1,0	41,8 ± 1,8	60,3 ± 1,4	46,8 ± 1,3	48,2 ± 0,8	62,7 ± 1,1	32,7 ± 1,9	73,2 ± 1,7
<b>1</b>	44,6 ± 1,2	37,4 ± 1,5	58,8 ± 1,3	40,9 ± 0,5	42 ± 0,6	54,7 ± 1,3	30,6 ± 2,4	70,9 ± 1,2
<b>0,5</b>	37,8 ± 1,3	32,22 ± 1,3	54,9 ± 0,8	37,8 ± 0,6	39,4 ± 1,5	46,2 ± 1,6	26,2 ± 1,8	67,2 ± 2,3
<b>0,25</b>	31,3 ± 0,6	30,8 ± 1,5	44,8 ± 1,2	35,5 ± 1,9	33,7 ± 1,8	37,5 ± 1,8	22,2 ± 1,8	62,9 ± 2,1
<b>0,125</b>	25,4 ± 1,4	27,56 ± 1,8	40,5 ± 1,8	32,6 ± 1,6	25,6 ± 1,7	31,3 ± 1,3	18,2 ± 1,9	54,8 ± 0,5
<b>0,062</b>	20 ± 2,4	21,74 ± 2,3	37,3 ± 0,4	30 ± 2,3	21,2 ± 0,3	27,4 ± 0,8	16,1 ± 2,5	48,9 ± 2,3
<b>0,031</b>	17,5 ± 1,7	16,5 ± 1,5	32,1 ± 1,2	27,4 ± 1,7	18,5 ± 2,4	25,9 ± 2,2	11,5 ± 1,36	40,8 ± 1,7
<b>0,015</b>	13,5 ± 2,1	10,6 ± 2,6	20,8 ± 3,3	26,1 ± 1,2	15 ± 1,2	23,1 ± 1,7	7,5 ± 1,6	27 ± 1,6
<b>Contrôle</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Post-traitement (Activité anti-biofilm)</b>								
<b>4</b>	50,3 ± 1,3	66,2 ± 1,1	61,4 ± 1,1	58,3 ± 1,2	55,1 ± 0,8	70,3 ± 2,1	47,2 ± 1,1	58,4 ± 1,5
<b>2</b>	50,1 ± 0,9	63,13 ± 2,1	54,7 ± 1,5	57,4 ± 0,9	44,5 ± 1,1	69,2 ± 0,6	42,1 ± 1,6	56,7 ± 2,0
<b>1</b>	45,7 ± 2,2	57,3 ± 1,1	50,8 ± 0,5	50,1 ± 1,5	43,4 ± 1,5	66,8 ± 0,9	40,43 ± 2,5	53,3 ± 1,3
<b>0,5</b>	44,3 ± 1,2	51,4 ± 1,6	50,1 ± 0,9	48,1 ± 1,3	41,7 ± 2,4	60,3 ± 1,3	36,2 ± 1,7	50,1 ± 1,5
<b>0,25</b>	33,2 ± 1,6	48,2 ± 0,3	44,6 ± 1,3	37,1 ± 1,7	40,8 ± 1,3	54,2 ± 1,5	31,7 ± 1,2	42,8 ± 1,1
<b>0,125</b>	30,1 ± 1,6	44,6 ± 2,4	40,9 ± 1,6	30,3 ± 1,1	35,9 ± 1,7	47,7 ± 1,2	28,2 ± 0,8	36,1 ± 0,9
<b>0,062</b>	20 ± 2,7	33,2 ± 1,9	35,3 ± 1,8	30 ± 1,7	26,9 ± 2,3	38,1 ± 1,5	26,3 ± 1,8	33,3 ± 0,6
<b>0,031</b>	17,5 ± 2,5	21,9 ± 1,7	33,1 ± 2,3	23,9 ± 2,9	21,7 ± 0,4	33,6 ± 1,4	21,4 ± 2,0	27,3 ± 1,5
<b>0,015</b>	13,5 ± 2,4	16,2 ± 1,42	23,2 ± 2,1	19,3 ± 2,2	19,4 ± 1,4	30,1 ± 2,7	15,4 ± 2,3	19,7 ± 0,8
<b>Contrôle</b>	0	0	0	0	0	0	0	0

**Tableau 42.** Pourcentages de l'inhibition (pré-traitement) et de la perturbation (post-traitement) de la formation des biofilms microbiens sur la surface de polystyrène (plaque de microtitration, 96 puits), par BS-PYR2.

Bios. (µg/ml)	<i>Esherchia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Salmonella typhimurum</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	<i>Candida albicans</i>
<b>Pré-traitement (Activité anti-adhésive)</b>								
<b>4</b>	63,1 ± 1,1	52,3 ± 1,2	43,2 ± 2,1	46,5 ± 2,4	70,3 ± 1,3	55,1 ± 1,7	45,6 ± 1,4	55,7 ± 1,3
<b>2</b>	57,5 ± 1,4	50,5 ± 0,9	40,7 ± 2,3	43,6 ± 1,9	63,7 ± 1,2	51,8 ± 1,5	42,4 ± 1,1	51,1 ± 2,1
<b>1</b>	53,9 ± 1,0	48,24 ± 2,0	38,1 ± 2,1	40,9 ± 1,1	60,4 ± 2,2	48,8 ± 1,6	38,7 ± 0,6	46,5 ± 0,7
<b>0,5</b>	51,4 ± 0,9	45,3 ± 1,8	35,2 ± 1,7	38,41 ± 1,9	54,32 ± 0,8	45,7 ± 1,5	32,1 ± 1,3	41,2 ± 1,6
<b>0,25</b>	47,7 ± 0,4	40,1 ± 0,7	32,7 ± 1,2	36,7 ± 1,1	50,66 ± 2,1	40,5 ± 2,4	27 ± 1,5	39,1 ± 1,6
<b>0,125</b>	42 ± 2,2	37,6 ± 1,4	30,2 ± 0,8	30,3 ± 2,1	41,7 ± 1,7	36,5 ± 0,6	23,4 ± 2,5	33 ± 1,8
<b>0,062</b>	36,4 ± 1,6	31,3 ± 2,1	28,3 ± 1,8	26,1 ± 1,9	37,3 ± 2,0	29,1 ± 0,7	19,6 ± 0,5	28,7 ± 0,7
<b>0,031</b>	33,2 ± 1,3	25,4 ± 2,4	25,4 ± 2,0	21,7 ± 2,2	30,7 ± 1,4	23,1 ± 1,1	15,8 ± 0,7	19,6 ± 1,3
<b>0,015</b>	29 ± 1,6	15,3 ± 1,3	19,4 ± 0,3	14,6 ± 3,1	21,1 ± 2,2	18,2 ± 1,8	10,8 ± 2,3	15,8 ± 2,2
<b>Contrôle</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Post-traitement (Activité anti-biofilm)</b>								
<b>4</b>	52,4 ± 1,6	56,31 ± 2,4	56,2 ± 1,1	38,1 ± 1,3	43,5 ± 1,8	61,1 ± 1,4	50,5 ± 2,3	45 ± 1,1
<b>2</b>	47,4 ± 2,6	53,11 ± 1,9	50,3 ± 2,5	36,5 ± 1,8	40,6 ± 2,1	58,9 ± 2,3	44,7 ± 1,6	44,4 ± 1,7
<b>1</b>	42,2 ± 1,4	48,4 ± 2,1	46,9 ± 1,7	31,4 ± 0,8	36,9 ± 1,8	54,5 ± 1,6	38,9 ± 1,3	41,4 ± 0,9
<b>0,5</b>	37,2 ± 1,2	42,23 ± 2,0	41,3 ± 1,2	27,6 ± 1,6	33,1 ± 1,2	47,5 ± 1,7	33,2 ± 1,2	39,2 ± 2,3
<b>0,25</b>	31,8 ± 1,2	38,7 ± 1,1	38,2 ± 1,3	25,9 ± 1,7	30,2 ± 2,3	40,3 ± 2,7	30,4 ± 1,2	31,8 ± 1,3
<b>0,125</b>	23,4 ± 0,6	32,9 ± 1,2	34,6 ± 2,2	21,3 ± 2,1	26,6 ± 1,2	34,8 ± 0,8	26,9 ± 1,2	25,7 ± 1,6
<b>0,062</b>	20,9 ± 0,6	26,17 ± 2,3	31,3 ± 1,8	18,7 ± 1,4	21,1 ± 1,2	27,1 ± 1,3	20,8 ± 1,4	21,3 ± 2,4
<b>0,031</b>	15,9 ± 1	20,36 ± 1,9	26,9 ± 1,8	15,3 ± 2,6	18,9 ± 1,4	25,7 ± 1,6	18,7 ± 1,3	17,9 ± 0,5
<b>0,015</b>	12,3 ± 2,5	18,64 ± 3,0	19,4 ± 2,4	11,9 ± 2	12,6 ± 0,9	22 ± 1,9	16,8 ± 1,2	13 ± 2,3
<b>Contrôle</b>	0	0	0	0	0	0	0	0



Les biosurfactants, étant des composés tensioactifs doués d'une activité interfaciale, peuvent induire une énergie alternative au niveau de surfaces et, également, s'ancrer dans la membrane de la paroi cellulaire, conduisant à la fuite des composants intracellulaires, et par conséquent, à la modification de l'hydrophobicité cellulaire (Elshikh *et al.*, 2016). Leur effet dépend de l'hydrophobicité bactérienne initiale ainsi que du type et de la concentration des biosurfactants. Par ailleurs, ces agents tensioactifs sont connus par leurs activités antibiotiques et anti-bactériennes, inhibant ainsi la croissance de bactéries à Gram négatif comme positif (Rivardo *et al.*, 2009).

Banat *et al.* (2014a), ont rapporté que la classe des lipopeptides est l'un des plus grands groupes de biosurfactants qui peut, efficacement, inhiber ou disperser les biofilms microbiens. Dans ce contexte, une étude a révélé que les lichenysines produites par la souche AL1.1 de *Bacillus licheniformis* sont dotées par des activités anti-biofilm et anti-adhésive intéressantes contre certains microorganismes pathogènes: *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Candida albicans* et *Campylobacter jejuni* (Coronel-León *et al.*, 2016). Les lipopeptides produits par *Bacillus cereus* NK1 ont montré également une réduction significative de la formation des biofilms par *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermis* (Sriram *et al.*, 2011). Une autre étude de Rivardo *et al.* (2011), a rapporté que deux lipopeptides produits par *Bacillus subtilis* V19T21 et *Bacillus licheniformis* V9T14 ont montré une activité anti-adhésive intéressante contre deux souches pathogènes de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Récemment, Chebbi *et al.* (2017a), ont souligné l'activité anti-adhésive et anti-biofilm des rhamnolipides (RHW10) produits par la souche W10 de *Pseudomonas aeruginosa* envers les souches CAN55 de *Bacillus licheniformis* et SH6 de *Staphylococcus capitis*.

### IX.3. Activité cicatrisante

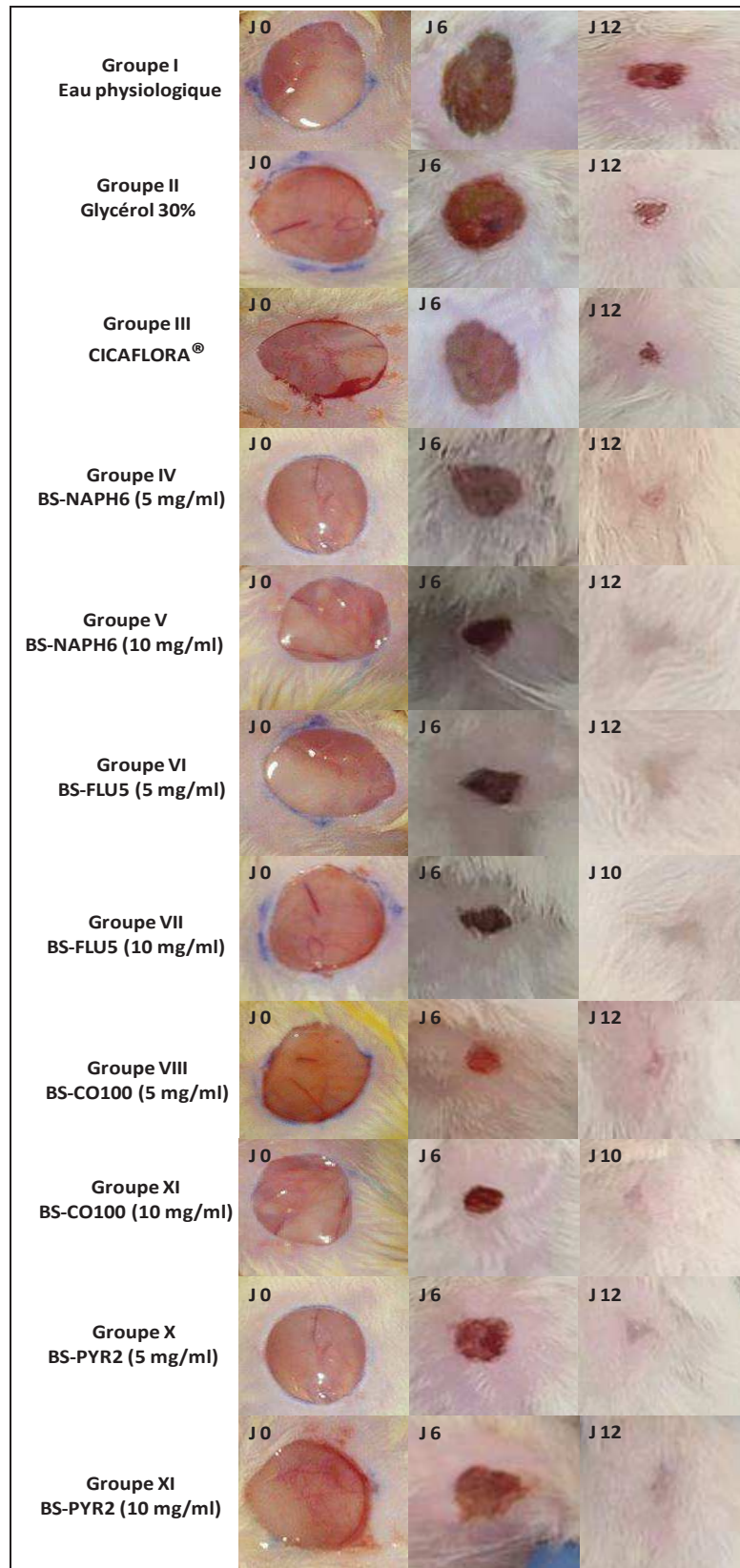
Malgré les progrès impressionnants de la médecine moderne, la disponibilité de médicaments stimulant le processus de cicatrisation est encore limitée (Zouari *et al.*, 2016). La recherche des nouveaux agents cicatrisants sûrs et efficaces justifie l'intérêt que porte l'industrie cosmétologique et pharmaceutique aux molécules bioactives d'origine microbienne (Mandal *et al.*, 2013). Les biosurfactants sont dotés de propriétés intéressantes potentiellement utiles dans l'industrie cosmétique en raison de ses propriétés de surface uniques, en exerçant des activités anti-rides et hydratantes sur la peau humaine. Ces biomolécules présentent, également des activités anti-microbiennes et anti-oxydantes intenses (Santos *et al.*, 2016). Cela ouvre la possibilité que des biosurfactants puissent être utilement

incorporés dans une large gamme de produits de soins de la peau à la place de surfactants chimiques (Marchant *et* Banat, 2012).

Dans ce contexte, l'évaluation du potentiel des biosurfactants produits par les souches, FLU5, NAPH6, CO100 et PYR2 en application cosmétique, l'activité cicatrisante, a été mise en évidence, en utilisant des rats mâles de race Wistar ayant subi une plaie mécanique. Ces rats ont été répartis en onze groupes, comme il est expliqué dans la partie matériel et méthodes.

### IX.3.1. Etude chromatique des plaies

Afin d'évaluer la qualité de la cicatrisation, les plaies ont été photographiées régulièrement durant la période de traitement. Nous avons pris les photographies au jour de l'incision mécanique qui fait induire la plaie (j 0), courant la phase de formation du tissu de granulation (j 6) et courant la phase de ré-épithélialisation (j 10- j 12) (Fig. 89). L'étude de l'évolution de la couleur des plaies chez les onze groupes a montré une coloration rouge vive similaire durant les trois premiers jours. Cette coloration s'est transformée à partir du troisième jour en rouge sombre indiquant la formation d'un caillot sanguin. Au cours du temps, le caillot du sang s'est transformé en une croûte qui s'est rétractée chez les rats recevant un traitement (Fig. 89). En outre, chez les rats non traitées, on a observé un bourrelet inflammatoire, qui donne naissance à un œdème se situant sur les berges de la plaie. A partir du 4<sup>ème</sup> jour du traitement, le processus de cicatrisation a été marqué par une réduction de la taille des croûtes distinguées par une coloration rouge foncée ou marron laissant place à une nouvelle épithélialisation, qui était plus avancée chez les groupes traités par les biosurfactants BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-CO100 et BS-PYR2 (Fig. 89). Une coloration rose pâle proche de la couleur d'une peau saine normale avec une surface lisse a été observée vers le 10<sup>ème</sup> jour pour les biosurfactants BS-FLU5 et BS-CO100 (10 mg/ml) et vers le 12<sup>ème</sup> jour du traitement pour les biosurfactants BS-FLU5 (5 mg/ml), BS-CO100 (5 mg/ml), BS-NAPH6 (5 et 10 mg/ml) et BS-PYR2 (5 et 10 mg/ml) (Fig. 89). Cet aspect est moins intense pour le groupe traité par le produit de référence CICAFLORA<sup>®</sup>. Par contre, les groupes traités par l'eau physiologique et par le glycérol 30%, ont montré, à la fin de l'expérimentation, une plaie ouverte avec des tissus de couleur rouge (Fig. 89).

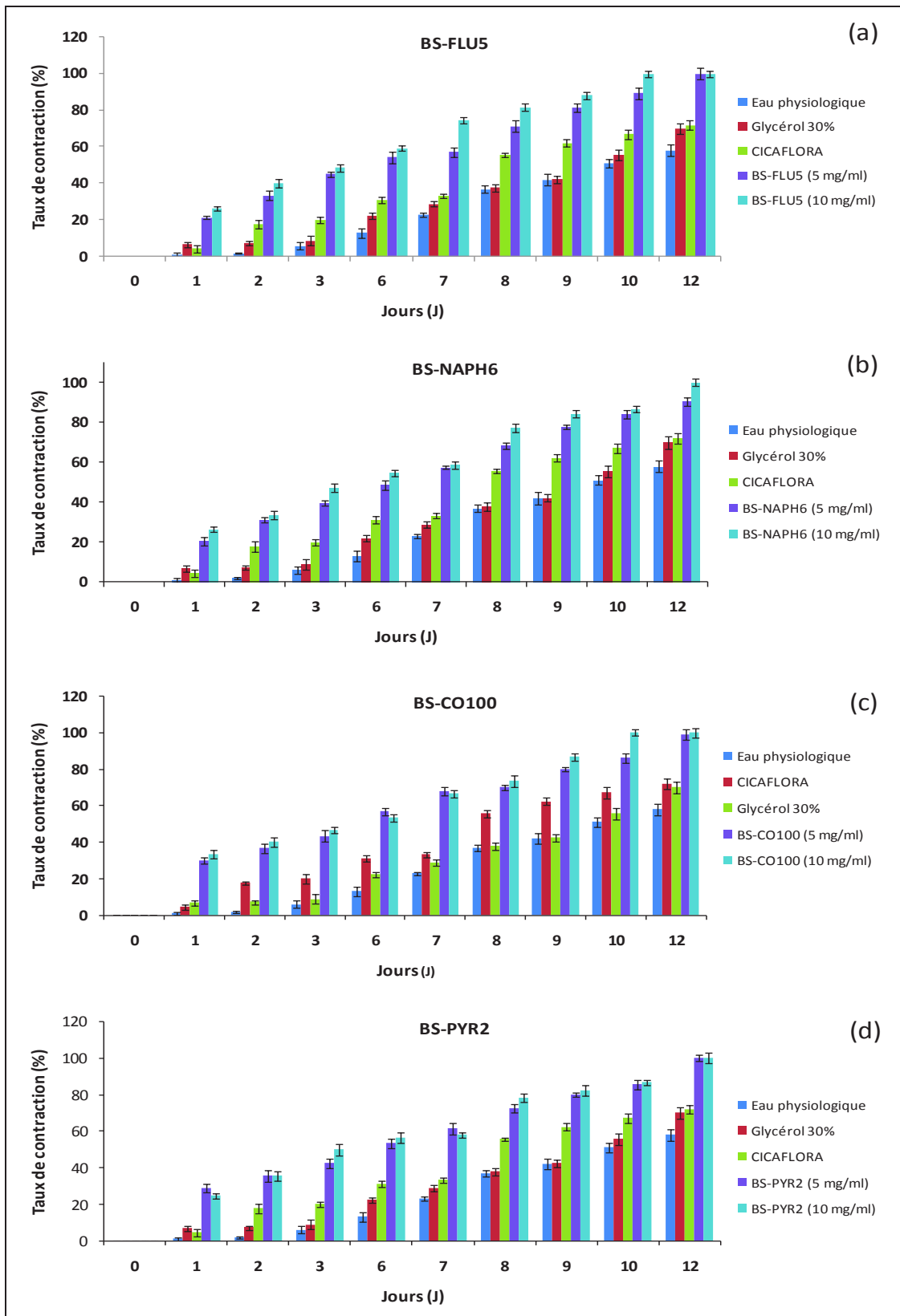


**Figure 89.** Photographies représentatives de l'aspect macroscopique des plaies le jour de l'incision et après 6,10 et/ou12 jours. Les groupes I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X et XI sont traités par l'eau physiologique, le glycérol (30%), CICAFLORA®, BS-FLU5 (5 mg/ml), BS-FLU5 (10 mg/ml), BS-NAPH6 (5 mg/ml), BS-NAPH6 (10 mg/ml), BS-CO100 (5 mg/ml), BS-CO100 (10 mg/ml), BS-PYR2 (5 mg/ml), et BS-PYR2 (10 mg/ml), respectivement.

### IX.3.2. Evaluation des superficies des plaies

Les taux moyens de contraction des plaies des différents groupes du jour de l'incision vers la fin du processus cicatriciel (0-12<sup>ème</sup> jours), sont illustrés dans la figure 90.

A partir des résultats obtenus, on peut conclure que les données de l'analyse chromatique qualitative des plaies, convergent avec ceux issus de l'évaluation quantitative (taux de clôture) du processus cicatriciel. En effet, durant la période du traitement (du jour de l'incision au 12<sup>ème</sup> jour), le taux moyen de contraction des plaies des rats témoins (eau physiologique) est de l'ordre de 58%. En outre, chez les rats traités par le glycérol et le produit de référence CICAFLORA<sup>®</sup>, les taux moyens de contraction ont été légèrement augmentés pour atteindre, respectivement, 70% et 72%. Cependant, le traitement des plaies avec les quatre biosurfactants BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-CO100 et BS-PYR2, en utilisant deux doses pour chacun (5 et 10 mg/ml), ont permis d'augmenter significativement le taux de contraction pour atteindre des pourcentages entre 90-100%. Nous remarquons que le taux de contraction est plus important en augmentant la dose en biosurfactants. En effet, les diamètres des plaies traitées avec la dose de 10 mg/ml de BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-CO100 et BS-PYR2 étaient inférieurs par rapport à celles traitées avec une dose de 5 mg/ml. De plus, il est à noter que BS-FLU5 et BS-CO100 (10 mg/ml) sont plus efficaces vu qu'ils atteignent la fin du processus cicatriciel au bout de 10 jours seulement contre 12 jours pour les autres (BS-FLU5 et BS-CO100 à 5mg/ml; BS-NAPH6 et BS-PYR2 à 5 et 10 mg/ml). À la fin de l'expérimentation, les rats non traités (eau physiologique) ont encore une plaie ouverte d'environ 58%. Cette constatation est en accord avec la littérature, dans laquelle il a été décrit que la contraction naturelle totale des plaies est atteinte au cours de la 21<sup>ème</sup> journée de la plaie (Lawrence, 1998).



**Figure 90.** Taux de contraction des plaies pour les différents groupes étudiés BS-FLU5 (a), BS-NAPH6 (b), BS-CO100 (c) et BS-PYR2 (d).

Il en ressort de ces résultats que les biosurfactants BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-CO100 et BS-PYR2, possèdent une activité cicatrisante intéressante et ils contribuent à une accélération du processus cicatriciel. Des études montrant l'efficacité d'utiliser des biosurfactants comme des agents cicatrisants, ont été rapportées. En effet, l'application du gel à base de biosurfactants de nature lipopeptidiques produits par la souche *Bacillus subtilis* SPB1 sur des plaies effectuées à des modèles de rats, a augmenté significativement le pourcentage de fermeture de la plaie pendant une période de 13 jours par rapport aux groupes traités par CICAFLORA® (Zouari *et al.*, 2016). Une autre étude réalisée par Santanu *et al.* (2018) a rapporté qu'une pommade à base des lipopeptides produits par la souche *Bacillus stratosphericus* A15 a amélioré la fermeture de la plaie (97%) en 10 jours par rapport au groupe témoin non traité (72%). De même, les rhamnolipides, en tant que composés tensioactifs, se sont révélés efficaces pour de nombreux traitements de la peau, comme la cicatrisation des plaies, la guérison du choc de brûlure et le traitement des rides (Randhawa *et Rahman*, 2014). Il a été décrit que les rhamnolipides produits par *Pseudomonas aeruginosa* ont présenté des effets puissants sur le traitement des cicatrices, appliquées sur un modèle d'oreille de lapin (Shen *et al.*, 2016).

Le pouvoir cicatrisant de ces agents tensioactifs pourrait être attribué à leur activité antimicrobienne, qui empêche la prolifération des microorganismes (Zouari *et al.*, 2016). Les biosurfactants sont donc capables de contrôler la charge microbienne au niveau des plaies, assurant ainsi une meilleure protection contre les infections possibles. De même, il a été montré que les biosurfactants sont doués d'un pouvoir antioxydant intéressant (Ben ayed *et al.*, 2015; Santanu *et al.*, 2017). Ceci peut assurer une prévention contre les dommages causés par les radicaux libres formés au cours de la phase inflammatoire et accélère ainsi la contraction des plaies. Par ailleurs, l'effet hémostatique des biosurfactants pourrait expliquer, également, l'effet cicatrisant de ces biomolécules. En effet, l'hémostase induit la stabilisation de la fibrine, un élément clef dans le processus initial de la cicatrisation. Elle, permet de recruter, par effet chimiotactique, les fibroblastes et stimuler la production de collagène par ces cellules (Zouari *et al.*, 2016).

En tant que produits naturels synthétisés par les microorganismes, les biosurfactants ont été proposés pour une utilisation dans les produits cosmétiques et pharmaceutiques, en raison de leur faible toxicité ainsi que leur biodégradabilité (Banat *et al.*, 2000). L'application externe des biosurfactants sur la peau de l'animal semblait être utile selon plusieurs études, suggérant ainsi la possibilité d'utiliser ces agents tensioactifs biologiques en toute sécurité



dans l'application externe humaine (Shen *et al.*, 2016). À cet égard, les biosurfactants BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-CO100 et BS-PYR2 pourraient être développés comme des médicaments anti-cicatrisants pour des applications potentielles à l'avenir.

## **X. Production des biosurfactants de la souche FLU5 à différentes échelles: «Scale-up»**

L'industrie des biosurfactants a connu une croissance remarquable au cours des dernières décennies, bien que la production à grande échelle de ces biomolécules reste un défi de point de vue économique. De nombreux critères sont demandés pour une production viable et rentable des biosurfactants, à l'instar: le type de matière primaire, les conditions de production en particulier le temps requis pour la fermentation, le marché cible, les propriétés de biosurfactant et les procédés de purification... (Santos *et al.*, 2016).

La souche FLU5 de *Bacillus stratosphericus* montre sa potentialité à produire des biosurfactants avec des caractéristiques tensioactives puissantes (faible CMC, réduction importante de tension de surface, grande stabilité *vis-à-vis* d'une large gamme de pH, température et salinité...), en utilisant une source de carbone bon marché (huile de friture résiduelle). Les analyses ESI et MALDI-TOF MS/MS montrent que les biosurfactants BS-FLU5 appartiennent à la famille des lipopeptides et en particulier aux surfactines. Il a été rapporté que les lipopeptides, et plus particulièrement les surfactines, sont reconnus comme étant des puissants biosurfactants, en raison de leurs propriétés fonctionnelles (activité de surface et activité émulsifiante) et biologiques (activités antibactérienne, antifongique, activité antiadhésive, activité anticoagulante, activité antivirale et activité anti-tumorale) (Ben ayed *et Nasri*, 2016). En outre, l'évaluation de la cytotoxicité des biosurfactants BS-FLU5, montre que ces biomolécules ne présentent pas d'effet toxique sur les cellules rénales humaines HEK, même à des concentrations élevées (1000 µg/ml).

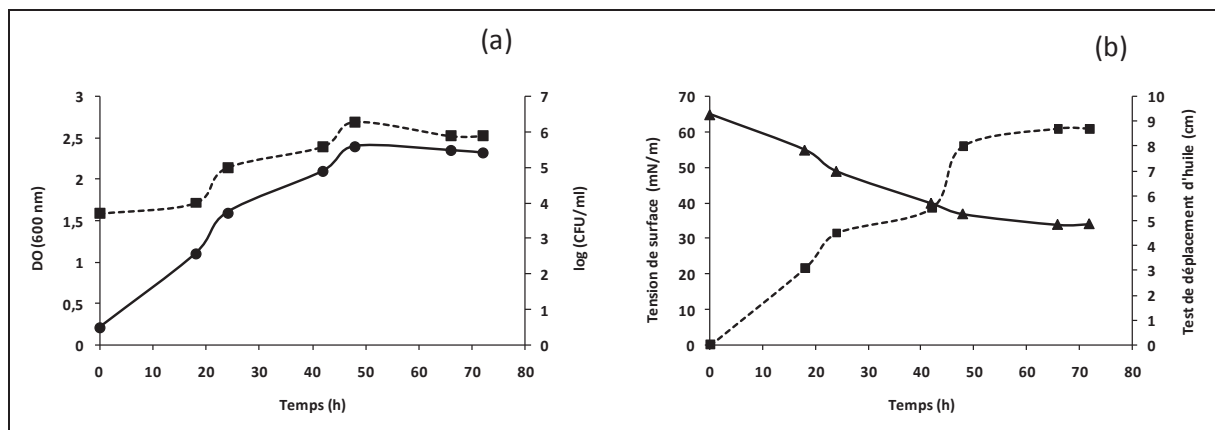
Vu les caractéristiques tensioactives intéressantes de BS-FLU5 et les travaux limités sur la production des lipopeptides par l'espèce *Bacillus stratosphericus*, la souche FLU5 a été choisie comme étant une bonne candidate pour une tentative de production des biosurfactants à grande échelle.

Le milieu de culture et la source de carbone utilisés, sont des facteurs critiques pour une production viable des agents tensioactifs à l'échelle industrielle (Santos *et al.*, 2016). En effet, le substrat peut représenter jusqu'à 50% des coûts de production totaux d'où l'importance du choix des sources de carbone alternatives peu coûteuses (De Almeida *et al.*, 2016). A cet

égard, un milieu économique nommé ME, a été choisi pour la production des agents tensioactifs par la souche FLU5.

Dans un premier temps, le suivi de la production des biosurfactants par la souche FLU5, sur le milieu économique ME, a été réalisé, à l'échelle laboratoire dans un Erlenmeyer de 1 litre (volume total), contenant 250 ml du milieu ME (volume utile).

Les cultures ont été suivies par mesure de la DO à 600 nm et par dénombrement sur milieu solide. La mesure de la tension de surface ainsi que le test de déplacement d'huile, ont été également réalisés pour mettre en évidence la production des agents tensioactifs par la souche FLU5. Les résultats montrent une augmentation de la biomasse de la souche FLU5, au cours de différents temps d'incubation:  $DO_{max} = 2,4$ ;  $\log(CFU/ml)_{max} = 6,3$ , après 48 h d'incubation (Fig. 91a).



**Figure 91.** Evaluation de la biomasse (DO (●), log (CFU/ml) (■)) (a), de la tension de surface (▲) et du test de déplacement d'huile (◆) (b), suite à des cultures de la souche FLU5, sur milieu ME (250 ml dans un Erlenmeyer de 1 litre), à 37 °C et à 180 rpm.

Les mesures de la tension de surface (TS) montrent une réduction intéressante allant de 65 mN/m jusqu'à 34 mN/m, après 66 h d'incubation (Fig. 91b). Le test de déplacement d'huile a montré également la formation d'un halo de diamètre de 8,7 cm, après 66 h d'incubation (Fig. 91b). La récupération des biosurfactants, BS-FLU5, produits par la souche FLU5 a été réalisée après 66 h. La quantité du biosurfactant brut récupérée est de l'ordre de 1,51 g/l.

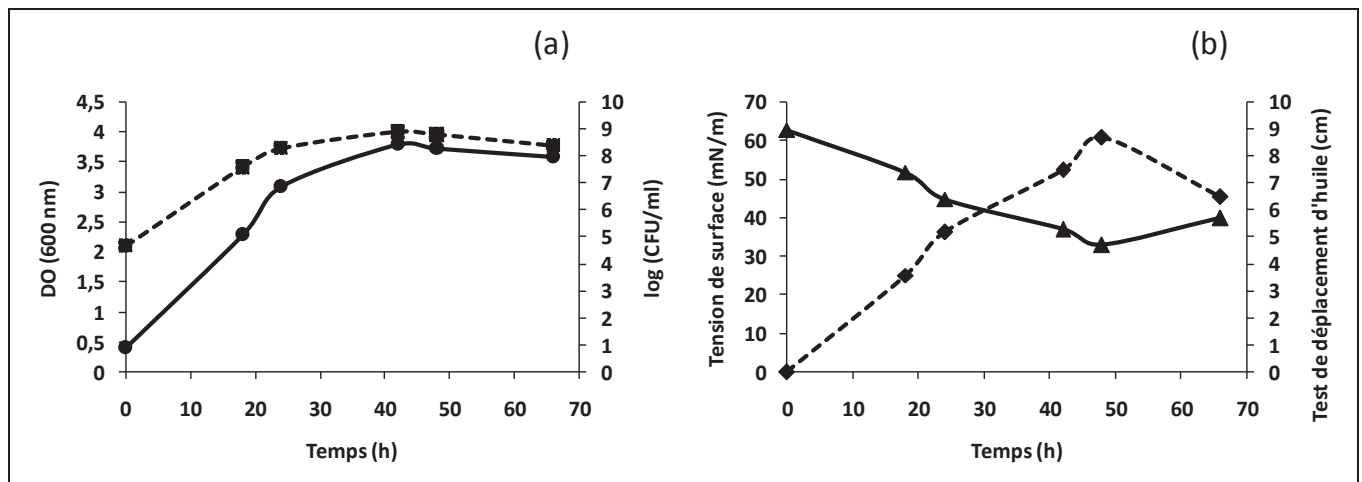
Les résultats obtenus sont prometteurs et encourageants pour envisager la production des biosurfactants BS-FLU5 à une échelle plus grande. Pour ce faire, un fermenteur de 20 litres (volume totale), a été utilisé pour la production de biosurfactants par la souche FLU5, en utilisant 5 litres du milieu ME (volume utile) (Fig. 92).





**Figure 92.** Fermenteur de 20 litres contenant 5 litres de culture FLU5 dans le milieu ME, à 37 °C.

Le suivi de la cinétique de croissance, montre une augmentation de la biomasse de la souche FLU5, au cours de différents temps d'incubation:  $DO_{max} = 3,8$ ;  $\log(CFU/ml)_{max} = 8,9$ , après 42 h d'incubation (Fig. 93a).



