

574-01/01

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE

SPECIALITE : GENIE ENZYMATIQUE, BIOCONVERSION, MICROBIOLOGIE

présenté par

Djamel-Eddine ABDELOVAHID

Laboratoire de Technologie Enzymatique de l'U.T.C.
Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle

D43

TAXONOMIE ET CAPACITES DEGRADATIVES
DE BACTERIES ASSIMILANT LES HYDROCARBURES

soutenue le 17 Juillet 1989

JURY

M.	D. THOMAS	Président
M.	P. FUSEY	
M.	J.M. LEBAULT	
M.	J. OUDOT	
Mme	N. TRUFFAUT	



Inscrit sous le N° *AA50*
Date de *2007 oct 11*
Cote

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE DE TECHNOLOGIE DE COMPIEGNE

SPECIALITE : GENIE ENZYMATIQUE, BIOCONVERSION, MICROBIOLOGIE

présenté par

Djamel-Eddine ABDELOUAHID

Laboratoire de Technologie Enzymatique de l'U.T.C.
Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle

TAXONOMIE ET CAPACITES DEGRADATIVES
DE BACTERIES ASSIMILANT LES HYDROCARBURES

soutenue le 17 Juillet 1989

JURY

M.	D. THOMAS	Président
M.	P. FUSEY	
M.	J. M. LEBAULT	
M.	J. OUDOT	
Mme	N. TRUFFAUT	

Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur THOMAS, Directeur du Laboratoire de Technologie Enzymatique à l'Université de Technologie de Compiègne, qui a bien voulu diriger cette thèse. Je le remercie pour l'honneur qu'il me fait d'en présider le jury.

Je dois beaucoup à Monsieur OUDOT, Sous-directeur au Laboratoire de Cryptogamie du M.N.H.N., qui a dirigé mes travaux avec beaucoup d'attention. Je le remercie pour avoir suivi sans relâche tous mes pas, pour ses conseils amicaux et sa disponibilité constante. Je lui dois ma formation en microbiologie.

Je suis extrêmement reconnaissant à Monsieur le Professeur FUSEY, qui m'avait accueilli dans son laboratoire en D.E.A.. Je le remercie pour avoir guidé et orienté mes premiers pas de recherche dans ce domaine et pour avoir accepté d'être le rapporteur de ma thèse.

J'exprime mes plus vifs remerciements à Madame TRUFFAUT, Professeur à l'U.T.C., pour l'intérêt qu'elle a bien voulu porter à ce travail et pour avoir accepté d'en être rapporteur.

Je remercie Monsieur LEBault, Professeur à l'U.T.C., pour avoir bien voulu s'intéresser à ces travaux et me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Que Monsieur BAUDOIN du Laboratoire de Cryptogamie du M.N.H.N. soit remercié pour avoir réalisé les calculs de la taxonomie numérique.

J'exprime ma reconnaissance aux chercheurs et techniciens du Laboratoire de Cryptogamie du M.N.H.N.. Je remercie tout particulièrement Mademoiselle CLEMENT et Monsieur HALOUI pour l'efficace collaboration technique qu'ils m'ont apportée tout au long de ce travail.

INTRODUCTION

La contamination du milieu naturel par des hydrocarbures existe depuis des temps géologiques anciens. Elle était naguère localisée au niveau des fuites naturelles de certains gisements et n'avait d'impact biologique qu'en des régions très limitées de l'écosystème.

C'est l'exploitation, récente et intensive, du pétrole par l'homme qui a entraîné une augmentation considérable de la surface des zones contaminées par les hydrocarbures. Potentiellement, la presque totalité des domaines terrestres et maritimes est concernée, que ce soit par des déversements accidentels ou par des rejets chroniques de déchets pétroliers.

On estime à six millions de tonnes la quantité de pétrole déversée chaque année dans l'océan mondial (Brown 1987; Dumenil et al. 1988) avec toutes les conséquences néfastes que cela entraîne sur la faune et la flore (Barille et al. 1981; Harvey 1981; Santella et al. 1982; Lehr and Jerina 1983; Cerneglia 1984; Scott et al. 1984; Donnelly et al. 1985).

Cependant, comme toute matière organique, le pétrole évolue sous l'action de mécanismes physico-chimiques et biologiques. En particulier, certains constituants pétroliers peuvent être dégradés par des microorganismes.

C'est dans ce cadre de la biodégradation microbienne des hydrocarbures que s'inscrit notre travail, dont le but est de préciser les caractéristiques des capacités dégradatives de bactéries actives, avec une attention particulière pour les aspects taxonomiques, écologiques et physiologiques du processus.

C H A P I T R E I

EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE

Dans cette revue, nous rappelons brièvement la constitution chimique du pétrole. Nous présentons ensuite les acquis concernant la biodégradation microbienne des hydrocarbures, en citant les microorganismes actifs et décrivant les principales voies métaboliques connues. Enfin nous étudions l'influence des facteurs qui conditionnent l'activité de biodégradation, tant au laboratoire que dans le milieu naturel.

1. LE PETROLE ET SES CONSTITUANTS

Le pétrole est un mélange extrêmement complexe qui résulte de la réduction géochimique de la matière organique fossile animale et végétale. Les milliers de composants individuels du pétrole peuvent être regroupés en classes basées sur des relations structurales, et il est possible de séparer un pétrole brut en trois fractions constitutives principales : saturée, aromatique et asphaltique ou polaire (Brown et al. 1969). Les principaux types structuraux d'un pétrole brut sont rapportés dans le tableau suivant :

Tableau 1. Composition chimique d'un pétrole brut

Hydrocarbures saturés	
alcanes linéaires	hydrocarbures aliphatiques
alcanes ramifiés	
cycloalcanes ou naphtènes :	hydrocarbures alicycliques
Hydrocarbures aromatiques	
de 1 à 6 cycles	
Fraction asphaltiques	
résines	
asphaltènes	

1.1 Hydrocarbures saturés

A l'intérieur de la fraction saturée, on trouve des n-alcanes, des alcanes ramifiés (iso-alcanes) ainsi que des cyclo-alcanes (naphtènes).

1.1.1 Les n-alcanes

Ce sont des chaînes linéaires (Fig. 1) dont le nombre s'étend de C₅ (pentane) jusqu'à environ C₄₀ (tetracontane). Dans un brut, la distribution des n-alcanes est régulière et le rapport entre la somme des alcanes impairs et des alcanes pairs (Carbon Preference Index ou CPI) est voisin de l'unité. Un pétrole brut contient de 10 à 40% de n-alcanes.



Figure 1. Structure moléculaire des n-alcanes

1.1.2 Les alcanes ramifiés

Ils comportent une ou plusieurs ramifications. Les iso-alcanes portent un groupe méthyle en position α (Fig. 2). Les anteiso-alcanes ont une ramification en position β (Fig. 3) et les isoprénoides comportent plusieurs ramifications (Fig. 4).

Le pristane et le phytane, respectivement isoC-19 et isoC-20, sont les isoprénoides les plus caractéristiques d'un pétrole brut. Ils proviennent de respectivement de l'oxydation et de la réduction du phytol, dérivé de l'hydrolyse de la chlorophylle. A ce titre, ce sont des "marqueurs biologiques", qui prouvent l'origine biologique du pétrole.

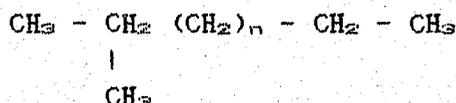


Figure 2. Structure moléculaire des iso-alcanes

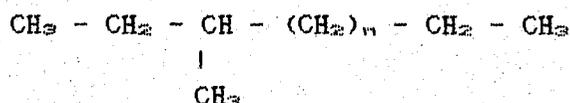


Figure 3. Structure moléculaire des anteiso-alcanes

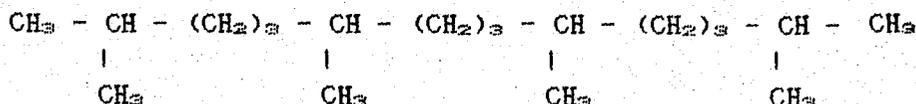


Figure 4. Structure moléculaire du pristane

1.1.3 Les alcanes cycliques

Les hydrocarbures alicycliques ou naphténiques contiennent de 1 à 6 cycles saturés souvent associés à des structures aliphatiques ou aromatiques. Le cyclohexane est la structure de base la plus répandue. Les stéranes et les triterpanes sont des alcanes polycycliques caractéristiques d'un pétrole brut, eux aussi considérés comme marqueurs biologiques.

1.2 Hydrocarbures aromatiques

Ce sont des composés insaturés dont la molécule contient de 1 à 6 cycles benzéniques. On distingue les hydrocarbures monoaromatiques, dont le plus simple est le benzène, et les hydrocarbures polyaromatiques, dont les cycles peuvent être plus ou moins condensés. Certains aromatiques, surtout polycycliques, sont connus pour leurs propriétés mutagènes et cancérigènes (Sims and Grover 1974, 1981; Harvey 1981; Jacob et al. 1982; Kumar and Lehr 1982; Lehr and Jerina 1983; Leisinger 1983).

1.3 Fraction asphaltique

Contrairement aux hydrocarbures saturés et aromatiques constitués exclusivement de carbone et d'hydrogène, la fraction asphaltique incorpore en outre de l'azote, du soufre, de l'oxygène ou des métaux. Elle est traditionnellement divisée en asphaltènes (insolubles dans le pentane ou l'hexane) et en résine. Ce sont des structures très complexes à haut poids moléculaire comportant de nombreuses fusions et ramifications, ce qui rend leur étude extrêmement délicate.

2. LA BIODEGRADATION DU PETROLE

Comme toute matière organique, le pétrole subit plusieurs types de transformations de nature d'une part, physico-chimique dont le phénomène majeur est la photooxydation (Burwood and Speers 1974; Collen and Larson 1978; Larson et al. 1979; Rontani et al. 1985), et d'autre part biologique (biodégradation) due essentiellement à l'action des microorganismes. Ces transformations aboutissent progressivement à l'élimination d'une partie des constituants du pétrole et à leur intégration dans le cycle naturel. Les nombreux travaux consacrés à l'étude de ce phénomène ont fait l'objet d'articles de synthèse périodiques (Zobell 1946; Atlas 1981, 1984; Oudot 1984).

De nombreux microorganismes du sol possèdent une aptitude remarquable à dégrader les différents composants du pétrole brut. C'est sur cette capacité métabolique qu'est basée la technique du "land-farming", qui consiste à répandre volontairement les déchets pétroliers sur des sols, les boues ainsi épandues étant soumises à l'activité microbienne (Bartha et Bossert 1984).

2.1 Les microorganismes actifs

Parmi les microorganismes impliqués dans le processus de biodégradation, on trouve essentiellement :

- des bactéries : (cf. 2.2), qui font l'objet de notre étude (cf. Chap. III)
- des champignons filamenteux : L'aptitude des champignons à utiliser les hydrocarbures est connue depuis Myoshi (1895). Les souches les plus actives appartiennent à deux ordres principaux : les moniliales et les mucorales avec *Aspergillus* et *Penicillium* comme genres les plus représentés (Nyns et al. 1968; Cerniglia 1979, 1984; Oudot et al. 1986).
- des levures : Les espèces actives les plus souvent rencontrées appartiennent aux genres *Candida*, *Rhodotorula* (Le Petit 1975; Atlas 1981) et *Sporobolomyces* (Atlas 1981).
- des algues et cyanobactéries : Walker et al. (1975) ont montré qu'une algue achlorophyllienne, *Prothotoca zopfii* est capable de dégrader des hydrocarbures. Par la suite Cerniglia et al. (1980) montrent que 9 cyanobactéries, 5 algues vertes, 1 algue rouge, 2 algues brunes et 1 diatomée ont cette même aptitude.

2.2 Les bactéries dégradant les hydrocarbures

L'utilisation du pétrole comme source de carbone et d'énergie par les bactéries a été reconnue depuis Schngen (1913), qui a observé qu'une "mycobactérie" se développait sur milieu minéral gélosé exposé à la vapeur des hydrocarbures.

Des bactéries actives du sol ainsi que des eaux douces et maritimes ont été recensées par Atlas (1984). Les souches les plus fréquemment citées appartiennent aux genres : *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Vibrio*, "coryneforme", *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Alcaligenes*. D'autres genres comme *Actinomyces* (Zobell 1946; Austin et al. 1977 a, b), *Aeromonas* (Buckley et al. 1976; Walker et Colwell 1976), *Cytophaga* (Matels 1967; Cook and Westlake 1974) et *Bacillus* (Matels 1967; Kachholz and Rehm 1977; Odu 1978; Kawakami et Nishimura 1981; Berwick 1984; Rasolomanana et al. 1987) sont moins fréquemment cités.

Aspect génétique

On considère souvent que les voies métaboliques de la biodégradation sont codées par chromosome. Mais depuis Chakrabarty (1972), on a montré chez certaines souches de *Pseudomonas* que les gènes codant pour la dégradation de certains hydrocarbures peuvent être portés par du DNA extrachromosomal (plasmide). Ainsi la dégradation du salicylate peut être déterminée par un plasmide (SAL) chez *Pseudomonas putida* (Chakrabarty 1972). De la même manière, la biodégradation du camphre (Rheinwald et al. 1973), de l'octane (Chakrabarty et al. 1973), du naphthalène (Dunn and Gunsalus 1973; Yen and Gunsalus 1982-1985), du toluène (Worssey and Williams 1975; Dunn et al. 1980; Franklin and Williams 1980) et du xylène (Friello et al. 1976) est codée respectivement par les plasmides (CAM), (OCT), (NAH), (TOL), et (XYL). D'autres plasmides

dégradatifs ont été mis en évidence chez *Acinetobacter calcoaceticus* (Rusansky et al. 1987) et *Flavobacterium sp* (Chandhry et al. 1988). La découverte de ces plasmides explique a posteriori les constatations faites sur l'instabilité des capacités de dégradation de certaines bactéries. Par ailleurs, une bactérie est capable d'apprendre à biodégrader de nouvelles molécules lorsqu'elle obtient de nouvelles séquences d'information génétique par des mécanismes de conjugaison ou grâce aux transposons (Gunsalus et Marshall 1972; Eaton et Timmis 1984; Grady 1985).