**Figure 93.** Evaluation de la biomasse (DO (●), log (CFU/ml) (■)) (a), de la tension de surface (▲) et du déplacement d'huile (◆) (b), suite à des cultures de la souche FLU5 dans un fermenteur de 20 litres contenant 5 litres de milieu ME, à 37 °C.

Par ailleurs, une diminution de la tension de surface a été marquée, allant de 63 mN/m jusqu'à 33 mN/m, après 48 h d'incubation (Fig. 93b). Le test de déplacement d'huile a montré également la formation d'un halo de diamètre de 8,7 cm, après 48 h d'incubation (Fig. 93b).

La récupération des biosurfactants produits par la souche FLU5 a été réalisée après 48 h. La quantité de biosurfactant brut récupérée est de l'ordre de 2,4 g/l (Fig. 94). Une

amélioration de la production des biosurfactants BS-FLU5 par rapport à l'échelle laboratoire en utilisant le même milieu ME (1,51 g/l, pour un volume de 250 ml , Erlenmeyer de 1 litre), a été notée.



**Figure 94.** Biosurfactant BS-FLU5 brut extrait après la fermentation de 5 litres.

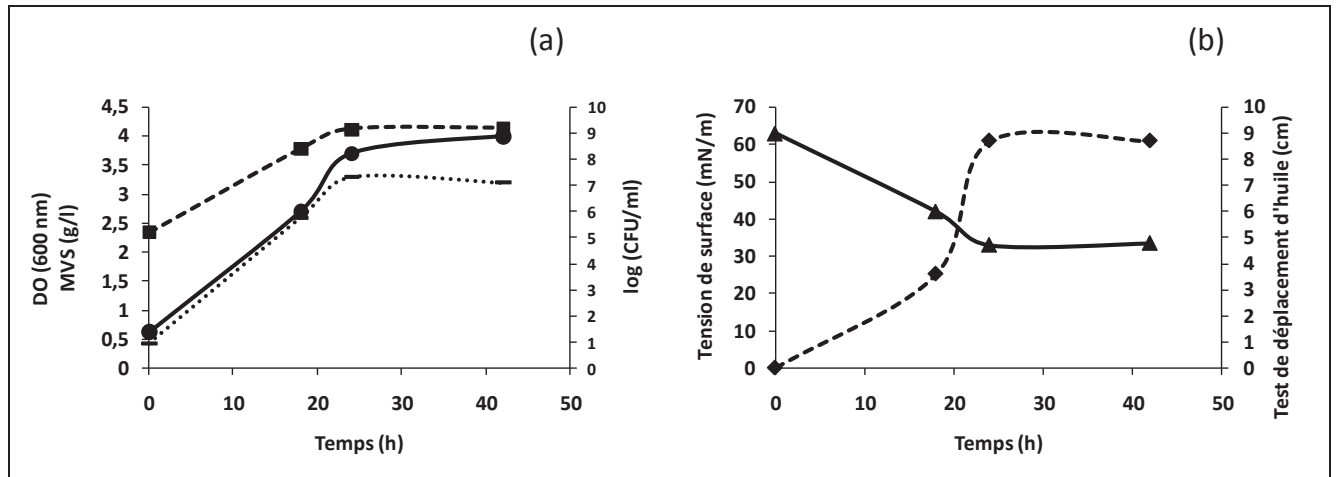
Suite à ces résultats pertinents, la production des biosurfactants BS-FLU5 a été réalisée en utilisant des volumes de culture plus grands. Dans ce contexte, un fermenteur de 100 litres (volume totale), a été utilisé pour faire la culture de la souche FLU5 dans 60 litres (volume utile) du milieu économique ME (Fig. 95).



**Figure 95.** Fermenteur de 100 litres contenant 60 litres de culture FLU5 dans le milieu ME, à 37°C.

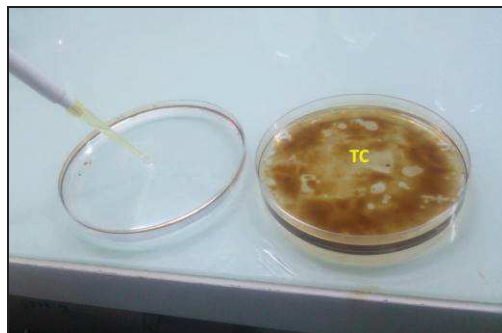
La croissance de la souche FLU5 a été suivie par mesure de la  $DO_{600nm}$ , du log (CFU/ml) et de la matière volatile en suspension. Les résultats montrent une augmentation importante de la biomasse FLU5, au cours des différents temps d'incubation:  $DO_{max} = 4$ ; log

(CFU/ml)<sub>max</sub> = 9,2 (Fig. 96a), après 42 h d'incubation. La valeur maximale de la matière volatile en suspension était de l'ordre de 3,3 (g/l) (24 h) (Fig. 96a).



**Figure 96.** Evaluation de la biomasse (DO<sub>600 nm</sub> (●), log (CFU/ml) (■) et MVS (-)) (a); de la tension de surface (▲) et du test de déplacement d'huile (◆) (b), suite à des cultures de la souche FLU5 dans un fermenteur de 100 litres contenant 60 litres du milieu ME, à 37 °C.

Par ailleurs, on constate une réduction de la tension de surface (allant de 63 mN/m à 33 mN/m), après 24 h et 42 h d'incubation (Fig. 96b). Le test de déplacement d'huile a montré la formation d'un halo de diamètre de 8,7 cm, après 24 h et 42 h d'incubation (Fig. 97).



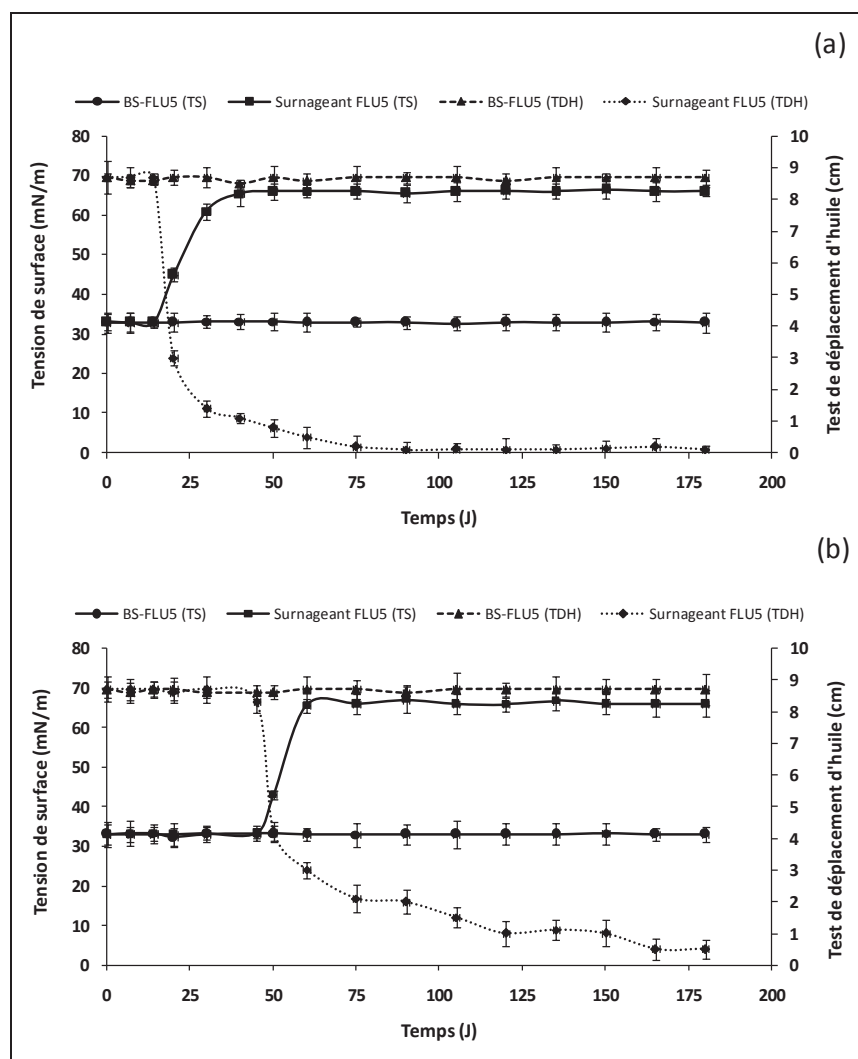
**Figure 97.** Test de déplacement d'huile réalisé avec le surnageant de la culture FLU5 sur le milieu ME, réalisée dans le fermenteur de 100 litres, après 42 h (a), en comparaison avec un témoin chimique (b).

La récupération de biosurfactants produits par la souche FLU5, cultivée dans le fermenteur de 100 litres, a été réalisée après 42 h d'incubation. La quantité de biosurfactant brut récupérée est de l'ordre de 3,5 g/l.

Une amélioration de la production des biosurfactants BS-FLU5 a été constatée tout en augmentant le volume de production. En effet, la tension de surface minimale (33 mN/m) est atteinte au bout de 24 h et de 42 h dans les fermenteurs de 100 et de 20 litres, respectivement. Aussi, le résultat du test de déplacement d'huile maximal (8,7 cm) est atteint au bout de 24 h et de 48 h dans les fermenteurs de 100 et de 20 litres, respectivement. En outre, la quantité des

biosurfactant produits a subi une augmentation remarquable allant de 1,51 g/l à l'échelle laboratoire (1 litre), à 3,5 g/l à un plus grand échelle (100 litres). Il a été démontré que l'agitation mécanique et l'apport de l'oxygène dissous en quantité suffisante améliorent la production des biosurfactants (Joshi *et* Desai, 2014).

La stabilité des biosurfactants bruts produits par la souche FLU5, ainsi que le surnageant de la culture FLU5 réalisée sur le milieu ME, dans le fermenteur de 100 litres, a été suivie, *vis-à-vis* de deux températures différentes (ambiante et 4 °C), pendant 6 mois. Le suivi de la stabilité a été réalisé par mesure de la tension de surface (TS) et du test de déplacement d'huile (TDH) (Fig. 98).



**Figure 98.** Etude de la stabilité des biosurfactants bruts produits par la souche FLU5, ainsi que les surnageants de la culture FLU5 réalisée sur le milieu ME dans le fermenteur de 100 litres, *vis-à-vis* de deux températures, ambiante (a) et 4 °C (b) pendant 6 mois.

Les résultats montrent que les biosurfactants bruts BS-FLU5, sont stables *vis-à-vis* de deux températures testées, (TS = 33 mN/m et TDH = 8,7 cm), pendant 180 jours. Cependant,

les surnageants de la culture FLU5, montrent une stabilité à 4 °C, pendant 45 jours (TS = 33 mN/m et TDH = 8,7 cm). Une augmentation de la tension de surface (TS = 43 mN/m) et une diminution du diamètre de l'halo formé lors du test de déplacement d'huile (TDH = 4,2), ont été observées après 50 jours, à 4 °C.

Par ailleurs, une modification des propriétés tensioactives des surnageants de la culture FLU5, a été également marquée, à la température ambiante, après 20 jours d'incubation (TS = 45 mN/m, TDH = 3 cm). Ceci, peut-être dû, à la prolifération des microorganismes et des moisissures à la surface de la culture, modifiant ainsi, les propriétés tensioactives des biosurfactants (Santos *et al.*, 2016). Il est nécessaire de soumettre ces biomolécules aux méthodes de conservation pour empêcher la modification de ses propriétés tensioactives. Ainsi, les méthodes de chauffage peuvent être utilisées afin d'inhiber la croissance des moisissures (Santos *et al.*, 2016). L'étude de la stabilité des biosurfactants BS-FLU5, *vis-à-vis* d'une large gamme de température, a montré qu'ils sont stables à 121 °C. Un cycle d'autoclavage (121 °C, pendant 20 min), peut être alors, envisagé pour conserver les biosurfactants BS-FLU5, pendant une période plus longue.

Selon nos connaissances, nous rapportons pour la 1<sup>ère</sup> fois la production des biosurfactants à grande échelle, par une souche affiliée à l'espèce *Bacillus stratosphericus*, en utilisant un milieu économique (ME). Par ailleurs, notre étude répond à plusieurs conditions demandées pour une production viable et rentable de biosurfactants: milieu économique permettant de diminuer au moins 50% du coût de production (De Almeida *et al.*, 2016), temps de fermentation relativement court (après 42 h d'incubation) et propriétés tensioactives intéressantes du biosurfactant produit (TS, TDH, stabilité...).

Une étude antérieure a rapporté la production des surfactines par la souche LB5a de *Bacillus subtilis*, en utilisant 40 litres (volume utile) des eaux usées de manioc, comme milieu de culture, dans un fermenteur de 80 litres (volume totale). La quantité des biosurfactants récupérée était de l'ordre de 2,4 g/l (après 24 à 36 h de fermentation) (Barros *et al.*, 2008; de Andrade *et al.*, 2016).

Le marché cible est d'une importance fondamentale pour l'implantation d'un projet de production des biosurfactants industriels. En effet, l'utilisation de bouillons de fermentation pourrait être une solution viable, surtout si l'application est dans un contexte environnemental, car les biosurfactants n'ont pas besoin d'être purs et peuvent être synthétisés en utilisant un mélange de sources de carbone bon marché, ce qui permettrait la création d'une technologie viable sur le plan économique et environnemental pour les processus de biorestauration. Pour les produits cosmétiques, médicaux et alimentaires, la production n'est viable qu'à petite

échelle, car les méthodes de chromatographie sur colonne nécessaires à la séparation des molécules ne sont pas économiques à grande échelle (Santos *et al.*, 2016). Puisque 60 à 80% des coûts totaux de production sont habituellement associés aux processus de collecte, de séparation et de purification. Il est devenu intéressant d'étudier comment remplacer les méthodes traditionnelles par des techniques alternatives efficaces et rentables pour la récupération et la purification des biosurfactants (de Andrade *et al.*, 2016; Najmi *et al.*, 2018).

## XI. Conclusion

Les quatre souches marines, FLU5, NAPH6, CO100 et PYR2, ont montré une grande capacité à synthétiser des agents tensioactifs (BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-CO100 et BS-PYR2), en utilisant des sources de carbone bon marché, en particulier l'huile de friture résiduelle, minimisant ainsi le coût élevé de la production de ces biomolécules. Les analyses par spectrométries de masse (ESI et MALDI-TOF), des biosurfactants BS-FLU5, BS-PYR2 et BS-CO100 purifiés, montrent qu'il s'agit des lipopeptides, les biosurfactants BS-NAPH6 sont de nature rhamnolipidique, sur la base des analyses FTIR. La caractérisation de ces biosurfactants montrent qu'ils sont doués des propriétés tensioactives puissantes: une faible CMC; réduction importante de la tension de surface, formation des halos de diamètres importants lors des tests de déplacement d'huile, grande stabilité *vis-à-vis* d'une large gamme de pH, de température et de salinité). Par ailleurs, l'évaluation de la cytotoxicité des biosurfactants étudiés, a montré qu'ils n'ont pas des effets toxiques sur des cellules rénales humaines HEK-239 à des concentrations jusqu'à 1000 µg/ml pour BS-FLU5 et BS-CO100 et jusqu'à 200 µg/ml pour BS-NAPH6 et BS-PYR2.

L'application des biosurfactants produits par les souches FLU5, NAPH6, CO100 et PYR2, dans la remobilisation des hydrocarbures présents dans un sol contaminé par l'huile de moteur usée, a montré qu'ils sont plus efficaces que des surfactants synthétiques (Tween 20, Tween 80, Triton x-100 et SDS). Les biosurfactants BS-FLU5, BS-PYR2 et BS-CO100, présentent des activités anti-adhésives et anti-biofilms intéressantes contre des biofilms d'une variété des microorganismes pathogènes. Par ailleurs, une bonne propriété cicatrisante sur des plaies d'excision chez un modèle expérimental des rats Wistar, a été montrée par les quatre bio-tensioactifs pour des concentrations de l'ordre de 5 et 10 mg/ml, en comparaison avec un cicatrisant de référence (CICAFLOA<sup>®</sup>).

Ces résultats, mettant en relief les caractéristiques originales de nos quatre surfactants biologiques, ouvrent la voie d'envisager une production des biosurfactants à une échelle plus



grande. La souche FLU5 a été choisie comme étant une bonne candidate pour une tentative de production des biosurfactants à une grande échelle. Ce choix a été basé sur plusieurs critères: propriétés tensioactives intéressantes de BS-FLU5, pas d'effet cytotoxique sur des cellules rénales humaines HEK, même à des concentrations élevées (1000 µg/ml), ces biosurfactants sont de nature lipopeptiques et en particulier des surfactines, classés parmi les surfactants biologiques les plus intéressants et les plus populaires, limitation des recherches rapportées sur la production des lipopeptides par l'espèce *Bacillus stratosphericus*. La production des biosurfactants à partir de la souche FLU5, en utilisant un milieu économique nommé ME, a été rapportée aux échelles suivantes: Erlenmeyer (1 litre volume final, 250 ml volume utile); Fermenteur semi-pilote (20 litre volume final, 5 litres volume utile) et fermenteur pilote (100 litres volume final, 60 litres volume utile). Les résultats montrent une amélioration des quantités des biosurfactants produits à grande échelle par rapport à l'échelle laboratoire.

L'ensemble de ces résultats, prometteurs, montrent que les tensioactifs biologiques BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-CO100 et BS-PYR2 demeurent d'intérêts biotechnologiques pour des applications dans divers domaines (l'environnement, la cosmétique, l'agroalimentaire...). La production des biosurfactants à grande échelle semble être, également, une stratégie intéressante pour l'industrialisation de nos produits.

Une partie de ces travaux a été valorisée par:

- ❖ Un brevet national d'invention (INNORPI), intitulé «Biosurfactants de *Bacillus stratosphericus*: Production, caractérisation et potentialités biotechnologiques». (2018). **Dorra Hentati**, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha. Référence TN2018/0098, 27 Mars 2018.
- ❖ Un article publié dans la revue “*Ecotoxicology and Environmental Safety*” (IF=3,974), intitulé «Production and characterization of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5» (2018). **Dorra Hentati**, Alif Chebbi, Fatma Hadrich, Ilhem Frikha, Francesc Rabanal, Sami Sayadi, Angeles Manresa & Mohamed Chamkha. 167: 441-449.
- ❖ Un article soumis dans la revue “*Environmental Sciences and Pollution Research*” (IF=2,8), intitulé: «Efficiency in biodegradation of hydrocarbons and biosurfactant production by a newly halotolerant *Pseudomonas* sp. strain isolated from contaminated seawater» (2018). **Dorra Hentati**, Asma Mahmoudi, Alif Chebbi, Fatma Hadrich, Ilhem Frikha, Sami Sayadi & Mohamed Chamkha.

Ecotoxicology and Environmental Safety 167 (2019) 441–449



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

## Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ecoenv](http://www.elsevier.com/locate/ecoenv)



### Production, characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5

Dorra Hentati<sup>a</sup>, Alif Chebbi<sup>a</sup>, Fatma Hadrich<sup>a</sup>, Ilhem Frikha<sup>a</sup>, Francesc Rabanal<sup>b</sup>, Sami Sayadi<sup>a</sup>, Angeles Manresa<sup>c</sup>, Mohamed Chamkha<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Environmental Bioprocesses, Centre of Biotechnology of Sfax, University of Sfax, PO Box 1177, 3018 Sfax, Tunisia

<sup>b</sup> Section of Organic Chemistry, Department of Inorganic and Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franquès, 1, 08028 Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Section of Microbiology, Department of Biology, Health and Environment, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain





**CONCLUSION GENERALE  
& PERSPECTIVES**

Le milieu marin côtier subit de nombreuses pollutions provenant de rejets directs (effluents urbains et industriels, déversements de pétrole...) et indirects (apports fluviaux et atmosphériques). Le littoral Sud de Sfax y compris les ports souffre d'une pollution presque généralisée qui menace sérieusement les ressources naturelles existantes dans la région (les sols, les aquifères et l'écosystème marin).

Notre étude a été menée sur des échantillons des eaux de mer de surface contaminées par des hydrocarbures provenant du port de plaisance (Chott Krekannah), du port de commerce et du port de pêche de la ville de Sfax, Tunisie, ainsi que des échantillons de sédiments de surface contaminés également par des hydrocarbures et ayant comme origine le port de pêche de Sfax. D'autres échantillons des eaux de mer prélevées à partir des zones présumées lointaines de la pollution de chaque port, ont été également collectés et considérés comme des témoins. Les prélèvements ont été réalisés au cours de la période 2013-2017 (93 échantillons en total).

Dans un premier volet, nous nous sommes intéressés au cours du 1<sup>er</sup> chapitre à la caractérisation physico-chimique des échantillons marins étudiés. Les résultats prouvent une contamination par des micropolluants organiques (hydrocarbures) et inorganiques (métaux) qui sont considérés comme des excellents traceurs de la pollution urbaine et industrielle et ils font partie des composés les plus toxiques étant donné leur faible biodégradation.

Par ailleurs, l'approche moléculaire PCR-SSCP a été utilisée pour caractériser la composition et la dynamique de la communauté microbienne (*Bacteria*, *Eucarya*, et *Archaea*) dans les différents échantillons marins étudiés. Les résultats SSCP montrent une dominance du domaine *Bacteria* suivie des domaines *Eucarya* et *Archaea*. Les profils SSCP révèlent que la structure de la communauté microbienne dans les différents échantillons étudiés était visuellement dynamique et non stable.

Des analyses statistiques moyennant le logiciel R, ont été réalisées dans le but d'établir une relation entre les résultats de PCR-SSCP du domaine *Bacteria* et les différents paramètres physico-chimiques des échantillons des eaux de mer et pour mieux évaluer l'effet de ces paramètres sur la composition de la communauté bactérienne. Nous notons qu'aucune corrélation n'a été identifiée entre la communauté bactérienne et les paramètres physico-chimiques. Ceci peut être expliqué par le fait que les paramètres physico-chimiques sont souvent assujettis à des variations aléatoires spatio-temporelles induites par des facteurs

naturels et par les activités anthropiques qui modifient les caractéristiques de l'eau et qui affectent, par conséquent, la biodiversité microbienne de cet écosystème.

La méta-analyse de certains échantillons marins (Sédiment et eaux), en utilisant des techniques de séquençage haut-débit (Pyroséquençage et Illumina MiSeq), a révélé la dominance des taxons hydrocarbonoclastes (*Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Idiomarina*, *Planctomycetes*, *Donghicola*, *Oleibacter*, *Gramella*, *Vibrio*, *Winogradskyella*...), dans les différents échantillons étudiés. Ces microorganismes ont été décrits fréquemment dans la littérature pour leurs capacités à dégrader les hydrocarbures, montrant leur rôle dans l'atténuation naturelle de ces contaminants dans les environnements marins anthropisés.

Les hydrocarbures, et en particulier les HAPs, sont considérés comme des contaminants prioritaires des écosystèmes marins à cause de leur caractère récalcitrant et leur activité mutagène et/ou cancérigène (Duran *et* Cravo-Laureau, 2016). La biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes est considérée comme le processus principal d'élimination de ces contaminants (Nikitha *et al.*, 2017). Les sites contaminés par ces composés (hydrocarbures) sont des biotopes prometteurs pour isoler des microorganismes doués des potentialités biodégradatives intéressantes. Ainsi, la deuxième partie de ce travail a porté sur l'isolement et la caractérisation des bactéries hydrocarbonoclastes. Les travaux de recherche ont été menés sur quatre souches bactériennes aérobies: FLU5 et NAPH6, isolées à partir des eaux de mer provenant du port de pêche de Sfax, après des enrichissements sur le fluoranthène et le naphthalène, respectivement, et PYR2 et CO100 isolées à partir des sédiments marins provenant du port de pêche de Sfax, après des enrichissements sur le pyrène et le pétrole brut, respectivement.

La souche FLU5 possède des capacités biodégradatives sur le fluoranthène, un HAP composé de trois noyaux aromatiques et d'un cyclopentane, en l'absence de l'extrait de levure et en présence de 30 g/l NaCl. Les caractérisations phénotypiques et phylogénétiques montrent que la souche FLU5 est membre du genre *Bacillus* et qu'elle est étroitement liée à l'espèce *Bacillus stratosphericus* (similarité de l'ARNr 16S de 99,66%). Les analyses GC-MS montrent que la souche FLU5 est capable de dégrader 44,5% du fluoranthène (100 mg/l) au bout de 30 jours d'incubation. En plus, la souche FLU5 dégrade presque 94,5% de la fraction aliphatique présente dans le pétrole brut, au bout de 20 jours d'incubation. FLU5 montre aussi une grande capacité de métaboliser une large gamme d'hydrocarbures aliphatiques,

aromatiques et complexes (octane, BTEX, acide gallique, pyrène, pétrole brut, mazout,...), utilisés comme seules sources de carbone et d'énergie.

La deuxième souche NAPH6 est capable de dégrader le naphthalène, un HAP composé de deux noyaux aromatiques, utilisé comme seule source de carbone et d'énergie. Les caractérisations phénotypiques et phylogénétiques montrent que la souche NAPH6 est membre du genre *Pseudomonas* et qu'elle est étroitement reliée à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* (similarité de l'ARNr 16S de 99,86%). Cette souche montre des potentialités biodégradatives intéressantes sur le naphthalène, en l'absence de l'extrait de levure et en présence de 30 g/l NaCl. Les analyses GC-MS montrent que la souche NAPH6 est capable de dégrader la totalité du naphthalène (200 mg/l) au bout de 7 jours d'incubation à 37 °C. La souche NAPH6 est capable également de croître sur le pétrole brut (1%, v/v), en présence de 30 g/l NaCl. Les analyses GC-MS montrent qu'elle est capable de dégrader presque la totalité des hydrocarbures aliphatiques (98,2%) présents dans le pétrole brut (1%, v/v), au bout de 20 jours d'incubation à 37 °C. La souche NAPH6 montre également une capacité remarquable de croître sur d'autres hydrocarbures polyaromatiques: phénanthrène, fluoranthène, pyrène.

La souche PYR2 montre sa capacité de croître sur le pyrène, un HAP composé de 4 noyaux aromatiques, en l'absence de l'extrait de levure et en présence de 30 g/l NaCl, à 37 °C. Les caractérisations phénotypiques et phylogénétiques montrent que la souche PYR2 est membre du genre *Bacillus* et qu'elle est étroitement reliée à l'espèce *Bacillus licheniformis* (similarité de l'ARNr 16S de 99%). Les analyses GC-FID montrent que la souche PYR2 est capable de dégrader 42,1% du pyrène (200 mg/l) au bout de 30 jours d'incubation.

La souche CO100 montre des potentialités biodégradatives intéressantes sur le pétrole brut (1%, v/v) présent dans le milieu minimum, sans l'ajout de l'extrait de levure et en présence de 100 g/l NaCl. Les études phénotypiques et phylogénétiques préliminaires (en se basant sur 750 pb de la séquence du gène de l'ARNr 16S de la souche CO100), montre qu'elle appartient au genre *Staphylococcus*. Les analyses GC-MS prouvent que la souche CO100 est capable de dégrader 72% des hydrocarbures aliphatiques présents dans le pétrole brut (1%, v/v), au bout de 20 jours d'incubation à 37 °C. La souche CO100 montre également une capacité remarquable de croître sur d'autres sources de carbone (phénanthrène, fluoranthène, pyrène, mazout, huile de moteurs usée, huile de friture résiduelle, glycérol...).

Les souches FLU5, NAPH6, PYR2 et CO100, ont montré des potentialités biodégradatives intéressantes sur des hydrocarbures et en particulier sur des HAPs, en présence des concentrations élevées en NaCl (30 ou 100 g/l). Ceci, prouve que ces souches

hydrocarbonoclastes pourraient être de bonnes candidates utilisées dans la biorestauration des environnements salins sans besoin de dilution coûteuse du sol et de l'eau chargés en sel.

Les hydrocarbonoclastes, très recherchés pour être appliqués en bioremédiation, sont considérés comme des candidats potentiels pour produire des agents tensioactifs. En effet, vu la faible solubilité des hydrocarbures dans le milieu aqueux, les biotensioactifs présentent un grand intérêt puisqu'ils peuvent contribuer à accélérer la vitesse de dégradation des hydrocarbures au cours de la bioremédiation (Banat *et al.*, 2000). Ces bactéries peuvent produire des biosurfactants solubilisant, ainsi, les composés hydrocarbonés en les rendant plus accessibles à l'attaque microbienne. Dans ce cadre, nous nous sommes intéressés dans une 3<sup>ème</sup> partie du travail à suivre une éventuelle production de biosurfactants par nos 4 souches sélectionnées FLU5, NAPH6, PYR2 et CO100, durant leur croissance sur différentes sources de carbone (huile d'olive, huile de maïs, huile de friture résiduelle, margine, mélasse, lactosérum, lait en poudre périmé, huile de moteurs usée...), en réalisant la mesure de la tension de surface et le test de déplacement d'huile. Le premier critère utilisé dans la littérature pour suivre la production de biosurfactants est la réduction de la tension de surface. Au cours de la croissance des 4 souches sur différentes sources de carbone, une diminution de la tension de surface (TS) a été constatée. Le test de déplacement d'huile montre aussi la formation des halos de diamètres importants en présence de certains substrats. Les souches FLU5, NAPH6, PYR2 et CO100 montrent une grande capacité à produire des biosurfactants sur la plupart des substrats testés, et en particulier sur l'huile de friture résiduelle, qui est une source de carbone bon marché, minimisant ainsi le coût élevé de production de ces tensioactifs. Les biosurfactants peuvent être produits sur des ressources agricoles et de déchets renouvelables réduisant ainsi de façon significative le coût de production. Le substrat peut représenter jusqu'à 50% des coûts de production totaux d'où l'importance du choix des sources de carbone alternatives peu coûteuses (De Almeida *et al.*, 2016).

Les concentrations micellaires critiques (CMCs) des biosurfactants bruts produits par les souches FLU5, NAPH6, CO100 sur l'huile de friture résiduelle (1%, v/v) et PYR2 sur le bouillon nutritif (BN) sont de l'ordre de 0,25; 0,2; 0,75 et 0,25 g/l, respectivement.

L'étude de la stabilité des biosurfactants produits par les souches FLU5, NAPH6, PYR2 et CO100 montrent qu'ils sont stables *vis-à-vis* de la température (de 4 jusqu'à 121°C pour BS-FLU5, BS-NAPH6 et BS-PYR2 et de -20 jusqu'à 121°C pour BS-CO100), du pH (de 2,1 à 12 pour BS-FLU5, de 4,2 à 12 pour BS-NAPH6; de 2,1 à 12 pour BS-PYR2 et de 4,3 à 12 pour BS-CO100) et de la salinité (de 0 à 120 g/l NaCl pour BS-FLU5; de 0 à 150 g/l NaCl

pour BS-NAPH6; de 0 à 200 g/l NaCl pour BS-PYR2 et de 0 à 300 g/l NaCl pour BS-CO100).

La stabilité élevée de différents biosurfactants étudiés *vis-à-vis* des hautes températures, est très demandée dans le cas d'application des surfactants biologiques dans des produits cosmétiques, alimentaires et pharmaceutiques, où le chauffage est réalisé pour obtenir la stérilité (Khopade *et al.*, 2012). Par ailleurs, la stabilité des biosurfactants *vis-à-vis* de la salinité et du pH est un critère bien recherché pour des applications biotechnologiques, comme en bioremédiation, par exemple.

Les biosurfactants produits par les 3 souches bactériennes FLU5, PYR2 et CO100 ont été purifiés par chromatographie sur colonne de gel de silice et par chromatographie sur couche mince (CCM). Les analyses de spectrométrie de masse ESI/MS montrent que les biosurfactants produits par ces souches appartiennent à la famille des lipopeptides. En comparant les masses trouvées avec des masses indiquées pour des complexes lipopeptidiques produits à partir d'autres souches, on peut constater que les souches FLU5 et PYR2 produisent des surfactines et des lichenysines, respectivement, alors que la souche CO100 produit des iturines et des lichenysines. En revanche, la souche NAPH6 produit des biosurfactants de nature rhamnolipidique, sur la base des analyses FTIR.

Afin d'évaluer la cytotoxicité des biosurfactants bruts produits par les 4 souches FLU5, NAPH6, PYR2 et CO100 sur le bouillon nutritif (BN), la viabilité des cellules rénales humaines HEK (Human Embryo Kidney 293) a été déterminée après traitement des cellules avec différentes concentrations pour chaque biosurfactant (0-1000 µg/ml) durant 24 h et 48 h. Les résultats montrent que pour toutes les concentrations testées de BS-FLU5 et BS-CO100, le taux de viabilité des cellules HEK traitées est supérieur à 80%. Conformément à l'ISO 10993-5, 2009, lorsque la viabilité cellulaire présente plus de 80%, le produit testé peut être considéré comme non toxique (ISO Report, 2009). Les biosurfactants BS-NAPH6 et BS-PYR2 ne présentent pas d'effet toxique, à des concentrations inférieures ou égales à 200 µg/ml.

Les résultats obtenus qui mettent en relief les propriétés tensioactives intéressantes des biosurfactants BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-PYR2 et BS-CO100, pourraient encourager la possibilité de l'utilisation de ces produits biologiques dans diverses applications. Dans ce contexte, des essais d'applications des biosurfactants étudiés ont été réalisés: remobilisation des hydrocarbures contenus dans des sols, activité cicatrisante, ainsi que des activités anti-adhésive et anti-biofilm.

Les effets des biosurfactants produits par les souches FLU5, NAPH6, CO100 et PYR2 sur la solubilisation des hydrocarbures présents dans un sol contaminé par l'huile de moteurs usée, en les comparant avec des surfactants chimiques (Tween 20, Tween 80, Triton x-100, et SDS), ont été réalisés. Les résultats obtenus montrent un effet de remobilisation plus important provoqué par les tensioactifs biologiques que les tensioactifs chimiques.

Par ailleurs, l'effet cicatrisant des biosurfactants issus des quatre souches FLU5, NAPH6, PYR2 et CO100 a été évalué *in vivo*, sur des rats de race Wistar ayant subi une plaie mécanique (une excision cutanée dorsale de 1,5 cm × 1 cm). Les résultats montrent que les quatre bio-tensioactifs possèdent une dynamique de cicatrisation plus efficace que celle du produit de référence CICAFLORA®.

En outre, l'application des biosurfactants BS-FLU5, BS-PYR2 et BS-CO100 dans la prévention (pré-traitement) et l'élimination (post-traitement), des biofilms microbiens qui sont considérés comme une source de problèmes tant dans le domaine médical que dans l'industrie ou même l'environnement, a été réalisée. Les résultats obtenus montrent que les biosurfactants testés ont des activités anti-biofilm et anti-adhésive importantes contre la formation des biofilms d'une variété des microorganismes testés: bactéries à gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurum* ATCC 14028 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883); bactéries à gram positif (*Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Résistante à la méthicilline) ATCC 43300 et *Enterococcus faecalis* ATCC 29216) ainsi que la levure *Candida albicans* ATCC 10231.

Au vu de ces résultats pertinents, les souches FLU5, NAPH6, PYR2 et CO100 ainsi que leurs biosurfactants demeurent prometteurs et pourraient être utilisés avec succès dans divers applications biotechnologiques. Ils peuvent servir pour performer les stratégies de bioremédiation des eaux et des sédiments marins contaminés par des hydrocarbures, ainsi que d'autres applications tels que l'agroalimentaire, la cosmétique, l'agriculture, etc...

La production des biosurfactants à partir de la souche FLU5, en utilisant un milieu économique nommé ME, a été rapportée aux échelles suivantes: Erlenmeyer (1 litre volume final, 250 ml volume utile); Fermenteur semi-pilote (20 litres volume final, 5 litres volume utile) et fermenteur pilote (100 litres volume final, 60 litres volume utile). Les résultats montrent une amélioration des quantités des biosurfactants produits à grande échelle par rapport à l'échelle laboratoire.



A l'issue de notre travail de recherche, plusieurs perspectives peuvent être dégagées afin de compléter, approfondir et renforcer les résultats obtenus.

Dans le but d'améliorer la production des biosurfactants BS-FLU5, une optimisation des procédés de fermentation, en utilisant des plans d'expériences adéquats, pourrait être d'un grand intérêt. Egalement, une adéquation des milieux de culture des autres souches NAPH6, PYR2 et CO100, ainsi la production des biosurfactants, à une grande échelle, pourraient être envisagées. Par ailleurs, il serait intéressant de faire une expression hétérologue des gènes codant pour la synthèse des biosurfactants dans différents systèmes d'expression, afin de surproduire les biosurfactants sur une grande échelle. Le séquençage des génomes complets des souches isolées, permettra d'identifier les gènes responsables de la biodégradation des hydrocarbures et de la production des biosurfactants.

Il serait judicieux de réaliser une étude du coût et de la rentabilité de production de biosurfactants à une échelle pilote, pour garantir une production viable de ces biomolécules. Par ailleurs, la réalisation des applications de remobilisation et de biodégradation des HAPs et des hydrocarbures complexes, à grande échelle, moyennant des cultures bactériennes hydrocarbonoclastes, ainsi que leurs biosurfactants, pourrait être projetée.

En plus, des analyses biochimiques, histologiques et physiologiques, suite à la cicatrisation par les biosurfactants, pourraient être réalisées, afin de vérifier la bonne néoformation tissulaire; et garantir l'efficacité de l'application cutanée des surfactants biologiques, en sécurité.

Les études de microbiologie environnementale visant l'effet des hydrocarbures sur la composition de la communauté microbienne se sont focalisées, généralement, sur la réponse des communautés bactériennes, les archées et les eucaryotes étant beaucoup moins étudié. Il serait donc, intéressant, d'étudier la réponse de ces communautés, à la contamination aux hydrocarbures. Par ailleurs, la contamination aux hydrocarbures dans les milieux côtiers est souvent associée à des pollutions par les éléments traces métalliques. Ces contaminations, peuvent avoir une influence sur la composition de la communauté microbienne plus importante que les hydrocarbures (Bayen, 2012; Sun *et al.*, 2013; Jeanbille, 2015). Ainsi, l'étude de la réponse de la communauté microbienne au sein de nos échantillons marins, *vis-à-vis* des métaux, en utilisant des technologies de séquençage haut-débit, semble être d'un grand intérêt.



# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Remarque :** Cette partie à été réalisée à l'aide du logiciel **EndNote® (Bld 4094)**, (<http://www.endnote.com>) en respectant les abréviations des titres des journaux selon les instructions mentionnées dans le site **Index Medicus** ([http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms\\_cond.html](http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html)).

- Abdel-Mawgoud, A.M., Aboulwafa, M.M., Hassouna, N.A.-H. 2008. Characterization of Surfactin Produced by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **150**(3), 289-303.
- Abdel-Mawgoud, A.M., Lépine, F., Déziel, E. 2010. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **86**(5), 1323-1336.
- Abouhend, A.S., El-Moselhy, K.M. 2015. Spatial and seasonal variations of heavy metals in water and sediments at the Northern Red Sea Coast. *American Journal of Water Resources*, **3**(3), 73-85.
- Abouseoud, M., Yataghene, A., Amrane, A., Maachi, R. 2008. Biosurfactant production by free and alginate entrapped cells of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, **35**(11), 1303-1308.
- Acosta-González, A., Marqués, S. 2016. Bacterial diversity in oil-polluted marine coastal sediments. *Current Opinion in Biotechnology*, **38**, 24-32.
- Adedosu, T.A., Adedosu, H.O., Sojinu, O.S., Olajire, A.A. 2013. N-Alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) profile of soil from some polluted sites in Niger Delta, Nigeria. *Environmental Earth Sciences*, **68**(8), 2139-2144.
- Adeniji, A.O., Okoh, O.O., Okoh, A.I. 2017. Petroleum Hydrocarbon Profiles of Water and Sediment of Algoa Bay, Eastern Cape, South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **14**(10), 1263.
- Aislabie, J., McLeod, M., Fraser, R. 1998. Potential for biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross Dependency, Antarctica. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **49**(2), 210-214.
- Al-Abdali, F., Massoud, M., Al-Ghadban, A. 1996. Bottom sediments of the Arabian Gulf—III. Trace metal contents as indicators of pollution and implications for the effect and fate of the Kuwait oil slick. *Environmental Pollution*, **93**(3), 285-301.
- Al-Mailem, D.M., Sorkhoh, N.A., Al-Awadhi, H., Eliyas, M., Radwan, S.S. 2010. Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. *Extremophiles*, **14**(3), 321-328.
- Al-Said, T., Naqvi, S., Al-Yamani, F., Goncharov, A., Fernandes, L. 2018. High total organic carbon in surface waters of the northern Arabian Gulf: Implications for the oxygen minimum zone of the Arabian Sea. *Marine pollution bulletin*, **129**(1), 35-42.
- Ali, H.R., El-Gendy, N.S., Moustafa, Y.M., Roushdy, M.I., Hashem, A.I. 2012. Degradation of Asphaltenic Fraction by Locally Isolated Halotolerant Bacterial Strains. *ISRN Soil Science*, **2012**, 11.
- Ali Khan, A.H., Tanveer, S., Alia, S., Anees, M., Sultan, A., Iqbal, M., Yousaf, S. 2017. Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation. *Ecological Engineering*, **104**, 158-164.
- Aloulou, F., Kallel, M., Dammak, M., Elleuch, B., Saliot, A. 2010. Even-numbered n-alkanes/n-alkenes predominance in surface sediments of Gabes Gulf in Tunisia. *Environmental Earth Sciences*, **61**(1), 1-10.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological reviews*, **59**(1), 143-169.
- Amiard-Triquet, C., Burgeot, T., Claisse, D. 1999. La surveillance de la qualité du milieu marin: l'expérience du Réseau national d'observation (RNO) et le développement de biomarqueurs. *Océanis*, **25**(4), 651-684.
- Anderson, J.W., Lee, R.F. 2006. Use of biomarkers in oil spill risk assessment in the marine environment. *Human and Ecological Risk Assessment*, **12**(6), 1192-1222.
- Anjum, F., Gautam, G., Edgard, G., Negi, S. 2016. Biosurfactant production through *Bacillus* sp. MTCC 5877 and its multifarious applications in food industry. *Bioresource Technology*, **213**, 262-269.
- ANPE, Agence nationale de protection de l'environnement 2012. Manuel de procédures du pniu pour lutter contre les événements de pollution marine. Réf: AF 02-10. p 30-59.
- Aparna, A., Srinikethan, G., Smitha, H. 2012. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **95**, 23-29.
- Austad, T., Taugbøl, K. 1995. Chemical flooding of oil reservoirs 2. Dissociative surfactant-polymer interaction with a negative effect on oil recovery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **103**(1-2), 73-81.

- Avoine, J. 1981. L'estuaire de la Seine : sédiments et dynamique sédimentaire. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Caen. p. 236.
- Azubuike, C.C., Chikere, C.B., Okpokwasili, G.C. 2016. Bioremediation techniques–classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **32**(11), 180.
- Bahuguna, A., Lily, M.K., Dangwal, K., Munjal, A., Singh, R.N. 2012. Degradation of Naphthalene by a novel strain *Bacillus licheniformis* BMIT5ii (MTCC 9446). *Journal of Pharmacy Research Vol*, **5**(3), 1600-1604.
- Baldwin, B.R., Nakatsu, C.H., Nies, L. 2003. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(6), 3350-3358.
- Banat, I.M., De Rienzo, M.A.D., Quinn, G.A. 2014a. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. *Applied microbiology and biotechnology*, **98**(24), 9915-9929.
- Banat, I.M., Makkar, R.S., Cameotra, S.S. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, **53**(5), 495-508.
- Banat, I.M., Satpute, S.K., Cameotra, S.S., Patil, R., Nyayanit, N.V. 2014b. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. *Frontiers in microbiology*, **5**, 697.
- Barros, F.F.C., Ponezi, A.N., Pastore, G.M. 2008. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **35**(9), 1071-1078.
- Bayen, S. 2012. Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: A review. *Environmental International*, **48**(1), 84-101.
- Ben Ayed, H., Bardaa, S., Moalla, D., Jridi, M., Maalej, H., Sahnoun, Z., Rebai, T., Jacques, P., Nasri, M., Hmidet, N. 2015. Wound healing and in vitro antioxidant activities of lipopeptides mixture produced by *Bacillus mojavensis* A21. *Process Biochemistry*, **50**(6), 1023-1030.
- Ben ayed, H., Nasri, M. 2016. Les lipopeptides de *Bacillus*: des molécules bioactives à structure particulière et à forte potentialité d'application. *Nutrition et Santé*, **5**(2), 115-125.
- Bertrand, J.-C., Bianchi, M., Al Mallah, M., Acquaviva, M., Mille, G. 1993. Hydrocarbon biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration. *Journal of experimental marine biology and ecology*, **168**(1), 125-138.
- Bertrand, J.C., Caumette, P., Mille, G., Gilewicz, M., Denis, M. 1989. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Science Progress (1933- )*, **73**(3 (291)), 333-350.
- Bertrand, J.-C., Mille, G. 1989. Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures. *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques. Masson (Paris), Chapitre*, **13**, 343-385.
- Bezza, F.A., Nkhalambayausi Chirwa, E.M. 2016. Biosurfactant-enhanced bioremediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in creosote contaminated soil. *Chemosphere*, **144**, 635-644.
- Boateng, J., Catanzano, O. 2015. Advanced therapeutic dressings for effective wound healing-a review. *Journal of pharmaceutical sciences*, **104**(11), 3653-3680.
- Boateng, J.S., Matthews, K.H., Stevens, H.N., Eccleston, G.M. 2008. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *Journal of pharmaceutical sciences*, **97**(8), 2892-2923.
- Bodour, A.A., Drees, K.P., Maier, R.M. 2003. Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and environmental microbiology*, **69**(6), 3280-3287.
- Borah, D., Yadav, R. 2014. Biodegradation of diesel, crude oil, kerosene and used engine oil by a newly isolated *Bacillus cereus* strain DRDU1 from an automobile engine in liquid culture. *Arabian Journal for Science and Engineering*, **39**(7), 5337-5345.
- Bouchez Naïtali, M., Rakatozafy, H., Marchal, R., Leveau, J.Y., Vandecasteele, J.P. 1999. Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *Journal of Applied Microbiology*, **86**(3), 421-428.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Vandecasteele, J.-P. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43**(1), 156-164.

- Branquinho, F.R.G.P.N. 2014. Unveiling population diversity, biosurfactant and antibacterial agents production of *Bacillus pumilis* group species. Thesis, Faculty of Pharmacy of the University of Porto, Chapter 4; p.351-389.
- Brian-Jaisson, F. 2014. Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines, Toulon.
- Bridier, A., Sanchez-Vizueté, P., Guilbaud, M., Piard, J.-C., Naïtali, M., Briandet, R. 2015. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food microbiology*, **45**, 167-178.
- Callaghan, B., Lydon, H., Roelants, S.L., Van Bogaert, I.N., Marchant, R., Banat, I.M., Mitchell, C.A. 2016. Lactonic Sophorolipids increase tumor burden in Apcmin<sup>±</sup>-mice. *PloS one*, **11**(6), e0156845.
- Cameotra, S.S., Makkar, R.S. 2004. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology*, **7**(3), 262-266.
- Cameotra, S.S., Makkar, R.S. 1998. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **50**(5), 520-529.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Pena, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, **7**(5), 335.
- Castillo, M.A., Trujillo, I.S., Alonso, E.V., de Torres, A.G., Pavón, J.C. 2013. Bioavailability of heavy metals in water and sediments from a typical Mediterranean Bay (Málaga Bay, Region of Andalucía, Southern Spain). *Marine pollution bulletin*, **76**(1-2), 427-434.
- Cazalet, M.L. 2012. Caractérisation physico-chimique d'un sédiment marin traité aux liants hydrauliques: Évaluation de la mobilité potentielle des polluants inorganiques, INSA de Lyon.
- Cébron, A., Norini, M.P., Beguiristain, T., Leyval, C. 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative Bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods*, **73**, 148-159.
- Cerniglia, C.E. 1993. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, **4**(3), 331-338.
- Cerniglia, C.E., Sutherland, J.B. 2010. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi. in: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, (Ed.) K.N. Timmis, Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg, pp. 2079-2110.
- Chachkhiani, M., Dabert, P., Abzianidze, T., Partskhaladze, G., Tsiklauri, L., Dudaoui, T., Godon, J.J. 2004. 16S rDNA characterisation of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology*, **93**(3), 227-232.
- Chaerun, S.K., Tazaki, K., Asada, R., Kogure, K. 2004. Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. *Environment International*, **30**(7), 911-922.
- Chakraborty, S., Owens, G. 2014. Metal distributions in seawater, sediment and marine benthic macroalgae from the South Australian coastline. *International Journal of Environmental Science and Technology*, **11**(5), 1259-1270.
- Chalghmi, H. 2015. Etude de la pollution marine par les hydrocarbures et caractérisation de leurs effets biochimiques et moléculaires sur la palourde de *Ruditapes* sp, Université de Bordeaux.
- Chamkha, M., Sayadi, S., Bru, V., Godon, J.-J. 2008. Microbial diversity in Tunisian olive fermentation brine as evaluated by small subunit rRNA-Single strand conformation polymorphism analysis. *International journal of food microbiology*, **122**(1-2), 211-215.
- Chaouay, A., Okhrib, R., Hilali, M., Bazzi, L., Chahid, A., Khiri, F. Contribution à l'étude de l'analyse physico-chimique et de la contamination métallique de l'eau de mer du littoral d'Agadir (Sud du Maroc).(Contribution to the study of physico-chemical analysis and metal contamination of coastal Agadir seawater).(South Morocco).
- Charpiot, A. 2012. La méthanisation dans la filière laitière. Compte rendu-n° 001233011. Département Techniques d'élevage et Qualité. Service Bâtiment-Environnement.
- Chebbi, A., Elshikh, M., Haque, F., Ahmed, S., Dobbin, S., Marchant, R., Sayadi, S., Chamkha, M., Banat, I.M. 2017a. Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* strain W10; as antibiofilm/antibiofouling products for metal protection. *Journal of basic microbiology*, **57**(5), 364-375.



- Chebbi, A., Hentati, D., Cheffi, M., Bouabdallah, R., Choura, C., Sayadi, S., Chamkha, M. 2018. Promising abilities of mercapto-degrading *Staphylococcus capitis* strain SH6 in both crude oil and waste motor oil as sole carbon and energy sources: its biosurfactant production and preliminary characterization. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **93**(5), 1401-1412.
- Chebbi, A., Hentati, D., Zaghden, H., Baccar, N., Rezgui, F., Chalbi, M., Sayadi, S., Chamkha, M. 2017b. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation and biosurfactant production by a newly isolated *Pseudomonas* sp. strain from used motor oil-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **122**, 128-140.
- Chen, J., Huang, P., Zhang, K., Ding, F. 2012. Isolation of biosurfactant producers, optimization and properties of biosurfactant produced by *Acinetobacter* sp. from petroleum-contaminated soil. *Journal of applied microbiology*, **112**(4), 660-671.
- Chen, Q., Li, J., Liu, M., Sun, H., Bao, M. 2017. Study on the biodegradation of crude oil by free and immobilized bacterial consortium in marine environment. *PloS one*, **12**(3), e0174445.
- Chen, Q., Liu, J., Liu, F., Wang, B., Cao, Z. 2016. Biologic risk and source diagnose of 16 PAHs from Haihe River Basin, China. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, **10**(1), 46-52.
- Chiellini, C., Iannelli, R., Verni, F., etroni, G. 2013. Bacterial communities in polluted seabed sediments: a molecular biology assay in Leghorn Harbor. *Scientific World Journal*, 165706.
- Chong, H., Li, Q. 2017. Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. *Microbial cell factories*, **16**(1), 137.
- Chong, K.-P., Alexander, A. 2016. Early detection and management of ganoderma basal stem rot disease: a special report from Sabah. *Transactions on Science and Technology*, **3**(3), 517-523.
- Chooklin, C.S., Maneerat, S., Saimmai, A. 2014. Utilization of Banana Peel as a Novel Substrate for Biosurfactant Production by Halobacteriaceae archaeon AS65. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **173**(2), 624-645.
- Christen, R. 2008. Global sequencing: a review of current molecular data and new methods available to assess microbial diversity. *Microbes and Environments*, **23**(4), 253-268.
- Christopher, M. 2016. *Logistics & supply chain management*. Pearson UK.
- Christova, N., Tuleva, B., Lalchev, Z., Jordanova, A., Jordanov, B. 2004. Rhamnolipid biosurfactants produced by *Renibacterium salmoninarum* 27BN during growth on n-hexadecane. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **59**(1-2), 70-74.
- Chuan, O., Chuen, Y., Mei, F. 2016. Determination of total organic carbon concentration in surficial sediments of Sungai Pinang, Penang, Malaysia [Penentuan jumlah karbon organik dalam sedimen permukaan di Sungai Pinang, Pulau Pinang, Malaysia].
- Ciacci, C., Barmo, C., Gallo, G., Maisano, M., Cappello, T., D'Agata, A., Leonzio, C., Mauceri, A., Fasulo, S., Canesi, L. 2012. Effects of sublethal, environmentally relevant concentrations of hexavalent chromium in the gills of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, **120**, 109-118.
- Cirigliano, M.C., Carma, G.M. 1984. Isolation of a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. *Applied and environmental microbiology*, **48**(4), 747-750.
- Clark, L.L., Dajcs, J.J., McLean, C.H., Bartell, J.G., Stroman, D.W. 2006. *Pseudomonas otitidis* sp. nov., isolated from patients with otic infections. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**(4), 709-714.
- Cochrane, S.A., Vederas, J.C. 2016. Lipopeptides from *Bacillus* and *Paenibacillus* spp.: a gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal Research Reviews*, **36**(1), 4-31.
- Colati, K.A.P., Dalmaschio, G.P., de Castro, E.V.R., Gomes, A.O., Vaz, B.G., Romão, W. 2013. Monitoring the liquid/liquid extraction of naphthenic acids in brazilian crude oil using electrospray ionization FT-ICR mass spectrometry (ESI FT-ICR MS). *Fuel*, **108**, 647-655.
- Colombo, J.C., Cabello, M., Arambarri, A.M. 1996. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolytic fungi. *Environmental pollution*, **94**(3), 355-362.
- Coronel-León, J., de Grau, G., Grau-Campistany, A., Farfan, M., Rabanal, F., Manresa, A., Marqués, A.M. 2015. Biosurfactant production by AL 1.1, a *Bacillus licheniformis* strain isolated from Antarctica: production, chemical characterization and properties. *Annals of Microbiology*, **65**(4), 2065-2078.

- Coronel-León, J., Marqués, A., Bastida, J., Manresa, A. 2016. Optimizing the production of the biosurfactant lichenysin and its application in biofilm control. *Journal of applied microbiology*, **120**(1), 99-111.
- Cortés-Sánchez Ade, J., Hernández-Sánchez, H., Jaramillo-Flores, M.E. 2013. Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: New trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiological Research*, **168**(1), 22-32.
- Costa, S., Déziel, E., Lépine, F. 2011. Characterization of rhamnolipid production by *Burkholderia glumae*. *Letters in applied microbiology*, **53**(6), 620-627.
- Couillard, C. M., Lee, K., Légaré, B. King, T. L. 2005. Effect of dispersant on the composition of the water-accommodated fraction of crude oil and its toxicity to larval marine fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**(6), 1496-504.
- Da Cunha, C.D., Rosado, A.S., Sebastián, G.V., Seldin, L., Von der Weid, I. 2006. Oil biodegradation by *Bacillus* strains isolated from the rock of an oil reservoir located in a deep-water production basin in Brazil. *Applied microbiology and biotechnology*, **73**(4), 949-959.
- Dalmaso, G., Ferreira, D., Vermelho, A. 2015. Marine extremophiles: a source of hydrolases for biotechnological applications. *Marine drugs*, **13**(4), 1925-1965.
- Das, N., Chandran, P. 2011. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, **2011**.
- Das, P., Yang, X.-P., Ma, L.Z. 2014. Analysis of biosurfactants from industrially viable *Pseudomonas* strain isolated from crude oil suggests how rhamnolipids congeners affect emulsification property and antimicrobial activity. *Frontiers in Microbiology*, **5**(696).
- De Almeida, D.G., Soares Da Silva, R.d.C.F., Luna, J.M., Rufino, R.D., Santos, V.A., Banat, I.M., Sarubbo, L.A. 2016. Biosurfactants: Promising Molecules for Petroleum Biotechnology Advances. *Frontiers in Microbiology*, **7**(1718).
- de Andrade, C.J., Barros, F.F., de Andrade, L.M., Rocco, S.A., Luis Sforça, M., Pastore, G.M., Jauregi, P. 2016. Ultrafiltration based purification strategies for surfactin produced by *Bacillus subtilis* LB5A using cassava wastewater as substrate. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **91**(12), 3018-3027.
- de França, Í.W.L., Lima, A.P., Lemos, J.A.M., Lemos, C.G.F., Melo, V.M.M., de Sant'ana, H.B., Gonçalves, L.R.B. 2015. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catalysis Today*, **255**, 10-15.
- de Oliveira, M.R., Magri, A., Baldo, C., Camilios-Neto, D., Minucelli, T., Celligoi, M.A.P.C. 2015. Sophorolipids A promising biosurfactant and its applications. *Int J Adv Biotechnol Res*, **6**, 161-174.
- DeLong, E.F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **89**(12), 5685-5689.
- Denton, G.R., Bearden, B., Concepcion, L., Siegrist, H., Vann, D., Wood, H. 2001. Contaminant assessment of surface sediments from Tanapag Lagoon, Saipan. *Water and Environmental Research Institute of the Western Pacific (WERI) Technical Report*(93).
- Desai, J.D., Banat, I.M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **61**(1), 47-64.
- Díaz De Rienzo, M.A., Banat, I.M., Dolman, B., Winterburn, J., Martin, P.J. 2015. Sophorolipid biosurfactants: Possible uses as antibacterial and antibiofilm agent. *New Biotechnology*, **32**(6), 720-726.
- Dijkstra, N., Junttila, J., Skirbekk, K., Carroll, J., Husumd, K., Hald, M. 2017. Benthic foraminifera as bio-indicators of chemical and physical stressors in Hammerfest harbor (Northern Norway). *Marine Pollution Bulletin*, **114**(1), 384-396.
- Ding, G.-C., Heuer, H., Zühlke, S., Spitteller, M., Pronk, G.J., Heister, K., Kögel-Knabner, I., Smalla, K. 2010. Soil type-dependent responses to phenanthrene as revealed by determining the diversity and abundance of polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase genes by using a novel PCR detection system. *Applied and environmental microbiology*, **76**(14), 4765-4771.
- Dooley, S., Heyne, J., Won, S.H., Dievert, P., Ju, Y., Dryer, F.L. 2014. Importance of a Cycloalkane Functionality in the Oxidation of a Real Fuel. *Energy & Fuels*, **28**(12), 7649-7661.

- Drira, Z., Kmiha-Megdiche, S., Sahnoun, H., Hammami, A., Allouche, N., Tedetti, M., Ayadi, H. 2016. Assessment of anthropogenic inputs in the surface waters of the southern coastal area of Sfax during spring (Tunisia, Southern Mediterranean Sea). *Marine pollution bulletin*, **104**(1-2), 355-363.
- Ducker, W.A., Grant, L.M. 1996. Effect of Substrate Hydrophobicity on Surfactant Surface-Aggregate Geometry. *The Journal of Physical Chemistry*, **100**(28), 11507-11511.
- Durairaj, K., Velmurugan, P., Park, J.-H., Chang, W.-S., Park, Y.-J., Senthilkumar, P., Choi, K.-M., Lee, J.-H., Oh, B.-T. 2018. Characterization and assessment of two biocontrol bacteria against *Pseudomonas syringae* wilt in *Solanum lycopersicum* and its genetic responses. *Microbiological Research*, **206**, 43-49.
- Duran, R., Cravo-Laureau, C. 2016. Role of environmental factors and microorganisms in determining the fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in the marine environment. *FEMS Microbiology Reviews*, **40**(6), 814-830.
- Dutta, K., Shityakov, S., Das, P.P., Ghosh, C. 2017. Enhanced biodegradation of mixed PAHs by mutated naphthalene 1, 2-dioxygenase encoded by *Pseudomonas putida* strain KD6 isolated from petroleum refinery waste. *3 Biotech*, **7**(6), 365.
- Eddouaouda, K., Mnif, S., Badis, A., Younes, S.B., Cherif, S., Ferhat, S., Mhiri, N., Chamkha, M., Sayadi, S. 2012. Characterization of a novel biosurfactant produced by *Staphylococcus* sp. strain 1E with potential application on hydrocarbon bioremediation. *Journal of basic microbiology*, **52**(4), 408-418.
- Eganhouse, R., Sherblom, P. 2001. Anthropogenic organic contaminants in the effluent of a combined sewer overflow: impact on Boston Harbor. *Marine Environmental Research*, **51**(1), 51-74.
- Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., Banat, I.M. 2016. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters*, **38**(6), 1015-1019.
- Er-Raioui, H., Bouzid, S., Marhraoui, M., Saliot, A. 2009. Hydrocarbon pollution of the Mediterranean coastline of Morocco. *Ocean & Coastal Management*, **52**(2), 124-129.
- Eskandari, S., Hoodaji, M., Tahmourespour, A., Abdollahi, A., Mohammadian-Baghi, T., Eslamian, S., Ostad-Ali-Askari, K. 2017. Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Bacillus Licheniformis* ATHE9 and *Bacillus Mojavensis* ATHE13 as Newly Strains Isolated from Oil-Contaminated Soil. *Journal of Geography, Environment and Earth Science International*, **11**(2), 1-11.
- Fang, X., Thornton, C., Scheffler, B.E., Willett, K.L. 2013. Benzo [a] pyrene decreases global and gene specific DNA methylation during zebrafish development. *Environmental toxicology and pharmacology*, **36**(1), 40-50.
- Faragallah, H., Askar, A., Okbah, M., Moustafa, H. 2009. Physico-chemical characteristics of the open Mediterranean sea water far about 60 Km from Damietta harbor, Egypt. *Journal of Ecology and the Natural Environment*, **1**(5), 106-119.
- Fathepure, B.Z. 2014. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Frontiers in Microbiology*, **5**(173).
- Feng, B.W., Li, X.R., Wang, J.H., Hu, Z.Y., Meng, H., Xiang, L.Y., Quan, Z.X. 2009. Bacterial diversity of water and sediment in the Changjiang estuary and coastal area of the East China Sea. *FEMS Microbiology Ecology*, **70**(2), 236-248.
- Filibeli, A., Yilmaz, R., Alyanak, I. 1995. Dredged material of Izmir Harbor: its behavior and pollution potential. *Water Science and Technology*, **32**(2), 105-113.
- Flemming, H.-C. 2011. Microbial biofouling: unsolved problems, insufficient approaches, and possible solutions. in: *Biofilm Highlights*, Springer, pp. 81-109.
- Fondi, M., Orlandini, V., Emiliani, G., Papaleo, MC., Maida, I., Perrin, E, Vaneechoutte, M, Dijkshoorn, L, Fani, R. 2012. Draft Genome Sequence of the Hydrocarbon-Degrading and Emulsan-Producing Strain *Acinetobacter venetianus* RAG-1T. *Journal of Bacteriology*, **194**(17), 4771-4772.
- Fox, G.E., Pechman, K.R., Woese, C.R. 1977. Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to procaryotic systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **27**(1), 44-57.

- Gans, J., Wolinsky, M., Dunbar, J. 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science*, **309**(5739), 1387-1390.
- Gargouri, D., Azri, C., Serbaji, M.M., Jedoui, Y., Montacer, M. 2011. Heavy metal concentrations in the surface marine sediments of Sfax Coast, Tunisia. *Environmental Monitoring and Assessment*, **175**(1-4), 519-530.
- Gassara, F., Suri, N., Voordouw, G. 2017. Nitrate-mediated microbially enhanced oil recovery (N-MEOR) from model upflow bioreactors. *Journal of hazardous materials*, **324**, 94-99.
- 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, Hydrocarbon-Degrading Marine Bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **42**(4), 568-576.
- Geetha, S., Banat, I.M., Joshi, S.J. 2018. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*.
- George, S., Jayachandran, K. 2013. Production and characterization of rhamnolipid biosurfactant from waste frying coconut oil using a novel *Pseudomonas aeruginosa* D. *Journal of Applied Microbiology*, **114**(2), 373-383.
- Gerchman, Y., Patichov, R., Zeltzer, T. 2012. Lipolytic, Proteolytic, and Cholesterol-Degrading Bacteria from the Human Cerumen. *Current Microbiology*, **64**(6), 588-591.
- GESAMP, 1989. United nation group of expert on the scientific aspect of marine pollution. Article premier, paragraphe 1.
- Gillespie, I.M.M., Philp, J.C. 2013. Bioremediation, an environmental remediation technology for the bioeconomy. *Trends in Biotechnology*, **31**(6), 329-332.
- Global Market Insights, 2018. <https://www.gminsights.com/industry-analysis/biosurfactantsmarket-report>. Accessed March 8, 2018.
- Godon, J., Duthoit, F., Delbes, C., Millet, L., Montel, M. 2001. Use of molecular fingerprint for the study of complex microbial ecosystem. Application to "AOC Salers" cheese [16S rDNA, SSCP]. *Lait (France)*.
- Godon, J.-J., Moletta, R. 1998. Une carte d'identité moléculaire pour les microéboueurs. *Biofutur*, **1998**(178), 38-40.
- Goeury, C. 2012. Numerical modelling of oil spill drifts in continental and estuarine waters, Université Paris-Est.
- Goeury, D. 2014. LA POLLUTION MARINE. in: *Mers et océans*, (Ed.) R. Woessner, Atlande. Paris.
- Grand View Research, 2015. <https://www.grandviewresearch.com/industryanalysis/biosurfactants-industry>. Accessed March 8, 2018.
- Gricajeva, A., Bendikienė, V., Kalėdienė, L. 2016. Lipase of *Bacillus stratosphericus* L1: Cloning, expression and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, **92**, 96-104.
- Gudiña, E.J., Rodrigues, A.I., de Freitas, V., Azevedo, Z., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. 2016. Valorization of agro-industrial wastes towards the production of rhamnolipids. *Bioresource Technology*, **212**, 144-150.
- Gunther, N.W., Nunez, A., Fett, W., Solaiman, D.K. 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Applied and environmental microbiology*, **71**(5), 2288-2293.
- Haba, E., Espuny, M.J., Busquets, M., Manresa, A. 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*, **88**(3), 379-387.
- Haddock, J.D., Horton, J.R., Gibson, D.T. 1995. Dihydroxylation and dechlorination of chlorinated biphenyls by purified biphenyl 2, 3-dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain LB400. *Journal of bacteriology*, **177**(1), 20-26.
- Hahn, H.H., Pfeifer, R. 1994. The contribution of parked vehicle emissions to the pollution of urban run-off. *Science of The Total Environment*, **146-147**, 525-533.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, **41**, 95-98.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, **2**(2), 95.



- Hameed, A., Lin, S.-Y., Lai, W.-A., Shahina, M., Liu, Y.-C., Hsu, Y.-H., Young, C.-C. 2016. *Idiomarina tyrosinivorans* sp. nov., isolated from estuarine surface water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **66**(12), 5384-5391.
- Hamley, I.W. 2015. Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. *Chemical Communications*, **51**(41), 8574-8583.
- Hansen, M.B., Nielsen, S.E., Berg, K. 1989. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of immunological methods*, **119**(2), 203-210.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P. 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials*, **169**(1), 1-15.
- Harshey, R.M., Mireles, J.R., Toguchi, A. 2003. Use of cyclic heptapeptides for the inhibition of biofilm formation. PCT WO03011821 (A2).
- Hasanizadeh, P., Moghimi, H., Hamed, J. 2017. Biosurfactant production by *Mucor circinelloides* on waste frying oil and possible uses in crude oil remediation. *Water Science et Technology*, **6**(7-8), 1706-1714.
- Häussler, S., Nimtz, M., Domke, T., Wray, V., Steinmetz, I. 1998. Purification and characterization of a cytotoxic exolipid of *Burkholderia pseudomallei*. *Infection and immunity*, **66**(4), 1588-1593.
- Hazrati, S., Rostami, R., Farjaminezhad, M., Fazlzadeh, M. 2016. Preliminary assessment of BTEX concentrations in indoor air of residential buildings and atmospheric ambient air in Ardabil, Iran. *Atmospheric Environment*, **132**, 91-97.
- Head, I.M., Jones, D.M., Larter, S.R. 2003. Biological activity in the deep subsurface and the origin of heavy oil. *Nature*, **426**, 344.
- Head, I.M., Jones, D.M., Röling, W.F.M. 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, **4**, 173.
- Hedlund, B.P., Geiselbrecht, A.D., Staley, J.T. 2001. *Marinobacter* strain NCE312 has a *Pseudomonas*-like naphthalene dioxygenase. *FEMS Microbiology Letters*, **201**(1), 47-51.
- Henkel, M., Geissler, M., Weggenmann, F., Hausmann, R. 2017. Production of microbial biosurfactants: Status quo of rhamnolipid and surfactin towards large-scale production. *Biotechnology journal*, **12**(7), 1600561.
- Hentati, D., Chebbi, A., Loukil, S., Kchaou, S., Godon, J.-J., Sayadi, S., Chamkha, M. 2016. Biodegradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Bacillus stratosphericus* from Mediterranean seawater of the Sfax fishing harbour, Tunisia. *Environmental Science and Pollution Research*, **23**(15), 15088-15100.
- Hernandez-Raquet, G., Budzinski, H., Caumette, P., Dabert, P., Le Menach, K., Muyzer, G., Duran, R. 2006. Molecular diversity studies of bacterial communities of oil polluted microbial mats from the Etang de Berre (France). *FEMS microbiology ecology*, **58**(3), 550-562.
- Hofemeister, J., Conrad, B., Adler, B., Hofemeister, B., Feesche, J., Kucheryava, N., Steinborn, G., Franke, P., Grammel, N., Zwintscher, A. 2004. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus subtilis* A1/3. *Molecular Genetics and Genomics*, **272**(4), 363-378.
- Hörmann, B., Müller, M.M., Syltatk, C., Hausmann, R. 2010. Rhamnolipid production by *Burkholderia plantarii* DSM 9509T. *European journal of lipid science and technology*, **112**(6), 674-680.
- Huang, Z., Hu, Y., Shou, L., Song, M. 2013. Isolation and partial characterization of cyclic lipopeptide antibiotics produced by *Paenibacillus ehimensis* B7. *BMC Microbiology*, **13**(1), 87.
- Huber, C., Klimant, I., Krause, C., Werner, T., Mayr, T., Wolfbeis, O.S. 2000. Optical sensor for seawater salinity. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, **368**(2-3), 196-202.
- Hussein Amin Mohamed Abdelwahed, W. 2011. Study on the regulation and biosynthesis of fengycin and plipastatin produced by *Bacillus subtilis*, Lille 1.
- Hwang, Y.-H., Park, B.-K., Lim, J.-H., Kim, M.-S., Song, I.-B., Park, S.-C., Yun, H.-I. 2008. Evaluation of Genetic and Developmental Toxicity of Surfactin C from *Bacillus subtilis* BC1212. *Journal of Health Science*, **54**(1), 101-106.
- Ihaka, R., Gentleman, R. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of computational and graphical statistics*, **5**(3), 299-314.