Ainsi l'on a réussi le transfert de plusieurs plasmides dégradatifs dans une même cellule hôte (Chakrabarty 1972; Friello et al. 1976; Jacoby et al. 1978). Plus récemment, Stephens et al. (1989) ont mis en évidence la synthèse enzymatique chez *Escherichia coli* cloné par un gène de *Pseudomonas* codant pour la dégradation du toluène. Au laboratoire, ces souches se sont révélées effectivement actives, mais les essais d'implantation dans le milieu naturel n'ont pas été concluants, du fait de la compétition avec les microorganismes indigènes, mieux adaptés à leur environnement local.

3. LE METABOLISME DES HYDROCARBURES CHEZ LES BACTERIES

Des travaux biochimiques fondamentaux se sont attachés à l'étude des voies métaboliques empruntées par des cultures pures de microorganismes pour dégrader des composés pétroliers simples, ainsi que des enzymes impliquées dans le processus de biodégradation (Atlas 1981; Dutta et al. 1983; Gosh et al. 1983; Lindly et al. 1986).

3.1 Dégradation des alcanes

La dégradabilité d'un pétrole brut dépend de sa composition et de la configuration moléculaire de ses classes constitutives (Atlas 1975). Les n-alcanes sont les hydrocarbures les plus facilement dégradables (Neufeld et al. 1980; Cameotra et al. 1983). Après une attaque généralement monoterminal, on observe la formation d'un alcool primaire puis d'une aldéhyde et d'un acide monocarboxylique. La dégradation de l'acide se poursuit par β -oxydation qui conduit à la production d'acides gras plus courts de deux atomes de carbone et d'acetylcoenzyme A avec une éventuelle libération de gaz carbonique (Fig. 5).

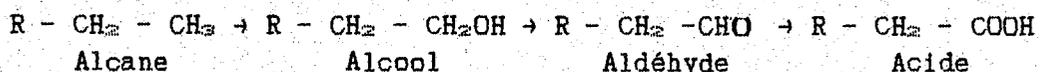


Figure 5. Schéma de la biodégradation des n-alcanes

Les alcanes linéaires sont assimilés par la plupart des bactéries actives *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Micrococcus* (King et al. 1975; Hallas et al. 1978; Murphy et al. 1983).

Les alcanes ramifiés sont métabolisés par un nombre plus restreint de microorganismes et une ramification méthyle augmente, en général, la résistance de ces composés à l'attaque microbienne (Pirnik 1979; Schaeffer et al. 1979; Nakajima et al. 1985).

Les alcanes isoprénoïdes très ramifiés comme le pristane étaient autrefois considérés comme résistants à la biodégradation. En fait, ils se sont avérés subir une ω -oxydation, avec formation d'acides dicarboxyliques comme principale étape de dégradation (Mc Kenna et al. 1971; Pirnick 1979; Nakajima et al. 1985).

Les alcanes ramifiés sont assimilés par des souches de *Corynebacterium* (Mc Kenna et Kallio 1971), *Micrococcus* (Jobson et al. 1972; Rambeloarisoa et al. 1984), *Pseudomonas* (Fall et al. 1979) et *Acinetobacter* et *Alcaligenes* (Rambeloarisoa et al. 1984).

Les cycloalcanes sont particulièrement résistants à l'attaque microbienne (Donaghue et al. 1976; Stirling et al. 1977; Trudgill 1978; Perry 1979). Les composés alicycliques complexes, tels que les hopanes (composés pentacycliques) sont parmi les composants les plus persistants des déversements du pétrole dans la nature. Cependant, malgré les énormes quantités d'hydrocarbures alicycliques répandues dans la biosphère, on ne constate pas d'accumulation particulière de ces composés dans l'environnement (Oudot, 1984). Ceci implique que des microorganismes possèdent la capacité métabolique de les assimiler (Beam et al. 1974; Davis et al. 1979). Pourtant au laboratoire, très peu de souches se sont révélées capables de métaboliser ces composés en culture pure : *Nocardia* (Stirling et al. 1977) et *Pseudomonas* (Anderson et al. 1980), *Pseudomonas* et *Acinetobacter* (Walker et al. 1975).

En fait leur dégradation est possible si les microorganismes utilisent comme substrat de croissance un autre composé présent simultanément dans le milieu. C'est le phénomène de la cooxydation (Horvath 1972; Perry 1979; Alexander 1979, 1981; Dalton et Stirling 1982; Rasolomanana et al. 1987).

3.2 Dégradation des aromatiques

La dégradation des hydrocarbures aromatiques a fait l'objet de plusieurs articles de synthèse : Gibson (1971, 1976); Cripps et Watkinson (1978); Subramanian et al. (1978). Les monoaromatiques sont plus rapidement dégradés que les polycycliques. L'hydrocarbure aromatique le plus simple est le benzène dont le premier stade de dégradation est la fission du noyau qui donne du catéchol (Fig. 6)

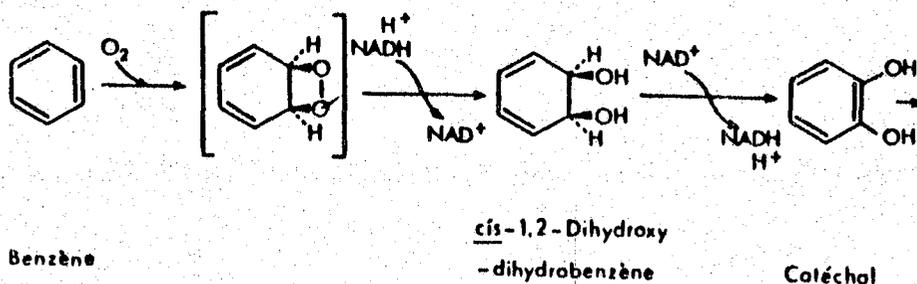


Figure 6. Conversion du benzène en catéchol

Les structures aromatiques condensées sont sujettes à une dégradation microbienne qui suit des étapes métaboliques identiques aux structures monocycliques (Zobell 1971; Deam Raymond et al. 1975; Gibson 1975). Cependant les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont relativement résistants aux attaques microbiennes mais peuvent être dégradés essentiellement par cooxydation (Barnsley 1975; Gibson 1975; Walker et al. 1974, 1976; Walker et Colwell 1975). La dégradabilité des structures aromatiques est fonction du nombre de noyaux qu'elles comportent (Oudot 1984).

Les souches actives sur les composés aromatiques appartiennent essentiellement aux genres *Arthrobacter* (Tittmann et al. 1980), *Pseudomonas* (Gibson 1976; Zilber 1980; Solanas et al. 1984; Stucki et al. 1987), *Flavobacterium* (Stucki et al. 1987), *Acinetobacter* et *Alcaligenes* (Rambelocarisoa 1983), *Mycobacterium* (Guerin and Jones 1988) et *Beijerinckia* (Schocken and Gibson 1984).

3.3 Dégradation des asphaltiques

Les asphaltiques considérés dans leur ensemble s'avèrent extrêmement résistants à la biodégradation et les étapes métaboliques de la dégradation de ces composés sont pratiquement inconnues. Ceci est dû à la complexité de leurs structures chimiques et l'avancement des connaissances dans ce domaine est directement lié aux développements des techniques analytiques. Au laboratoire, on a noté la persistance, voire même une augmentation de ces fractions (Zajic et al. 1974; Oudot 1979, 1984; Oudot et al. 1986). Il en est de même dans le milieu naturel : sols (Jobson et al. 1972) et sédiments marins (Fusey et Oudot 1982, 1984a). Toutefois nous avons isolé des souches bactériennes capables de dégrader une certaine partie de cette fraction (cf. Chap. IV).

Ainsi (Oudot 1984a), la biodégradabilité des constituants pétroliers est plus liée à leur structure moléculaire intrinsèque qu'aux capacités enzymatiques particulières de la microflore qui les utilise, et l'on observe un ordre constant dans la biodégradation des hydrocarbures d'un pétrole, des fractions les plus dégradables (n-alcanes) aux plus résistantes ou réfractaires (asphaltiques). Dans le milieu naturel, le pouvoir autoépurateur d'un biotope résulte des capacités dégradatives de la microbiocénose présente dont l'expression est contrôlée par les facteurs physico-chimiques de l'environnement local.

4. FACTEURS INFLUENCANT LA BIODEGRADATION

L'élimination ou la persistance des polluants pétroliers dans un biotope est fonction des propriétés des écosystèmes touchés. Ainsi dans un environnement défavorable, les hydrocarbures du pétrole peuvent persister indéfiniment, alors que dans un autre aux conditions propices, les mêmes hydrocarbures peuvent être complètement biodégradés. En particulier une aération insuffisante, des températures trop basses, une surcharge trop importante en carbone pétrolier ou encore un déficit en éléments nutritifs peuvent être autant de facteurs limitants.

4.1 Nature et état physique des polluants pétroliers

Les hydrocarbures sont très peu solubles dans l'eau et leur biodégradation n'est possible que lorsqu'ils sont en contact physique avec les microorganismes. Dans les écosystèmes aquatiques, le pétrole s'étend en formant une couche mince qui se fragmente en une multitude de gouttelettes. Cette dispersion fine du pétrole favorise la biodégradation par l'augmentation de la surface réactionnelle mise à la disposition des microorganismes. C'est d'ailleurs l'un des buts des produits dispersants utilisés pour lutter contre les marées noires.

Dans les sols, interviennent surtout des mouvements verticaux liés à la perméabilité de la matrice organo-minérale. Les phénomènes d'évaporation et de photooxydation sont très réduits. Par ailleurs le contenu qualitatif en hydrocarbures d'un mélange pétrolier influe sur la biodégradation (Mulknis-Phillips 1974; Walker et al. 1976; Davis et al. 1977; Westlake et al. 1978).

4.2 Température

La biodégradation des hydrocarbures a été enregistrée dans une large gamme de température et on a isolé des microorganismes psychrophiles, mésophiles et thermophiles dégradant les hydrocarbures. Zobell (1973) et Traxler (1973) ont étudié la dégradation des hydrocarbures en-dessous de 0°C, alors que Klug et Markovetz (1967) et Mateles et al. (1967) ont signalé une activité de biodégradation à 70°C.

C'est aux températures moyennes que l'activité de biodégradation est la plus intense avec un optimum situé entre 20 et 30°C (Oudot 1975; Atlas 1975).

Souvent la température n'est pas le facteur principal limitant la biodégradation, mais elle a néanmoins une influence déterminante sur l'activité de biodégradation et sur le développement des populations microbiennes.

4.3 Oxygène

L'aération a une importance primordiale dans la biodégradation des hydrocarbures et des concentrations élevées en produits pétroliers peuvent conduire à une inhibition de la biodégradation par manque de réoxygénation du milieu (Fusey et Oudot 1984).

Dans le sol, la biodégradation n'est active que dans l'horizon superficiel aérobie, ce qui explique que les divers procédés de landfarming préconisent toujours des façons culturales superficielles (labour, hersage) pour favoriser l'aération des couches contaminées. Cependant, il existerait des microorganismes capables de dégrader les hydrocarbures en anaérobiose qui utiliseraient les nitrates ou les sulfates comme accepteurs d'électrons (Parekh 1977; Yoshinari & al. 1977; Schinck 1985; Kuhn et al. 1988).

Quoique des bactéries anaérobies puissent intervenir dans la dégradation de produits intermédiaires formés (Jobson et al. 1979), la biodégradation des hydrocarbures reste un processus essentiellement aérobie et la minéralisation de 1 g d'hydrocarbures nécessite 3.4 g d'oxygène.

4.4 Eléments nutritifs

Les microorganismes ont besoin d'azote et de phosphore pour former leur biomasse. La disponibilité de ces éléments nutritifs dans un milieu fortement contaminé est critique car le rapport C/N et C/P est défavorable pour la croissance microbienne. Cependant N et P ne sont pas limitants dans le cas d'une faible contamination (Bartha et Atlas 1977; Fusey et Oudot 1980; Oudot et al. 1989).

La demande en azote par rapport au carbone pétrolier dégradé s'établit entre 3 et 16% (Bridie et al. 1971; Atlas et Bartha 1973; Atlas 1981; Fusey et al. 1983; Floodgate 1984), tandis que la nature de la source d'azote, minérale ou organique, n'est pas a priori un facteur limitant la biodégradation (Benkirane-Bennis 1981).

Le phosphore peut également limiter la biodégradation si sa concentration est insuffisante (Ward & Brock 1976). Les autres éléments nutritifs majeurs : soufre, potassium, sodium, calcium sont généralement présents en quantité suffisante dans le milieu naturel. Un déficit en fer peut limiter la biodégradation aussi bien en mer que dans le sol (Dibble & Bartha 1976; Moucawi & al. 1981).

De même un milieu totalement carencé en magnésium ne permet pas le développement de microorganismes dégradant les hydrocarbures (Fusey et al. 1975, 1980) et l'action de cet élément au niveau enzymatique a été confirmée.

L'importance de facteurs de croissance et des vitamines est bien connue pour des souches pures hétérotrophes. Rivière et al. (1974) ont montré une augmentation de la biodégradation de quelques hydrocarbures par des souches pures en présence de facteurs de croissance, alors que dans le cas d'une culture mixte, les facteurs de croissance sont produits en quantité suffisante (Fusey et al. 1980).

Tous ces facteurs influençant la biodégradation sont en fait étroitement liés et interdépendants, et ils peuvent devenir alternativement limitants selon les conditions de l'équilibre dynamique qui s'établit entre le milieu et le stade d'évolution des contaminants.

4.5 Autres facteurs

Le pH joue un rôle moins important et celui des milieux naturels n'est pas un obstacle. On note une adaptation sélective de la microflore en fonction du pH. Un pH acide favorise le développement des champignons, alors qu'un pH basique favorise les bactéries (Oudot 1975). Les très fortes concentrations en sel réduisent les capacités métaboliques des bactéries (lacs arctiques) (Ward & Brock 1978), mais la salinité naturelle des océans n'a pas d'influence notable.

En revanche, la pression hydrostatique a une action importante et, aux grandes profondeurs marines, l'activité microbienne vis-à-vis de la matière organique, et des hydrocarbures, est très réduite (Jannash et al. 1971).