- Imhoff-Stuckle, D., Pfennig, N. 1983. Isolation and characterization of a nicotinic acid-degrading sulfate-reducing bacterium, *Desulfococcus niacini* sp. nov. *Archives of microbiology*, **136**(3), 194-198.
- IPIECA-IOGP. 2015. In-situ burning of spilled oil. IPIECA-IOGP Good Practice Guide Series, Oil Spill Response Joint Industry Project (OSR-JIP). 523. <http://oilspillresponseproject.org>.
- ISO Report, 2009. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity. International Organization for Standardization, Geneva. 10993-5.
- ITOPF, 2011. Effects of Oil Pollution on the Marine Environment. Technical Information Paper (TIP) No. 13, International Tanker Owners Pollution Federation.
- Jeanbille, M., 2015. Réponse des consortia microbiens benthiques à une contamination chronique aux hydrocarbures. Thèse, Université de Pau et des Pays de l'Adour, France.
- Jeanbille, M., Gury, J., Duran, R., Tronczynski, J., Agogué, H., Ben Saïd, O., Ghiglione, J.-F., Auguet, J.-C. 2016. Response of Core Microbial Consortia to Chronic Hydrocarbon Contaminations in Coastal Sediment Habitats. *Frontiers in Microbiology*, **7**(1637).
- Jeffries, T.C., Schmitz Fontes, M.L., Harrison, D.P., Van-Dongen-Vogels, V., Eyre, B.D., Ralph, P.J., Seymour, J.R. 2016. Bacterioplankton dynamics within a large anthropogenically impacted urban estuary. *Frontiers in microbiology*, **6**, 1438.
- Jemil, N., Manresa, A., Rabanal, F., Ben Ayed, H., Hmidet, N., Nasri, M. 2017. Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain. *Journal of Chromatography B*, **1060**, 374-386.
- Jiang, L., Shen, C., Long, X., Zhang, G., Meng, Q. 2014. Rhamnolipids elicit the same cytotoxic sensitivity between cancer cell and normal cell by reducing surface tension of culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **98**(24), 10187-10196.
- Johnsen, A.R., Karlson, U. 2005. PAH degradation capacity of soil microbial communities—does it depend on PAH exposure? *Microbial ecology*, **50**(4), 488-495.
- Joshi, S.J., Geetha, S.J., Desai, A.J. 2015. Characterization and Application of Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* R2. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **177**(2), 346-361.
- Jukes, T.H., Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro HN (ed) Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York, pp 21-132.
- Juliana Guerra de, O., Crispin Humberto, G.-C. 2013. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **56**(1), 155-160.
- Kanaly, R.A., Harayama, S. 2000. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *Journal of Bacteriology*, **182**(8), 2059-2067.
- Kanlayavattanukul, M., Lourith, N. 2010. Lipopeptides in cosmetics. *International journal of cosmetic science*, **32**(1), 1-8.
- Karimi, B., Habibi, M., Esvand, M. 2015. Biodegradation of naphthalene using *Pseudomonas aeruginosa* by up flow anoxic-aerobic continuous flow combined bioreactor. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, **13**(1), 26.
- Khopade, A., Ren, B., Liu, X.-Y., Mahadik, K., Zhang, L., Kokare, C. 2012. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. *Journal of Colloid and Interface Science*, **367**(1), 311-318.
- Kim, K.-H., Jahan, S.A., Kabir, E., Brown, R.J.C. 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*, **60**, 71-80.
- Kiran, G.S., Sabarathnam, B., Thajuddin, N., Selvin, J. 2014. Production of Glycolipid Biosurfactant from Sponge-Associated Marine Actinobacterium *Brachybacterium paraconglomeratum* MSA21. *Journal of Surfactants and Detergents*, **17**(3), 531-542.
- Kirso, U., Irha, N. 1998. Role of algae in fate of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, **41**(1), 83-89.
- Kjeldahl, J. 1883. Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen körpern. *Zeitschrift für analytische Chemie*, **22**(1), 366-382.
- Klein, B., Roether, W., Manca, B.B., Bregant, D., Beitzel, V., Kovacevic, V., Luchetta, A. 1999. The large deep water transient in the Eastern Mediterranean. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, **46**(3), 371-414.

- Knechtel, R. J. 1978. A more economical method for the determination of chemical oxygen demand. *Water Control*.
- Korlević, M., Zucko, J., Dragić, M.N., Blažina, M., Pustijanac, E., Zeljko, T.V., Gacesa, R., Baranasic, D., Starcevic, A., Diminic, J. 2015. Bacterial diversity of polluted surface sediments in the northern Adriatic Sea. *Systematic and applied microbiology*, **38**(3), 189-197.
- Kostka, J.E., Prakash, O., Overholt, W.A., Green, S.J., Freyer, G., Canion, A., Delgardio, J., Norton N., Hazen, T.C., Huettel, M. 2011. Hydrocarbon degrading Bacteria and the bacterial community response in gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(22), 7962-7974.
- Kumar, A.P., Janardhan, A., Viswanath, B., Monika, K., Jung, J.-Y., Narasimha, G. 2016. Evaluation of orange peel for biosurfactant production by *Bacillus licheniformis* and their ability to degrade naphthalene and crude oil. *3 Biotech*, **6**(1), 43.
- Kumar, M., León, V., Materano, A.D.S., Ilzins, O.A. 2007. A halotolerant and thermotolerant *Bacillus* sp. degrades hydrocarbons and produces tensio-active emulsifying agent. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **23**(2), 211-220.
- Labana, S., Kapur, M., Malik, D.K., Prakash, D., Jain, R. 2007. Diversity, biodegradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. in: *Environmental bioremediation technologies*, Springer, pp. 409-443.
- Lacoue-Labarthe, T. 2007. Incorporation des métaux dans les œufs de la seiche commune *Sepia officinalis* et effets potentiels sur les fonctions digestives et immunitaires, Université de La Rochelle.
- Lan, G., Fan, Q., Liu, Y., Chen, C., Li, G., Liu, Y., Yin, X. 2015. Rhamnolipid production from waste cooking oil using *Pseudomonas* SWP-4. *Biochemical Engineering Journal*, **101**, 44-54.
- Lang, N., Delichere, P., Tuel, A. 2002. Post-synthesis introduction of transition metals in surfactant-containing MCM-41 materials. *Microporous and mesoporous materials*, **56**(2), 203-217.
- Latimer, J.S., Quinn, J.G. 1998. Aliphatic petroleum and biogenic hydrocarbons entering Narragansett Bay from tributaries under dry weather conditions. *Estuaries*, **21**(1), 91-107.
- Lawrence, W.T. 1998. Physiology of the acute wound. *Clinics in plastic surgery*, **25**(3), 321-340.
- Le Dû-Lacoste, M. 2008. Etude des phénomènes de biotransformation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons) : relation exposition - génotoxicité.
- Leahy, J., Colwell, R. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiology Reviews*, **54**(3), 305-315.
- Leamon, J.H., Lee, W.L., Tartaro, K.R., Lanza, J.R., Sarkis, G.J., deWinter, A.D., Berka, J., Lohman, K.L. 2003. A massively parallel PicoTiterPlate™ based platform for discrete picoliter-scale polymerase chain reactions. *Electrophoresis*, **24**(21), 3769-3777.
- Lee, M., Kim, M.K., Vancanneyt, M., Swings, J., Kim, S.-H., Kang, M.S., Lee, S.-T. 2005. *Tetragenococcus koreensis* sp. nov., a novel rhamnolipid-producing bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **55**(4), 1409-1413.
- Lei, A.-P., Hu, Z.-L., Wong, Y.-S., Tam, N.F.-Y. 2007. Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresource technology*, **98**(2), 273-280.
- Li, J., Deng, M., Wang, Y., Chen, W. 2016. Production and characteristics of biosurfactant produced by *Bacillus pseudomycoloides* BS6 utilizing soybean oil waste. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **112**, 72-79.
- Li, Y.-M., Haddad, N.I., Yang, S.-Z., Mu, B.-Z. 2008. Variants of lipopeptides produced by *Bacillus licheniformis* HSN221 in different medium components evaluated by a rapid method ESI-MS. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **14**(3), 229-235.
- Lima, A.O.d.S., Cabral, A., Andreote, F.D., Cavalett, A., Pessatti, M.L., Dini-Andreote, F., da Silva, M.A.C. 2013. Draft Genome Sequence of *Bacillus stratosphericus* LAMA 585, Isolated from the Atlantic Deep Sea. *Genome Announcements*, **1**(3).
- Lin, M., Hu, X., Chen, W., Wang, H., Wang, C. 2014. Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. BZ-3, isolated from crude oil contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **94**, 176-181.

- Lins, A.B., Bione, A.M., Silva, T.C., De Souza, D.G., Campos-Takaki, G.M. 2016. Low-cost production of biosurfactant by *Cunninghamella phaeospora* using agro-industrial wastes. In *Microbes in the Spotlight: Recent Progress in the Understanding of Beneficial and Harmful Microorganisms* ed Mendez Vilas A. pp. 339-343. Brown Walker Press, Florida.
- Liu, B., Ju, M., Liu, J., Wu, W., Li, X. 2016. Isolation, identification, and crude oil degradation characteristics of a high-temperature, hydrocarbon-degrading strain. *Marine pollution bulletin*, **106**(1-2), 301-307.
- Liu, F., Wang, Y., Qu, C., Zheng, Z., Miao, J., Xu, H., Xiao, T. 2017. The complete genome of hydrocarbon-degrading *Pseudoalteromonas* sp. NJ289 and its phylogenetic relationship. *Acta Oceanologica Sinica*, **36**(2), 88-93.
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M. 2012. Comparison of next-generation sequencing systems. *BioMed Research International*, **2012**.
- Lohrer, D., Hancock, N. 2004. Marine soft sediments: more diversity than meets the eye. *Water and Atmosphere*, **3**,12.
- Long, E.R., MacDonald, D.D., Smith, S.L., Calder, F.D. 1995. Incidence of adverse biological of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management*, **19**(1), 81-97.
- Louati, A., Elleuch, B., Kallel, M., Saliot, A., Dagaut, J., Oudot, J. 2001. Hydrocarbon contamination of coastal sediments from the Sfax area (Tunisia), Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, **42**(6), 444-451.
- Ludwig, W., Kirchhof, G., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Betzl, D., Ehrmann, M., Hertel, C., Jilg, S., Tatzel, R., Zitzelsberger, H. 1992. Complete 23S ribosomal RNA sequences of Gram-positive bacteria with a low DNA G+ C content. *Systematic and applied microbiology*, **15**(4), 487-501.
- Madslie, E.H., Rønning, H.T., Lindbäck, T., Hassel, B., Andersson, M.A., Granum, P.E. 2013. Lichenysin is produced by most *Bacillus licheniformis* strains. *Journal of Applied Microbiology*, **115**(4), 1068-1080.
- Magalhães, E.R.B., Silva, F.L., Sousa, M.A.D.S.B., Dos Santos, E.S. 2018. Use of different agroindustrial waste and produced water for biosurfactant production. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, **15**(1), 17-26.
- Mahanty, B., Pakshirajan, K., Dasu, V. 2006. Production and properties of a biosurfactant applied to polycyclic aromatic hydrocarbon solubilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **134**(2), 129-141.
- Maiti, A., Das, S., Bhattacharyya, N. 2012. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Bacillus thuringiensis* strain NA2. *J Sci*, **1**(4), 72-75.
- Makkar, R.S., Cameotra, S.S., Banat, I.M. 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB express*, **1**(1), 5.
- Maliji, D., Olama, Z., Holail, H. 2013. Environmental studies on the microbial degradation of oil hydrocarbons and its application in Lebanese oil polluted coastal and marine ecosystem. *Int J Curr Microbiol App Sci*, **2**(6), 1-18.
- Mandal, S.M., Barbosa, A.E., Franco, O.L. 2013. Lipopeptides in microbial infection control: scope and reality for industry. *Biotechnology Advances*, **31**(2), 338-345.
- Maneerat, S., Phetrong, K. 2007. Isolation of biosurfactant-producing marine bacteria and characteristics of selected biosurfactant. *Songklanakarin J Sci Technol*, **29**(3), 781-791.
- Mani, P., Dineshkumar, G., Jayaseelan, T., Deepalakshmi, K., Ganesh Kumar, C., Senthil Balan, S. 2016. Antimicrobial activities of a promising glycolipid biosurfactant from a novel marine *Staphylococcus saprophyticus* SBPS 15. *3 Biotech*, **6**(2), 163.
- Marchand, M., Kantin, R. 1997. Contaminants chimiques en milieux aquatiques (Troisième partie, Présentation de quelques éléments caractéristiques). *Océanis(Paris)*.
- Marchant, R., Banat, I.M. 2012. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. *Trends in Biotechnology*, **30**(11), 558-565.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.-J., Chen, Z. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, **437**(7057), 376.



- Markets and Markets, 2016. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactants-market-493.html>. Accessed March 8, 2018.
- Markets and Markets, 2017. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/biosurfactant-market-163644922.html>. Accessed March 8, 2018.
- Martin, P. 1997. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science*, **276**(5309), 75-81.
- Massu, N., Landmann, G. 2011. Connaissance des impacts du changement climatique sur la biodiversité en France métropolitaine, synthèse de la bibliographie. ECOFOR. p 180.
- Mata Sandoval, J.C., Karns, J., Torrents, A. 2000. The influence of surfactants and biosurfactants on the bioavailability of hydrophobic organic pollutants in subsurface environments. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, **16**(4).
- McClements, D.J., Gumus, C.E. 2016. Natural emulsifiers—Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: Molecular and physicochemical basis of functional performance. *Advances in Colloid and Interface Science*, **234**, 3-26.
- McElroy, A., Farrington, J., Teal, J. 1989. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. *Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment*. CRC Press, Inc., Boca Raton Florida. 1989. p 1-39, 14 fig, 9 tab, 159 ref. NOAA Contract 83-ABD-00012.
- McGenity, T.J. 2010. Halophilic Hydrocarbon Degraders. in: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, (Ed.) K.N. Timmis, Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg, pp. 1939-1951.
- Mearns, A.J., Reish, D.J., Bissell, M., Morrison, A.M., Rempel-Hester, M.A., Arthur, C., Rutherford, N., Pryor, R. 2018. Effects of Pollution on Marine Organisms. *Water Environment Research*, **90**(10), 1206-1300.
- Mi Jin, H., Hyun Kim, K., Ok Jeon, C. 2015. *Alteromonas naphthalenivorans* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from tidal-flat sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **65**(11), 4208-4214.
- Mnif, I., Ghribi, D. 2015. Review lipopeptides biosurfactants: mean classes and new insights for industrial, biomedical, and environmental applications. *Peptide Science*, **104**(3), 129-147.
- Mnif, S., Chamkha, M., Labat, M., Sayadi, S. 2011. Simultaneous hydrocarbon biodegradation and biosurfactant production by oilfield-selected bacteria. *Journal of applied microbiology*, **111**(3), 525-536.
- Mnif, S., Chamkha, M., Sayadi, S. 2009. Isolation and characterization of Halomonas sp. strain C2SS100, a hydrocarbon-degrading bacterium under hypersaline conditions. *Journal of Applied Microbiology*, **107**(3), 785-794.
- Mnif, S., Zayen, A., Karray, F., Bru-Adan, V., Loukil, S., Godon, J.J., Chamkha, M., Sayadi, S. 2012. Microbial population changes in anaerobic membrane bioreactor treating landfill leachate monitored by single-strand conformation polymorphism analysis of 16S rDNA gene fragments. *International biodeterioration & biodegradation*, **73**, 50-59.
- Mohan, P.K., Nakhla, G., Yanful, E.K. 2006. Biodegradability of surfactants under aerobic, anoxic, and anaerobic conditions. *Journal of Environmental Engineering*, **132**(2), 279-283.
- Mohd Zin, N.B., Mohamad Yusof, B., Oslan, S.N., Wasoh, H., Tan, J.S., Ariff, A.B., Halim, M. 2017. Utilization of acid pre-treated coconut dregs as a substrate for production of detergent compatible lipase by *Bacillus stratosphericus*. *AMB Express*, **7**(1), 131.
- Monier, J.M., Cécillon, S. 2015. Les outils de biologie moléculaire et leur utilisation dans le domaine de la gestion des sites pollués – Synthèse. 39 pages. ADEME.
- Morelli, J.J., Szajer, G. 2000. Analysis of surfactants: Part I. *Journal of Surfactants and Detergents*, **3**(4), 539-552.
- Morley, N., Burton, J., Tankere, S., Martin, J.-M. 1997. Distribution and behaviour of some dissolved trace metals in the western Mediterranean Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, **44**(3-4), 675-691.
- Morris, C.E., Bardin, M., Berge, O., Frey-Klett, P., Fromin, N., Girardin, H., Guinebretière, M.-H., Lebaron, P., Thiéry, J.M., Troussellier, M. 2002. Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **66**(4), 592-616.

- Moya-Ramírez, I., García-Román, M., Fernández-Arteaga, A. 2016. Waste Frying Oil Hydrolysis in a Reverse Micellar System. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, **4**(3), 1025-1031.
- Mukherjee, S., Das, P., Sivapathasekaran, C., Sen, R. 2009. Antimicrobial biosurfactants from marine *Bacillus circulans*: extracellular synthesis and purification. *Letters in Applied Microbiology*, **48**(3), 281-288.
- Müller, M.M., Hormann, B., Kugel, M., Sylдатк, C., Hausmann, R. 2011. Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **89**(3), 585-92.
- Müller, M.M., Hörmann, B., Kugel, M., Sylдатк, C., Hausmann, R. 2011. Evaluation of rhamnolipid production capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in comparison to the rhamnolipid over-producer strains DSM 7108 and DSM 2874. *Applied microbiology and biotechnology*, **89**(3), 585-592.
- Mulligan, C.N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution*, **133**(2), 183-198.
- Muthusamy, K., Gopalakrishnan, S., Ravi, T.K., Sivachidambaram, P. 2008. Biosurfactants: properties, commercial production and application. *Current science*, 736-747.
- Najmi, Z., Ebrahimipour, G., Franzetti, A., Banat, I.M. 2018. In situ downstream strategies for cost-effective bio/surfactant recovery. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **65**(4), 523-532.
- Nakajima, K., Sato, A., Takahara, Y., Iida, T. 1985. Microbial Oxidation of Isoprenoid Alkanes, Phytane, Norpristane and Farnesane. *Agricultural and Biological Chemistry*, **49**(7), 1993-2002.
- Nakano, M., Iehata, S., Tanaka, R., Maeda, H. 2012. Extracellular neutral lipids produced by the marine bacteria *Marinobacter* sp. *Biocontrol science*, **17**(2), 69-75.
- Nalini, S., Parthasarathi, R. 2013. Biosurfactant production by *Serratia rubidaea* SNAU02 isolated from hydrocarbon contaminated soil and its physico-chemical characterization. *Bioresource technology*, **147**, 619-622.
- Namwong, S., Tanasupawat, S. 2014. Identification of *Staphylococcus* strain CH1-8 and its oil-degradation. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **4**, 024-029.
- Nanjani, S.G., Soni, H.P. 2013. Characterization of an extremely halotolerant *Staphylococcus arlettae* HPSSN35C isolated from Dwarka Beach, India. *Journal of Basic Microbiology*, **54**(8), 843-850.
- Nayak, A.S., Vijaykumar, M., Karegoudar, T. 2009. Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **63**(1), 73-79.
- Nedia, G., Chafai, A., Moncef, S.M., Chokri, Y. 2011. Spatial distribution of heavy metals in the coastal zone of “Sfax-Kerkennah” plateau, Tunisia. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, **30**(2), 221-233.
- Nikitha, T., Satyaprakash, M., Vani, S.S., Sadhana, B., Padal, S. 2017. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: their transport, fate and biodegradation in the environment. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, **6**(4), 1627-1639.
- Nwinyi, O.C., Ajayi, O.O., Amund, O.O. 2016. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by two strains of *Pseudomonas*. *brazilian journal of microbiology*, **47**(3), 551-562.
- O'Toole, G.A. 2011. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments: JoVE*(47).
- O'Hara, P.D., Morandin, L.A. 2010. Effects of sheens associated with offshore oil and gas development on the feather microstructure of pelagic seabirds. *Marine Pollution Bulletin*, **60**(5), 672-678.
- Onbasli, D., Aslim, B. 2009. Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas* spp. *J Environ Biol*, **30**(1), 161-163.
- Ongena, M., Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in microbiology*, **16**(3), 115-125.
- Onwosi, C.O., Odibo, F.J.C. 2012. Effects of carbon and nitrogen sources on rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas nitroreducens* isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **28**(3), 937-942.

- Ortmann, A.C., Lu, Y. 2015. Initial community and environment determine the response of bacterial communities to dispersant and oil contamination. *Marine Pollution Bulletin*, **90**(1), 106-114.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Piotrowska-Seget, Z., Cameotra, S.S. 2011. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International journal of molecular sciences*, **12**(1), 633-654.
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G.A., Poliwoda, A., Piotrowska-Seget, Z. 2014. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research*, **21**(15), 9385-9395.
- Padmapriya, B., Suganthi, S., Anishya, R. 2013. Screening, optimization and production of biosurfactants by *Candida* species isolated from oil polluted soils. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, **13**(2), 227-233.
- Pailan, S., Saha, P. 2015. Chemotaxis and degradation of organophosphate compound by a novel moderately thermo-halo tolerant *Pseudomonas* sp. strain BUR11: evidence for possible existence of two pathways for degradation. *PeerJ*, **3**, e1378.
- Paissé, S., Coulon, F., Goñi-Urriza, M., Peperzak, L., McGENITY, T.J., Duran, R. 2008. Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment. *FEMS microbiology ecology*, **66**(2), 295-305.
- Palmisano, M.M., Nakamura, L.K., Duncan, K.E., Istock, C.A., Cohan, F.M. 2001. *Bacillus sonorensis* sp. nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the Sonoran Desert, Arizona. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**(5), 1671-1679.
- Paralovo, S.L., Borillo, G.C., Barbosa, C.G.G., Godoi, A.F.L., Yamamoto, C.I., de Souza, R.A.F., Andreoli, R.V., Costa, P.S., Almeida, G.P., Manzi, A.O., Pöhlker, C., Yáñez-Serrano, A.M., Kesselmeier, J., Godoi, R.H.M. 2016. Observations of atmospheric monoaromatic hydrocarbons at urban, semi-urban and forest environments in the Amazon region. *Atmospheric Environment*, **128**, 175-184.
- Park, S., Yoon, S.Y., Jung, Y.-T., Won, S.-M., Yoon, J.-H. 2016. *Gramella sediminilitoris* sp. nov., isolated from a tidal flat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **66**(7), 2704-2710.
- Patel, S., Ahmed, S., Eswari, J.S. 2015. Therapeutic cyclic lipopeptides mining from microbes: latest strides and hurdles. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **31**(8), 1177-1193.
- Patil, S., Paradeshi, J., Chaudhari, B. 2016. Suppression of charcoal rot in soybean by moderately halotolerant *Pseudomonas aeruginosa* GS-33 under saline conditions. *Journal of Basic Microbiology*, **56**(8), 889-899.
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M.C., Deka, S. 2017. Characterization of Biosurfactant Produced during Degradation of Hydrocarbons Using Crude Oil As Sole Source of Carbon. *Frontiers in Microbiology*, **8**(279).
- Patton, J.F., Dieter, M.P. 1980. Effects of petroleum hydrocarbons on hepatic function in the duck. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, **65**(1), 33-36.
- Patzelt, H. 2005. Hydrocarbon degradation under hypersaline conditions. in: *Adaptation to life at high salt concentrations in archaea, bacteria, and eukarya*, Springer, pp. 105-122.
- Pecci, Y., Rivardo, F., Martinotti, M.G., Allegrone, G. 2010. LC/ESI-MS/MS characterisation of lipopeptide biosurfactants produced by the *Bacillus licheniformis* V9T14 strain. *Journal of Mass Spectrometry*, **45**(7), 772-778.
- Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Xue, Y., Fu, X.-Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.-S., Yao, Q.-H. 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS microbiology reviews*, **32**(6), 927-955.
- Peng, S. 2015. The nutrient, total petroleum hydrocarbon and heavy metal contents in the seawater of Bohai Bay, China: Temporal-spatial variations, sources, pollution statuses, and ecological risks. *Marine Pollution Bulletin*, **95**(1), 445-451.
- Perfumo, A., Banat, I.M., Canganella, F., Marchant, R. 2005. Rhamnolipid production by a novel thermophilic hydrocarbon-degrading *Pseudomonas aeruginosa* AP02-1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **72**(1), 132.



- Pornsunthorntawee, O., Arttaweeporn, N., Paisanjit, S., Somboonthanate, P., Abe, M., Rujiravanit, R., Chavadej, S. 2008. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recovery. *Biochemical Engineering Journal*, **42**(2), 172-179.
- Potters, G. 2013. Marine Pollution. 1st edition, Dr. Geert Potters ISBN 978-87-403-0540-1, <http://bookboon.com/en/marine-pollution-ebook>.
- Powell, S.M., Bowman, J.P., Ferguson, S.H., Snape, I. 2010. The importance of soil characteristics to the structure of alkane-degrading bacterial communities on sub-Antarctic Macquarie Island. *Soil Biology and Biochemistry*, **42**(11), 2012-2021.
- Prince, R.C., Gramain, A., McGenity, T.J. 2010. Prokaryotic Hydrocarbon Degraders. in: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, (Ed.) K.N. Timmis, Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg, pp. 1669-1692.
- PROJET SMAP III - Tunisie, 2006 -2008. Stratégies de gestion intégrée des zones côtières pour les régions du KROUMIRIE ET MOGODS et les municipalités de Sfax.
- Qi, J., Wang, B., Li, J., Ning, H., Wang, Y., Kong, W., Shen, L. 2015. Genetic determinants involved in the biodegradation of naphthalene and phenanthrene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Environmental Science and Pollution Research*, **22**(9), 6743-6755.
- Quail, M.A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T.D., Harris, S.R., Connor, T.R., Bertoni, A., Swerdlow, H.P., Gu, Y. 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC genomics*, **13**(1), 341.
- Quéguiner, B. 2009. Biogéochimie Côtière. Centre d'Océanologie de Marseille, Aix-Marseille Université; CNRS; LOPB UMR 6535, Laboratoire d'Océanographie et de Biogéochimie, OSU/Centre d'Océanologie de Marseille, pp 49.
- Rajasekar, A., Babu, T.G., Pandian, S.K., Maruthamuthu, S., Palaniswamy, N., Rajendran, A. 2007. Biodegradation and corrosion behavior of manganese oxidizer *Bacillus cereus* ACE4 in diesel transporting pipeline. *Corrosion Science*, **49**(6), 2694-2710.
- Rajendhran, J., Gunasekaran, P. 2011. Microbial phylogeny and diversity: small subunit ribosomal RNA sequence analysis and beyond. *Microbiological research*, **166**(2), 99-110.
- Rajeswari, V., Priyadarshini, S.K., Saranya, V., Suguna, P., Shenbagarathai, R. 2016. Immunostimulation by phospholipopeptide biosurfactant from *Staphylococcus hominis* in *Oreochromis mossambicus*. *Fish & shellfish immunology*, **48**, 244-253.
- Ramani, K., Jain, S.C., Mandal, A.B., Sekaran, G. 2012. Microbial induced lipoprotein biosurfactant from slaughterhouse lipid waste and its application to the removal of metal ions from aqueous solution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **97**, 254-263.
- Randhawa, K.K.S., Rahman, P.K.S.M. 2014. Rhamnolipid biosurfactants - past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in Microbiology*, **5**, 454.
- Ranjard, L. 2012. L'apport des techniques de la biologie moléculaire à la connaissance de la biodiversité microbienne dans les sols et de ses fonctions. *Innovations Agronomiques (21)*, 31-43.(2012).
- Readman, J., Fillmann, G., Tolosa, I., Bartocci, J., Villeneuve, J.-P., Catinni, C., Mee, L. 2002. Petroleum and PAH contamination of the Black Sea. *Marine Pollution Bulletin*, **44**(1), 48-62.
- Reddy, M.S., Basha, S., Joshi, H., Ramachandraiah, G. 2005. Seasonal distribution and contamination levels of total PHCs, PAHs and heavy metals in coastal waters of the Alang-Sosiya ship scrapping yard, Gulf of Cambay, India. *Chemosphere*, **61**(11), 1587-1593.
- Rehm, H., Reiff, I. 1981. Mechanisms and occurrence of microbial oxidation of long-chain alkanes. in: *Reactors and Reactions*, Springer, pp. 175-215.
- Rehmann, K., Noll, H.P., Steinberg, C.E., Kettrup, A.A. 1998. Pyrene degradation by *Mycobacterium* sp. strain KR2. *Chemosphere*, **36**(14), 2977-2992.
- Reis, R., Pacheco, G., Pereira, A., Freire, D. 2013. Biosurfactants: production and applications. in: *Biodegradation-Life of Science*, InTech.
- Rey, M.W., Ramaiya, P., Nelson, B.A., Brody-Karpin, S.D., Zaretsky, E.J., Tang, M., de Leon, A.L., Xiang, H., Gusti, V., Clausen, Ib.G., Olsen, P.B., Rasmussen, M.D., Andersen, J.T., Jørgensen, P.L., Larsen, T.S., Sorokin, A. 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. *Genome Biology*, **5**(10), R77.

- Řezanka, T., Siristova, L., Sigler, K. 2011. Rhamnolipid-producing thermophilic bacteria of species *Thermus* and *Meiothermus*. *Extremophiles*, **15**(6), 697.
- Richir, J., Gobert, S. 2016. Trace elements in marine environments: occurrence, threats and monitoring with special focus on the costal mediterranean. *Journal of Environmental and Analytical Toxicology*, **6**(1).
- Rivardo, F., Turner, R.J., Allegrone, G., Ceri, H., Martinotti, M.G. 2009. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **83**(3), 541-553.
- Roberts M.S., Nakamura, L. K., Cohan, F.M. 1994. *Bacillus mojavensis* sp. nov., Distinguishable from *Bacillus subtilis* by Sexual Isolation, Divergence in DNA Sequence, and Differences in Fatty Acid Composition. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44**(2), 256-264.
- Rodier, J., Bazin, C., Broutin, J., Chambon, P., Champsaur, H., Rodi, L. 1996. L'Analyse de l'Eau (8ème édn). *Dunod, Paris: France*.
- Rodrigues, L., Banat, I.M., Teixeira, J., Oliveira, R. 2006. Biosurfactants: potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **57**(4), 609-618.
- Rodrigues, L., Van der Mei, H.C., Teixeira, J., Oliveira, R. 2004. Influence of biosurfactants from probiotic bacteria on formation of biofilms on voice prostheses. *Applied and environmental microbiology*, **70**(7), 4408-4410.
- Ron, E.Z., Rosenberg, E. 2014. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. *Current Opinion in biotechnology*, **27**, 191-194.
- Ronaghi, M., Uhlen, M., Nyren, P. 1998. Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Analytic Biochemistry*, **242**(1), 84-89.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M., Nyren, P. 1996. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, **281**, 363-365.
- Rooney, A.P., Price, N.P., Ray, K.J., Kuo, T.-M. 2009. Isolation and characterization of rhamnolipid-producing bacterial strains from a biodiesel facility. *FEMS microbiology letters*, **295**(1), 82-87.
- Rosano-Hernández, M.C., Ramírez-Saad, H., Fernández-Linares, L. 2012. Petroleum-influenced beach sediments of the Campeche Bank, Mexico: diversity and bacterial community structure assessment. *Journal of environmental management*, **95**, S325-S331.
- Rosenberg, E., Ron, E. 1999. High-and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, **52**(2), 154-162.
- Rosenberg, E., Schwartz, Z., Tenenbaum, A., Rubinovitz, C., Legmann, R., Ron, E.Z. 1989. A MICROBIAL POLYMER THAT CHANGES THE SURFACE PROPERTIES OF LIMESTONE: EFFECT OF BIODISPERSAN IN GRINDING LIMESTONE AND MAKING PAPER. *Journal of Dispersion Science and Technology*, **10**(3), 241-250.
- Rubio-Ribeaux, D., da Silva Andrade, R.F., da Silva, G.S., de Holanda, R.A., Pele, M.A., Nunes, P., Campos-Takaki, G.M. 2017. Promising biosurfactant produced by a new *Candida tropicalis* UCP 1613 strain using substrates from renewable-resources. *African Journal of Microbiology Research*, **11**(23), 981-991.
- Sadouk, Z., Hacene, H., Tazerouti, A. 2008. Biosurfactants Production from Low Cost Substrate and Degradation of Diesel Oil by a *Rhodococcus* Strain. *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP*, **63**(6), 747-753.
- Sahnoun, R., Mnif, I., Fetoui, H., Gdoura, R., Chaabouni, K., Makni-Ayadi, F., Kallel, C., Ellouze-Chaabouni, S., Ghribi, D. 2014. Evaluation of *Bacillus subtilis* SPB1 Lipopeptide Biosurfactant Toxicity Towards Mice. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, **20**(3), 333-340.
- Salehizadeh, H., Mohammadizad, S. 2009. Microbial enhanced oil recovery using biosurfactant produced by *Alcaligenes faecalis*. *Iranian Journal of Biotechnology*, **7**(4), 216-223.
- Salihu, A., Abdulkadir, I., Almstapha, M.N. 2009. An investigation for potential development on biosurfactants. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, **4**(5), 111-117.
- Salvà-Serra, F., Jakobsson, H.E., Busquets, A., Gomila, M., Jaén-Luchoro, D., Seguí, C., Aliaga-Lozano, F., García-Valdés, E., Lalucat, J., Moore, E.R. 2017. Genome Sequences of Two Naphthalene-Degrading Strains of *Pseudomonas balearica*, Isolated from Polluted Marine Sediment and from an Oil Refinery Site. *Genome announcements*, **5**(14), e00116-17.