PROBLEMATIQUE ET PLAN DU TRAVAIL

Ce bref rappel des données générales connues dans le phénomène de la biodégradation des hydrocarbures en fait apparaître les aspects bien établis mais aussi les points encore obscurs et discutés.

La taxonomie des bactéries impliquées est assez fluctuante et les souches actives sont plutôt mal définies. Sur le plan systématique et de la taxonomie, certains concepts et méthodes ont récemment évolué. C'est ce qui nous a conduit (Chap. III) à mener une étude taxonomique aussi précise que possible des souches que nous avons pu isoler de différents biotopes tempérés et tropicaux.

Les capacités dégradatives des bactéries actives ont jusqu'à présent été étudiées soit de manière très ponctuelle (une souche - un substrat), soit au contraire très globale (taux de biodégradation total du pétrole - culture mixte). Nous affinons considérablement ces résultats en analysant de façon détaillée le taux de biodégradation d'un pétrole total, de ses fractions constitutives et de composés individuels pour chacune des souches actives (Chap. IV et V). Nous comparons ensuite les performances des souches individuelles et des cultures mixtes, et nous tentons de discerner des relations entre la position taxonomique des souches et leurs aptitudes métaboliques.

Après avoir défini une cinétique moyenne de la biodégradation en culture non renouvelée au laboratoire (Chap. VI), nous abordons le problème, controversé, de la stabilité des capacités dégradatives chez les souches actives, c'est-à-dire la variation, le maintien ou la perte de ces potentialités métaboliques lors de la conservation à moyen terme des souches.

C H A P I T R E I I

MATERIEL ET METHODES

1. TERRAINS EXPERIMENTAUX ET SITES DE PRELEVEMENT

Les échantillons ont été prélevés dans divers milieux naturels (Tab. 2) situés en zone tropicale (Indonésie) et tempérée (région parisienne).

Tableau 2. Origine des échantillons étudiés

Zone tempérée	. Sol agricole "Grignon"
	. Sol du terreau "M.N.H.N." de jardin
Zone tropicale	. Sol forestier
	. Sédiment de rivière
	. Sédiment marin
	. Eau de mer

1.1 Zone tempérée

Les souches ont été isolées d'un sol agricole et d'un terreau de jardin contaminés ou non contaminés par des hydrocarbures.

Le sol agricole est un limon argileux de la station agronomique de Grignon, reposant sur un sous-sol calcaire lutétien, qui a été pollué par un épandage de fuel n° 2 à raison de 90 t/ha. Les échantillons pour analyse ont été prélevés trois ans après la contamination dans l'horizon 0-30 cm. Des échantillons témoins de sol non contaminé ont été prélevés dans la parcelle adjacente.

Le terreau "MNHN" provient d'une terre de jardin polluée un mois auparavant par du pétrole brut.

1.2 Zone tropicale

Tous les échantillons proviennent d'Indonésie (Est-Kalimantan, île de Bornéo). Ils ont été prélevés dans des zones terrestres et maritimes soumises à l'impact d'activités pétrolières.

Les échantillons de sol proviennent d'un site forestier contaminé par des rejets massifs de pétrole brut issus d'une station de stockage d'hydrocarbures. Des prélèvements ont également été réalisés dans les sédiments d'une petite rivière très peu profonde drainant cette zone forestière, en aval du site pollué.

Les échantillons marins sont issus pour une part de sédiments de mangrove littorale contaminée par des effluents pétroliers au débouché d'une rivière polluée. D'autres échantillons ont été prélevés dans l'eau de mer aux alentours immédiats d'une plateforme de production offshore, ainsi que dans les sédiments de fond sous-jacents, à 30 m de profondeur.

2. TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

2.1 Isolement des souches

Aussi bien pour le domaine terrestre que pour le domaine marin, deux milieux de culture principaux ont été utilisés.

Pour l'isolement de bactéries hétérotrophes totales (BHT), on emploie un milieu nutritif complet (MI et MII), tandis que pour l'isolement des bactéries adaptées aux hydrocarbures (BAH), on utilise un milieu minéral synthétique (MIII et MIV) ne contenant pas d'autre source de carbone que le pétrole brut. Les milieux contiennent ou non des sels d'eau de mer synthétique pour aquarium (HW), selon que l'on s'intéresse au domaine terrestre ou marin. Leur composition est la suivante :

MI : Milieu nutritif sol-rivière

Trypticase soja	30 g
Gélose	20 g
Eau distillée (E.D.)	1 000 ml

MII : Milieu nutritif mer

Trypticase soja	30 g
Sel de mer synthétique	30 g
Gélose	20 g
E.D.	1 000 ml

MIII : Milieu minéral synthétique sol-rivière

KH_2PO_4	0.68 g
Na_2HPO_4	1.79 g
MgSO_4	0.35 g
NO_3NH_4	1 g
$\text{CaCl}_2\text{FeSO}_4$	0.4 mg
Extrait de levure (E.L.)	10 mg
E.D.	1 000 ml

On ajoute à ce milieu 0.1 ml d'une solution d'oligo-éléments contenant par litre : CuSO_4 50mg, H_3BO_3 100mg, MnSO_4 100mg, ZnSO_4 100mg, NaMoO_4 100mg et CoCl_2 100 mg.

M IV : Milieu minéral synthétique mer

Sels d'eau de mer synthétique	30	g
NO ₃ NH ₄	1	g
KH ₂ PO ₄	0.1	g
E.L.	10	mg
E.D.	1 000	ml

Ces deux derniers milieux peuvent être utilisés sous forme liquide ou solide, auquel cas on complémente avec 20 g de gélose par litre. Le pétrole est ajouté à raison de 2 gouttes par tube. Pour réaliser les boîtes de milieu M III ou M IV, on réchauffe les tubes contenant le milieu gélosé à 50°C. Le pétrole est homogénéisé par passage de tube sur agitateur Vortex, et les plaques sont rapidement coulées. Le milieu fige instantanément et contient du pétrole en émulsion fine.

On utilise la technique classique d'isolement par étalement sur boîte de dilutions successives. Après homogénéisation, 10 g (poids humide) de chacun des échantillons solides étudiés sont introduits dans une fiole Erlenmeyer contenant 100 ml de diluant, on obtient ainsi la dilution -1. Pour les échantillons d'eau, la dilution -1 est obtenue directement en mettant 1 ml dans 9 ml de diluant. Le diluant est de l'eau distillée stérile (échantillons de sol et d'eau douce) ou de l'eau de mer synthétique stérile (échantillons d'eau de mer). A partir de cette dilution initiale, on réalise des dilutions successives en progression géométrique de raison 10 (1 ml dans 9 ml de diluant), jusqu'à obtenir la dilution -8.

Pour chaque dilution, onensemence deux boîtes de Pétri contenant un milieu complet ou synthétique selon que l'on cherche à isoler des souches hétérotrophes totales ou des souches capables de se développer sur les hydrocarbures. Les boîtes sont mises à incuber à 28° ±1°C. L'incubation dure 8 jours pour les BHT et 15 à 21 jours pour BAH.

On procède ensuite à la purification des souches isolées par repiquages successifs sur les milieux complets. Les repiquages sont répétés autant de fois que nécessaire pour obtenir des souches pures.

Il a été constaté que toutes les souches isolées des sols marins sur les milieux salés se développaient sur les milieux sans ajout de sel. En conséquence, les cultures d'identification et de conservation ont été faites sur les milieux non salés.

Après un premier tri d'élimination des souches apparemment identiques, un code identificateur à quatre caractères a été attribué à chaque souche isolée en fonction de son origine et du milieu d'isolement employé.

- Premier caractère ;

Origine G = Grignon, M = Muséum, I = Indonésie

- Deuxième caractère;

T = Parcelle témoin, C = Parcelle contaminée, R = Rivière, M = Eau de mer, D = Sédiment marin

- Troisième et quatrième caractère ;

numéro d'ordre : de 01 à 30 = Milieu synthétique; de 31 à 60 = Milieu complet.

On obtient ainsi les catégories résumées dans le tableau 3.

Tableau 3. Souches hétérotrophes totales et souches adaptées aux hydrocarbures par biotope d'origine et par milieu d'isolement

Origine	Milieu d'isolement		Biotope témoin	Biotope contaminé
<i>Sol agricole</i> <i>"Grignon"</i>	Synthétique	(BAH)	GT01 à GT30	GC01 à GC30
	Complet	(BHT)	GT31 à GT60	GC31 à GC60
<i>Terreau de</i> <i>Jardin "MNHN"</i>	Synthétique	(BAH)	MT01 à MT30	MC01 à MC30
	Complet	(BHT)	MT31 à MT60	MC31 à MC60
<i>Sol forestier</i>	Synthétique	(BAH)	-	IS01 à IS30
	Complet	(BHT)	-	IS31 à IS60
<i>Sédiment de</i> <i>rivière</i>	Synthétique	(BAH)	-	IR01 à IR30
	Complet	(BHT)	-	IR31 à IR60
<i>Sédiment marin</i>	Synthétique	(BAH)	-	ID01 à ID30
	Complet	(BHT)	-	ID31 à ID60
<i>Eau de mer</i>	Synthétique	(BAH)	-	IM01 à IM30
	Complet	(BHT)	-	IM31 à IM60

2.2 Test préliminaire d'utilisation des hydrocarbures

On a vérifié l'aptitude des souches isolées à utiliser les hydrocarbures en réalisant une culture préliminaire. Chaque souche pure a été cultivée sur milieu synthétique (M III, IV) liquide en tube (20 x 200mm) pendant 15 à 21 jours. le milieu de culture est dépourvu de toute source de carbone, mis à part le pétrole et donc en principe sélectif pour les bactéries ayant une aptitude à se développer sur les hydrocarbures. En fin d'incubation, les tubes présentant un trouble du milieu sont supposés correspondre à des souches actives. Les souches ainsi retenues ont été identifiées, et l'étude détaillée de leurs capacités dégradatives vis-à-vis des hydrocarbures a été entreprise.

2.3 Identification des souches

En vue d'obtenir le maximum d'informations possible, un grand nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques ont été étudiés à la fois par les tests classiques et par des batteries de tests complémentaires (API). L'ensemble des données a permis d'utiliser des techniques de classification automatique par ordinateur pour regrouper les souches, et l'identification finale a été réalisée par comparaison aux données de la bibliographie (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*).

2.3.1 Caractères étudiés

. *Morphologie et coloration*

- Aspect des colonies - pigmentation (examen visuel sur milieu complet Trypticase-soja)
- Coloration de Gram
- Morphologie : forme et dimension (examen microscopique des colorations et à l'état frais)
- Mobilité : examen à l'état frais sur gélose molle

On traite en suite séparément les bactéries à Gram positif ou variable et les bactéries à Gram négatif, les tests appliqués étant en partie différents.

. *Caractères physiologiques et biochimiques*

- Tests classiques
- Type respiratoire : les caractères aérobie stricte, anaérobie facultative et microaérophile, sont étudiés sur le milieu (Trypticase-soja semi-solide)
- Formation de spores (*Bacillus*) : milieu de sporulation (sur gélose nutritive) thermorésistance (20 minutes à 80°C)
- Recherche de la catalase
- Recherche de la cytochrome oxydase
- Pigment diffusible (Milieu de King), on note l'apparition du pigment bleu (K. A.) ou vert (K. B.)
- Métabolisme du glucose : l'oxydation-fermentation du sucre est étudiée sur le milieu d'Hugh et Lefson
- Tests complémentaires (galeries API)
Ce système est composé d'une galerie de microtubes contenant des substrats déshydratés pour la mise en évidence d'enzymes ou l'utilisation de sucres. Une suspension bactérienne est réalisée à partir d'une culture pure, et inoculée dans chaque microtube. La lecture des réactions est réalisée après 24 ou 48 h d'incubation à 28 ± 1°C.

Pour nos essais d'identification, nous avons utilisé 2 types de galeries :

- Pour les bactéries à Gram positif ou variable, la galerie API 20 B. Cette galerie est constituée de 20 microtubes et permet d'effectuer 22 réactions biochimiques (cf. Tableau 3bis).

Tableau 3bis. Liste des caractères étudiés

+ testé chez les souches à Gram +

- testé chez les souches à Gram -

Coloration de Gram	+ -	Arginine dihydrolase ADH	-
Pigment colonies	+ -	Hydrolyse esculine ESC	-
Pigment diffusible	+ -	β galactosidase PNPG	-
Bâtonnets	+ -	Assimilation :	
Bâtonnets ramifiés	+ -	Saccharose SAC	+
Coque	+ -	Arabinose ARA	+ -
Filament	+ -	Mannitol MAN	+ -
Spores	+ -	Fructose FRU	+
Mycélium aérien	+ -	Glucose GLU	+ -
Mobilité	+ -	Maltose MAL	+ -
Aérobie stricte	+ -	Amidon AMD	+
Anaérobie facultative	+ -	Rhamnose RHA	+
Oxydation glucose	+	Galactose GAL	+
Fermentation glucose	+ -	Mannose MNE	+ -
Cytochrome oxydase	+ -	Sorbitol SOR	+
Catalase	+ -	Glycerol GLY	+
Hydrolyse gélatine	+ -	Acétylglucosamine NAG	-
Réduction nitrate	+ -	Gluconate GNT	-
β galactosidase ONPG	+	Caprate CAP	-
Hydrolyse urée URE	+ -	Adipate ADI	-
Production indole IND	+ -	Malate MLT	-
Production H ₂ S	+	Citrate CIT	+ -
Production acétoïne VP	+	Phénylacétate PAC	-

- Pour les bactéries à Gram négatif, on a employé la galerie API 20 NE, qui est un système comportant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation pour l'identification des Bacilles à Gram négatif non entérobactéries.

L'ensemble des caractères étudiés est présenté dans le tableau 3bis. En tout, 35 caractères pour les Gram positif ou variable et 32 caractères pour les Gram négatifs ont été considérés.

2.3.2 Classification numérique et identification

Pour chaque souche, les résultats des tests ont été codés comme suit : réaction positive 1,0; réaction négative 0,1; réaction douteuse ou variable ($\frac{1}{2}$, $\frac{3}{4}$) dans le but d'utiliser les techniques de la taxonomie numérique. La méthode employée est celle de la classification ascendante hiérarchique, méthode des voisins réciproques (Jambu 1978). Les calculs ont été réalisés au Centre Informatique du Muséum, en utilisant le programme CAHVOR (1983) de l'Association pour le développement et la diffusion de l'analyse des données implanté au Centre de calcul du CNRS (C. I. R. C. E.).

Cette technique conduit au regroupement des souches en fonction de leur ressemblance. Chaque groupe de souche (ou phénon) est défini par le niveau de ressemblance entre les souches le constituant (indice de similarité). Les résultats sont représentés sous forme d'arborescences (dendrogrammes). On obtient ainsi une classification des souches, mais non leur identification.

L'identification proprement dite est réalisée par comparaison avec les caractéristiques des espèces reconnues par la taxonomie bactérienne actuelle, exposées dans le *Bergey's*. Dans le cas des Gram négatifs, API fournit les résultats aux tests API 20 NE de 59 espèces-types, appartenant à 14 genres différents. Ces données de référence ont été incorporées pour le traitement informatique et il est dès lors possible, lorsqu'une espèce-type est incluse dans un phénon, d'identifier les souches du phénon comme appartenant à l'espèce de référence. Quand tel n'est pas le cas, les résultats sont confrontés aux données de la littérature (*Bergey's*). Pour ce qui est des souches Gram positif ou variable (galerie API 20 B), API ne fournit aucune indication par rapport à des espèces-types et l'identification est uniquement faite en fonction des données bibliographiques du *Bergey's*.

Dans ce cas, les souches n'ont en général pu être identifiées qu'au niveau du genre, et rarement au niveau de l'espèce, les critères retenus par API ne recouvrant pas toujours ceux considérés dans le *Bergey's*.

2.4 Cultures pour essais de biodégradation

Pour déterminer les capacités dégradatives des souches vis-à-vis des hydrocarbures, on réalise des cultures en fioles. Les essais sont réalisés en fioles Erlenmeyer de 250 ml contenant 150 ml de milieu minéral synthétique (M III, M IV) auquel on ajoute 200 μ l de pétrole brut à l'aide d'une seringue de précision (S.M.I. Micropettor). Les fioles sont bouchées avec du coton cardé pour faciliter les échanges gazeux avec l'atmosphère, puis stérilisées 20 mn à 120°.

Les fioles sont ensuite ensemencées avec 1.5 ml d'une suspension dans l'eau distillée stérile de la souche étudiée. Chaque culture est répétée en 2 ou 3 exemplaires. Pour chaque expérience, on prépare également des fioles témoins laissées stériles pour la quantification des pertes abiotiques dues à l'évaporation des fractions légères du pétrole (cf. Composition du pétrole), et pour évaluer la consommation ou la non-consommation du substrat, c'est-à-dire le taux de biodégradation du pétrole.

L'incubation se fait en étuve à $28^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et à l'obscurité pendant 30 jours; les cultures ne sont pas agitées.

3. PETROLE UTILISE

Le pétrole utilisé dans nos essais comme substrat pour les études métaboliques est un brut arabian light de référence BAL 150, fourni par l'Institut Français du Pétrole (I.F.P.).

3.1 Composition chimique générale

Dans tous les essais, le BAL 150 est stérilisé dans les fioles. Il en résulte une perte par évaporation des fractions les plus légères (naphte). Cette perte par évaporation s'établit à 27%. Après stérilisation, le BAL 150 a la composition générale rapportée dans le tableau 5.

Tableau 5. Composition du Bal 150

Saturés	45 %
Aromatiques	30 %
Résines	19 %
Asphaltènes	6 %

Sur les 179 ± 3 mg introduits au départ dans chaque fiole, il reste après stérilisation 131 ± 2.5 mg

En mg, le résidu témoin moyen contient 56.6 ± 2.6 mg d'hydrocarbures saturés, 38.2 ± 1.2 mg d'hydrocarbures aromatiques, environ 23.7 ± 2.2 mg de résines et 7.6 ± 0.5 mg d'asphaltènes.

3.2 Analyse détaillée

Analysées par chromatographie en phase gazeuse capillaire/ordinateur (GC2/O, cf. Chap. V), les fractions saturées et aromatiques du pétrole témoin ont, après stérilisation, la composition suivante :

- Hydrocarbures saturés

Le chromatogramme de la fraction saturée du BAL 150 montre la distribution typique des n-alcane qui s'étendent entre nC14 et décroissent régulièrement jusqu'à nC40 (Fig. 7). Les pics intermédiaires représentent les iso-alcane avec les isoprénoïdes caractéristiques 1650 (nor-pristane, iso C-18), pristane (PR iso-C19) et phytane (PH iso-C20). Les groupes de pics a, b, c, d, e correspondant à des marqueurs biologiques : les triterpanes = naphtènes pentacycliques de la série des hopanes (Simoneit et al. 1979; Connan et al. 1979; Oudot 1984).

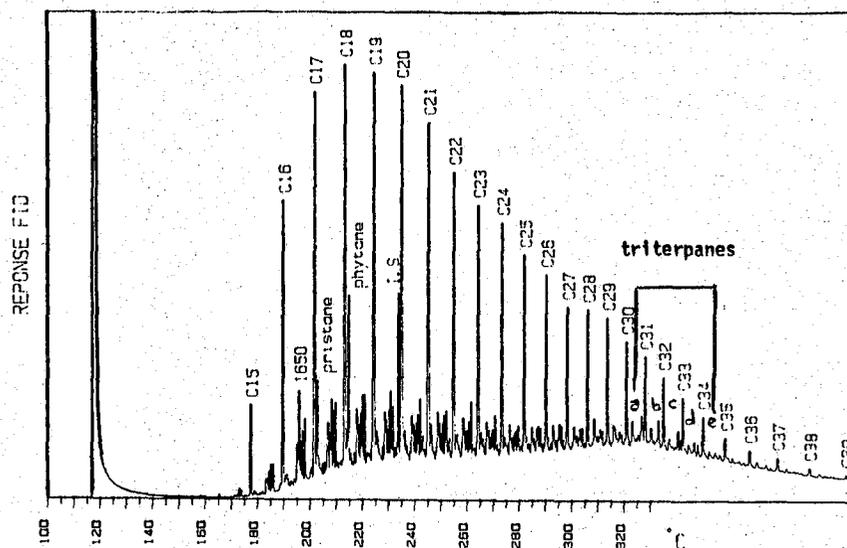


Figure 7. Analyse par GC2/O de la fraction saturée

- Hydrocarbures aromatiques

L'analyse par chromatographie de la fraction aromatique du BAL 150 est rapporté dans la figure 8. Les types moléculaires caractéristiques sont identifiés comme étant les méthyl (C1), diméthyl (C2), tri et tétraméthyl (C3 et C4) naphtalènes, ainsi que les C1 et C3 fluorènes, C1, C2, C3 dibenzothiophènes et les C1, C2 et C3 phénanthrènes.

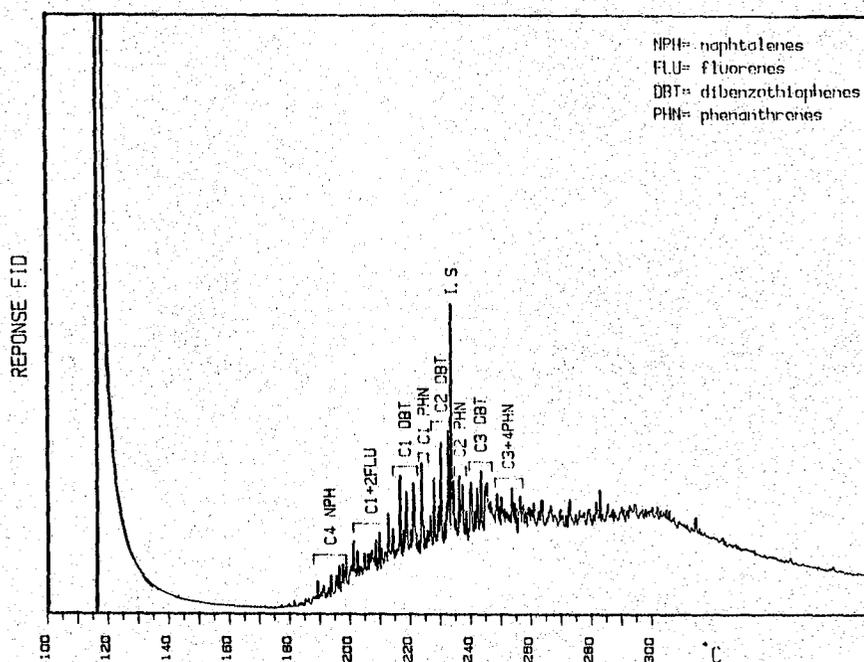


Figure 8. Analyse par GC2/D de la fraction aromatique

- Fraction asphaltique

Cette fraction très lourde ne peut pas être analysée par chromatographie gazeuse. Gravimétriquement, on évalue les résines et les asphaltènes respectivement à 19 et 6% du pétrole comme déjà précisé.

4. TECHNIQUES DE DOSAGE ET D'ANALYSE DES HYDROCARBURES

Pour déterminer les capacités dégradatives des souches vis-à-vis des fractions ou des constituants individuels du pétrole, il faut pouvoir comparer qualitativement et quantitativement la composition du pétrole témoin non dégradé à celle du résidu obtenu après exposition à l'action des microorganismes. Pour cela, nous avons fait appel à des techniques particulières d'extraction, de dosage et de caractérisation des hydrocarbures (Oudot, 1984).

La mesure du taux de biodégradation se fait par extraction et pesée du résidu en tenant compte de la perte abiotique (évaporation) estimée dans les fioles témoins stériles (méthode gravimétrique).

Les résultats sont affinés en fractionnant le résidu en ses diverses classes caractéristiques : saturés (S), aromatiques (A), résines (R) et asphaltènes (As). La composition détaillée des fractions saturée et aromatique est déterminée par GC2.

4.1 Extraction et fractionnement des hydrocarbures résiduels

En fin d'incubation, les produits pétroliers restants sont récupérés par extraction liquide-liquide dans des ampoules à décanter de 250 ml. Pour chaque fiole, on réalise 3 extractions successives avec 3 fois 20 ml de chloroforme.

Le solvant d'extraction est évaporé à l'obscurité pendant 3 jours à la température du laboratoire, puis le résidu est pesé (résidu total). Ce résidu est ensuite repris à l'hexane par exposition du cristalliseur aux ultrasons. Les asphaltènes insolubles dans ce solvant, sont recueillis par filtration sur un filtre taré en fibre de verre (Whatman GF/A). On détermine la masse des asphaltènes retenus par pesée des filtres une fois secs.

Le filtrat est ensuite séparé en classes saturée, aromatique et résine par chromatographie liquide-solide sur une colonne (15 x 1.5 cm) de silicagel (60-100 mesh) activé à 110°C pendant 12 heures. L'extrait concentré est déposé sur la colonne et élué successivement avec 3 x 20 ml d'hexane, 3 x 20 ml de benzène et 3 x 20 ml de méthanol au débit de 2 ml/mn. Le premier éluat contient les saturés, la fraction extraite au benzène contient les aromatiques, et la dernière fraction (méthanol) contient les résines.

La masse de chacune des fractions est déterminée par pesée, après évaporation du solvant à la température du laboratoire et à l'obscurité pendant 72 h (Fig. 9).

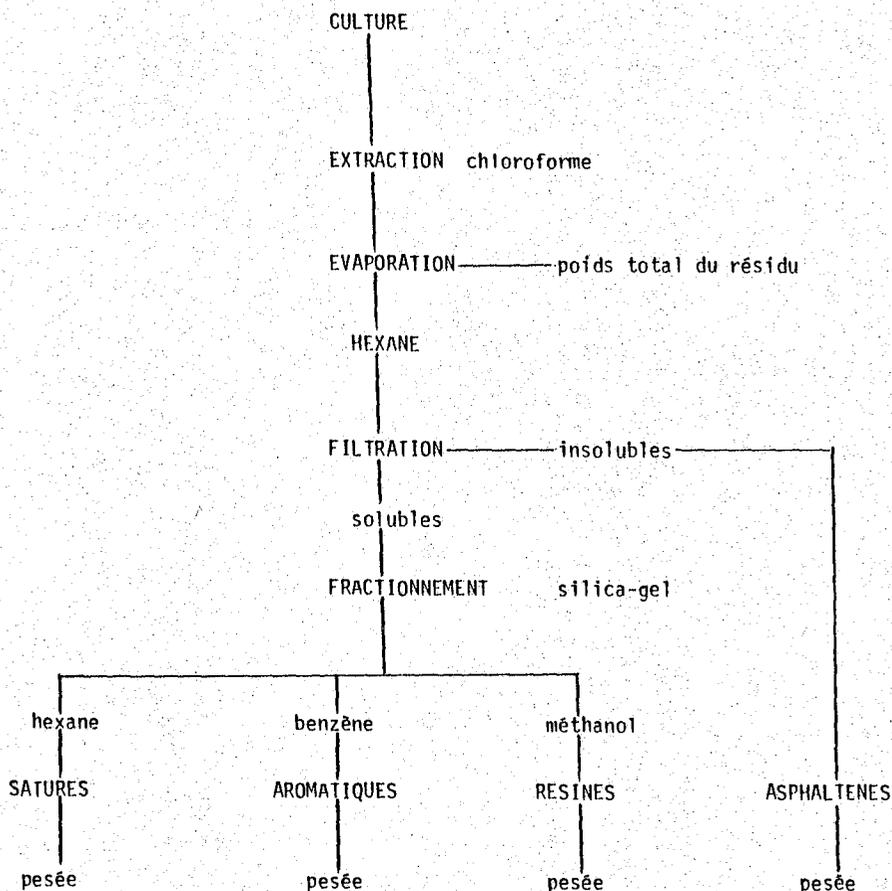


Figure 9. Protocole général d'extraction et de fractionnement des produits pétroliers

4.2 Détermination du taux de biodégradation

Le taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions est mesuré par différence entre le résidu dans les fioles témoins stériles après incubation et le résidu dans les fioles d'essai. La perte par évaporation est calculée en retranchant la masse du résidu dans les fioles témoins à la masse initiale du pétrole (Tableau 6).