- Sana, S., Datta, S., Biswas, D., Sengupta, D. 2018. Assessment of synergistic antibacterial activity of combined biosurfactants revealed by bacterial cell envelop damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, **1860**(2), 579-585.
- Santanu, S., Mazumder, A., Datta, S., Biswas, D. 2017. Towards the development of an effective in vivo wound healing agent from *Bacillus* sp. derived biosurfactant using *Catla catla* fish fat. *RSC Advances*, **7**, 13668-13677.
- Santos, D., Rufino, R., Luna, J., Santos, V., Sarubbo, L. 2016. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**(3), 401.
- Sarwar, A., Hassan, M.N., Imran, M., Iqbal, M., Majeed, S., Brader, G., Sessitsch, A., Hafeez, F.Y. 2018. Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease. *Microbiological Research*, **209**, 1-13.
- Sayadi, S., Zorgani, F., Ellouz, R. 1996. Decolorization of olive mill waste-waters by free and immobilized *Phanerochaete chrysosporium* cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **56**(3), 265-276.
- Schneiker, S., dos Santos, V.A.M., Bartels, D., Bekel, T., Brecht, M., Buhrmester, J., Chernikova, T.N., Denaro, R., Ferrer, M., Gertler, C. 2006. Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nature biotechnology*, **24**(8), 997.
- Schuler, B., Meyer, G., Peña, D., Mullins, O.C., Gross, L. 2015. Unraveling the Molecular Structures of Asphaltenes by Atomic Force Microscopy. *Journal of the American Chemical Society*, **137**(31), 9870-9876.
- Schultz, M.P., Bendick, J.A., Holm, E.R., Hertel, W.M. 2011. Economic impact of biofouling on a naval surface ship. *Biofouling*, **27**(1), 87-98.
- Sekhona Randhawa, K.K., Rahman, P.K. 2014. Rhamnolipid biosurfactants—past, present, and future scenario of global market. *Frontiers in microbiology*, **5**, 454.
- Sellami, M., Khlifi, A., Frikha, F., Miled, N., Belbahri, L., Rebah, F.B. 2016. Agro-industrial waste based growth media optimization for biosurfactant production by *Aneurinibacillus migulanus*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **5**(6), 578-583.
- Seo, J.-S., Keum, Y.-S., Li, Q. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *International journal of environmental research and public health*, **6**(1), 278-309.
- Šepič, E., Bricelj, M., Leskovšek, H. 1998. Degradation of fluoranthene by *Pasteurella* sp. IFA and *Mycobacterium* sp. PYR-1: isolation and identification of metabolites. *Journal of applied microbiology*, **85**(4), 746-754.
- Serbaji, M., Azri, C., Medhioub, K. 2012. Anthropogenic contributions to heavy metal distributions in the surface and sub-surface sediments of the northern coast of Sfax, Tunisia. *International Journal of Environmental Research*, **6**(3), 613-626.
- Shahidul Islam, M., Tanaka, M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, **48**(7), 624-649.
- Sharma, D., Saharan, B.S., Chauhan, N., Procha, S., Lal, S. 2015. Isolation and functional characterization of novel biosurfactant produced by *Enterococcus faecium*. *SpringerPlus*, **4**(1), 4.
- Shekhar, S., Sundaramanickam, A., Balasubramanian, T. 2015. Biosurfactant Producing Microbes and their Potential Applications: A Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **45**(14), 1522-1554.
- Shen, C., Jiang, L., Shao, H., You, C., Zhang, G., Ding, S., Bian, T., Han, C., Meng, Q. 2016. Targeted killing of myofibroblasts by biosurfactant di-rhamnolipid suggests a therapy against scar formation. *Scientific Reports*, **6**, 37553.
- Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G.S.N., Dutt, C.B.S., Wainwright, M., Narlikar, J.V., Bhargava, P.M. 2006. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**(7), 1465-1473.
- Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F., Hajibabaei, M. 2012. Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular ecology*, **21**(8), 1794-1805.

- Siddikee, M.A., Chauhan, P.S., Anandham, R., Han, G.-H, Sa, T. 2010. Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coastal soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **20**(1), 1577-1584.
- Silva, S.N.R.L., Farias, C.B.B., Rufino, R.D., Luna, J.M., Sarubbo, L.A. 2010. Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **79**(1), 174-183.
- Simonich, S.L.M., Motorykin, O., Jariyasopit, N. 2011. PAH intermediates: Links between the atmosphere and biological systems. *Chemico-Biological Interactions*, **192**(1), 26-29.
- Singh, D.N., Tripathi, A.K. 2013. Coal induced production of a rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas stutzeri*, isolated from the formation water of Jharia coalbed. *Bioresource technology*, **128**, 215-221.
- Singh, P., Patil, Y., Rale, V. Biosurfactant production: emerging trends and promising strategies. *Journal of Applied Microbiology*, **1**, 12.
- Souza, A., Rodriguez, D., Ribeaux, D., Luna, M., Lima e Silva, T., Andrade, R., Gusmão, N., Campos-Takaki, G. 2016. Waste Soybean Oil and Corn Steep Liquor as Economic Substrates for Bioemulsifier and Biodiesel Production by *Candida lipolytica* UCP 0998. *International Journal of Molecular Sciences*, **17**(10), 1608.
- Srinivasa Reddy, M., Basha, S., Joshi, H.V., Ramachandraiah, G. 2005. Seasonal distribution and contamination levels of total PHCs, PAHs and heavy metals in coastal waters of the Alang–Sosiya ship scrapping yard, Gulf of Cambay, India. *Chemosphere*, **61**(11), 1587-1593.
- Sriram, M.I., Kalishwaralal, K., Deepak, V., Gracerosepat, R., Srisakthi, K., Gurunathan, S. 2011. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **85**(2), 174-181.
- Stipcevic, T., Piljac, A., Piljac, G. 2006. Enhanced healing of full-thickness burn wounds using di-rhamnolipid. *Burns*, **32**(1), 24-34.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, **56**(1), 187-209.
- Stubblefield, W.A., Brinkman, S.F., Davies, P.H., Garrison, T.D., Hockett, J.R., McIntyre, M.W. 1997. Effects of water hardness on the toxicity of manganese to developing brown trout (*Salmo trutta*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**(10), 2082-2089.
- Sun, M.Y., Dafforn, K.A., Brown, M.V. Johnston, E.L. 2012. Bacterial communities are sensitive indicators of contaminant stress. *Marine Pollution Bulletin*, **64**(5), 1029-38.
- Suthar, H., Nerurkar, A. 2016. Characterization of Biosurfactant Produced by *Bacillus licheniformis* TT42 Having Potential for Enhanced Oil Recovery. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **180**(2), 248-260.
- Talluto, D. 2013. Impacts du déversement d'hydrocarbures sur les populations d'oiseaux marins. Master 1 BOE Gestion. Université Catholique de Louvain.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, **30**(12), 2725-2729.
- Tan, T., Wang, B., Shao, Z. 2009. *Donghicola xiamenensis* sp. nov., a marine bacterium isolated from seawater of the Taiwan Strait in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**(5), 1143-1147.
- Tapi, A., Chollet-Imbert, M., Scherens, B., Jacques, P. 2010. New approach for the detection of non-ribosomal peptide synthetase genes in *Bacillus* strains by polymerase chain reaction. *Applied microbiology and biotechnology*, **85**(5), 1521-1531.
- Tapilatu, Y.H., Grossi, V., Acquaviva, M., Milton, C., Bertrand, J.-C., Cuny, P. 2010. Isolation of hydrocarbon-degrading extremely halophilic archaea from an uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France). *Extremophiles*, **14**(2), 225-231.
- Tavares, L.F., Silva, P.M., Junqueira, M., Mariano, D.C., Nogueira, F.C., Domont, G.B., Freire, D.M., Neves, B.C. 2013. Characterization of rhamnolipids produced by wild-type and engineered *Burkholderia kururiensis*. *Applied microbiology and biotechnology*, **97**(5), 1909-1921.



- Teramoto, M., Ohuchi, M., Hatmanti, A., Darmayati, Y., Widyastuti, Y., Harayama, S., Fukunaga, Y. 2011. *Oleibacter marinus* gen. nov., sp. nov., a bacterium that degrades petroleum aliphatic hydrocarbons in a tropical marine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **61**(2), 375-380.
- Thamdrup, B., Canfield, D.E. 2000. Benthic Respiration in Aquatic Sediments. in: *Methods in Ecosystem Science*, (Eds.) O.E. Sala, R.B. Jackson, H.A. Mooney, R.W. Howarth, Springer New York. New York, NY, pp. 86-103.
- Tissot, B., Welte, D. 1978. *Petroleum formation and occurrence: A new approach to oil and gas exploration*. Springer.
- Torsvik, V., Sørheim, R., Goksøyr, J. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities—a review. *Journal of Industrial Microbiology*, **17**(3-4), 170-178.
- Tortella, G.R., Diez, M.C., Durán, N. 2005. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. *Critical Reviews in Microbiology*, **31**(4), 197-212.
- TUFFERY, G. 1980. ÉLÉMENTS DE GESTION ÉCOSANITAIRE DES ÉTANGS. *La pisciculture en étang: actes du Congrès sur la Pisciculture en Étang, Arbonne-la-Forêt, France, 11-12-13 mars 1980*, 373.
- Van Hamme, J.D., Singh, A., Ward, O.P. 2006. Petroleum microbiology part 1: underlying biochemistry and physiology. *Chimica oggi*, **24**(1).
- Vasileva-Tonkova, E., Galabova, D., Stoimenova, E., Lalchev, Z. 2006. Production and properties of biosurfactants from a newly isolated *Pseudomonas fluorescens* HW-6 growing on hexadecane. *Zeitschrift für Naturforschung C*, **61**(7-8), 553-559.
- Velma, V., Vutukuru, S., Tchounwou, P.B. 2009. Ecotoxicology of hexavalent chromium in freshwater fish: a critical review. *Reviews on environmental health*, **24**(2), 129-146.
- Vijaya, B., Jayalakshmi, N.R., Manjunath, K. 2013. Enumeration of biosurfactant producing microorganisms from oil contaminated soil in and around Bangalore (India). *International Journal of Current Science*, **5**, 86-94.
- Vijayakumar, S., Saravanan, V. 2015. Biosurfactants-Types, Sources and Applications. *Research Journal of Microbiology*, **10**(5), 181.
- Vikas, M., Dwarakish, G. 2015. Coastal pollution: a review. *Aquatic Procedia*, **4**, 381-388.
- Vila, J., López, Z., Sabaté, J., Minguillón, C., Solanas, A.M., Grifoll, M. 2001. Identification of a novel metabolite in the degradation of pyrene by *Mycobacterium* sp. strain AP1: actions of the isolate on two- and three-ring polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(12), 5497-5505.
- Vilela, W.F.D., Fonseca, S.G., Fantinatti-Garboggini, F., Oliveira, V.M., Nitschke, M. 2014. Production and Properties of a Surface-Active Lipopeptide Produced by a New Marine *Brevibacterium luteolum* Strain. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **174**(6), 2245-2256.
- Volkman, J.K., Holdsworth, D.G., Neill, G.P., Bavor Jr, H. 1992. Identification of natural, anthropogenic and petroleum hydrocarbons in aquatic sediments. *Science of the Total Environment*, **112**(2-3), 203-219.
- Wafi, H.N. 2015. Assessment of heavy metals contamination in the Mediterranean Sea along Gaza Coast-A case study of Gaza fishing harbor, Master Thesis, Institute of Water and Environment, Al-Azhar University, Gaza, Palestine.
- Wahl, M., Goecke, F., Labes, A., Dobretsov, S., Weinberger, F. 2012. The Second Skin: Ecological Role of Epibiotic Biofilms on Marine Organisms. *Frontiers in Microbiology*, **3**(292).
- Wald, J., Hroudova, M., Jansa, J., Vrchotova, B., Macek, T., Uhlik, O. 2015. Pseudomonads rule degradation of polyaromatic hydrocarbons in aerated sediment. *Frontiers in microbiology*, **6**, 1268.
- Wang, H., Frenklach, M. 1994. Transport properties of polycyclic aromatic hydrocarbons for flame modeling. *Combustion and Flame*, **96**(1), 163-170.
- Wang, L., Qiao, N., Sun, F., Shao, Z. 2008. Isolation, gene detection and solvent tolerance of benzene, toluene and xylene degrading bacteria from nearshore surface water and Pacific Ocean sediment. *Extremophiles*, **12**(3), 335-342.
- Wang, W., Wang, L., Shao, Z. 2010. Diversity and Abundance of Oil-Degrading Bacteria and Alkane Hydroxylase (alkB) Genes in the Subtropical Seawater of Xiamen Island. *Microbial Ecology*, **60**(2), 429-439.

- Ward, D.M., Santegoeds, C.M., Nold, S.C., Ramsing, N.B., Ferris, M.J., Bateson, M.M. 1997. Biodiversity within hot spring microbial mat communities: molecular monitoring of enrichment cultures. *Antonie van Leeuwenhoek*, **71**(1-2), 143-150.
- Warshawsky, D., Cody, T., Radike, M., Reilman, R., Schumann, B., LaDow, K., Schneider, J. 1995. Biotransformation of benzo [a] pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light. *Chemico-biological interactions*, **97**(2), 131-148.
- Whang, L.-M., Liu, P.-W.G., Ma, C.-C., Cheng, S.-S. 2008. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. *Journal of Hazardous Materials*, **151**(1), 155-163.
- Wiese, F.K., Ryan, P.C. 2003. The extent of chronic marine oil pollution in southeastern Newfoundland waters assessed through beached bird surveys 1984–1999. *Marine Pollution Bulletin*, **46**(9), 1090-1101.
- Winker, S., Woese, C.R. 1991. A definition of the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eucarya* in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics. *Systematic and Applied Microbiology*, **14**(4), 305-310.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, **51**(2), 221.
- Won, N.-I., Kim, K.-H., Kang, J.H., Park, S.R., Lee, H.J. 2017. Exploring the impacts of anthropogenic disturbance on seawater and sediment microbial communities in Korean coastal waters using metagenomics analysis. *International journal of environmental research and public health*, **14**(2), 130.
- Wongwongsee, W., Chareanpat, P., Pinyakong, O. 2013. Abilities and genes for PAH biodegradation of *Bacteria* isolated from mangrove sediments from the central of Thailand. *Marine Pollution Bulletin*, **74**(1), 95-104.
- Wuchter, C., Abbas, B., Coolen, M.J.L., Herfort, L., van Bleijswijk, J., Timmers, P., Strous, M., Teira, E., Herndl, G.J., Middelburg, J.J., Schouten, S., Sinninghe Damsté, J.S. 2006. Archaeal nitrification in the ocean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(33), 12317-12322.
- Xia, W.-J., Luo, Z.-b., Dong, H.-P., Yu, L., Cui, Q.-F., Bi, Y.-Q. 2012. Synthesis, Characterization, and Oil Recovery Application of Biosurfactant Produced by Indigenous *Pseudomonas aeruginosa* WJ-1 Using Waste Vegetable Oils. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **166**(5), 1148-1166.
- Xiao, Y.-P., Hui, W., Wang, Q., Roh, S.W., Shi, X.-Q., Shi, J.-H., Quan, Z.-X. 2009. *Pseudomonas caeni* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from the sludge of an anaerobic ammonium-oxidizing bioreactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **59**(10), 2594-2598.
- Xu, H.X., Wu, H.Y., Qiu, Y.P., Shi, X.Q., He, G.H., Zhang, J.F., Wu, J.C. 2011. Degradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Herbaspirillum chlorophenicum* from activated sludge. *Biodegradation*, **22**(2), 335-345.
- Yakimov, M.M., Giuliano, L., Gentile, G., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, W.-R., Lünsdorf, 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 of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**(3), 779-785.
- Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R.B., Abraham, W.-R., Lünsdorf, H., Timmis, K.N. 1998. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **48**(2), 339-348.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V., Fredrickson, H.L. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and environmental microbiology*, **61**(5), 1706-1713.
- Yan, X., Sims, J., Wang, B., Hamann, M.T. 2014. Marine actinomycete *Streptomyces* sp. ISP2-49E, a new source of Rhamnolipid. *Biochemical systematics and ecology*, **55**, 292-295.
- Yang, Y., Wang, J., Liao, J., Xie, S. 2014. Distribution of Naphtalene Dioxygenase Genes in Crude Oil-Contaminated Soils. *Microbiol Ecology*, **68**(4), 785-793.

- Zaghden, H., Kallel, M., Elleuch, B., Oudot, J., Saliot, A. 2007. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments of Sfax, Tunisia, Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*, **105**(1-2), 70-89.
- Zaghden, H., Serbaji, M.M., Saliot, A., Sayadi, S. 2016. The Tunisian Mediterranean coastline: potential threats from urban discharges Sfax-Tunisian Mediterranean coasts. *Desalination and Water Treatment*, **57**(52), 24765-24777.
- Zaghden, H., Tedetti, M., Sayadi, S., Serbaji, M.M., Elleuch, B., Saliot, A. 2017. Origin and distribution of hydrocarbons and organic matter in the surficial sediments of the Sfax-Kerkennah channel (Tunisia, Southern Mediterranean Sea). *Marine pollution bulletin*, **117**(1-2), 414-428.
- Zenati, B., Chebbi, A., Badis, A., Eddouaouda, K., Boutoumi, H., El Hattab, M., Hentati, D., Chelbi, M., Sayadi, S., Chamkha, M., Franzetti, A. 2018. A non-toxic microbial surfactant from *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* SdK644 for crude oil solubilization enhancement. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **154**, 100-107.
- Zhang, J., Zhang, E., Scott, K., Burgess, J.G. 2012. Enhanced Electricity Production by Use of Reconstituted Artificial Consortia of Estuarine Bacteria Grown as Biofilms. *Environmental Science & Technology*, **46**(5), 2984-2992.
- Zhang, Z., Lo, I.M.C. 2015. Biostimulation of petroleum-hydrocarbon-contaminated marine sediment with co-substrate: involved metabolic process and microbial community. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99**(13), 5683-96.
- Zhou, H., Chen, J., Yang, Z., Qin, B., Li, Y., Kong, X. 2015. Biosurfactant production and characterization of *Bacillus* sp. ZG0427 isolated from oil-contaminated soil. *Annals of Microbiology*, **65**(4), 2255-2264.
- Zhu, X., Ni, X., Waigi, M.G., Liu, J., Sun, K., Gao, Y. 2016. Biodegradation of mixed PAHs by PAH-degrading endophytic bacteria. *International journal of environmental research and public health*, **13**(8), 805.
- Zhuang, W.Q., Tay, J.H., Maszenan, A., Krumholz, L., Tay, S.L. 2003. Importance of Gram-positive naphthalene-degrading bacteria in oil-contaminated tropical marine sediments. *Letters in applied microbiology*, **36**(4), 251-257.
- Zonta, R., Botter, M., Cassin, D., Pini, R., Scattolin, M., Zaggia, L. 2007. Sediment chemical contamination of a shallow water area close to the industrial zone of Porto Marghera (Venice Lagoon, Italy). *Marine Pollution Bulletin*, **55**(10-12), 529-542.
- Zouari, R., Moalla-Rekik, D., Sahnoun, Z., Rebai, T., Ellouze-Chaabouni, S., Ghribi-Aydi, D. 2016. Evaluation of dermal wound healing and in vitro antioxidant efficiency of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **84**, 878-891.
- Zumstein, E., Moletta, R., Godon, J.J. 2000. Examination of two years of community dynamics in an anaerobic bioreactor using fluorescence polymerase chain reaction (PCR) single-strand conformation polymorphism analysis. *Environmental Microbiology*, **2**(1), 69-78.



# **ANNEXES**

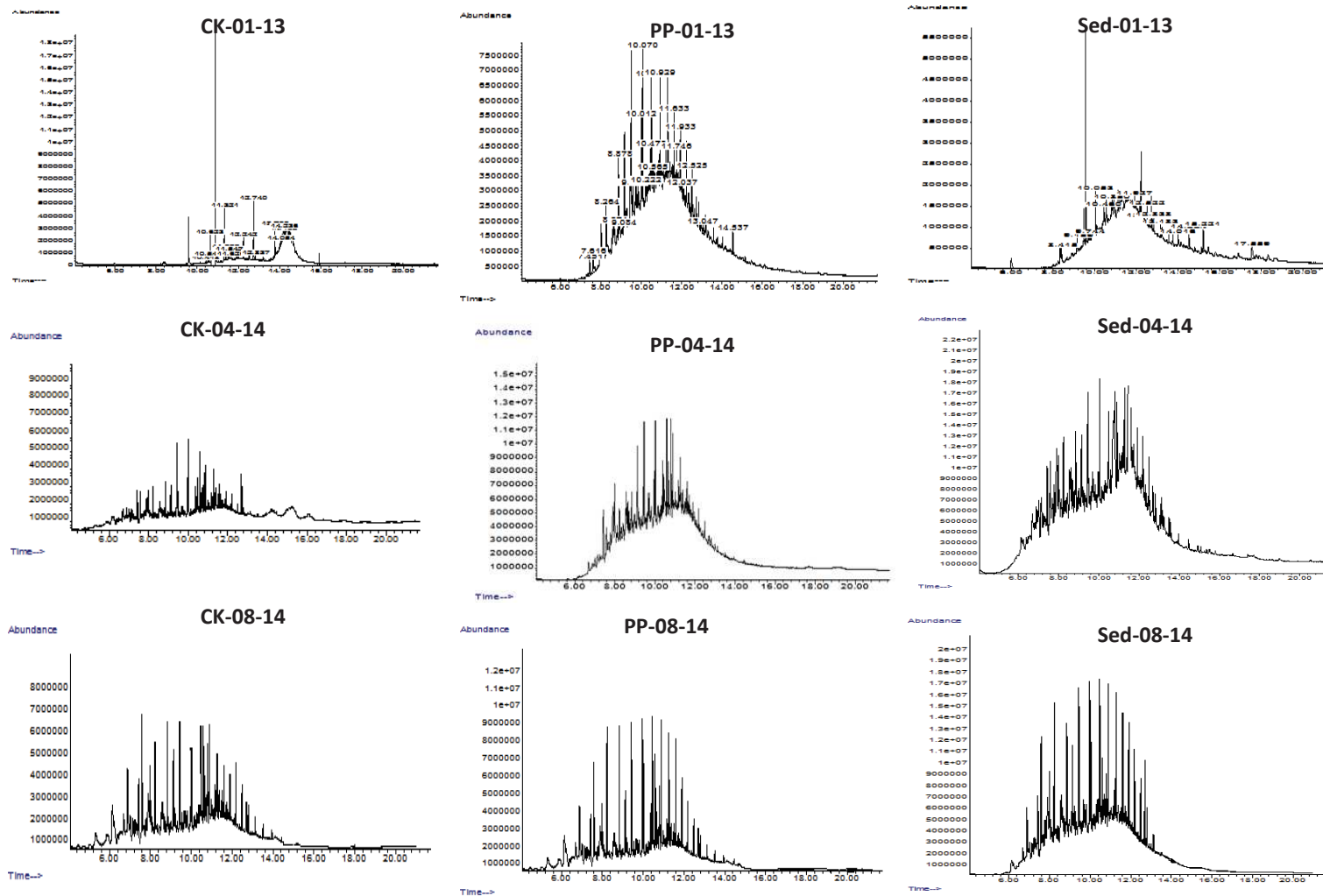
## ANNEXE I

Tableau. Propriétés physico-chimiques des 16 HAPs prioritaires (selon INERIS, 2005).

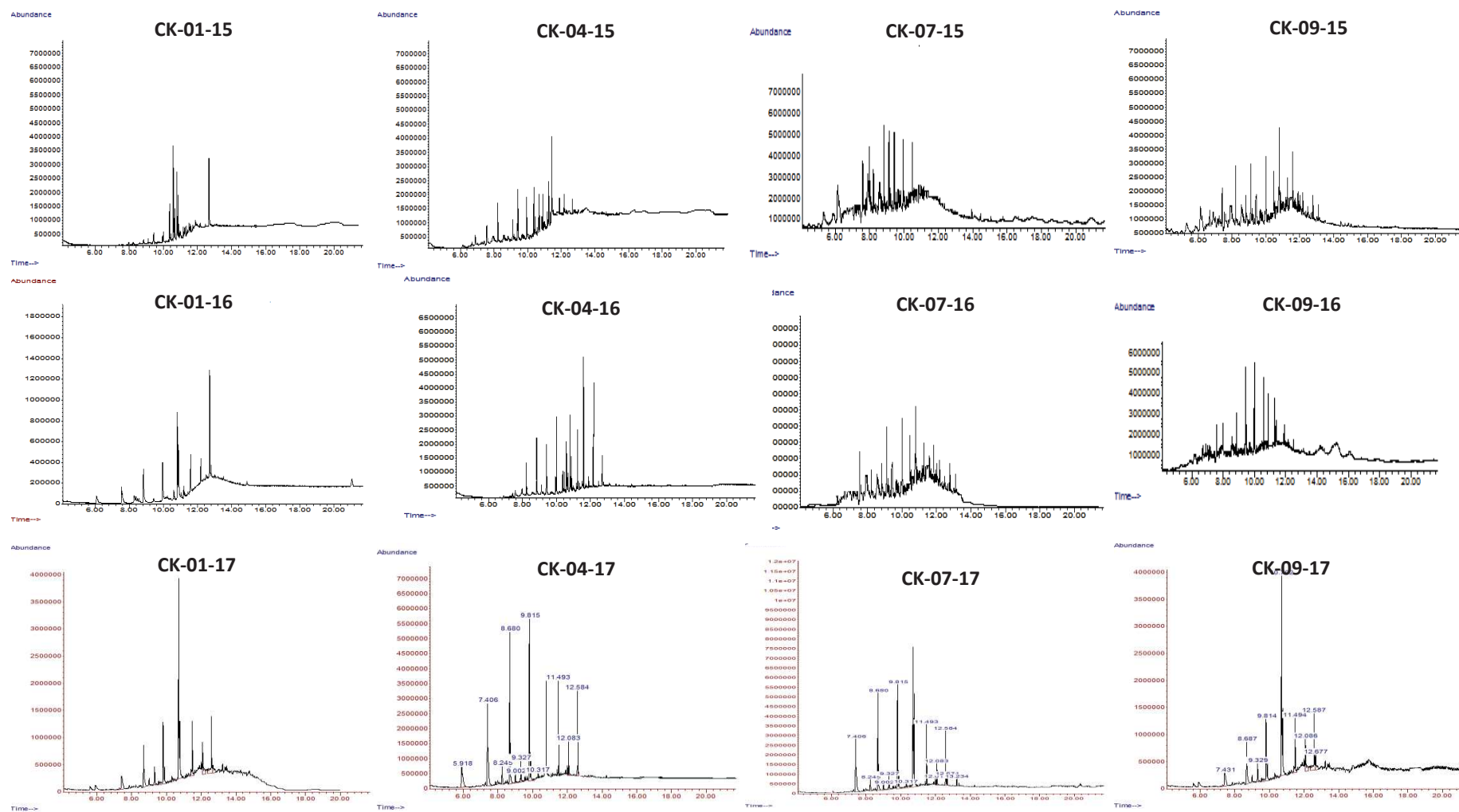
Nom des HAPs	Masse Molaire (g/mol)	Solubilité dans l'eau à 25 °C (mg/l)	Demi-vie (j=jour, a=année)	T <sub>fusion</sub> (°C)	T <sub>ébullition</sub> (°C)
Naphthalène	128,2	32	16-48j	80	218
Acénaphtylène	152,2	3,93	/	96	270
Acénaphène	154,2	3,42	/	92	277
Fluorène	166,2	1,9	32-60j	216	295
Phénanthrène	178,2	1	16-200j	116	340
Anthracène	178,2	0,07	50j-1,3a	101	342
Fluoranthène	202,3	0,27	140j-1,2a	111	375
Pyrène	202,3	0,16	210j-5,2a	149	404
Benz(a)anthracène	228,3	0,0057	102j-1,9a	255	435
Chrysène	228,3	0,002	1-2,7a	158	448
Benzo(a)pyrène	252,3	0,001	360j-1,7a	179	/
Benzo(b)fluoranthène	252,3	0,0008	2,5-5,9a	167	480
Dibenz(ah)anthracène	252,3	0,0038	57j-1,5a	217	495
Benzo(k)fluoranthène	278,3	0,0005	361j-2,6a	262	524
Benzo(ghi)oyrène	276,3	0,002	0,25a-1,8a	222	550
Irdeno(1,2,3-cd)pyrène	276,3	0,0008	1,6-2a	136	530

## ANNEXE II

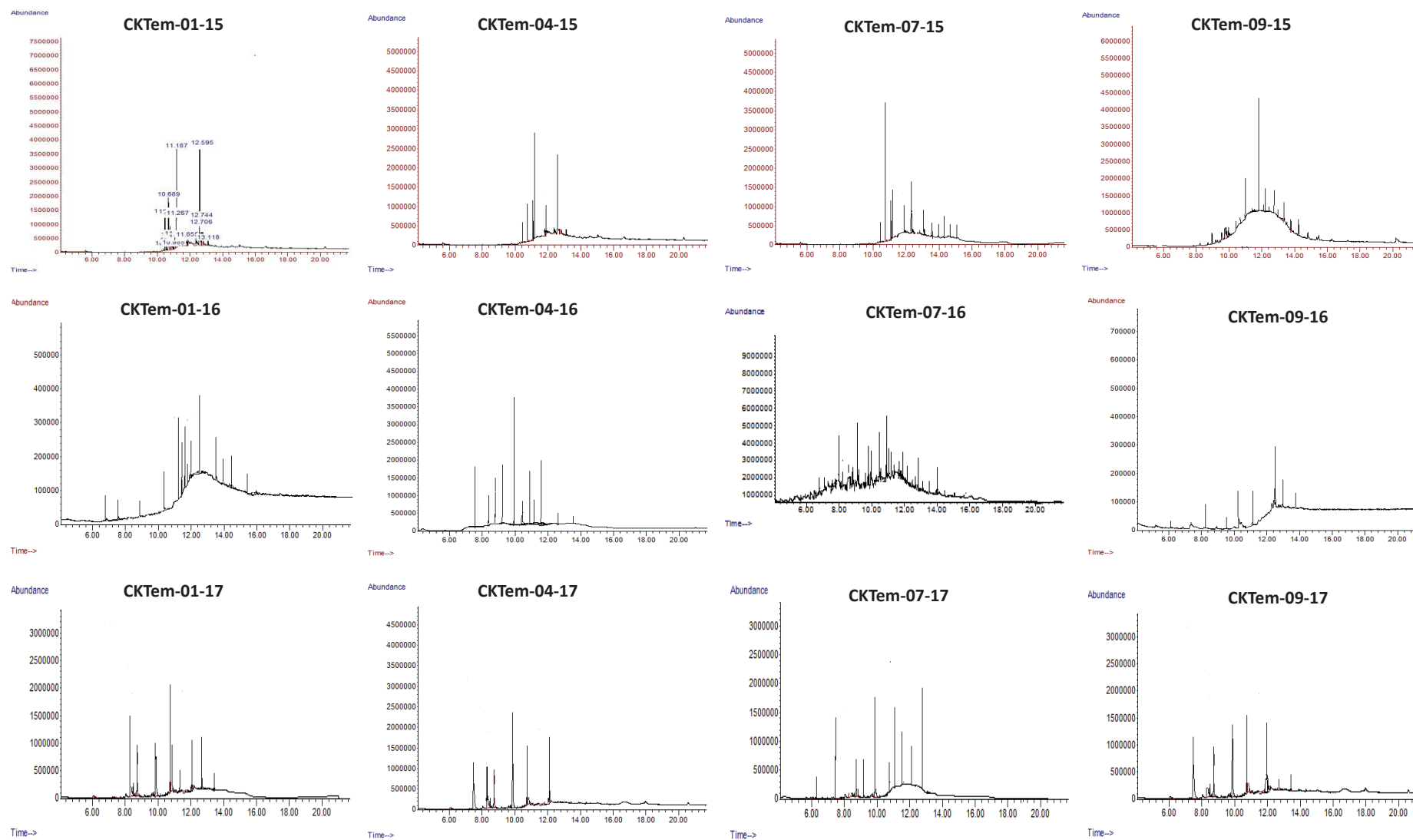
Figure 1. Chromatogrammes GC-MS montrant des hydrocarbures contenus dans les échantillons marins prélevés en 2013 et 2014.



**Figure 2.** Chromatogrammes GC-MS montrant des hydrocarbures contenus dans les eaux de mer polluées provenant du port de plaisance (CK) de Sfax, pendant 2015, 2016 et 2017.



**Figure 3.** Chromatogrammes GC-MS montrant des hydrocarbures contenus dans les eaux de mer témoins provenant du port de plaisance (CK) de Sfax, pendant 2015, 2016 et 2017.