Tableau 6. Calcul des taux de biodégradation

Soit MI = masse initiale du pétrole
 MRT = " du résidu dans les fioles témoins
 MRE = " " " " " " d'essai

On a $Evaporation = MI - MRT$

$\% Evap. = \frac{MI - MRT}{MI} \times 100$

$Biodégradation = MRT - MRE$

$\% Biodég. = \frac{MRT - MRE}{MRT} \times 100$

4.3 Analyses par chromatographie en phase gazeuse

La composition chimique d'une partie des fractions saturée et aromatique peut être analysée par GC2 à haute résolution.

Le système analytique est composé d'un chromatographe DELSI DI 200 équipé en injection directe et d'un détecteur à ionisation de flamme (FID). La colonne capillaire en silice fondue est une colonne Chrompack CP sil 5, de 50m x 0.32mm. Le signal du détecteur digitalisé puis stocké et traité sur un microordinateur Apple IIe 128 k à l'aide de logiciels permettant la correction, l'intégration et l'édition sur table traçante des chromatogrammes ainsi que plusieurs types de calcul sur les pics séparés (Oudot, 1984).

Les conditions opératoires sont les suivantes :

- Température injecteur et détecteur 350°C
- Programme de T° 100 à 330°C (saturés)
100 à 300°C (aromatiques)
- Gradient 3°/mn
- Gaz vecteur Helium sous 0.8 bar, vitesse linéaire 20 à 30 cm/s
- Quantité injectée 0.1 - 0.2 µl

Pour la plupart des analyses, on ajoute avant l'injection 0.2 mg de n-eicosène (fraction saturée) ou 0.1 mg de n-eicosène (fraction aromatique) pour utiliser la méthode de l'étalonnage interne (quantification de la surface des pics par rapport à la surface de l'étalon interne). Cet alcène (C20 = 1) n'interfère pas avec les hydrocarbures du pétrole.

4.4 Validité des résultats

Des travaux précédents ont montré que les techniques de culture et d'analyse utilisées autorisent un degré élevé de reproductibilité (moyenne > 0.95). Dans certains cas, et pour comparer entre eux des groupes de résultats expérimentaux, on a utilisé les techniques de l'analyse de variance à une voie. Lorsque les données le permettent, des corrélations statistiques ont été établies.

C H A P I T R E III

IDENTIFICATION DES SOUCHES ACTIVES

1. SOUCHES ISOLEES

A partir de chacun des biotopes d'origine, des souches ont été isolées par dilution-étalement d'une part sur le milieu complet, et d'autre part sur le milieu synthétique (cf. Chap. II, 2.1). Au départ, un nombre sensiblement équivalent de souches (environ 200) fut isolé sur les deux milieux, soit plus de 400 souches au total.

Un premier tri, basé uniquement sur l'aspect visuel des colonies a permis d'éliminer les souches identiques pour ne retenir que des souches apparemment différentes (environ 300). Toutes ces souches ont alors été soumises au test préliminaire d'utilisation des hydrocarbures par culture en tube. Les cultures présentant un trouble du milieu après 15 ou 21 jours correspondent à des souches présumées actives. Les résultats de ces essais sont rapportés dans le tableau 7 qui indique, pour chaque biotope, le nombre de souches isolées sur chacun des milieux d'isolement et le nombre de souches jugées actives après le test préliminaire.

Tableau 7. Nombre de souches isolées et testées dans chaque biotope

Biotope	Nbre de souches soumises au test préliminaire			Nbre de souches présumées actives après le test préliminaire		
	MC	MS	T	MC	MS	T
Sol de Grignon	32	39	71	18	33	51
Sol du jardin	54	35	89	18	28	46
Sol forestier	8	5	13	1	3	4
Sédiment de rivière	18	16	34	4	6	10
Eau de mer	17	17	34	9	15	24
Sédiment marin	31	24	55	17	23	40
Total	160	136	296	67	108	175

MC = Milieu complet MS = Milieu synthétique T = Total

On constate que si les deux milieux ont permis d'isoler un nombre initial sensiblement égal de souches, un plus grand nombre de souches présumées actives provient du milieu synthétique. Ainsi 67 des souches isolées sur milieu complet ont été jugées positives après l'essai préliminaire contre 108 des souches isolées sur milieu synthétique. Sur près de 300 souches testées, 175 ont été retenues comme présumées actives.

Un second tri a encore permis d'éliminer des souches apparemment identiques et c'est finalement un total de 110 souches qui furent étudiées en détail et soumises à la procédure d'identification.

2. IDENTIFICATION DES SOUCHES

Dans les bactéries à Gram positif ou variable, l'ensemble des "actinomycètes" pose des problèmes taxonomiques particuliers. Les concepts de la classification ont récemment évolué dans ce domaine et les critères taxonomiques diffèrent entre la huitième et dernière édition (1974) du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* jusqu'alors employée, et la première édition (1986) du *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. En particulier, le genre *Rhodococcus* a été réintroduit. C'est par référence à ce dernier ouvrage qu'ont été identifiées toutes les souches actives.

La distinction entre différents genres d'actinomycètes non sporulés (*Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus* et *Nocardia*) est ainsi établie :

- *Arthrobacter* se caractérise par un véritable cycle bâtonnets et coques; les formes longues évoluent vers la forme coccoïde; le mycélium aérien est absent; Gram variable, aérobie stricte, peu ou pas mobile, catalase positive, non acido-résistant, n'acidifie pas le glucose.
- *Corynebacterium* Bâtonnets irréguliers, des formes V, Y, en palissade, mycélium aérien absent, Gram positif, non mobile, catalase positive, non acido-résistant. Les *Corynebacterium* phytopathogènes sont aérobies stricts et oxydent le glucose, alors que les *Corynebacterium* pathogènes humains et animaux sont anaérobies facultatifs et fermentent le glucose. Les formes saprophytes ont été reclassées et pour la plupart réparties entre *Arthrobacter* et *Rhodococcus*.
- *Rhodococcus* Bâtonnets et formes coccoïdes, mycélium plus ou moins développé, peu ramifié. Pas (ou très peu) de mycélium aérien. Gram positif, aérobie strict, non mobile, catalase positive, partiellement acido-résistant, certaines souches produisent de l'acide à partir du glucose.

- *Nocardia* Mycélium très ramifié et fragmenté. Mycélium aérien généralement présent, Gram variable, aérobie stricte, non mobile, catalase positive. Certaines souches sont acido-résistantes, et le glucose est acidifié en présence d'oxygène.

La distinction entre *Rhodococcus* et *Nocardia* est particulièrement délicate. Des critères secondaires comme l'activité de la β -galactosidase (en général négative chez *Rhodococcus* et positive chez *Nocardia*), ou la sensibilité aux antibiotiques ont parfois été cités (T. Sukawana 1974). Même l'analyse des peptidoglycanes ne permet pas de trancher, les parois étant toutes du type IV (m-DAP). De même les intervalles dans la gamme des acides mycoliques, ainsi que le pourcentage (G + C) du DNA se recourent.

Nous nous sommes donc essentiellement basé sur la présence/absence de mycélium aérien pour classer ces souches. Lorsqu'il a été impossible de se prononcer, les souches filamenteuses ont seulement été dénommées nocardioformes. De la même façon, certaines souches de bâtonnets irréguliers non ramifiées sans cycle (bâtonnet coques) n'ont pas pu être attribuées aux genres *Arthrobacter* ni *Corynebacterium* et ont été nommées coryneformes.

Les 110 souches retenues ont été caractérisées par les techniques décrites au Chapitre II. Le premier critère distinctif est la coloration de Gram.

2.1 Souche à Gram positif ou variable

Les 74 souches à Gram positif ou variable ont été caractérisées par 11 critères morphologiques et physiologiques et 24 tests biochimiques. Elles ont ensuite été automatiquement classées par la méthode de classification ascendante hiérarchique (cf. Chap. II). On obtient ainsi un regroupement des souches les plus proches en phénons, que l'on compare aux données bibliographiques de référence pour l'identification. Les résultats sont représentés dans le dendrogramme de la figure 10.

Au niveau de regroupement supérieur, 92% de similitude, on obtient 21 phénons, dont 5 groupes de *Rhodococcus*, 2 groupes d'*Arthrobacter*, 3 groupes de *Nocardia*, 1 groupe de *Micrococcus* et 6 groupes de *Bacillus*. On observe le regroupement des souches Gram +/v en deux sous-ensembles. Le premier est essentiellement constitué par les genres : *Rhodococcus* et *Arthrobacter*, le second dominé par *Bacillus*. *Nocardia* se répartit entre les deux ensembles. Des souches individuelles se séparent de ces groupes, appartenant aux genres *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* et *Arthrobacter*. On a pu identifier jusqu'à l'espèce *Micrococcus roseus* et *Micrococcus luteus*. Les caractères moyens de chaque phénon sont rapportés dans le tableau 8. Par ailleurs, la liste de toutes les souches individuelles testées est donnée en l'Annexe.

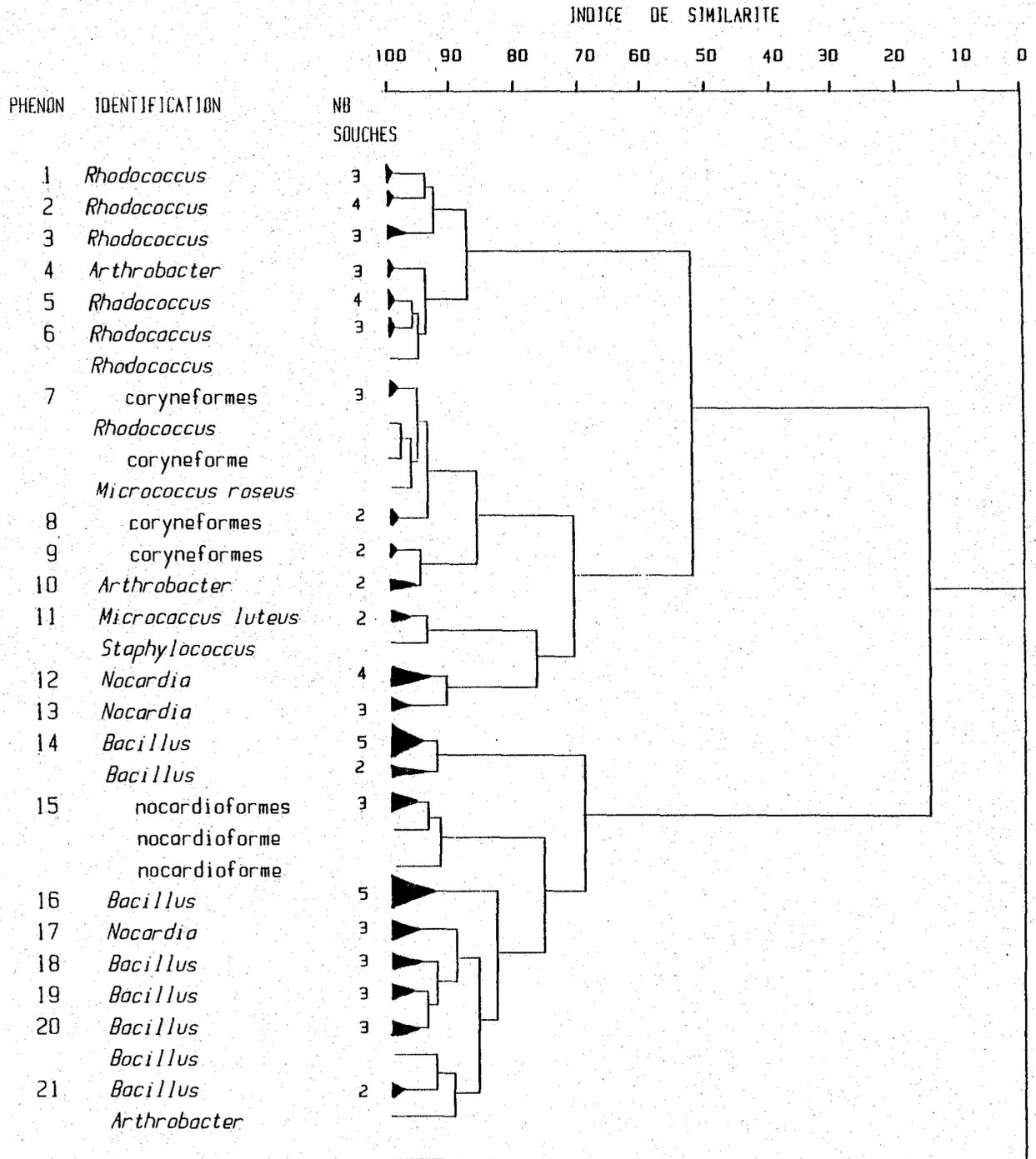


Figure 10. Dendrogramme 1 souches à Gram (+)

Tableau 8. Caractères moyens de chaque phénon des souches à Gram (+)

Phénon	Identification	Pigment colonie	Pigment diffusible	Bâtonnets	Bat. ramifiés	Coques	Filaments	Spores	Mycélium aérien	Mobilité	Aérobie stricte	Anaérobie facultative
1	<i>Rhodococcus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
2	<i>Rhodococcus</i>	+	-	+	D	-	-	-	-	-	+	D
3	<i>Rhodococcus</i>	+	-	+	D	-	-	-	-	-	+	D
4	<i>Rhodococcus</i>	+	-	+	D	-	-	-	-	-	+	-
5	<i>Rhodococcus</i>	+	-	+	D	-	-	-	-	-	+	D
6	<i>Arthrobacter</i>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
7	Coryneformes	D	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
8	Coryneformes	D	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
9	Coryneformes	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
10	<i>Arthrobacter</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
11	<i>Micrococcus</i>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
12	<i>Nocardia</i>	+	D	-	-	-	+	-	+	-	+	-
13	<i>Nocardia</i>	-	-	-	-	-	+	-	D	-	+	-
14	<i>Bacillus</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
15	Nocardioformes	D	+	-	-	-	+	-	D	-	+	-
16	<i>Bacillus</i>	-	-	+	-	-	-	+	-	D	+	-
17	<i>Nocardia</i>	-	-	+	-	-	+	-	D	-	+	-
18	<i>Bacillus</i>	-	D	+	-	-	-	+	-	-	+	-
19	<i>Bacillus</i>	D	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
20	<i>Bacillus</i>	-	-	+	D	-	-	D	-	-	+	D
21	<i>Bacillus</i>	D	-	+	-	-	-	D	-	D	+	-

Tableau 8. (suite)

Phénon	Identification	Oxyd. glucose	Ferm. glucose	Cyt. oxydase	Catalase	Gélatine	Nitrate réd.	OMPG	Urée	Indole	H ₂ S	VP
1	<i>Rhodococcus</i>	D	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
2	<i>Rhodococcus</i>	-	-	D	+	-	D	D	+	-	-	-
3	<i>Rhodococcus</i>	+	-	-	+	-	D	+	+	-	-	-
4	<i>Rhodococcus</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
5	<i>Rhodococcus</i>	D	-	-	+	-	-	D	+	-	-	-
6	<i>Arthrobacter</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
7	Coryneformes	-	-	+	-	D	-	-	-	-	-	-
8	Coryneformes	-	-	D	D	-	-	-	-	-	-	+
9	Coryneformes	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
10	<i>Arthrobacter</i>	+	-	-	+	-	+	D	+	-	-	D
11	<i>Micrococcus</i>	D	D	+	+	+	-	-	+	-	-	+
12	<i>Nocardia</i>	D	-	D	D	-	-	-	-	-	-	D
13	<i>Nocardia</i>	-	-	D	D	D	-	+	-	-	-	+
14	<i>Bacillus</i>	+	D	+	D	+	+	-	-	-	-	+
15	Nocardioformes	+	+	+	+	D	+	D	-	-	-	D
16	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+
17	<i>Nocardia</i>	+	-	-	+	+	+	D	D	-	-	-
18	<i>Bacillus</i>	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+
19	<i>Bacillus</i>	-	-	+	D	+	-	+	-	-	-	+
20	<i>Bacillus</i>	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
21	<i>Bacillus</i>	-	D	+	-	D	+	-	-	-	-	+

Phénon	Identification	Saccharose	Arabinose	Mannitol	Fructose	Glucose	Maltose	Amidon	Rhamnose	Galactose	Mannose	Sorbitol	Glycérol	Citrate
1	<i>Rhodococcus</i>	-	-	+	+	+	-	D	-	-	-	+	-	+
2	<i>Rhodococcus</i>	+	+	+	+	+	D	D	-	-	D	+	+	+
3	<i>Rhodococcus</i>	+	D	+	+	+	+	D	D	D	-	D	-	+
4	<i>Rhodococcus</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
5	<i>Rhodococcus</i>	D	D	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
6	<i>Arthrobacter</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	D	-	+
7	Coryneformes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Coryneformes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
9	Coryneformes	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	<i>Arthrobacter</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
11	<i>Micrococcus</i>	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	D
12	<i>Nocardia</i>	D	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	<i>Nocardia</i>	+	+	+	+	+	-	D	D	D	D	-	D	-
14	<i>Bacillus</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	D	D	-	-	D
15	Nocardioformes	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	D	+	D
16	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	+	D	D	-	D	+	-	-	+
17	<i>Nocardia</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
18	<i>Bacillus</i>	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
19	<i>Bacillus</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-
20	<i>Bacillus</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
21	<i>Bacillus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	D	D	D	D	-

2.2 Souches à Gram négatif

Contrairement aux bactéries Gram +, il a été possible d'inclure pour le traitement informatique les données connues de souches de référence du KIT API 20 NE. Ainsi on obtient non seulement une classification automatique mais également et directement l'identification des souches, lorsqu'une espèce de référence est incluse dans un phénon (pourcentage de similitude >95%). Le phénon peut alors être qualifié de taxon. Les résultats sont indiqués sur le dendrogramme de la figure 11.

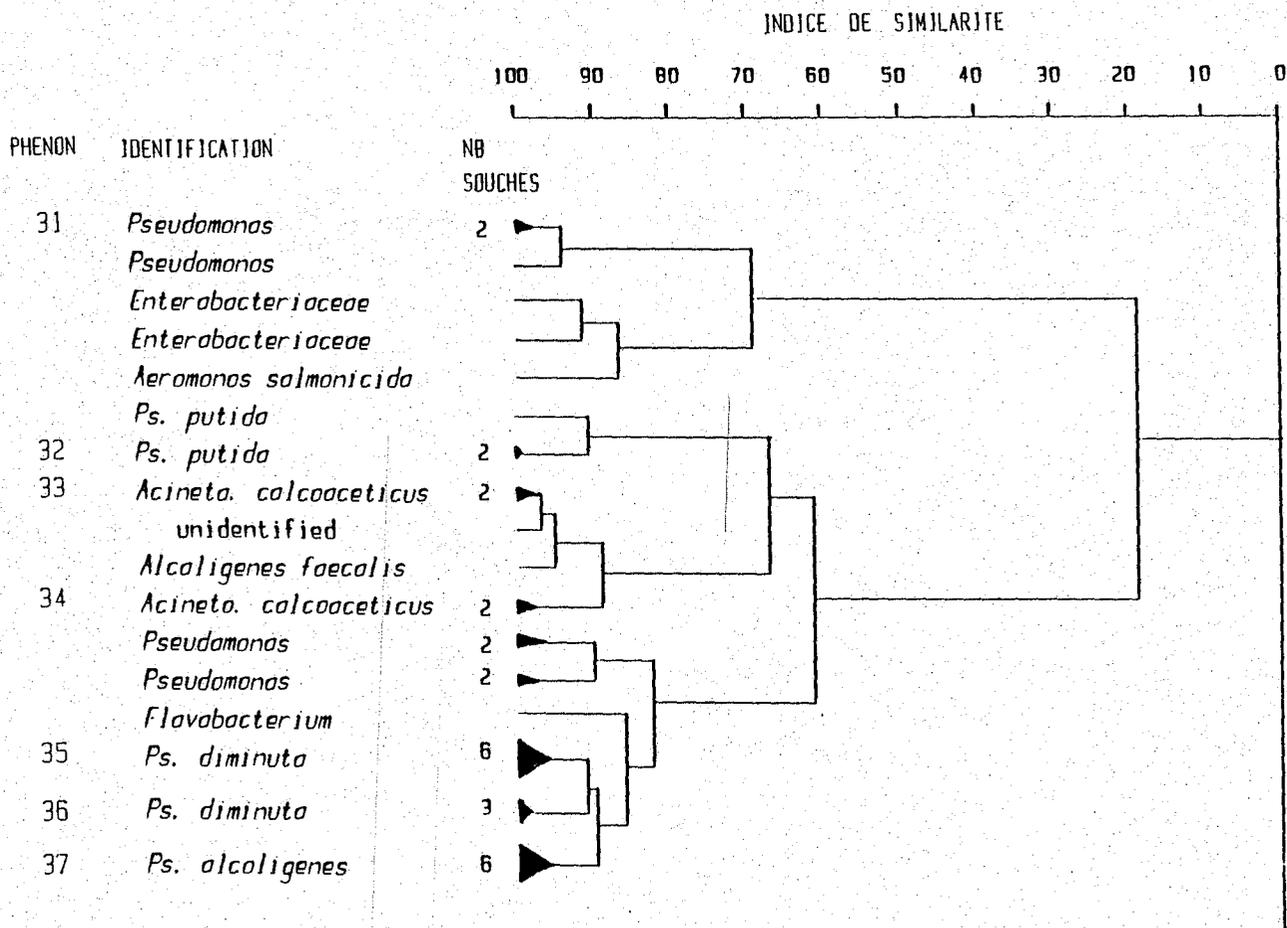


Figure 11. Dendrogramme 2 : Souches à Gram (-)

Certaines souches ne sont pas identifiées jusqu'à l'espèce par manque de correspondance avec les souches de référence incluses, ou avec les données de la littérature (*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* : Vol. 1).

Les souches sont divisées en 7 groupes du genre *Pseudomonas* et 2 groupes d'*Acinetobacter calcoaceticus*. Deux souches d'*Enterobacteriaceae* sont aussi présentes. Des souches individuelles d'*Aeromonas salmonicida*, *Alcaligenes faecalis* et *Flavobacterium* sp. ont été identifiées.

Le genre *Pseudomonas* est nettement prédominant : les espèces reconnues sont : *diminuta*, *alcaligenes* et *putida*.

Les espèces *Pseudomonas putida* et *Pseudomonas alcaligenes* sont bien définies sur le plan taxonomique, alors que *Pseudomonas "diminuta"* a une signification

taxonomique beaucoup moins clairement définie. Il s'agit d'un regroupement de *Pseudomonas* dont la plupart des réactions biochimiques sont négatives.

Les caractères moyens des groupes de souches sont rapportés dans le tableau 9.

Tableau 9. Caractères moyens de chaque phénon des souches à Gram (-)
(cf. Tableau 3bis)

Phénon	Identification	Pigment colonie	Pigment diffusible	Bâtonnets	Bâtonnets ramifiés	Coques	Filaments	Spores	Mobilité	Aérobie stricte	Anaérobie facultative	Fermentation du glucose	Cyt. oxydase	Gélatine	Nitrate	Urée	IND
31	<i>Pseudomonas sp.</i>	D	-	-	-	-	-	-	D	+	-	-	+	-	D	D	-
32	<i>Ps. putida</i>	D	-	+	-	-	-	-	D	+	-	-	+	-	-	+	-
33	<i>Ac. calcoaceticus</i>	-	-	+	-	D	-	-	-	+	-	-	-	-	-	D	-
34	<i>Ac. calcoaceticus</i>	D	D	-	-	D	-	-	-	+	-	-	-	D	D	-	D
35	<i>Ps. diminuta</i>	+	D	+	-	-	-	-	+	+	-	-	D	-	-	-	-
36	<i>Ps. diminuta</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	D	-	-
37	<i>Ps. alcaligenes</i>	+	D	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-

Phénon	Identification	ADH	ESC	PNPG	ARA	NAN	GLU	MAL	MNE	NAG	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC
31	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	+	D	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	D	+
32	<i>Ps. putida</i>	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-
33	<i>Ac. calcoaceticus</i>	-	D	-	D	-	D	-	-	-	D	D	D	+	+	-
34	<i>Ac. calcoaceticus</i>	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	D	+	-
35	<i>Ps. diminuta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	D	+
36	<i>Ps. diminuta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	<i>Ps. alcaligenes</i>	-	D	-	-	-	-	D	-	-	-	-	-	D	D	-

+ = réaction positive - = réaction négative D = réaction variable

3. DISCUSSION

3.1 Aspects taxonomiques

Les souches que nous avons identifiées avaient été considérées comme actives vis-à-vis des hydrocarbures sur la base du test préliminaire d'assimilation (en culture en tube). En fait comme indiqué plus loin (cf. Chap. IV), certaines souches n'ont pas confirmé leur activité métabolique sur les hydrocarbures. C'est le cas des coryneformes du groupe 7 (Annexe), de la majorité des *Bacillus*, de *Staphylococcus*, des *Enterobacteriaceae* et de quelques *Pseudomonas*. En fait, sur 34 souches Gram -, 10 se sont révélées inactives, et 24 sur 76 chez les Gram +.

Parmi les souches actives, on note essentiellement la présence de *Micrococcus*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter* et *Bacillus* chez les Gram + et *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* et *Alcaligenes* chez les Gram -.

En ce qui concerne les Gram négatifs, ces résultats confirment pour une large part des données déjà connues. Les staphylocoques et les entérobactéries (mis à part *Enterobacter*) sont toujours inactifs.

Si l'identification est valide, *Pseudomonas diminuta* n'avait pas encore été cité comme dégradant les hydrocarbures.

Pour ce qui est des Gram +, un grand nombre de genres avait été signalé comme possédant des représentants actifs sur les produits pétroliers. Ont été ainsi cités les genres : *Arthrobacter*, "coryneforme", *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Nocardia*, *Curtobacterium*, *Mycococcus*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*.

En fait, on peut penser que cette énumération de genres très voisins traduit la difficulté qu'il y avait à classer ces souches de coryneformes selon les anciens critères. Il est hautement vraisemblable que les souches isolées par les différents auteurs soient beaucoup plus proches que ne le laissent supposer les différents noms de genres employés et la plupart de ces souches seraient certainement maintenant reclassées comme *Rhodococcus* sur la base de nouveaux concepts taxonomiques. En revanche, *Arthrobacter* et *Nocardia* ont été souvent cités (Jones and Edington 1968; Bartha and Atlas 1977; Oudot et al. 1986), et nous trouvons également des souches actives appartenant à ces genres.

Micrococcus était déjà connu pour être actif sur les hydrocarbures (Jobson et al. 1972; Oudot 1975; Austin et al. 1977; Odu 1978).

Le cas de *Bacillus* prête encore à discussion. Certains travaux ont signalé l'existence de *Bacillus* actifs (Mateles 1967; Odu 1978; Kawakami et Nishimura 1981; Berwick 1984), mais la plupart des auteurs considèrent ce genre comme inactif sur les hydrocarbures, alors qu'il est souvent cité comme consommateur des produits de dégradation des hydrocarbures (Young Bae Kim & Rehm 1982).

Sur les 24 souches de *Bacillus* que nous avons isolées et testées, 8 ont confirmé leur activité sur les hydrocarbures. Il faut noter que 7 de ces souches sont originaires des sédiments marins d'Indonésie.

Le nombre de genres comportant des représentants actifs est relativement restreint, contrairement à ce qui a parfois été écrit (Bartha et Atlas 1977). En revanche, ces genres présentent en général une grande diversité spécifique, et une très large répartition géographique, ce qui explique et confirme que l'on trouve des souches bactériennes capables de dégrader les hydrocarbures dans pratiquement tous les milieux naturels (Butler et al. 1978; Oudot 1984; Neilson et al. 1985).

3.2 Aspects écologiques

En consultant le tableau 10 qui fait état de l'origine des souches en fonction de leur position taxonomique, il apparaît plusieurs points intéressants.