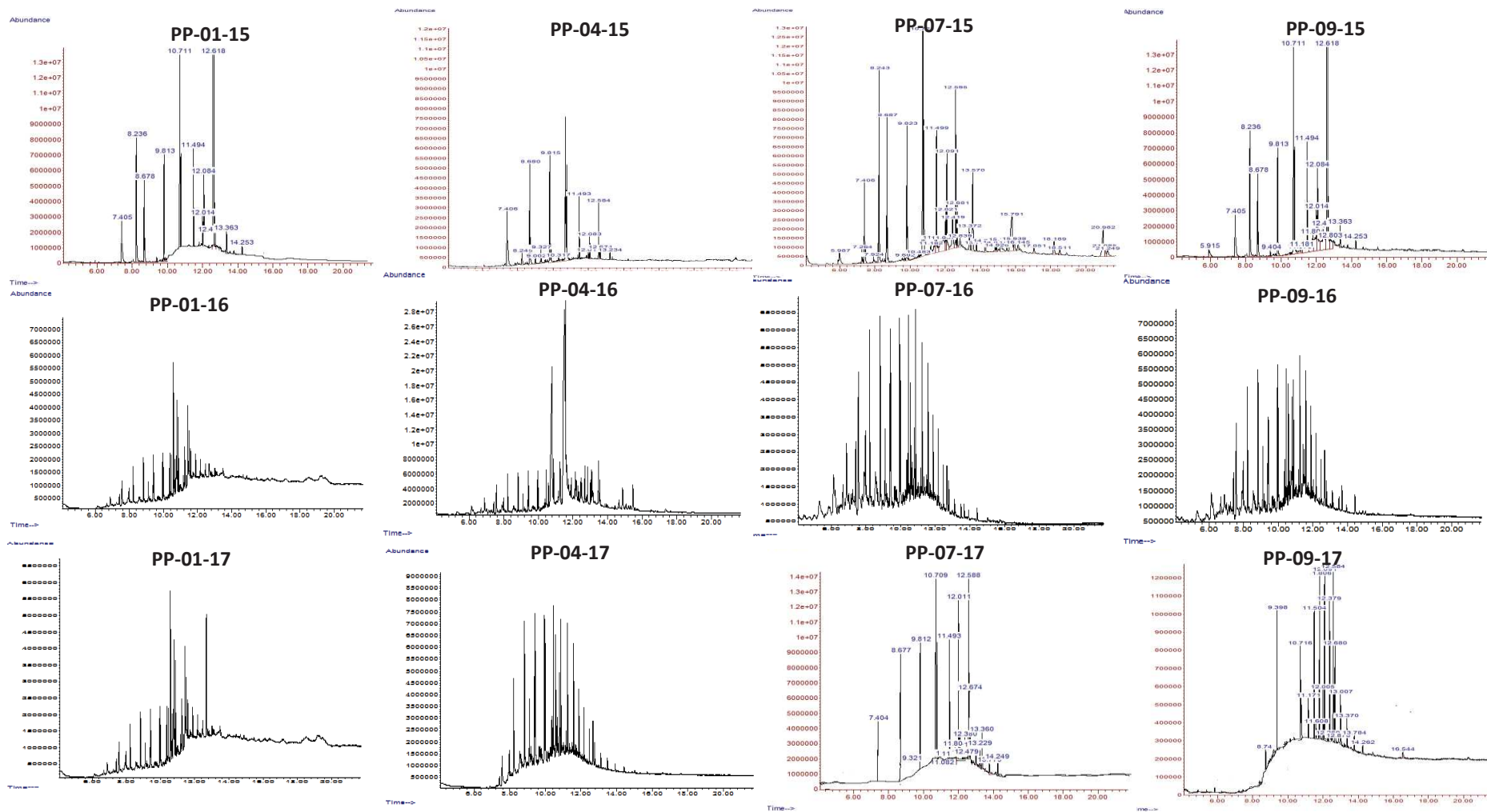




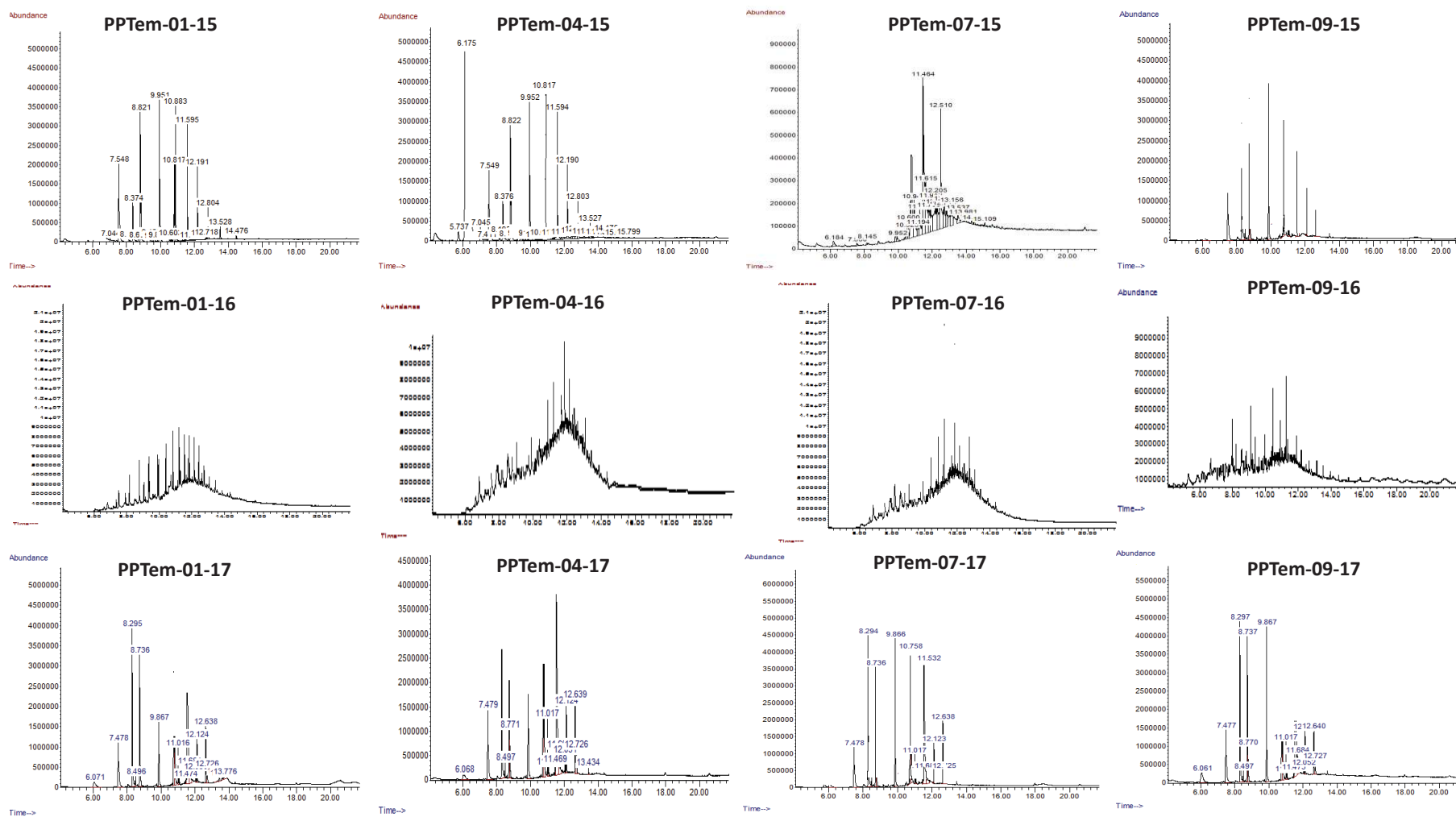




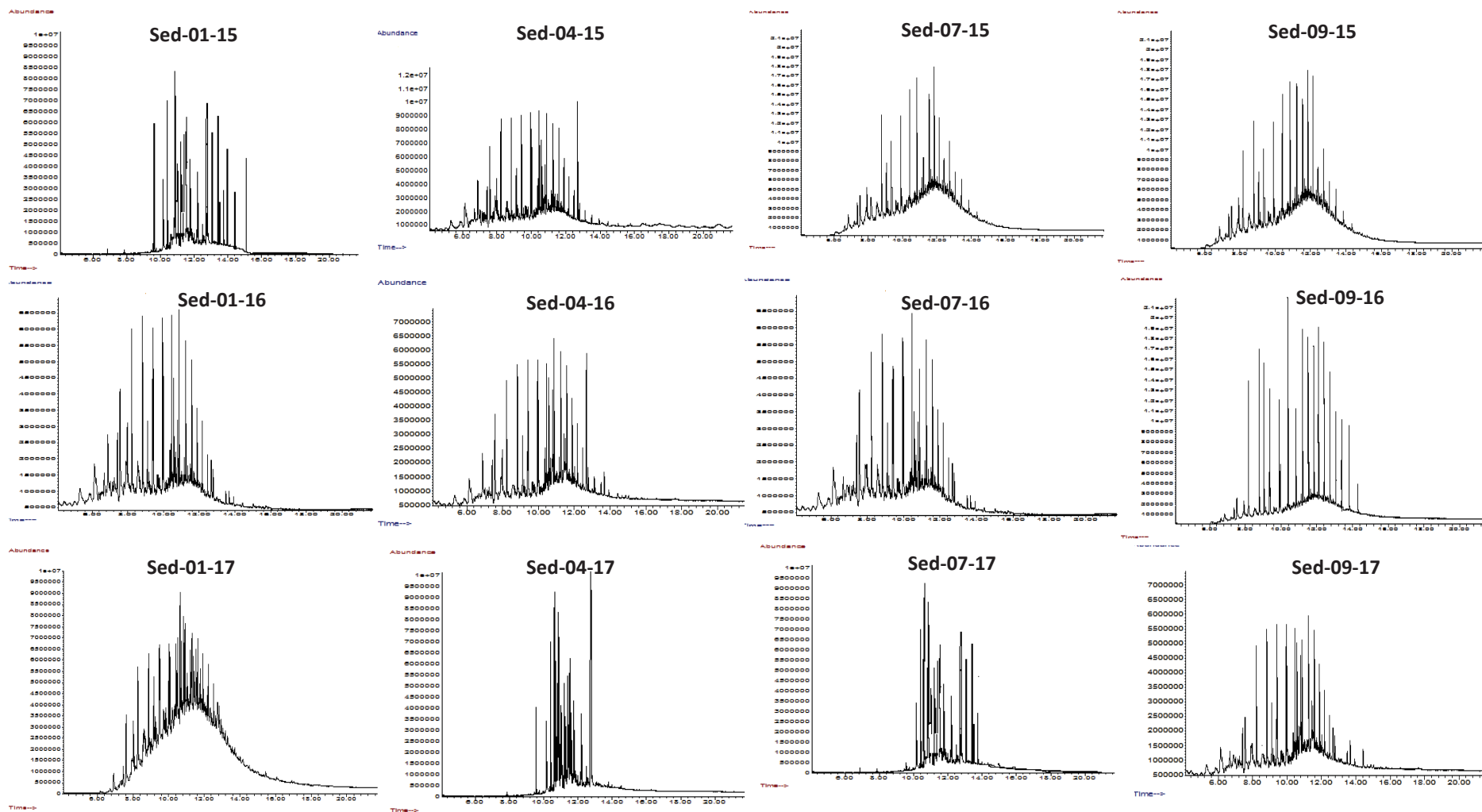
**Figure 6.** Chromatogrammes GC-MS montrant des hydrocarbures contenus dans les eaux de mer polluées provenant du port de pêche de Sfax, pendant 2015, 2016 et 2017.



**Figure 7.** Chromatogrammes GC-MS montrant des hydrocarbures contenus dans les eaux de mer témoins provenant du port de pêche de Sfax, pendant 2015, 2016 et 2017.



**Figure 8.** Chromatogrammes GC-MS montrant des hydrocarbures contenus dans les sédiments marins provenant du port de pêche de Sfax, pendant 2015, 2016 et 2017.





Composés (% d'identification $\geq$ 90)	MM (g/mol)	2013			2014					
		CK-01	PP-01	Sed-01	CK-04	PP-04	Sed-04	CK-08	PP-08	Sed-08
<b>Alcènes</b>										
Dodecène (C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> )	168,3				×		×			
Tridécène (C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> )	182,35					×	×		×	
Tétradécène (C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> )	196,37				×		×			
Pentadécène (C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> )	210,4							×		×
Hexadécène (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> )	224,43				×			×	×	
Heptadécène (C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> )	238,45				×	×			×	
Octadécène (C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> )	252,49					×			×	
Nonadécène (C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> )	266,51									×
Eicosène (C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> )	280,53						×			
Heneicosène (C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> )	294,56						×			
Docosène (C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> )	308,59								×	
Tricosène (C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> )	322,62									×
<b>Aromatiques</b>										
Phénol (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O)	94,11			×	×		×	×	×	×
Naphthalène (C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> )	128,17						×	×		
Phénanthrène (C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> )	178,23						×			
<b>Isoprénoïdes</b>										
Pristane (C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> )	268,51		×	×			×		×	
Phytane (C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> )	282,56		×						×	×
Squalène (C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> )	410,71	×								×

**MM:** Masse molaire (g/mol); **CK:** Chott Kreknnah (Port de plaisance); **PP:** Port de pêche; **Sed:** Sédiment ; **01, 04 et 08:** Mois de janvier, avril et août, respectivement.



Composés (% d'identification ≥ 90)	MM (g/mol)	2015								2016								2017								
		Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>t</sub>	Av <sub>t</sub>	Ju <sub>t</sub>	Se <sub>t</sub>	Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>t</sub>	Av <sub>t</sub>	Ju <sub>t</sub>	Se <sub>t</sub>	Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>t</sub>	Av <sub>t</sub>	Ju <sub>t</sub>	Se <sub>t</sub>	
<b>Alcènes</b>																										
Dodécène (C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> )	168,3																									
Tridécène (C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> )	182,35	×									×		×								×					
Tétradécène (C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> )	196,37		×		×					×																
Pentadécène (C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> )	210,4										×	×	×		×					×		×				
Hexadécène (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> )	224,43																					×				
Heptadécène (C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> )	238,45																						×			
Octadécène (C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> )	252,49																									
Nonadécène (C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> )	266,51	×			×								×													
Eicosène (C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> )	280,53		×																							
Heneicosène (C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> )	294,56				×	×																				
Docosène (C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> )	308,59																									
Tricosène (C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> )	322,62					×																				
<b>Aromatiques</b>																										
Phénol (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O)	94,11	×			×	×	×			×		×	×	×					×	×					×	
Naphthalène (C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> )	128,17		×																							
Phénanthrène (C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> )	178,23					×																				
<b>Isoprénoïdes</b>																										
Pristane (C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> )	268,51				×	×							×	×	×											
Phytane (C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> )	282,56	×				×																				
Squalène (C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> )	410,71				×																					

**MM:** Masse molaire (g/mol); **Ja, Av, Ju et Se:** Mois de Janvier, Avril, Juillet et Septembre, respectivement; **p:** pollué et **t:** témoin.





Composés (% d'identification ≥ 90)	MM (g/mol)	2015								2016								2017							
		Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>t</sub>	Av <sub>t</sub>	Ju <sub>t</sub>	Se <sub>t</sub>	Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>t</sub>	Av <sub>t</sub>	Ju <sub>t</sub>	Se <sub>t</sub>	Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>t</sub>	Av <sub>t</sub>	Ju <sub>t</sub>	Se <sub>t</sub>
<b>Alcènes</b>																									
Dodecène (C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> )	168,3																			×					
Tridécène (C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> )	182,35	×							×	×		×						×							×
Tétradécène (C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> )	196,37		×	×		×					×						×		×		×				
Pentadécène (C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> )	210,4	×					×				×					×		×							
Hexadécène (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> )	224,43		×		×							×				×	×		×				×		
Heptadécène (C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> )	238,45				×			×		×		×				×		×		×		×		×	
Octadécène (C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> )	252,49			×		×												×		×					
Nonadécène (C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> )	266,51		×						×			×													
Eicosène (C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> )	280,53	×									×														×
Heneicosène (C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> )	294,56			×											×		×		×		×		×		
Docosène (C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> )	308,59	×	×									×								×			×		
Tricosène (C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> )	322,62											×													
<b>Aromatiques</b>																									
Phénol (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O)	94,11	×	×				×	×		×		×	×		×		×	×		×		×		×	×
Naphthalène (C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> )	128,17		×		×						×			×			×				×		×		
Phénanthrène (C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> )	178,23	×									×						×								
<b>Isoprénoïdes</b>																									
Pristane (C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> )	268,51	×	×	×						×		×	×				×	×	×	×	×				×
Phytane (C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> )	282,56	×		×	×		×		×		×	×		×						×	×		×		
Squalène (C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> )	410,71		×				×				×	×		×						×	×		×	×	

**MM:** Masse molaire (g/mol); **Ja, Av, Ju et Se:** Mois de Janvier, Avril, Juillet et Septembre, respectivement; **p:** pollué et **t:** témoin.

Tableau 4. Composés hydrocarbonés présents dans les eaux de mer provenant du port de pêche de Sfax pendant 2015, 2016 et 2017.

Composés (% d'identification ≥ 90)	MM	2015								2016								2017								
		Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>t</sub>	Av <sub>t</sub>	Ju <sub>t</sub>	Se <sub>t</sub>	Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>t</sub>	Av <sub>t</sub>	Ju <sub>t</sub>	Se <sub>t</sub>	Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>t</sub>	Av <sub>t</sub>	Ju <sub>t</sub>	Se <sub>t</sub>	
<b>Alcanes</b>																										
Dodécane (C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> )	170,34			×	×	×	×					×	×					×			×	×				
Tridécanne (C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> )	184,36			×	×	×	×	×	×	×	×	×	×				×	×	×	×		×				×
Tétradécane (C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> )	198,38	×	×	×	×				×	×			×		×		×								×	×
Pentadécane (C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> )	212,41	×		×		×					×	×	×	×	×		×	×							×	
Hexadécane (C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> )	226,41		×	×	×		×	×	×	×	×	×		×			×				×	×	×			×
Heptadécane (C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> )	240,46	×	×		×	×			×				×	×	×						×	×	×			
Octadécane (C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> )	254,5	×		×	×	×	×	×		×	×	×	×		×		×		×	×						
Nonadécane (C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> )	268,52	×	×	×	×			×	×		×			×	×	×		×	×	×	×	×	×			×
Eicosane (C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> )	282,54	×	×	×	×	×	×		×		×			×		×	×		×	×	×	×	×			×
Prégnane (C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> )	288,51								×		×	×	×		×		×	×			×			×		
Heneicosane (C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> )	296,57	×			×			×	×	×	×		×		×	×		×	×	×	×	×	×			×
Docosane (C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> )	310,6		×		×	×	×			×	×	×	×	×		×		×	×	×		×				
Tricosane (C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> )	324,62	×		×	×			×			×	×	×				×		×	×						
Tétracosane (C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> )	338,65	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×		×					×	×	×			×		
Pentacosane (C <sub>25</sub> H <sub>52</sub> )	352,69		×		×	×						×	×	×	×			×	×				×	×		
Hexacosane (C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> )	366,71	×		×	×		×	×		×	×	×	×	×	×		×	×	×		×			×		
Heptacosane (C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> )	380,74		×	×	×	×				×	×	×	×		×		×	×		×	×					
Octacosane (C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> )	394,77	×		×						×		×			×					×		×				×
Nonacosane (C <sub>29</sub> H <sub>60</sub> )	408,6		×	×				×	×	×	×				×		×	×	×	×	×	×				
Triacotane (C <sub>30</sub> H <sub>62</sub> )	422,82			×	×					×	×	×	×							×	×					
Untriacontane (C <sub>31</sub> H <sub>64</sub> )	436,85				×						×	×	×							×	×			×		
Dotriacontane (C <sub>32</sub> H <sub>66</sub> )	450,86				×						×	×	×							×						

Composés (% d'identification ≥ 90)	MM	2015								2016								2017							
		Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>t</sub>	Av <sub>t</sub>	Ju <sub>t</sub>	Se <sub>t</sub>	Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>t</sub>	Av <sub>t</sub>	Ju <sub>t</sub>	Se <sub>t</sub>	Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>t</sub>	Av <sub>t</sub>	Ju <sub>t</sub>	Se <sub>t</sub>
<b>Alcènes</b>																									
Dodecène (C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> )	168,3																	×	×	×	×				
Tridécène (C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> )	182,35		×	×		×				×		×													
Tétradécène (C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> )	196,37	×		×		×				×	×		×	×			×				×		×		
Pentadécène (C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> )	210,4				×	×					×		×	×					×						
Hexadécène (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> )	224,43	×	×									×							×	×					
Heptadécène (C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> )	238,45			×	×	×	×					×												×	
Octadécène (C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> )	252,49					×	×	×	×		×				×			×		×			×		
Nonadécène (C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> )	266,51			×	×										×										×
Eicosène (C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> )	280,53				×						×						×		×						×
Heneicosène (C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> )	294,56							×		×	×			×						×				×	
Docosène (C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> )	308,59			×	×				×			×	×				×	×							
Tricosène (C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> )	322,62				×				×			×									×				
<b>Aromatiques</b>																									
Phénol (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O)	94,11	×	×		×	×		×			×	×	×		×			×	×		×				
Naphthalène (C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> )	128,17				×		×			×		×			×					×			×		
Phénanthrène (C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> )	178,23			×								×						×							
<b>Isoprénoïdes</b>																									
Pristane (C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> )	268,51	×	×	×	×		×			×		×	×					×		×	×			×	
Phytane (C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> )	282,56		×	×	×				×	×	×	×			×			×	×		×				
Squalène (C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> )	410,71			×	×		×					×	×					×	×		×		×		

**MM:** Masse molaire (g/mol); **Ja, Av, Ju et Se:** Mois de Janvier, Avril, Juillet et Septembre, respectivement; **p:** pollué et **t:** témoin.

Tableau 5. Composés hydrocarbonés présents dans les sédiments provenant du port de pêche de Sfax, pendant 2015, 2016 et 2017.

Composés (% d'identification $\geq$ 90)	MM (g/mol)	2015				2016				2017			
		Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>
<b>Alcanes</b>													
Dodécane (C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> )	170,34	×	×		×				×	×		×	
Tridécane (C <sub>13</sub> H <sub>28</sub> )	184,36	×	×	×	×	×	×	×		×	×	×	×
Tétradécane (C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> )	198,38	×	×				×	×	×	×	×	×	×
Pentadécane (C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> )	212,41	×					×	×		×		×	
Hexadécane (C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> )	226,41			×	×	×				×		×	
Heptadécane (C <sub>17</sub> H <sub>36</sub> )	240,46	×	×	×		×		×	×	×			×
Octadécane (C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> )	254,5		×	×	×		×	×	×	×			
Nonadécane (C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> )	268,52	×	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×
Eicosane (C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> )	282,54												
Prégnane (C <sub>21</sub> H <sub>36</sub> )	288,51	×	×	×		×	×	×	×	×	×	×	
Heneicosane (C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> )	296,57	×		×	×		×	×	×		×	×	
Docosane (C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> )	310,6	×			×	×	×	×		×		×	×
Tricosane (C <sub>23</sub> H <sub>48</sub> )	324,62		×			×		×	×	×		×	×
Tetracosane (C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> )	338,65		×	×		×		×	×		×		
Pentacosane (C <sub>25</sub> H <sub>52</sub> )	352,69	×	×	×	×		×				×		×
Hexacosane (C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> )	366,71	×			×	×	×		×	×	×	×	×
Heptacosane (C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> )	380,74	×	×		×			×		×	×	×	
Octacosane (C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> )	394,77		×	×			×	×				×	
Nonacosane (C <sub>29</sub> H <sub>60</sub> )	408,6			×		×	×	×	×			×	×
Triacotane (C <sub>30</sub> H <sub>62</sub> )	422,82	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
Untriacontane (C <sub>31</sub> H <sub>64</sub> )	436,85	×			×	×			×	×		×	×
Dotriacontane (C <sub>32</sub> H <sub>66</sub> )	450,86	×		×			×		×				×

Composés (% d'identification $\geq 90$ )	MM (g/mol)	2015				2016				2017			
		Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>	Ja <sub>p</sub>	Av <sub>p</sub>	Ju <sub>p</sub>	Se <sub>p</sub>
<b>Alcènes</b>													
Dodécène (C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> )	168,3	×			×		×	×		×		×	
Tridécène (C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> )	182,35	×	×			×	×	×	×			×	×
Tétradécène (C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> )	196,37	×		×	×	×	×					×	
Pentadécène (C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> )	210,4		×		×			×	×	×	×	×	×
Hexadécène (C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> )	224,43	×		×		×		×		×	×		×
Heptadécène (C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> )	238,45	×				×	×		×		×		×
Octadécène (C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> )	252,49		×	×			×		×			×	
Nonadécène (C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> )	266,51					×		×		×		×	
Eicosène (C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> )	280,53			×	×			×	×		×	×	
Heneicosène (C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> )	294,56	×	×				×		×	×	×		×
Docosène (C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> )	308,59		×			×	×	×		×	×		×
Tricosène (C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> )	322,62	×		×	×	×			×			×	
<b>Aromatiques</b>													
Phénol (C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O)	94,11	×	×	×	×	×	×	×	×	×		×	×
Naphthalène (C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> )	128,17	×			×		×	×			×	×	
Phénanthrène (C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> )	178,23		×					×	×				
<b>Isoprénoïdes</b>													
Pristane (C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> )	268,51		×	×		×	×	×	×	×		×	×
Phytane (C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> )	282,56	×	×	×	×		×	×		×	×	×	×
Squalène (C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> )	410,71		×	×		×		×	×		×	×	

**MM:** Masse molaire (g/mol); **Ja, Av, Ju et Se:** Mois de Janvier, Avril, Juillet et Septembre, respectivement.

## ANNEXE IV

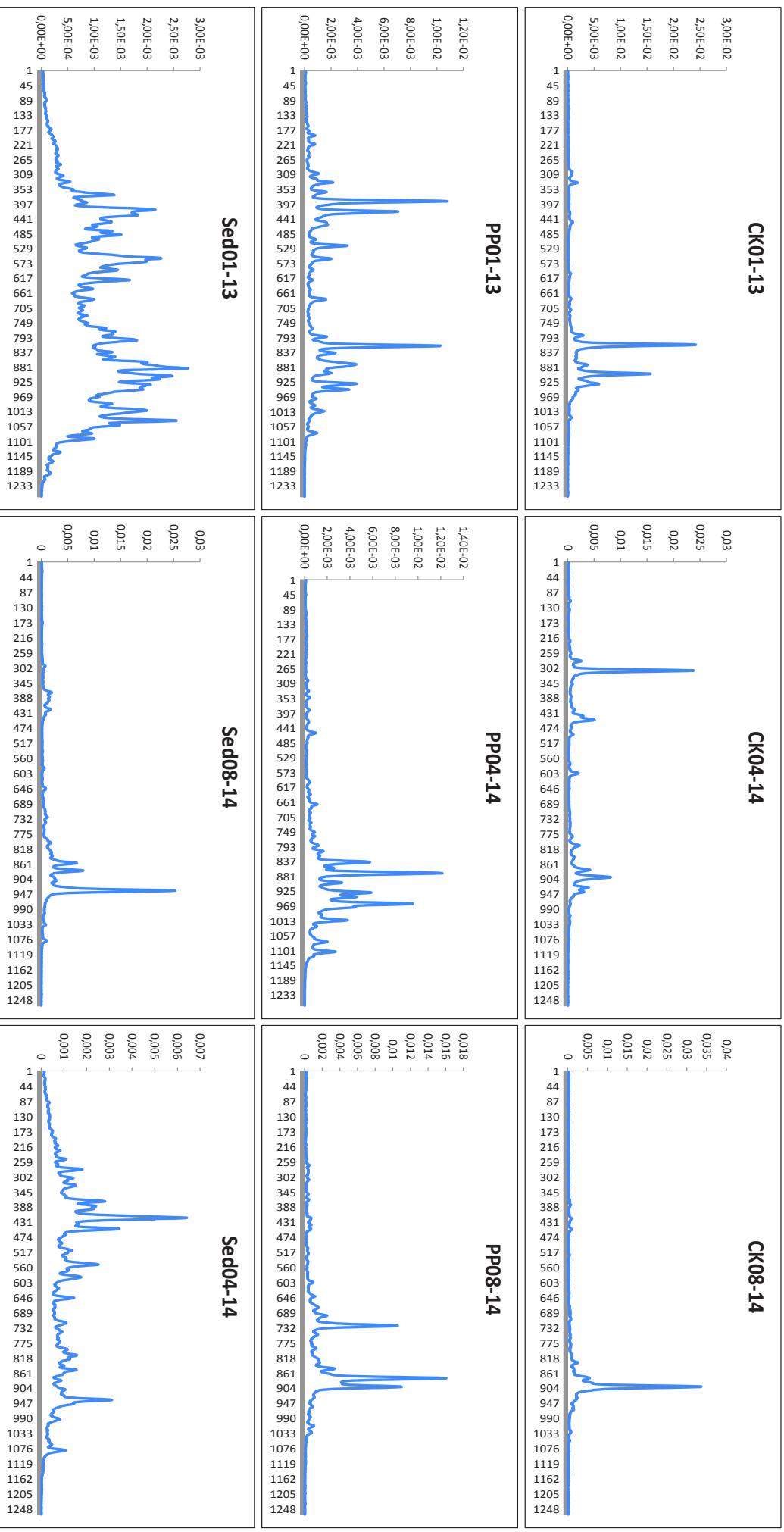
### **Profils SSCP montrant les communautés microbiennes (*Bacteria*, *Eucarya* et *Archaea*) dans les différents échantillons marins étudiés des ports de plaisance, de pêche et de commerce de la ville de Sfax.**

Eaux de mer prélevées des ports de plaisance (CK), de pêche (PP) et de commerce (PC); Sed : Sédiments issus du port de pêche; 01, 04, 07 et 09 correspondent aux mois de Janvier, Avril, Juillet et Septembre, respectivement ; 13, 14, 15, 16 et 17 correspondent aux années 2013, 2014, 2015, 2016 et 2017, respectivement.

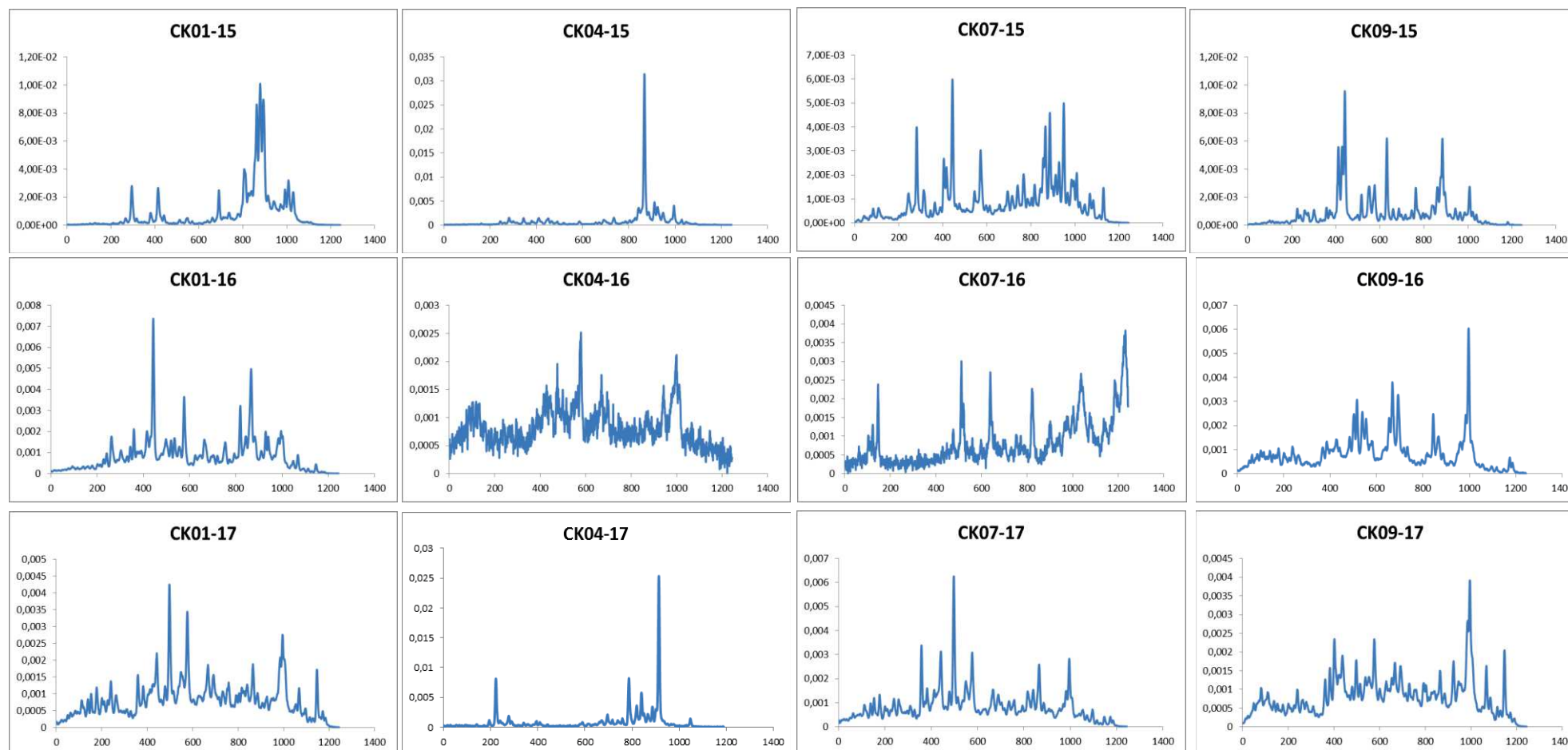


# Domaine *Bacteria*

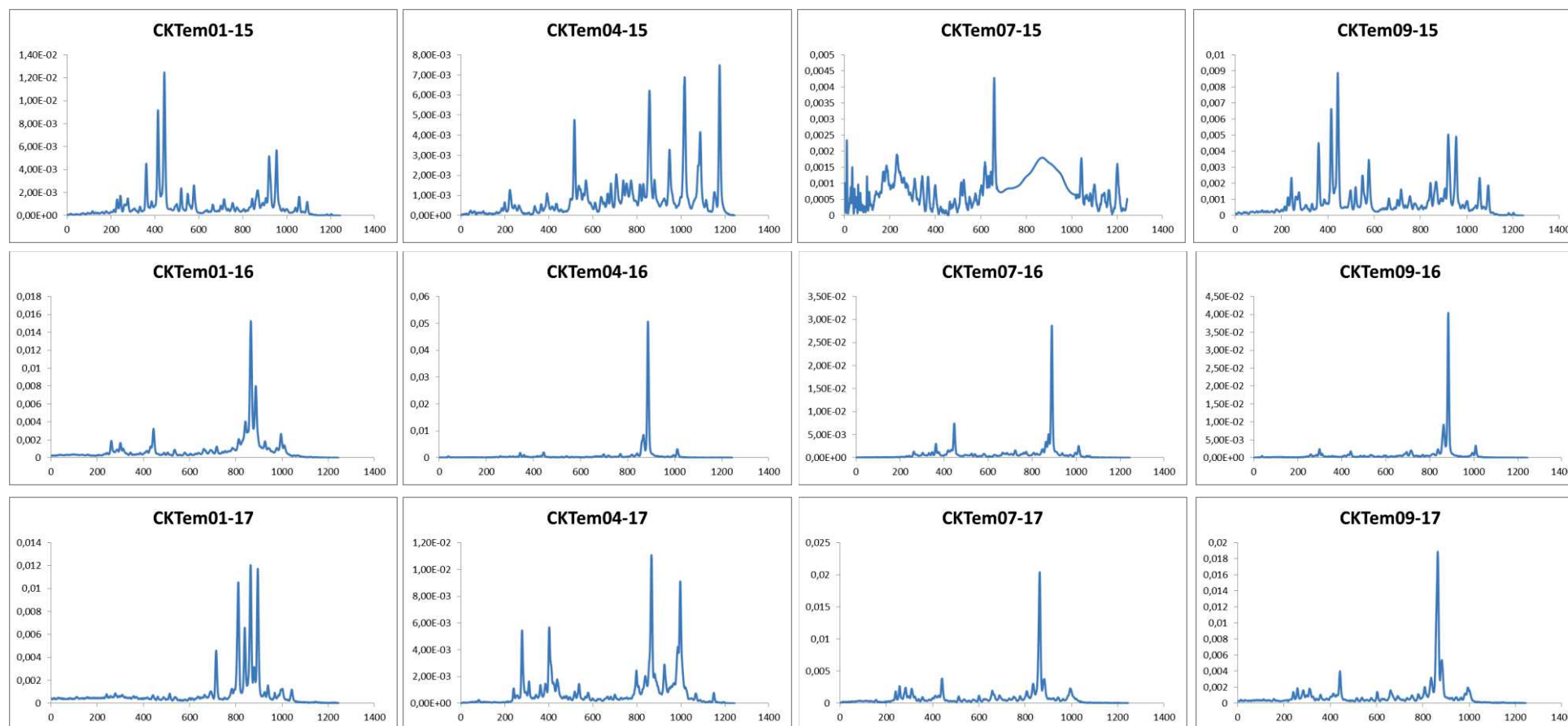
Figure 1. Profils SSCP présentant la communauté bactérienne existante dans les différents échantillons prélevés en 2013 et 2014.



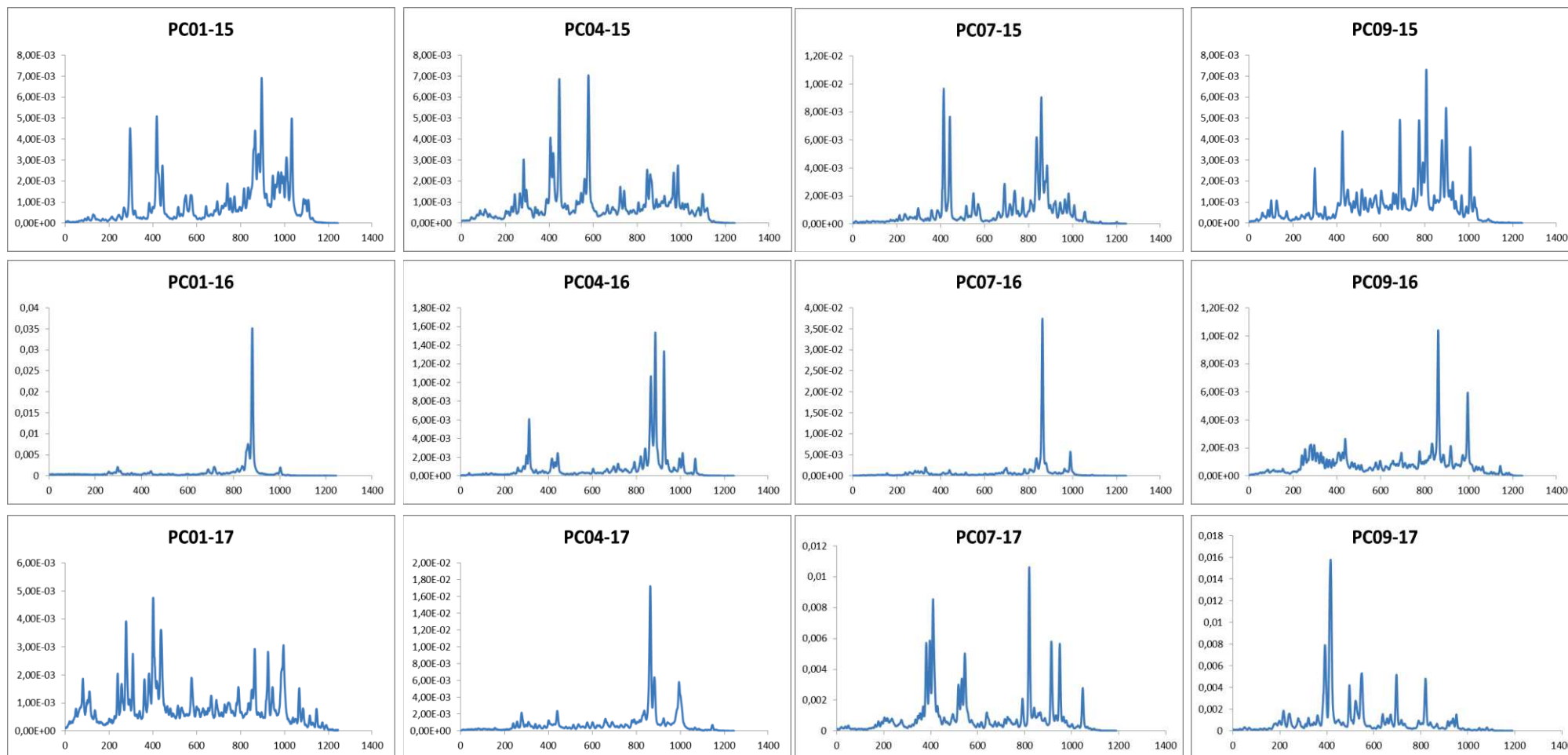
**Figure 2.** Profils SSCP présentant la communauté bactérienne existante dans les échantillons des eaux de mer polluées, provenant du port de plaisance (CK) et prélevés en 2015, 2016 et 2017.