Il existe des relations directes entre le biotope d'origine et la position taxonomique des souches, c'est-à-dire la composition spécifique de la microflore active. Ainsi, les actinomycètes (*Rhodococcus*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, coryneforme et nocardioforme) ont presque tous été isolés à partir des sols tempérés, tandis que *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* et *Micrococcus* proviennent exclusivement du milieu marin tropical. Les *Bacillus* actifs apparaissent inféodés au sédiment marin tandis que les *Pseudomonas* actifs se trouvent aussi bien dans le sédiment que dans l'eau de mer, où ils représentent avec *Alcaligenes*, les seuls genres actifs que nous ayons rencontrés.

Cette nette dichotomie (actinomycètes dans le sol, et *Pseudomonas*-*Bacillus* en milieu marin) est certainement plus liée à la nature du biotope (sol - milieu marin) qu'à une éventuelle influence du climat (zone tempérée - zone tropicale). Nous ne pouvons pas comparer un même biotope dans les deux environnements, car le seul biotope commun est le sol, et la comparaison n'est pas directement possible à cause du très faible nombre de souches actives isolées du sol en Indonésie.

Un autre point à noter est que le classement automatique des souches conduit généralement à un regroupement des souches de même origine à l'intérieur des phénons (Annexe I). Par exemple les *Rhodococcus* d'Indonésie (phénon 1) sont distincts des *Rhodococcus* de sol tempéré, eux-mêmes différenciés par l'analyse numérique (phénon 2-Grignon, phénon 3-Muséum). L'écart entre ces 3 phénons est pourtant faible (% de similitude >92%), mais on ne peut pas conclure s'il s'agit de souches distinctes de la même espèce ou d'espèces différentes.

Ce regroupement des souches par biotope à l'intérieur d'un phénon se vérifie également au niveau de *Rhodococcus* : phénon 5-Muséum et phénon 6-Grignon.

La même tendance, moins systématique, s'observe aussi chez *Nocardia* (phénon 12-13 et 17). Ainsi chez *Rhodococcus* et *Nocardia* on peut conclure à une certaine forme de spéciation géographique.

Tableau 10. Origine des souches en fonction de leur position taxonomique

Gram +						
Biotope	<i>Rhodococcus</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>coryneforme</i> <i>nocardioforme</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Micrococcus</i>
Grignon	7	5	1	2	0	0
M. N. H. N.	9	4	5	4	1	0
Sol forestier	1	0	0	0	0	1
Sédiment rivière	1	0	0	3	1	0
Sédiment marin	0	0	0	0	6	0
Eau de mer	0	0	0	0	0	1
Total	18	9	6	9	8	2

Gram -					
Biotope	<i>Pseudomonas</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Aeromonas</i>
Grignon	0	0	0	0	0
M. N. H. N.	0	0	0	0	0
Sol forestier	0	0	0	0	0
Sédiment rivière	1	1	0	0	0
Sédiment marin	9	2	1	0	1
Eau de mer	8	0	0	1	0
Total	18	3	1	1	1

C H A P I T R E I V

DETERMINATION DES CAPACITES DEGRADATIVES

Dans cette partie, nous avons mesuré et comparé le potentiel de biodégradation de chacune des souches isolées et identifiées. Les capacités dégradatives sont déterminées par gravimétrie et par chromatographie en phase gazeuse GC2.

Les résultats sont rapportés par biotope d'origine et par genre à l'intérieur de chaque biotope. Pour chaque souche, les résultats gravimétriques indiquent le taux de biodégradation du pétrole total (T), et de chacune des fractions constitutives : saturés (S), aromatiques (A), résines (R) et asphaltènes (AS). Les souches sont classées par ordre d'activité décroissante. Des cultures mixtes ont également été réalisées par milieu d'origine, et leurs performances comparées à celles des souches pures. Nous avons retenu comme actives les souches dont le pourcentage de biodégradation total est >10%. En-dessous de 5%, l'activité peut être considérée comme nulle, et faible entre 5 et 10%. Le fractionnement du résidu total n'a été réalisé que pour les souches actives selon ces critères. Les analyses chromatographiques ont été réalisées sur les fractions saturées et aromatiques, mais seules les analyses portant sur la fraction saturée sont considérées. En effet, l'étude par GC2 des aromatiques n'apporte pas d'éléments suffisamment significatifs, car peu de pics distincts sont séparés dans le pétrole utilisé comme substrat.

1. SOUCHES ORIGINAIRES DES SOLS DE ZONE TEMPEREE

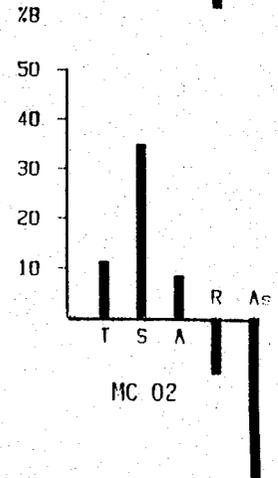
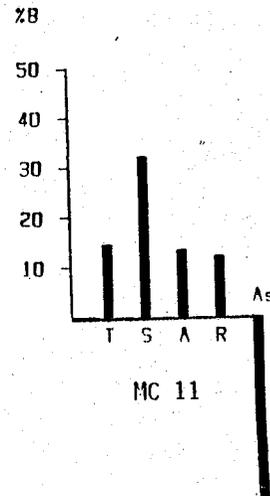
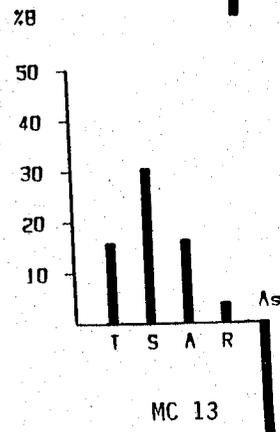
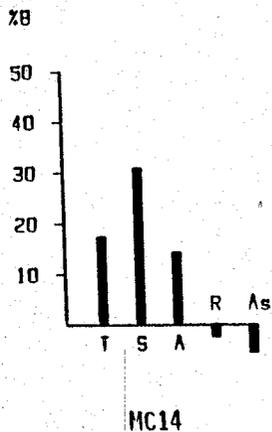
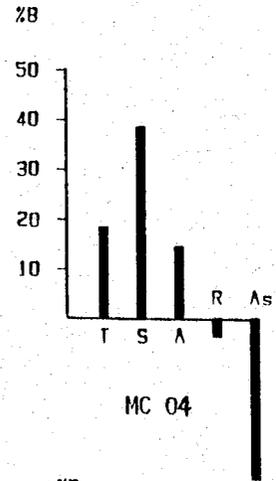
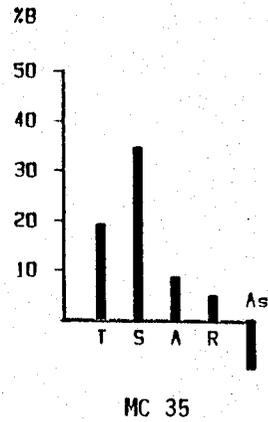
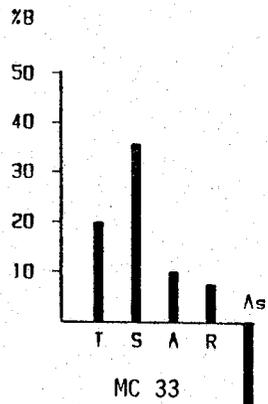
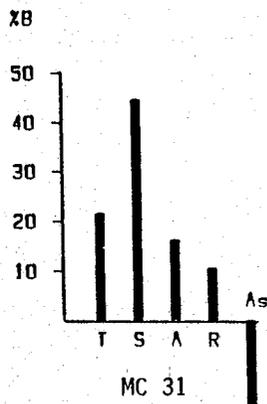
1.1 Terreau de jardin MNHN

Après l'essai préliminaire d'utilisation des hydrocarbures par culture en tube, 30 souches ont été retenues et testées. Les taux de biodégradation obtenus par ces souches sont rapportés dans les tableaux et histogramme suivants.

- *Rhodococcus*

Tableau 11 et Histogrammes 1. Taux de biodégradation du pétrole brut et de ses fractions obtenus par les souches du genre *Rhodococcus* (MNHN)

Genre <i>Rhodococcus</i>	T	S	A	R	AS
MC31	21.5	44.6	16.2	10.5	-18.6
MC33	19.8	35.6	10	7.5	-32.6
MC35	19.2	34.7	8.7	5	-10
MC04	18.4	38.5	14.5	- 3.8	-32.4
MC14	17.3	30.8	14.2	- 2.5	- 5.7
MC13	15.8	30.3	16.3	3.8	-24
MT32	15.6	31.7	13.1	- 3.5	-30
MC11	14.5	32.2	13.4	12.2	-37.5
MC02	11.3	34.9	8.5	-11.2	-32.8



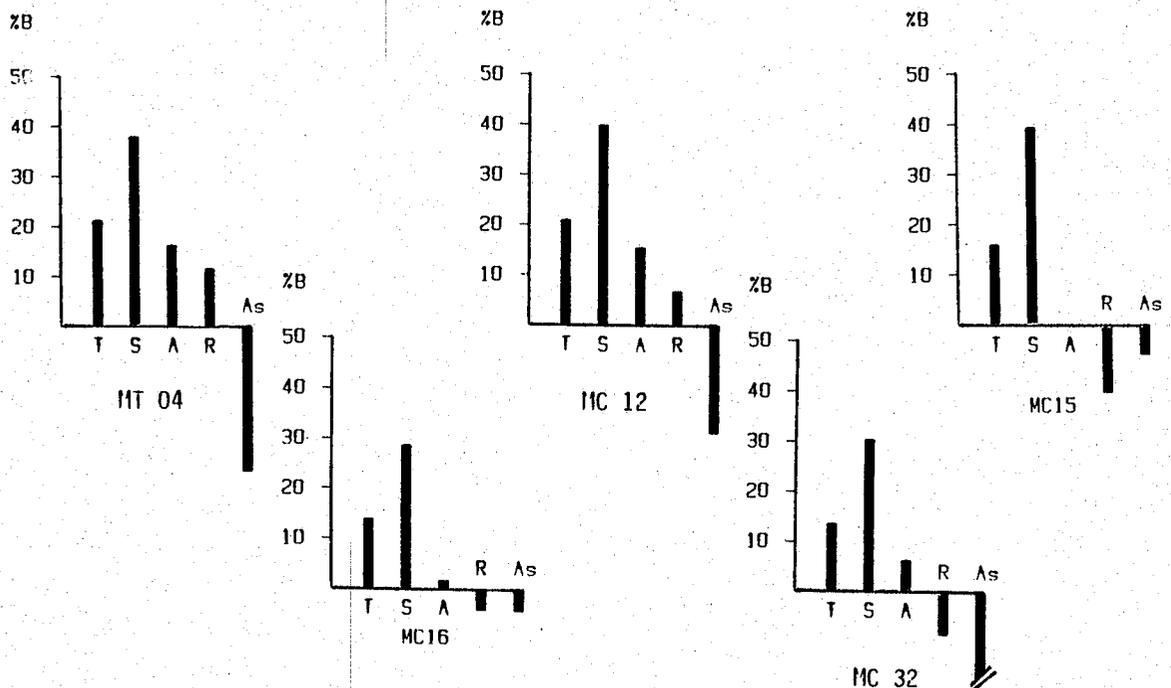
Toutes les souches montrent une activité vis-à-vis du pétrole total de 11 à 22%; les saturés sont plus dégradés (30 à 45%) que les aromatiques (9 à 16%).

A part MC31 qui a une activité faible sur les résines (10%), aucune souche ne montre une activité sur la fraction asphaltique. Au contraire, on constate une augmentation pondérale de la masse de la fraction asphaltène (cf. S Discussion).

- *Arthrobacter*

Tableau 12 et Histogrammes 2. Taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par les souches du genre *Arthrobacter* (MNHN)

Genre <i>Arthrobacter</i>	T	S	A	R	AS
MC104	21.1	37.8	16.2	11.6	-28.6
MC12	20.8	39.8	15.4	6.8	-21.2
MC15	15.8	39.2	00	-13.2	- 5.7
MC16	13.7	28.6	1.6	- 4.1	- 4.3
MC32	13.6	30.5	6.4	- 8.5	-35

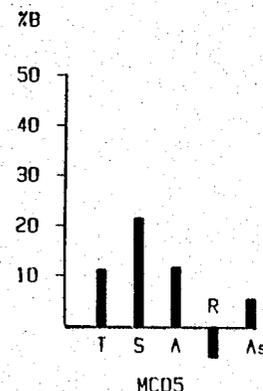
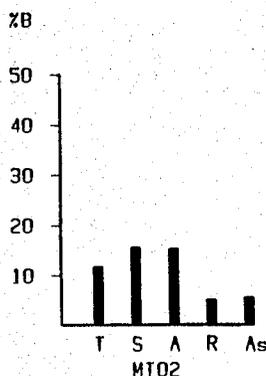
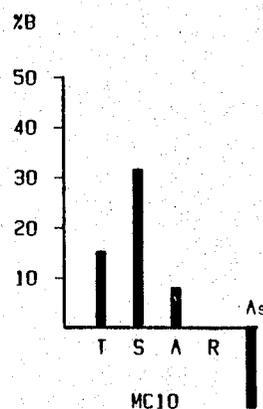
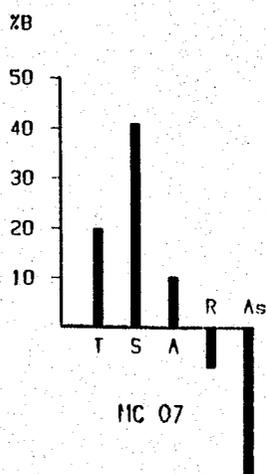


L'activité globale des souches se situe entre 14 et 21%. Toutes les souches montrent une activité importante vis-à-vis des saturés et seules les souches MC104 et MC12 dégradent la fraction aromatique et légèrement les résines, les asphaltènes ne sont pas dégradés.