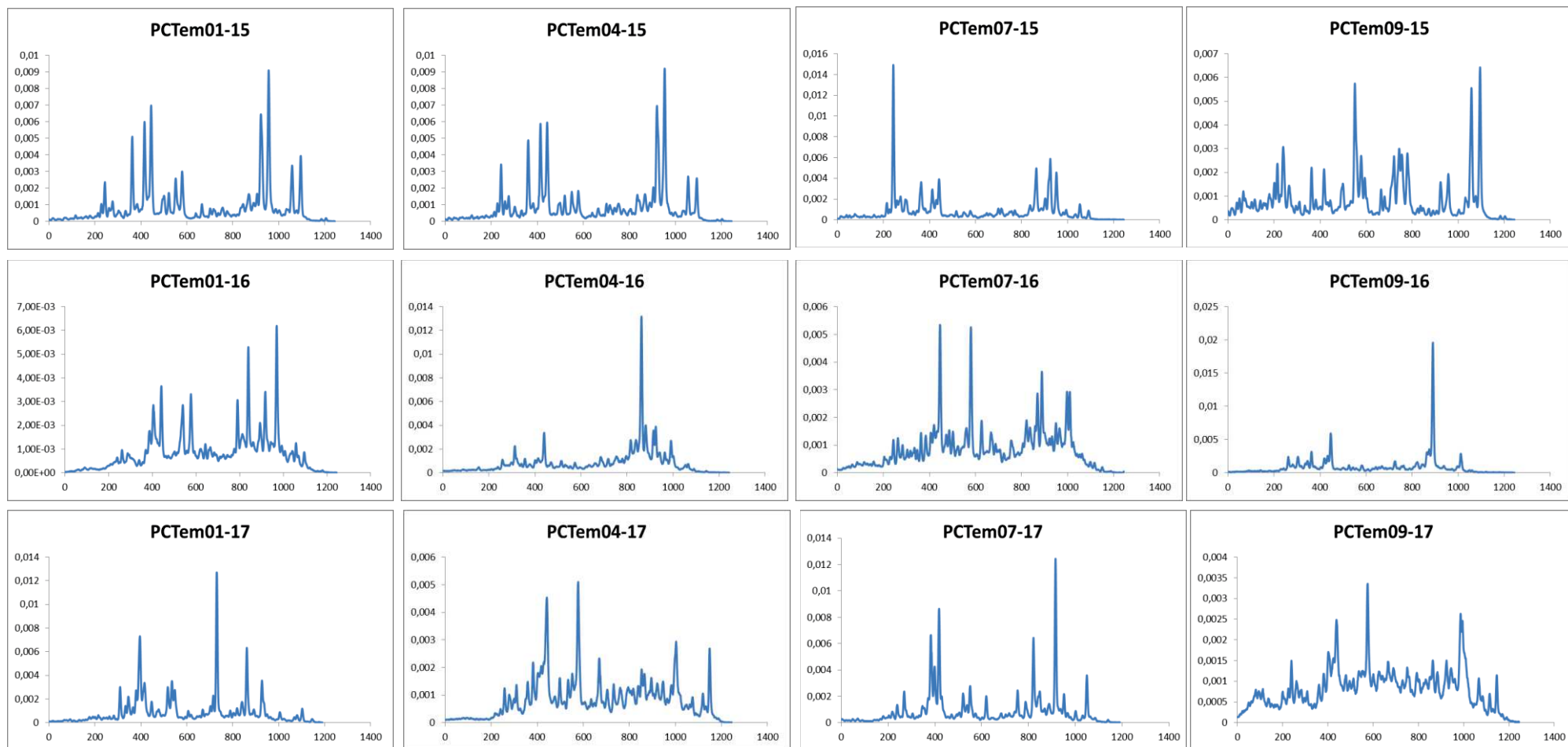
**Figure 3.** Profils SSCP présentant la communauté bactérienne existante dans les échantillons des eaux de mer témoins, provenant du port de plaisance (CK) et prélevés en 2015, 2016 et 2017.



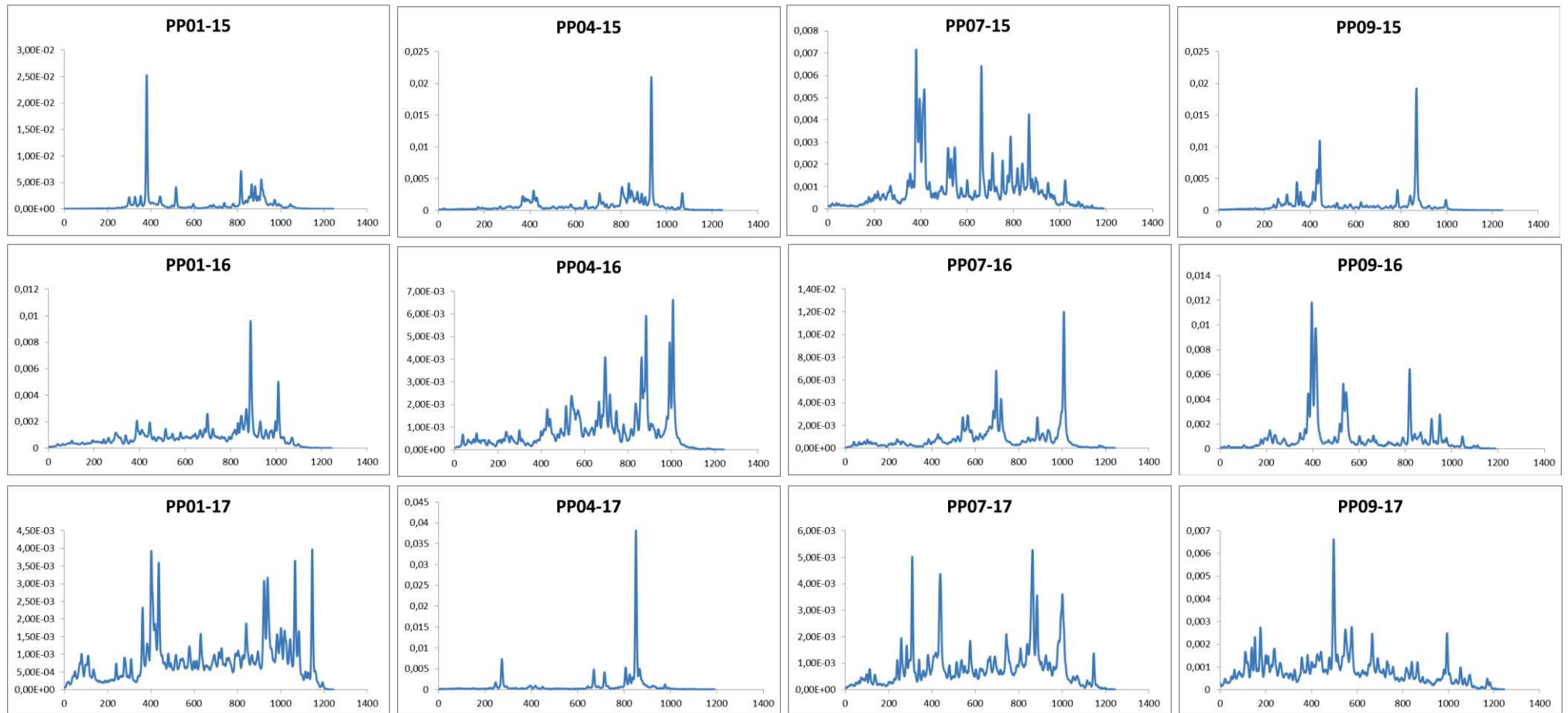
**Figure 4.** Profils SSCP présentant la communauté bactérienne existante dans les échantillons des eaux de mer polluées, provenant du port de commerce de Sfax et prélevés en 2015, 2016 et 2017



**Figure 5.** Profils SSCP présentant la communauté bactérienne existante dans les échantillons des eaux de mer témoins, provenant du port de commerce de Sfax et prélevés en 2015, 2016 et 2017.

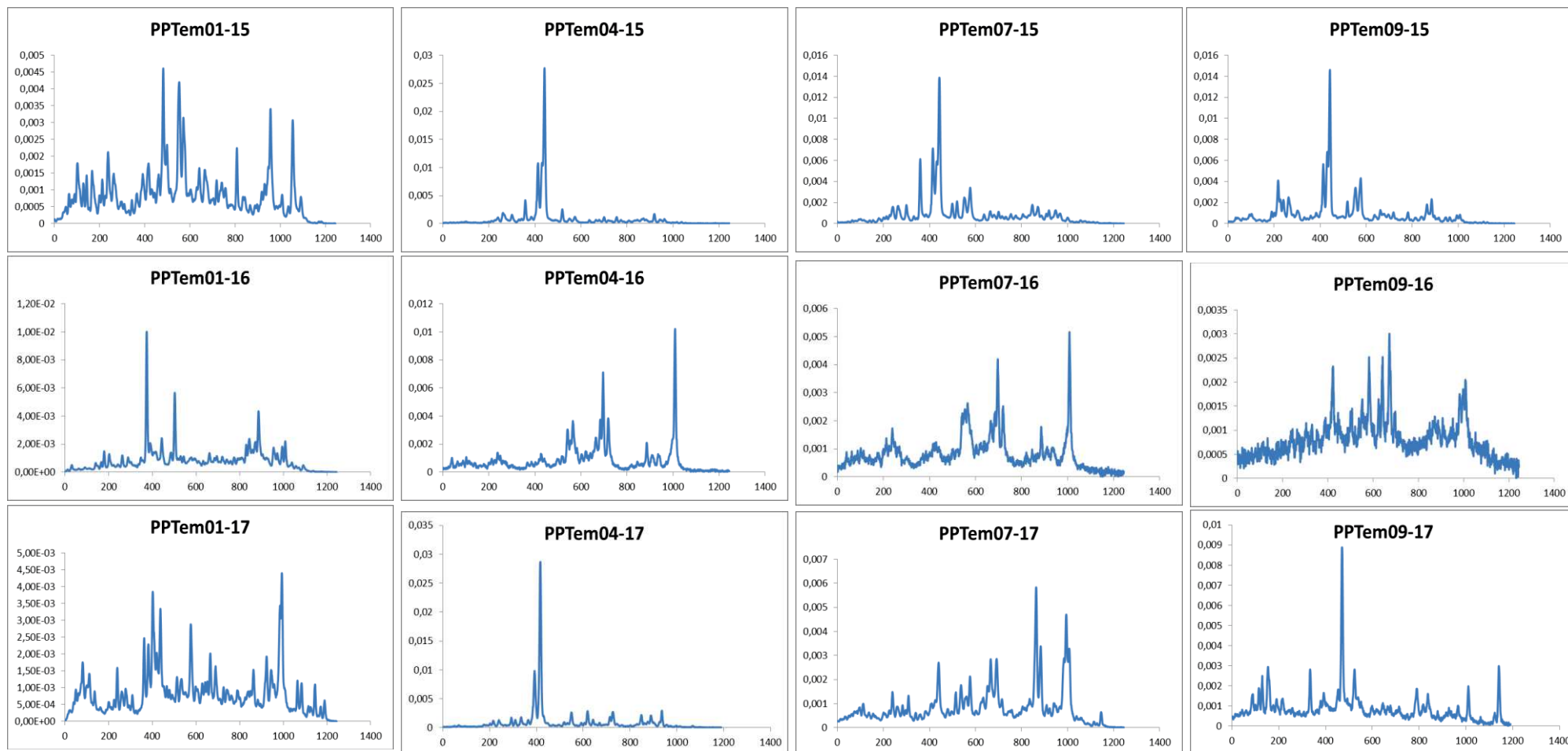


**Figure 6.** Profils SSCP présentant la communauté bactérienne existante dans les échantillons des eaux de mer polluées, provenant du port de pêche de Sfax et prélevés en 2015, 2016 et 2017.

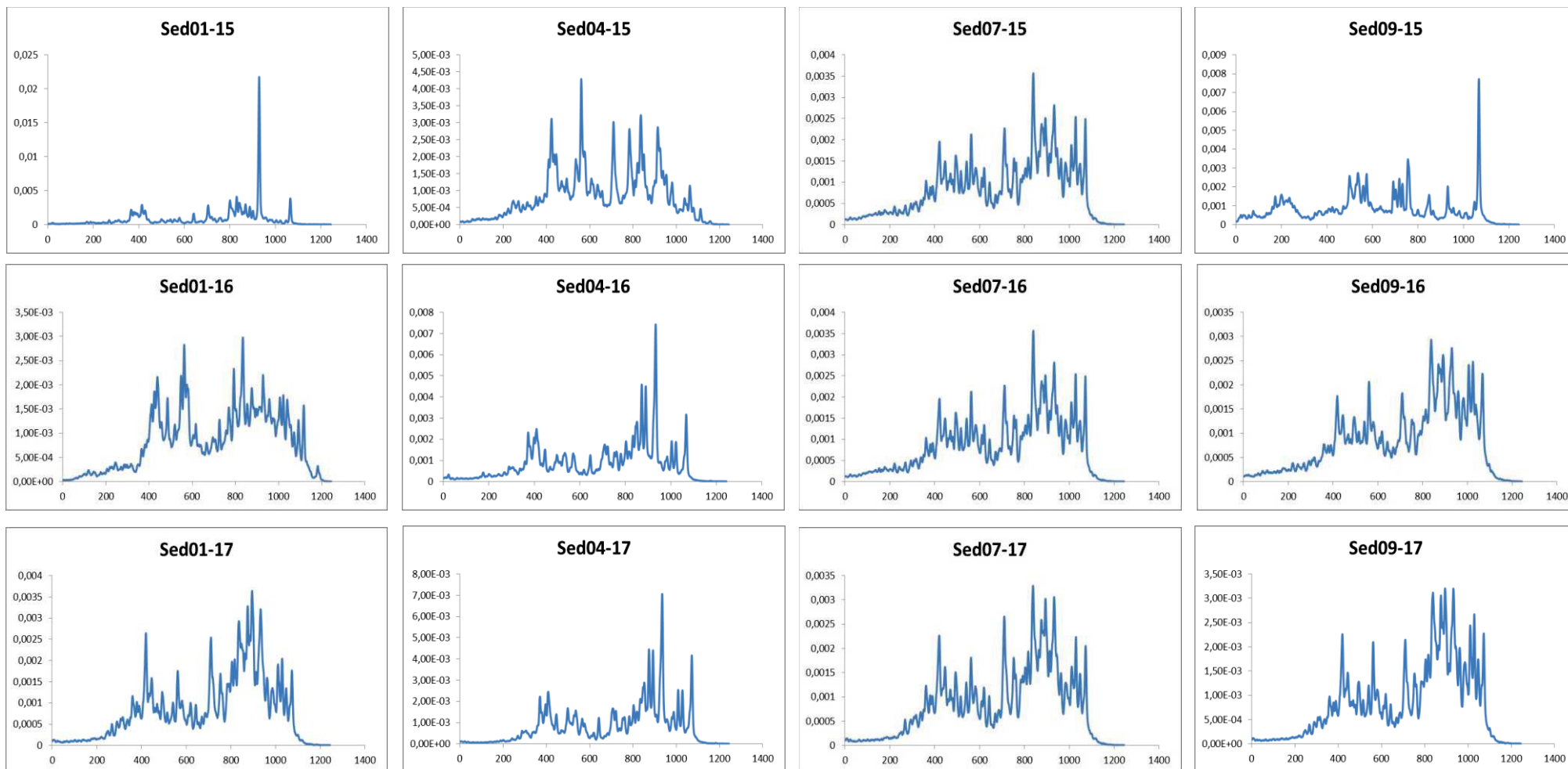




**Figure 7.** Profils SSCP présentant la communauté bactérienne existante dans les échantillons des eaux de mer témoins, provenant du port de pêche de Sfax et prélevés en 2015, 2016 et 2017.

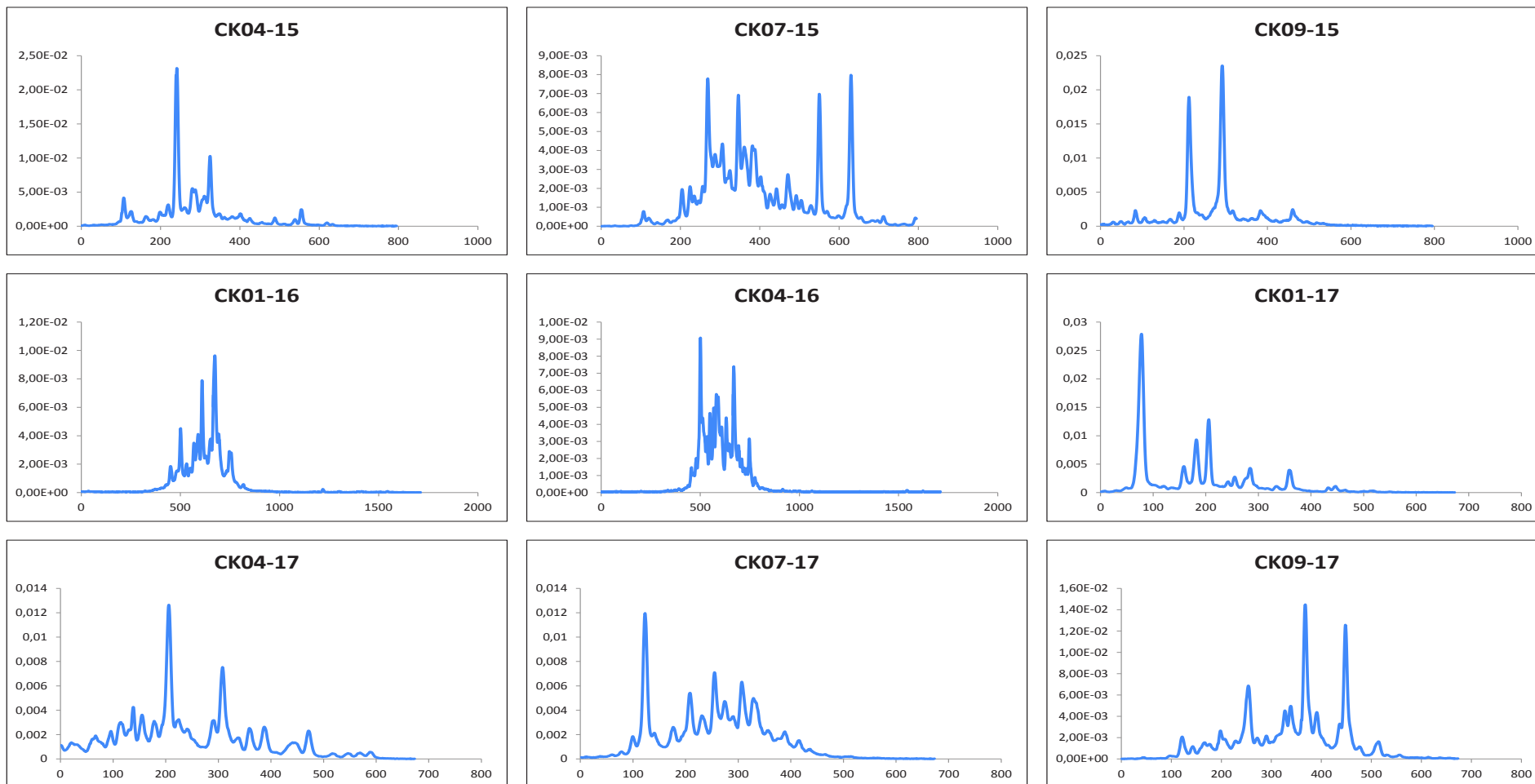


**Figure 8.** Profils SSCP présentant la communauté bactérienne existante dans les sédiments provenant du port de pêche de Sfax et prélevés en 2015, 2016 et 2017.

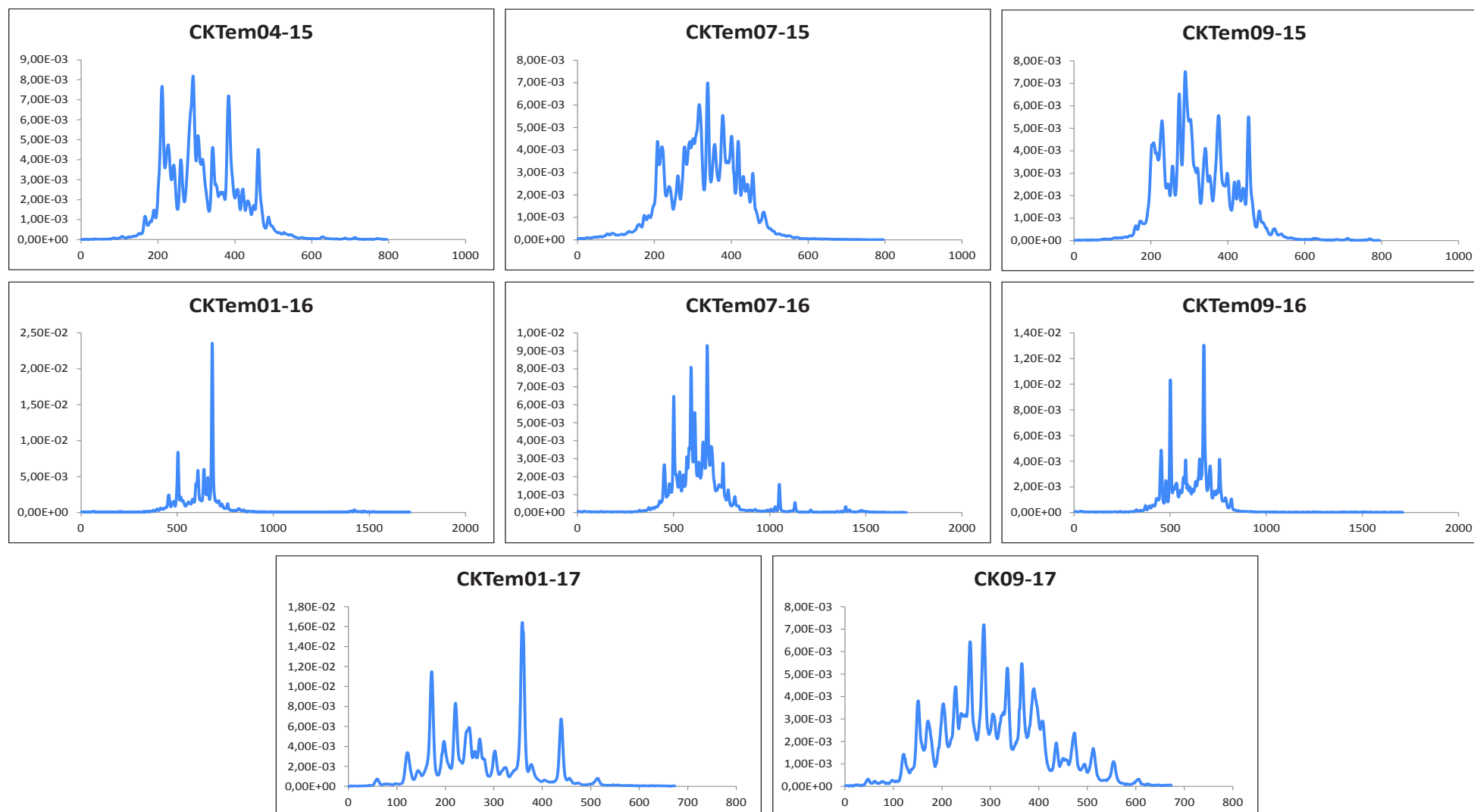


# Domaine *Eucarya*

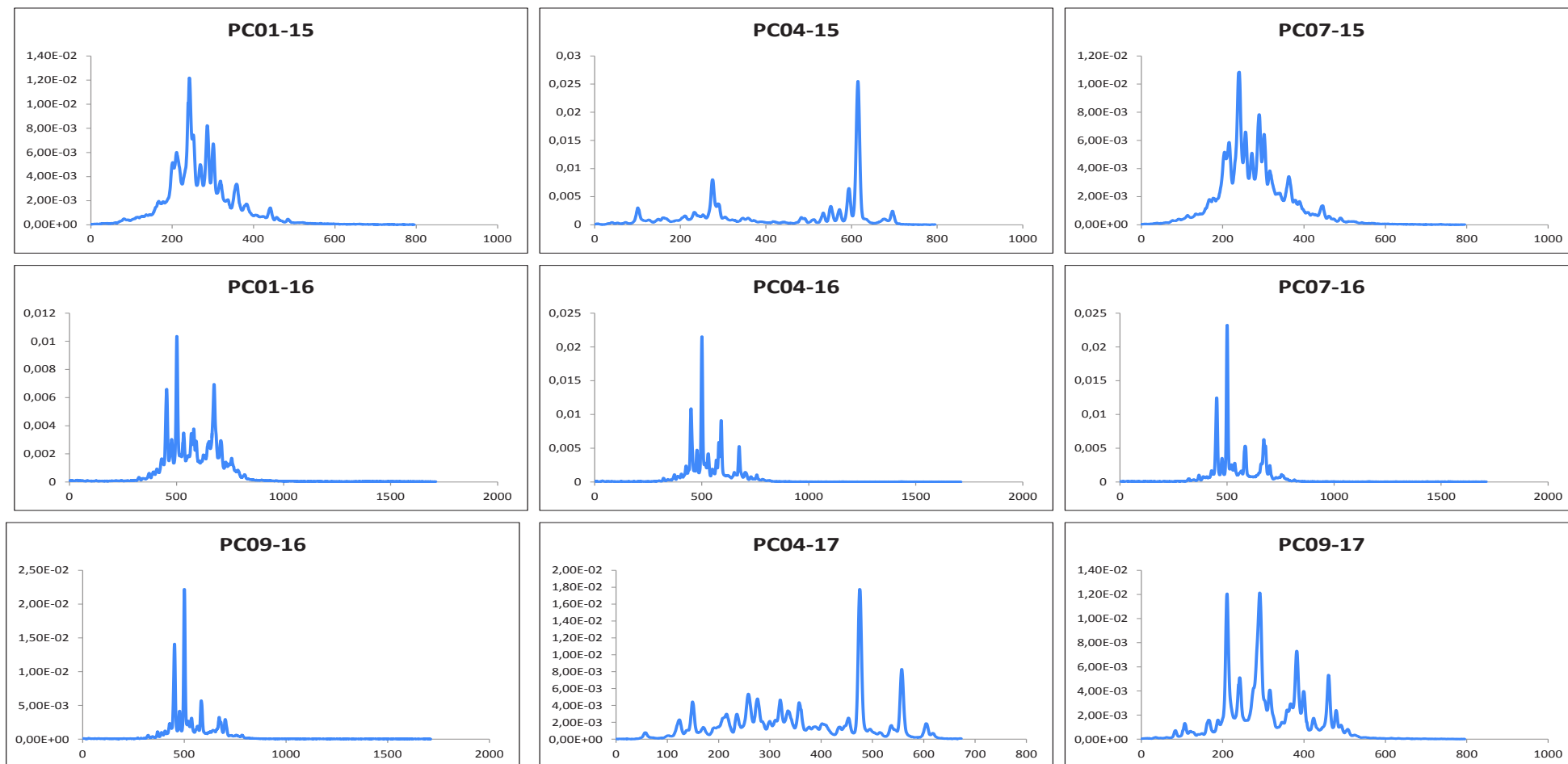
**Figure 9.** Profils SSCP présentant la communauté des microorganismes eucaryotes existante dans les échantillons des eaux de mer polluées provenant du port de plaisance de Sfax, prélevés en 2015, 2016 et 2017.



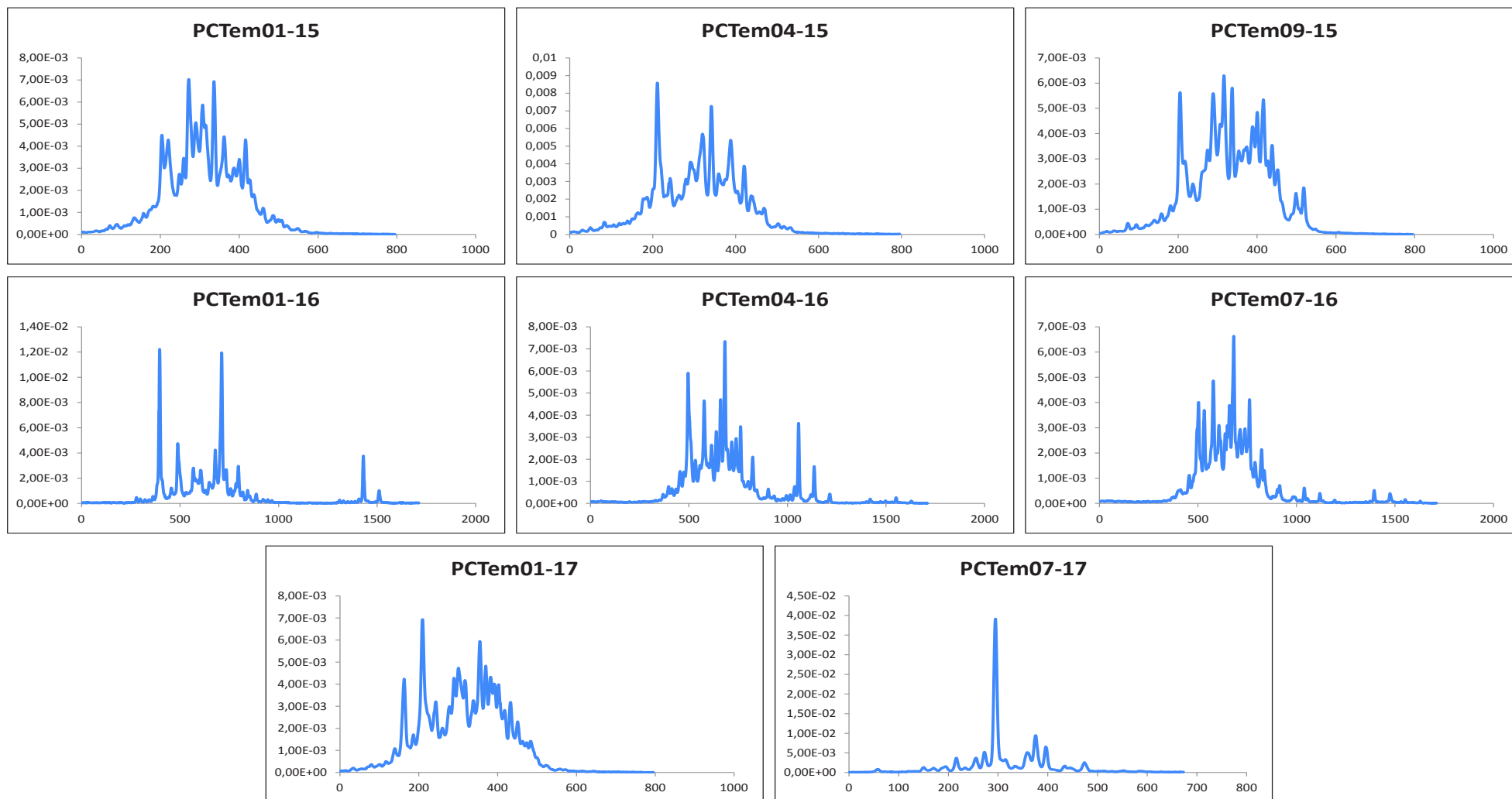
**Figure 10.** Profils SSCP présentant la communauté des microorganismes eucaryotes existante dans les échantillons des eaux de mer témoins provenant du port de plaisance de Sfax, prélevés en 2015, 2016 et 2017.



**Figure 11.** Profils SSCP présentant la communauté des microorganismes eucaryotes existante dans les échantillons des eaux de mer polluées provenant du port de commerce de Sfax, prélevés en 2015, 2016 et 2017.

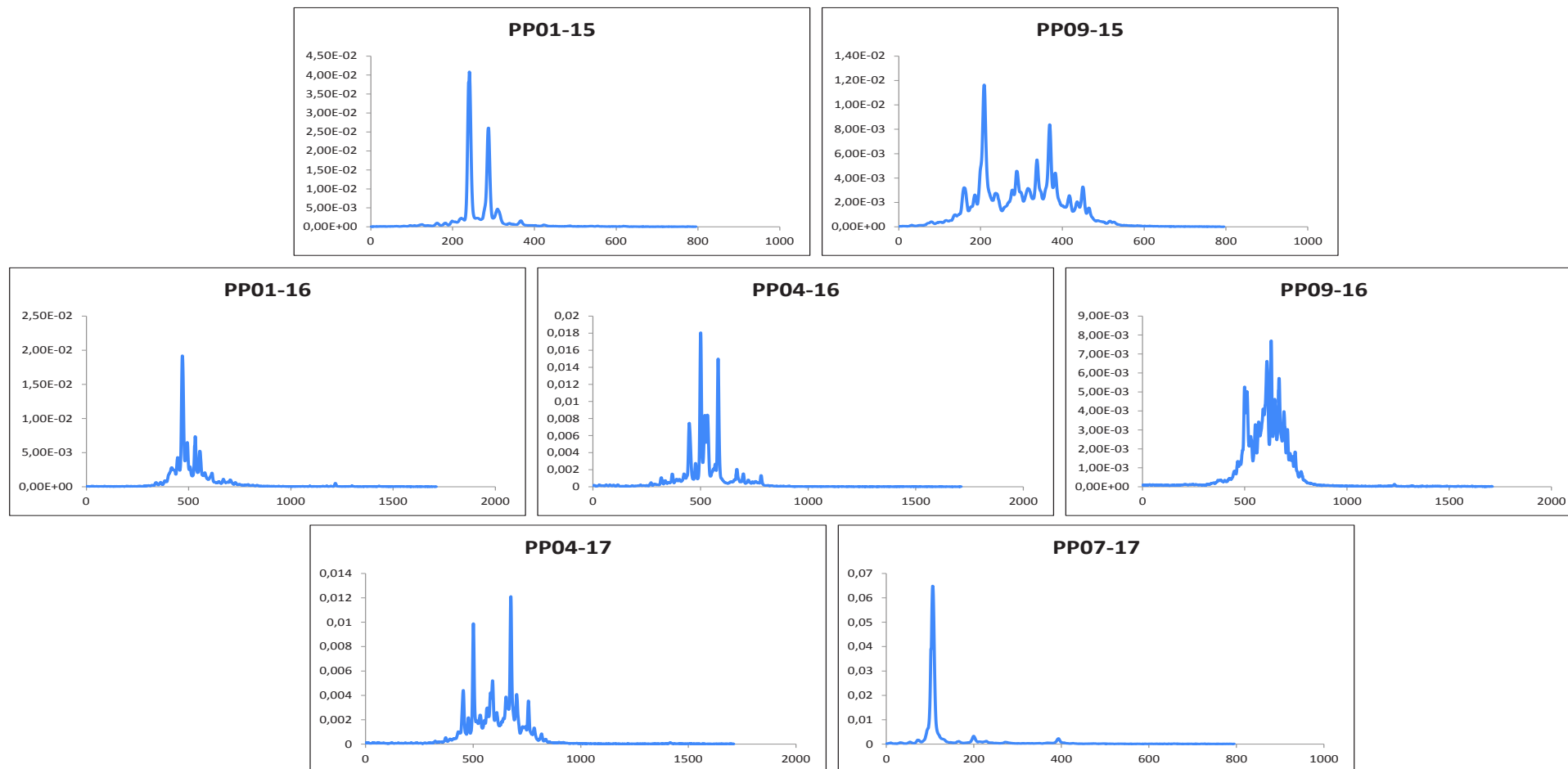


**Figure 12.** Profils SSCP présentant la communauté des microorganismes eucaryotes existante dans les échantillons des eaux de mer témoins provenant du port de commerce de Sfax, prélevés en 2015, 2016 et 2017.

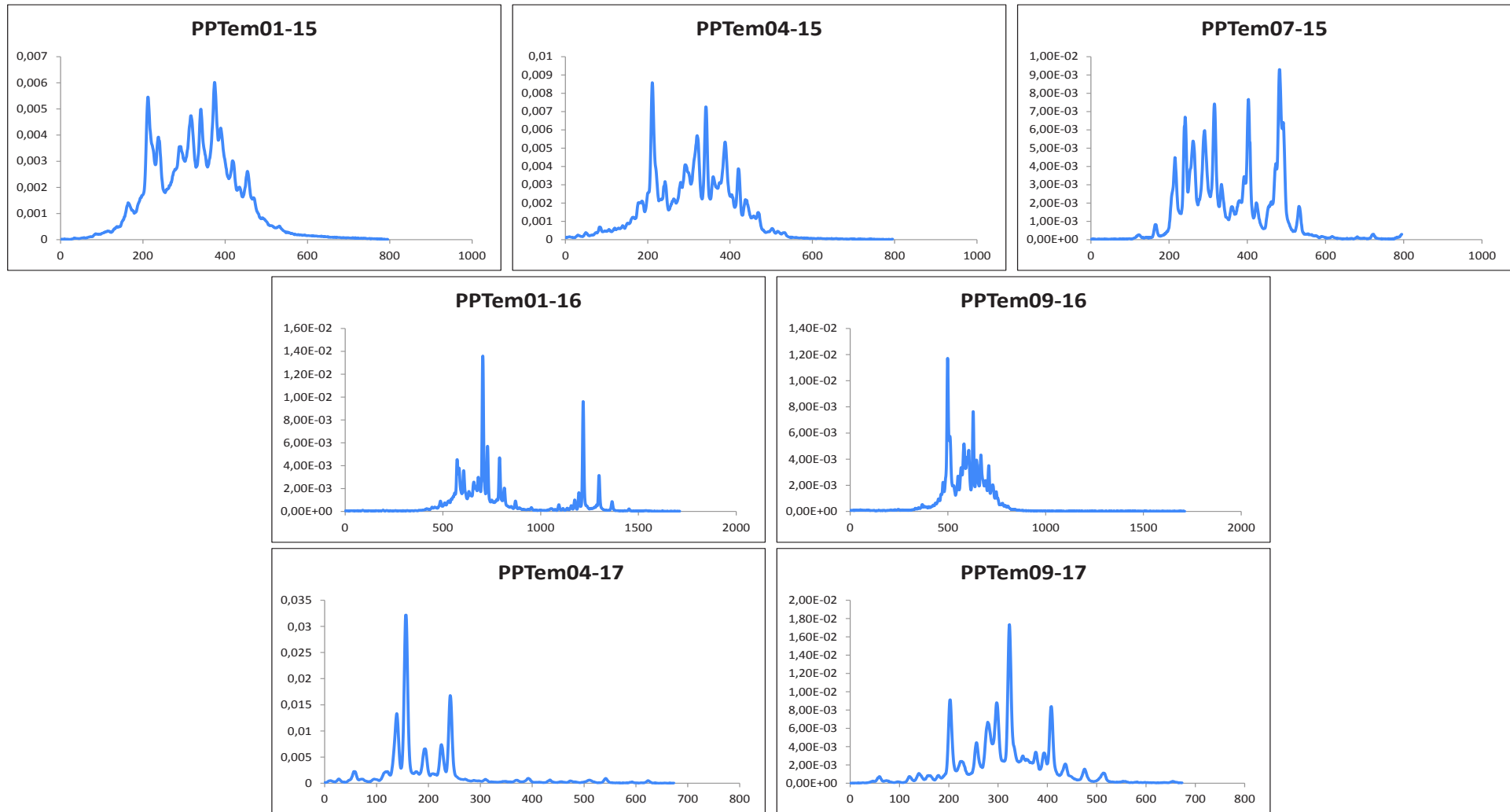




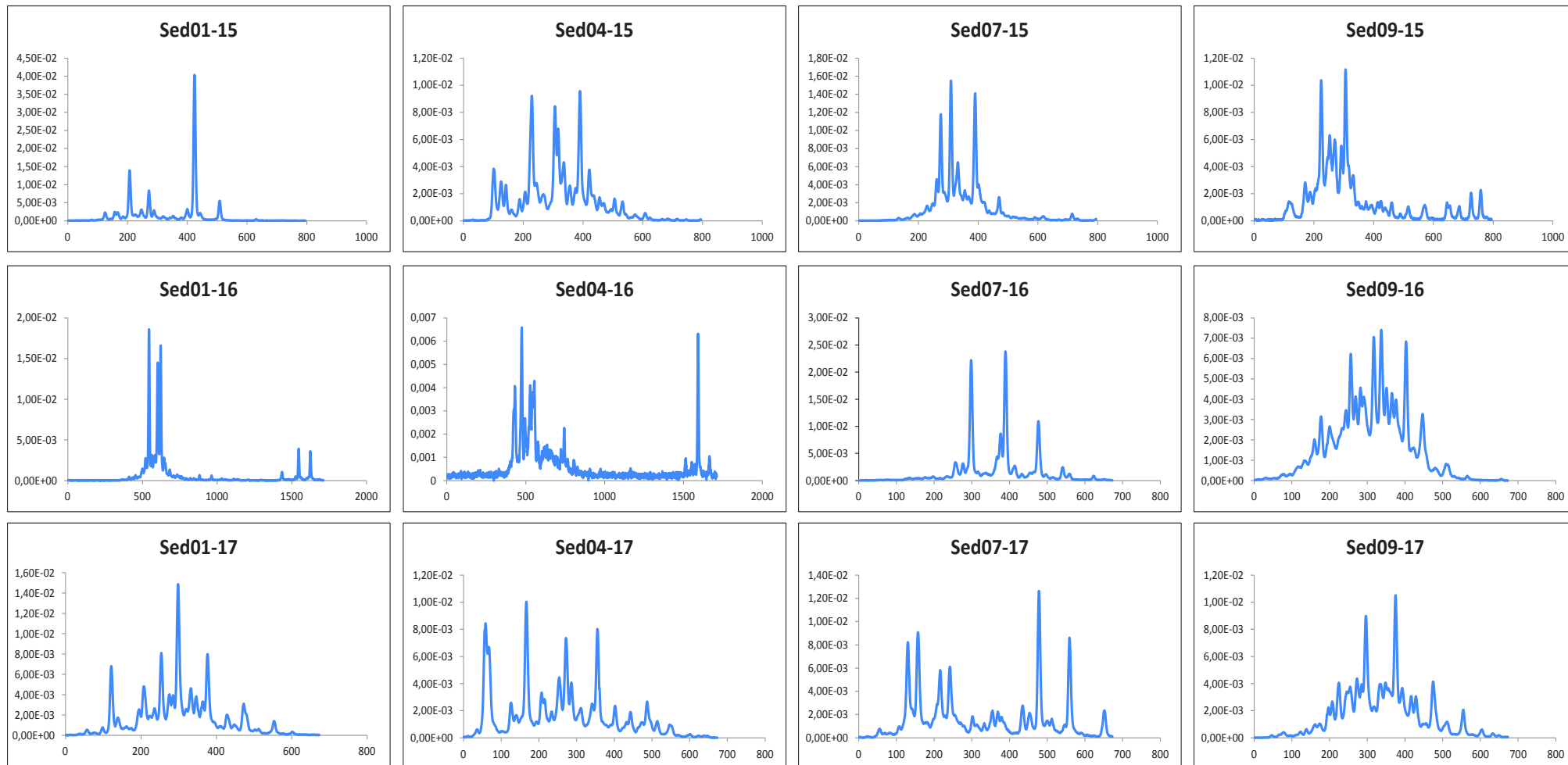
**Figure 13.** Profils SSCP présentant la communauté des microorganismes eucaryotes existante dans les échantillons des eaux de mer polluées provenant du port de pêche de Sfax, prélevés en 2015, 2016 et 2017.



**Figure 14.** Profils SSCP présentant la communauté des microorganismes eucaryotes existante dans les échantillons des eaux de mer témoins provenant du port de pêche de Sfax, prélevés en 2015, 2016 2017.

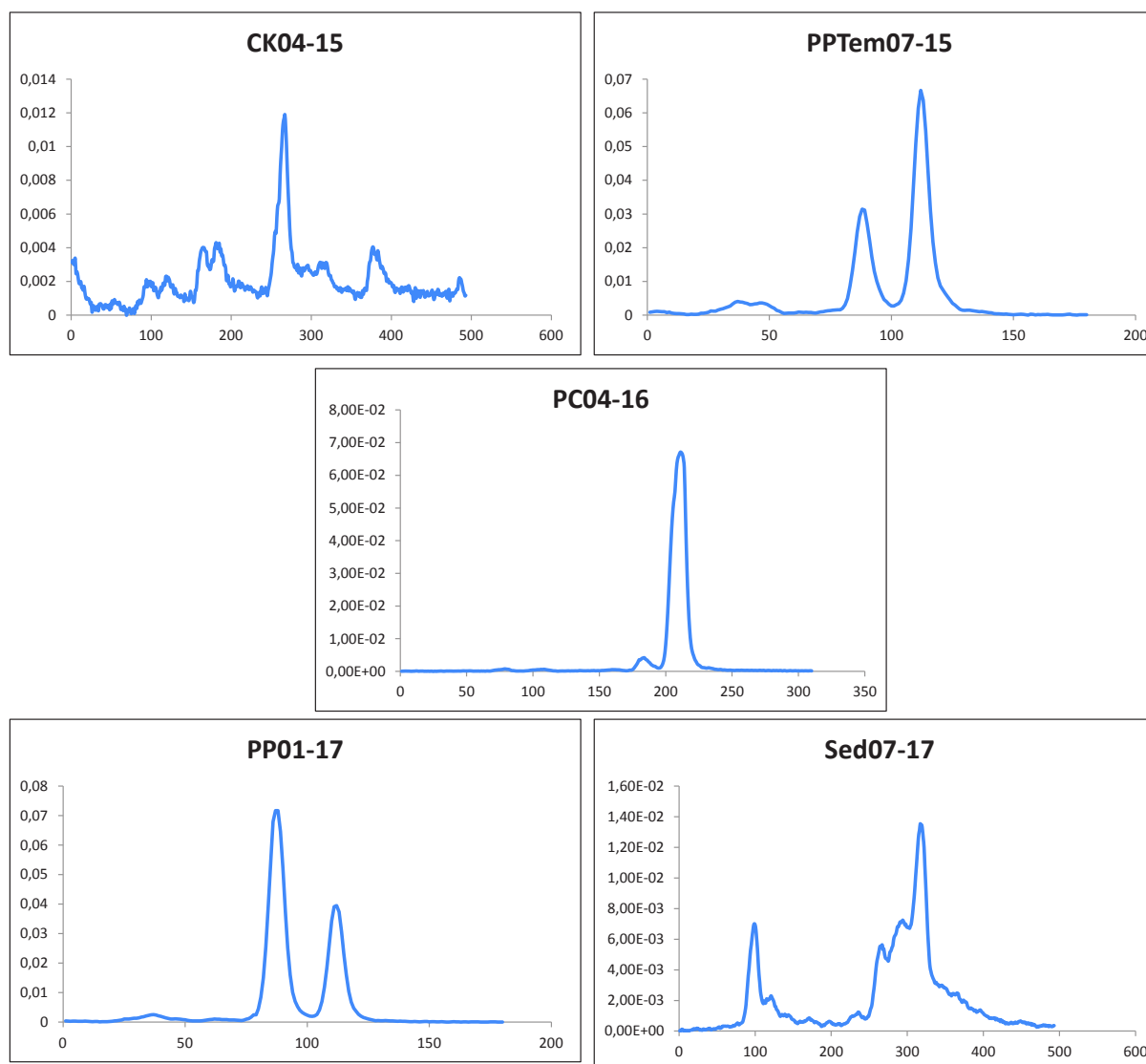


**Figure 15.** Profils SSCP présentant la communauté des microorganismes eucaryotes existante dans les sédiments provenant du port de pêche de Sfax, prélevés en 2015, 2016 et 2017.



# **Domaine *Archaea***

**Figure 16.** Profils SSCP présentant la communauté des archées existante dans les différents échantillons étudiés.



**Tableau 1.** Indice de diversité Simpson (exprimé en log) de différents échantillons étudiés, pour les 3 domaines (*Bacteria*, *Eucarya* et *Archaea*).

Echantillons	ID (Simpson) <i>Bacteria</i>	ID (Simpson) <i>Eucarya</i>	ID (Simpson) <i>Archaea</i>
CK-01-13	2,82	-	-
PP-01-13	3,69	-	-
Sed-01-13	5,71	-	-
CK-04-14	3,07	-	-
CK-08-14	2,54	-	-
PP-04-14	3,79	-	-
PP-08-14	2,82	-	-
Sed-04-14	5,19	-	-
Sed-08-14	3,05	-	-
CK-01-15	4,05	-	-
CK-04-15	2,9	3,19	4,25
CK-07-15	4,76	4,32	-
CK-09-15	4,15	2,67	-
CK <sub>TEM</sub> -01-15	3,92	-	-
CK <sub>TEM</sub> -04-15	4,08	4,51	-
CK <sub>TEM</sub> -07-15	5,12	5,14	-
CK <sub>TEM</sub> -09-15	4,29	4,88	-
PC-01-15	4,43	3,94	-
PC-04-15	4,56	2,83	-
PC-07-15	4,17	3,66	-
PC-09-15	4,32	-	-
PC <sub>TEM</sub> -01-15	4	5,21	-
PC <sub>TEM</sub> -04-15	4,03	4,85	-

PC <sub>TEM</sub> -07-15	4,02	-	1,91
PC <sub>TEM</sub> -09-15	4,31	5,1	-
PP-01-15	3,2	1,81	-
PP-04-15	3,45	-	-
PP-07-15	4,77	-	-
PP-09-15	2,98	4,1	-
PP <sub>TEM</sub> -01-15	5,03	5,64	-
PP <sub>TEM</sub> -04-15	2,53	4,14	-
PP <sub>TEM</sub> -07-15	3,95	4,03	-
PP <sub>TEM</sub> -09-15	3,67	-	-
Sed-01-15	3,44	2,16	-
Sed-04-15	5,3	3,52	-
Sed-07-15	5,53	3,56	-
Sed0915	5,05	4,53	-
CK-01-16	5,05	4,45	-
CK-04-16	5,99	4,12	-
CK-07-16	5,03	-	-
CK-09-16	4,92	-	-
CK <sub>TEM</sub> -01-16	4,19	3,21	-
CK <sub>TEM</sub> -04-16	1,94	-	-
CK <sub>TEM</sub> -07-16	2,94	4,71	-
CK <sub>TEM</sub> -09-16	2,47	3,93	-
PC-01-16	2,85	4,42	-
PC-04-16	3,39	2,68	-
PC-07-16	2,56	3,03	-
PC-09-16	4,68	3,11	-
PC <sub>TEM</sub> -01-16	5,08	3,72	-



PC <sub>TEM</sub> -04-16	4,37	4,71	-
PC <sub>TEM</sub> -07-16	5,15	4,97	-
PC <sub>TEM</sub> -09-16	3,84	-	-
PP-01-16	4,6	3,51	-
PP-04-16	4,58	3,04	1,1
PP-07-16	4,3	-	-
PP-09-16	5,19	3,8	-
PP <sub>TEM</sub> -01-16	5,01	4,1	-
PP <sub>TEM</sub> -04-16	4,5	-	-
PP <sub>TEM</sub> -07-16	5,61	-	-
PP <sub>TEM</sub> -09-16	5,87	4,24	-
Sed-01-16	6,13	3,19	-
Sed-04-16	4,76	4,54	-
Sed-07-16	5,53	3,36	-
Sed-09-16	6,33	4,62	-
CK-01-17	5,59	2,81	-
CK-04-17	4,85	3,24	-
CK-07-17	5,45	3,11	-
CK-09-17	6,09	4,1	-
CK <sub>TEM</sub> -01-17	3,69	4,56	-
CK <sub>TEM</sub> -04-17	4,07	-	-
CK <sub>TEM</sub> -07-17	3,47	-	-
CK <sub>TEM</sub> -09-17	3,47	4,84	-
PC-01-17	4,98	-	-
PC-04-17	3,94	4,54	-
PC-07-17	5,86	-	-
PC-09-17	5,58	4,12	-

PC <sub>TEM</sub> -01-17	5,49	3,69	-
PC <sub>TEM</sub> -04-17	5,4	-	-
PC <sub>TEM</sub> -07-17	5,01	2,75	-
PC <sub>TEM</sub> -09-17	6,21	-	-
PP-01-17	5,05	-	2,1
PP-04-17	5,29	2,74	-
PP-07-17	5,09	1,2	-
PP-09-17	4,85	-	-
PP <sub>TEM</sub> -01-17	5,18	-	-
PP <sub>TEM</sub> -04-17	5,06	2,6	-
PP <sub>TEM</sub> -07-17	5,23	-	-
PP <sub>TEM</sub> -09-17	4,96	3 81	-
Sed-01-17	5,77	3,41	-
Sed-04-17	4,74	3,36	-
Sed-07-17	5,68	3,65	4,47
Sed-09-17	5,72	3,21	-

## ANNEXE V

Résultat des analyses statistiques (RDA), des profils SSCP bactériens et des paramètres physico-chimiques des eaux de mer provenant de trois ports (plaisance, commerce et pêche) de Sfax, et des sédiments marins, provenant du port de pêche de Sfax, durant les années 2015, 2016 et 2017.

Paramètres	Eaux de mer		Sédiments	
	R <sup>2</sup>	<i>p</i> -valeur	R <sup>2</sup>	<i>p</i> -valeur
<b>Année</b>	0,05	0,301	0,181	0,421
<b>Degrée de pollution</b>	0	1	Nd	Nd
<b>Température</b>	0,0971	0,095	Nd	Nd
<b>pH</b>	0,0029	0,938	0,0075	0,65
<b>Salinité</b>	0,0109	0,786	0,0047	0,543
<b>DCO</b>	0,1010	0,080	Nd	Nd
<b>DBO<sub>5</sub></b>	0,1044	0,072	Nd	Nd
<b>DCO/DBO<sub>5</sub></b>	0,0555	0,279	Nd	Nd
<b>C<sub>tot</sub></b>	0,1059	0,075	Nd	Nd
<b>HC<sub>tot</sub></b>	0,093	0,096	0,0634	0,173
<b>N<sub>tot</sub></b>	0,1017	0,092	0,0801	0,159
<b>Cd</b>	0,0840	0,138	0,1463	0,361
<b>Cr</b>	0,0868	0,135	0,0081	0,865
<b>Cu</b>	0,0969	0,094	0,134	0,097
<b>Zn</b>	0,0996	0,087	0,1108	0,078
<b>Mn</b>	0,0699	0,168	0,0503	0,213
<b>Ni</b>	0,0757	0,158	0,105	0,111
<b>Fe</b>	0,0965	0,102	0,0812	0,143
<b>Na</b>	0,1237	0,34	0,1101	0,076
<b>Mg</b>	0,0746	0,144	0,0031	0,936
<b>Ca</b>	0,0068	0,856	0,0956	0,301
<b>K</b>	0,0427	0,25	0,0901	0,135

## ANNEXE VI 1

### Séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche FLU5 (1478 pb)

LOCUS KR676443 1478 bp DNA linear BCT 21-APR-2016

DEFINITION *Bacillusstratosphericus* strain FLU5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION KR676443

VERSION KR676443.1

KEYWORDS .

SOURCE *Bacillus stratosphericus*

ORGANISM *Bacillus stratosphericus*

*Bacteria*; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1478)

AUTHORS Hentati,D., Chebbi,A., Loukil,S., Kchaou,S., Godon,J.J., Sayadi,S. andChamkha,M.

TITLE Biodegradation of fluoranthene by a newly isolated strain of *Bacillus stratosphericus* from Mediterranean seawater of the Sfax fishing harbour, Tunisia

JOURNAL Environ SciPollutRes Int (2016)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1478)

AUTHORS Hentati,D., Chebbi,A., Sayadi,S. and Chamkha,M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (11-MAY-2015) Laboratory of Environmental Bioprocesses,  
Centre of Biotechnology of Sfax, Sidi Mansour, Km 6, Sfax 3018, Tunisia

#### ORIGIN

```
1 tttgatcctggctcaggacgaacgctggcggcgtgcctaatacatgcaagtcgagcggac
 61 agaagggagcttgcttccggatgtagcggcggacgggtgagtaaacctgggtaacctg
121 cctgtaagactgggataactccgggaaccggagctaataccggatagttcctgaaccg
181 catggttcaaggatgaaagacggttcggctgtcacttacagatggaccgcggcgcat
241 agctagttggtgagtaacggctcacaaggcgacgatgcgtagccgacctgagaggggtg
301 atcggccacactgggactgagacacggcccagactcctacgggaggcagcagtagggaa
361 cttccgcaatggacgaaagtctgacggagcaacgccgctgagtgatgaaggttttcgga
421 tcgtaaagctctgtgttagggaagaacaagtgaagagtaactgctgacacttgacgg
481 tacctaaccagaaagccacggctaactacgtgccagcagccgcgtaatactgaggtggc
541 aagcgtgtccggaattattggcgtaaagggtcgcagccggttcttaagtctgatgt
601 gaaagccccggctcaaccggggaggggtcattgaaactgggaaactgagtgagaaga
661 ggagagtggaattccacgtgtagcgggtgaaatgcgtagagatgtggaggaacaccagtgg
721 cgaagcgactctctggtctgtaactgacgctgaggagcgaagcgtggggagcgaacag
781 gattagataccctggtagtccacgccgtaaacgatgagtctaaagttagggggttcc
841 gcccttagtgctgcagctaacgcattaagcactccgctggggagtaggctgcaagac
901 tgaagtgcaaaaggaattgacggggcccgcacaagcggtagcagcatgtggttaattcga
961 agcaacgcgaagaaccttaccaggtcttgacatccttgacaacctagagataggcct
1021 tccttcggggacagagtacaggtggtgcatggtgtcgtcagctcgtgctgagatg
1081 tctgggttaagtcccgaacgagcgaaccttgatctagtggcagcattcagttggg
1141 cactctaaggtagctccggtgacaaaccggaggaaggtggggatgacgtcaaatcatca
1201 tgccccttatgactgggctacacacgtgctacaatggacagaacaaagggctgcgagac
1261 cgcaaggttagccaatcccacaatctgttctcagttcggatcgcagctgcaactcga
1321 ctgctgaaagctggaatcgtagtaatcgggatcagcatgcccggtgaatacgttccc
1381 gggccttgacacaccgcccgtcacaccagagagttgcaacaccggaagtcggtgagg
1441 taacctttatggagccagccgccgaaggtggggcagat//
```

## ANNEXE VI 2

### Séquence du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche NAPH6 (1469 pb)

LOCUS MH388026 1469 bp DNA linear BCT 30-MAY-2018

DEFINITION *Pseudomonas aeruginosa* strain NAPH6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION MH388026

VERSION MH388026.1

KEYWORDS .

SOURCE *Pseudomonas aeruginosa*

ORGANISM *Pseudomonas aeruginosa*

*Bacteria*; *Proteobacteria*; *Gammaproteobacteria*; *Pseudomonadales*; *Pseudomonadaceae*; *Pseudomonas*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1469)

AUTHORS Hentati,D. and Chamkha,M.

TITLE Efficiency in biodegradation of hydrocarbons and biosurfactant production by a newly halotolerant *Pseudomonas* sp. strain isolated from contaminated seawater

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1469)

AUTHORS Chamkha,M. and Hentati,D.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (25-MAY-2018) Laboratory of Environmental Bioprocesses, Centre of Biotechnology of Sfax,Sidi Mansour Km6, Sfax 1177, Tunisia

#### ORIGIN

```
1 atctggctcagattgaacgctggcggcaggcctaacacatgcaagtcgagcggatgaag
61 ggagcttctcctgattcagcggcgacgggtgagtaatgcctaggaatctgcctgta
121 gtgggggataacgtccgaaacgggcgtaataaccgatacgtcctgaggagaaagtgg
181 gggatcttcggacctcacgctatcagatgagcctaggctggattagctagtgggggt
241 aaaggcctaccaaggcgacgatccgtaactggctgagaggatgatcagtcacactggaa
301 ctgagacacggctccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattggacaatggcgga
361 aagcctgatccagccatgccgcgtgtgtaagaaggcttcggattgtaaagcactttaa
421 gttgggaggaaggcgagtaagtaataacctgctgtttgacgtaccaacagaataagc
481 accggtaacttctgtccagcagccgcgtaatacgaagggtcaagcgttaacgggaat
541 tactgggcgtaaaagcgcgctaggtggtcagcaagttggatgtgaaatccccgggctca
601 acctgggaactgcatccaaaactactgagctagagtagcggtagaggggtggtggaattcc
661 tgtgtagcgggtgaaatgcgtagatataggaaggaacaccagtggcgaaggcgaccactg
721 gactgatactgacactgaggtgcaaaagcgtggggagcaaacaggattagataccctgt
781 agccacgccgtaaacgatgtcgactagccgtgggatccttgagatcttagtggcgag
841 ctaacgcgataagtcaccgctggggagtagccgcaagggttaaaactcaaatgaatt
901 gacgggggcccgcacaagcggtgagcatgtggttaattcgaagcaacgcgaagaacct
961 tacctggccttgacatgctgagaacttccagagatggattggtgccttcgggaactcag
1021 acacaggtgctgcatggctgtcgtcagctcgtgctgagatgtgggttaagtccgta
1081 acgagcgaaccctgtccttagtaccagcacctgggtgggcactctaaggagactgc
1141 cggtgacaaaccggaggaagggtggggatgacgtcaagtcacatgccccttaccggccagg
1201 gctacacacgtgctacaatggtcgtgtaaaagggttccaagccgcgaggtggagctaat
1261 cccataaaaccgatgtagtccggatcgcagctcgaactcgactgcgtgaagtccgaat
1321 cgctagtaatcgtgaatcagaatgtcacgggtgaatacgttccgggccttgtacacaccg
1381 cccgtcacaccatggagtggtggtgctccagaagtagctagtctaaccgcaagggggacg
1441 gttaccacggagtgattcatgactgggggt//
```

## RESUME

La pollution des écosystèmes marins côtiers par les hydrocarbures est un problème environnemental majeur. En effet, les hydrocarbures, en particulier les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) présentent un risque toxicologique important, notamment par leurs propriétés cancérigènes et mutagènes. Les HAPs sont peu biodégradables et faiblement biodisponibles, ce qui les rend persistants dans l'environnement. Le même constat est fait pour le littoral Sud de Sfax (Tunisie), dont la pollution presque généralisée menace sérieusement les ressources naturelles existantes dans la région. La caractérisation physico-chimique des échantillons marins (eaux de mer et sédiments) prélevés à partir des trois ports (plaisance, commerce et pêche) de la ville de Sfax, prouve une contamination par des micropolluants organiques (hydrocarbures) et inorganiques (métaux) qui sont considérés comme des excellents traceurs de la pollution urbaine et industrielle et ils font partie des composés les plus toxiques étant donné leur faible biodégradation. La méthode d'empreinte moléculaire (PCR-SSCP) montre une dominance du domaine *Bacteria* suivie des *Eucarya* et des *Archaea* au sein des échantillons marins étudiés. La méta-analyse de certains échantillons étudiés, a révélé la dominance des taxons hydrocarbonoclastes (*Alcanivorax*, *Marinobacter*...).

Dans une autre partie de travail, quatre souches bactériennes marines hydrocarbonoclastes ont été isolées et caractérisées sur les plans phénotypique et phylogénétique, après des enrichissements sur des HAPs et sur le pétrole brut, comme seules sources de carbone et d'énergie, à 37 °C: FLU5 de *Bacillus stratosphericus*, NAPH6 de *Pseudomonas aeruginosa*, PYR2 de *Bacillus licheniformis* isolées sur le fluoranthène, le naphthalène et le pyrène, respectivement, en présence de 30 g/l NaCl; et CO100 de *Staphylococcus* sp., isolée sur le pétrole brut, en présence de 100 g/l NaCl. Les analyses chromatographiques, GC-MS ou GC-FID, montrent les capacités biodégradatives intéressantes de ces composés récalcitrants par les bactéries isolées. Par ailleurs, ces souches ont montré leur capacité à dégrader une large variété d'hydrocarbures: aliphatiques, monoaromatiques, polyaromatiques et complexes.

En outre, ces quatre souches bactériennes, sont capables de produire des biosurfactants nommés BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-PYR2 et BS-CO100, sur plusieurs sources de carbones, y compris l'huile de friture résiduelle, un substrat bon marché, minimisant ainsi le coût élevé de production de ces tensioactifs. Les analyses de spectrométrie de masse ESI, des biosurfactants BS-FLU5, BS-PYR2 et BS-CO100 purifiés, montrent qu'il s'agit des lipopeptides, alors que les biosurfactants BS-NAPH6 sont de nature rhamnolipidique, sur la base des analyses FTIR. Ces quatre biosurfactants sont caractérisés par des propriétés tensioactives intéressantes: une faible CMC, une importante réduction de la tension de surface... Ils sont stables *vis-à-vis* d'une large gamme de pH, de température et de salinité. De plus, ces agents tensioactifs sont doués d'activité de remobilisation des hydrocarbures contenus dans des sols pollués. Les biosurfactants BS-FLU5, BS-PYR2 et BS-CO100, présentent des activités anti-adhésives et anti-biofilms intéressantes contre des biofilms de certains microorganismes pathogènes. Par ailleurs, une propriété cicatrisante remarquable sur des plaies d'excision chez un modèle expérimental de rats de race Wistar, a été montrée par les quatre biosurfactants pour des concentrations de l'ordre de 5 et 10 mg/ml, en comparaison avec un cicatrisant de référence (CICAFLORE<sup>®</sup>). A noter que l'évaluation de la cytotoxicité des biosurfactants étudiés, a montré qu'ils n'ont pas des effets toxiques sur des cellules rénales humaines HEK-239 à des concentrations jusqu'à 1000 µg/ml pour BS-FLU5 et BS-CO100 et jusqu'à 200 µg/ml pour BS-NAPH6 et BS-PYR2. La production des biosurfactants BS-FLU5 à l'échelle pilote (deux fermenteurs de 20 et 100 litres, volumes totaux), en présence d'un milieu économique, montre une amélioration des quantités des biosurfactants produits par rapport à l'échelle laboratoire (Erlenmeyer, 1 litre (volume total)).

L'ensemble de ces résultats prometteurs, montrent que les souches marines isolées FLU5, NAPH6, PYR2 et CO100, ainsi que leurs biosurfactants demeurent d'intérêts biotechnologiques pour divers types d'applications, tels que la bioremédiation des eaux et des sédiments marins contaminés par des hydrocarbures, ainsi que d'autres applications dans des plusieurs domaines tels que l'agroalimentaire, la cosmétique, la médecine, l'agriculture, etc...

**Mots clés:** Ports; Pollution marine; Hydrocarbures; HAPs; Biodiversité microbienne; Biodégradation; Biosurfactants.

## ABSTRACT

Pollution of coastal marine ecosystems by hydrocarbons is a major environmental problem. In fact, hydrocarbons, in particular polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are classified as major pollutants in the marine environment, due to their high toxicity and their persistence within ecosystems. The South coast of Sfax (Tunisia) is an example of a polluted ecosystem subject to both urbanization and industrialization including the outfall of untreated domestic sewage and wastewaters, fishery activities, as well as ship traffic and boat pollution. The physico-chemical characterization of the seawater taken from three harbours (pleasure, commercial and fishing) of the city of Sfax, showed a heavy contamination by organic and inorganic micropollutants. These are excellent tracers of urban and industrial pollution, and they are among the most toxic compounds due to their low biodegradation. The molecular fingerprinting technique (PCR-SSCP) showed the dominance of the *Bacteria* domain followed by *Eucarya* and *Archaea* within the studied marine samples. The meta-analysis of some studied samples revealed the dominance of hydrocarbonoclast taxa.

In another part, four marine, aerobic and hydrocarbonoclastic strains: *Bacillus stratosphericus* FLU5, *Pseudomonas aeruginosa* NAPH6, *Bacillus licheniformis* PYR2, isolated after enrichments on fluoranthene, naphthalene and pyrene, respectively, and in the presence of 30 g/l NaCl. Strain *Staphylococcus* sp. CO100 was isolated after enrichment on crude oil, in the presence of 100 g/l. Chromatographic analysis, showed the interesting biodegradative capacities of these recalcitrant compounds by the isolated bacteria. In addition, these strains have shown their ability to degrade a wide variety of hydrocarbons: aliphatic, monoaromatic, polyaromatic and complex.

Besides, these strains showed their capacity to produce efficient surface active agents BS-FLU5, BS-NAPH6, BS-PYR2 and BS-CO100, on several substrates and in particular the residual frying oil, which is a cheap and renewable carbon source alternative, thus minimizing the high cost of producing surfactants. The ESI/MS analysis of the purified BS-FLU5, BS-PYR2 and BS-CO100 biosurfactants revealed that they are belonging to lipopeptide family. FTIR analysis showed the glycolipid nature, more precisely the rhamnolipid type, of biosurfactant BS-NAPH6. These four biosurfactants are characterized by interesting tensioactive properties (low CMC, important surface tension reduction...). Furthermore, these surface active agents showed interest stability against a broad range of pH, temperature and salinity. The application of these biosurfactants, in oil recovery, from hydrocarbons-contaminated soil, showed that they were more effective on the hydrocarbon-remobilization than some tested synthetic surfactants. The biosurfactants BS-FLU5, BS-PYR2 and BS-CO100, were found to have notable anti-adhesif and anti-biofilm activities, being able to prevent and eliminate the biofilm formation by pathogenic microorganisms. Moreover, the four tested biosurfactants showed an interesting healing activity, on the wound site in a rat model. They increased significantly the percentage of wound closure when compared to the untreated and CICAFLORA<sup>®</sup> (a reference pharmaceutical product) treated groups, using two different concentrations (5 and 10 mg/l). Interestingly, the evaluation of the cytotoxicity of the studied biosurfactants, showed that they have no toxic effects on human HEK-239 cells at concentrations up to 1000 µg/ml for BS-FLU5 and BS-CO100 and up to 200 µg/ml for BS-NAPH6 and BS-PYR2. An attempt to produce biosurfactant produce by strain FLU5 on a pilot-scale (fermentors of 20 and 100 liter, as total volume), using a cost-effective medium, was also performed. Preliminary results showed an increase in the quantities of biosurfactants BS-FLU5 produced on a pilot-scale compared to the lab-scale (Erlenmeyer of 1 liter). These results highlight the interest for potential use of strains FLU5, NAPH6, PYR2 and CO100, as well as their biosurfactants, in a wide variety of industrial, environmental and biotechnological applications.

**Key words:** Harbours; Marine pollution; Hydrocarbons; Microbial biodiversity; Biodegradation; Biosurfactants.