- *Nocardia*

Tableau 13 et Histogrammes 3. Taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par les souches du genre *Nocardia* (MNHN)

Genre <i>Nocardia</i>	T	S	A	R	AS
MC07	19.7	40.8	10.1	- 8	-30
MC10	15.3	31.6	8	00	-15.7
MT02	11.7	15.7	15.4	5.2	5.7
MC05	11.2	21.6	11.8	- 6.1	5.7
MC06	<5	-	-	-	-



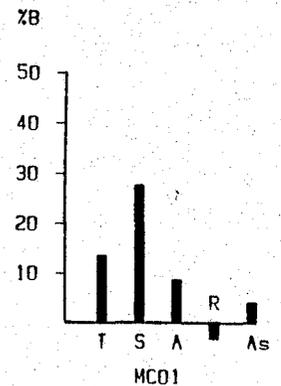
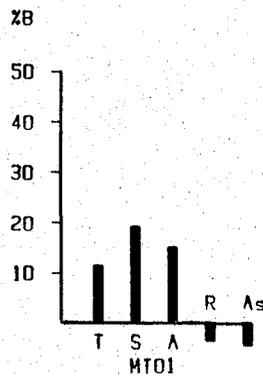
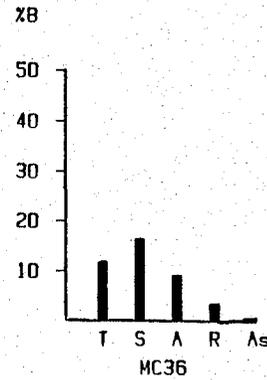
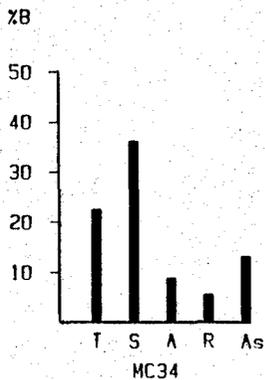
Les souches MC07 et MC10 dégradent mieux les saturés que les aromatiques et n'ont pas d'activité sur les résines et asphaltènes.

Les souches MT02 et MC05 sont relativement peu actives sur les saturés, mais plus efficaces que la moyenne sur les aromatiques. MT02 et MC05 ont une faible activité sur les asphaltènes.

- Nocardioformes et coryneformes

Tableau 14 et Histogrammes 4. Taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par les souches des groupes nocardioforme et coryneforme (MNHN)

	T	S	A	R	AS
Nocardioformes					
MC34	22.3	36	8.7	5.4	13
MC36	11.7	16.3	9	3.3	00
MT01	11.5	19.3	15.2	- 3.5	- 4.3
MC03	<5	-	-	-	-
Coryneforme					
MC01	13.5	27.7	8.8	- 3.1	4.3

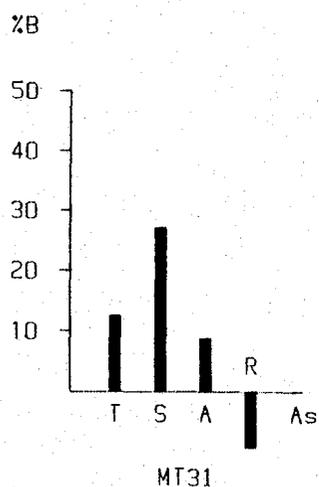


La fraction saturée est la plus dégradée (16 à 36%) que les aromatiques (9 à 15%) par les souches des deux groupes, alors que la fraction asphaltène est légèrement dégradée (13%) par la seule souche (MC34) du groupe nocardioforme.

- Autres genres

Tableau 15 et Histogramme 5. Taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par les souches du genre *Bacillus* et *Staphylococcus* (MNHN)

	T	S	A	R	AS
<i>Bacillus</i>					
MT31	12.5	27.1	8.8	- 9.3	00
MC08	<5	-	-	-	-
MC09	<5	-	-	-	-
<i>Staphylococcus</i>					
MC17	<5	-	-	-	-



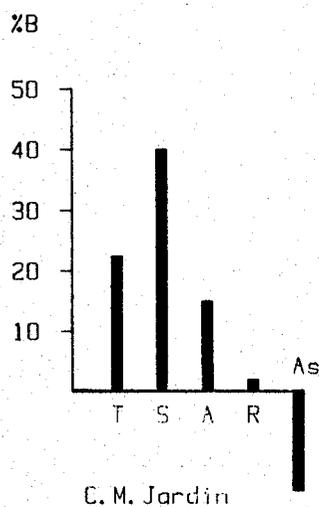
Une seule souche du genre *Bacillus* s'est montrée faiblement active (12%).
 La souche MC17 appartenant au genre *Staphylococcus* a une activité de dégradation négligeable (<5%).

Les souches testées individuellement en cultures pures ci-dessus ont été cultivées par groupes en vue de déterminer leur aptitude à utiliser les hydrocarbures en culture mixte.

Les taux de biodégradation de la culture mixte de toutes les souches bactériennes originaires du terreau de jardin pollué sont représentés dans les tableau et figure suivants :

Tableau 16 et Histogramme 6. Potentiel de biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par la culture mixte des souches MNHN

	T	S	A	R	AS
Culture mixte (M. N. H. N.)	22.4	40	15	2	-16.2



On constate que l'activité des souches en culture mixte est sensiblement la même que celle des souches les plus actives en culture pure.

Les résultats montrent que, parmi les 30 souches testées, les plus actives appartiennent aux genre : *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Nocardia* et aux groupes des nocardioformes et coryneformes, c'est-à-dire que ce sont exclusivement des actinomycètes.

Sept souches se sont révélées inactives (% B < 5). Elles appartiennent aux genres : *Nocardia*, *Bacillus*, *Staphylococcus* et au groupe nocardioforme.

L'activité des souches vis-à-vis des classes constitutives du pétrole saturée, aromatique, résine et asphaltène n'est pas identique. Ainsi les saturés sont les plus dégradés et les taux de biodégradation s'établissent entre 16 et 45%. Le maximum de biodégradation est obtenu avec *Rhodococcus* MC31.

Les aromatiques sont moins dégradés que les saturés et on note une variabilité relative à chacune des souches testées; le taux de biodégradation le plus élevé s'établit à 16%.

Aussi bien en culture pure qu'en culture mixte des bactéries, la fraction asphaltique n'est que peu ou pas attaquée.

La biodégradation maximum pour les résines est de 12% (*Arthrobacter* MT04) et atteint 10% chez *Rhodococcus* MC31. Les asphaltènes ne seraient faiblement attaqués que par le nocardioforme MC34. On note le plus souvent une augmentation pondérale de la masse des résines (-2 à -13%) et surtout des asphaltènes (-4 à -37%) que l'on explicitera par la suite.

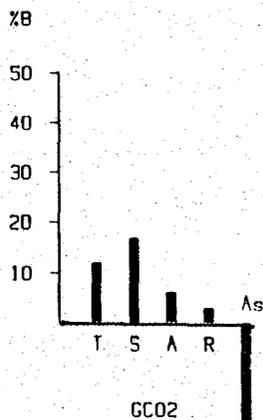
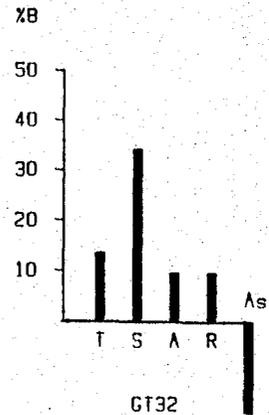
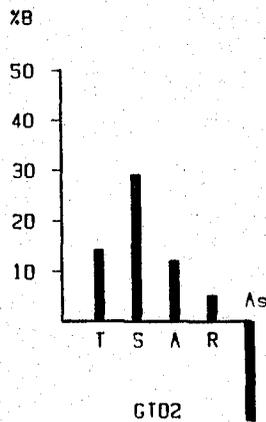
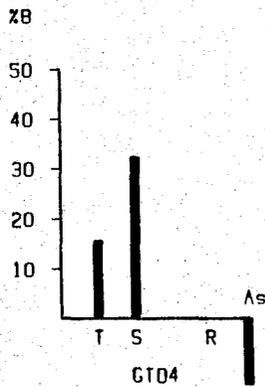
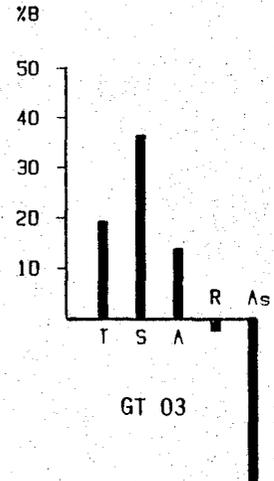
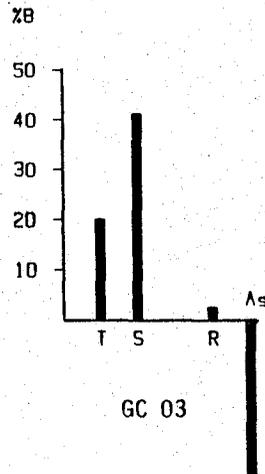
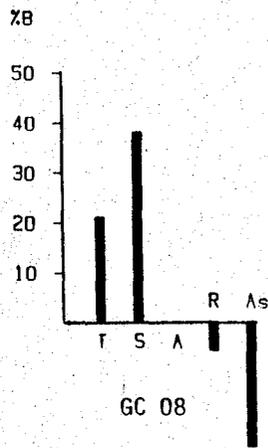
1.2 Sol agricole Grignon

Les 15 souches testées se sont révélées réellement actives (B >10%). Les résultats sont rapportés dans les tableaux et histogrammes suivants :

- *Rhodococcus*

Tableau 17. Taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par les souches du genre *Rhodococcus* (Grignon)

Genre	T	S	A	R	AS
<i>Rhodococcus</i>					
GC08	21	38	00	- 5.6	-25
GC03	20	41.2	-	2.5	-31
GT03	19.3	36.6	14	- 2.4	-32.8
GT04	15.6	32.3	-	00	-13.3
GT02	14.3	29	12	5	-20
GT32	13.4	34.1	9.4	9.4	-18.1
GC02	11.9	16.8	6.1	3.1	-18.7



Histogrammes 7. Taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par les souches du genre Rhodococcus (Grignon)

Le taux de biodégradation du pétrole total des souches de ce genre s'établit entre 12 et 21%.

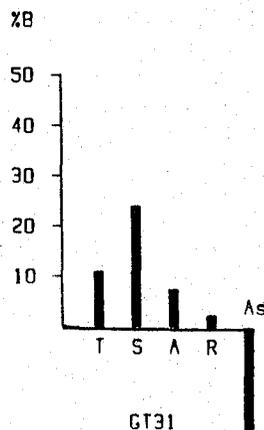
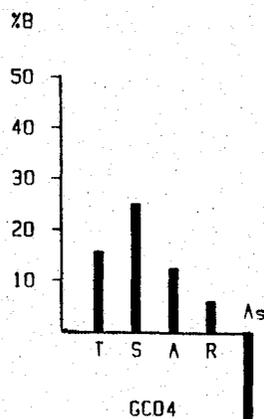
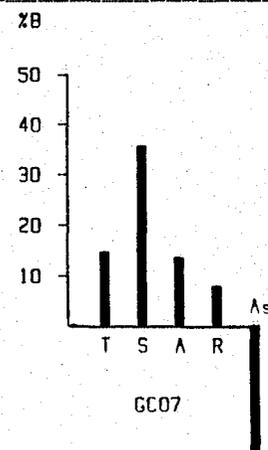
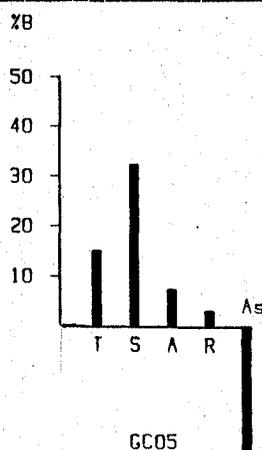
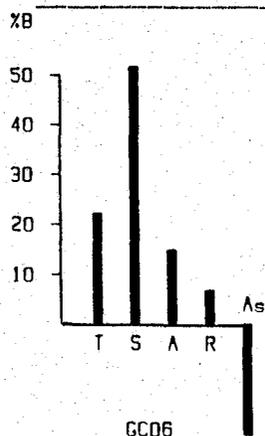
La fraction saturée est très dégradée par l'ensemble des souches (17 à 41%) au contraire des aromatiques qui sont dégradés entre 0 et 14%.

Les résines ne sont que faiblement attaquées par la souche GT32 (9%), alors que, sur les asphaltènes, on constate une augmentation en valeur absolue de cette fraction.

- *Nocardia*

Tableau 18 et Histogrammes 8. Taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par les souches du genre *Nocardia* (Grignon)

Genre <i>Nocardia</i>	T	S	A	R	AS
GC06	22.2	51.8	15	7	-22
GC05	15.1	32.4	7.4	3.2	-25.2
GC07	14.8	35.7	13.8	8.2	-25
GC04	15.7	25	12.5	6	-18
GT31	11	24	7.5	2.5	-20.8

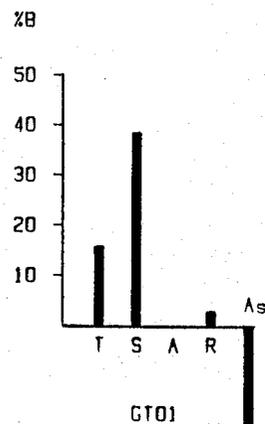
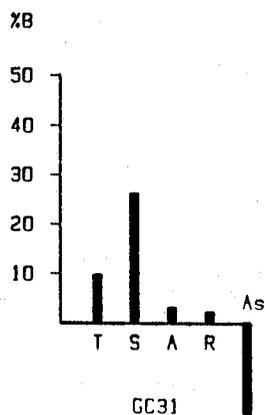
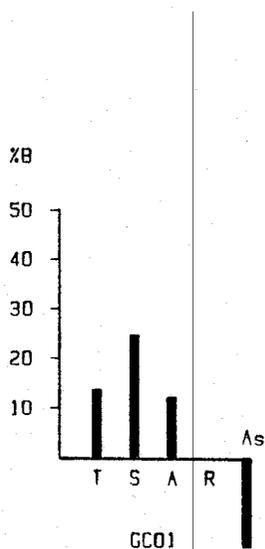


Tout comme *Rhodococcus*, ce genre est plus actif sur les saturés (24 à 52%) que sur les aromatiques (7 à 14%). L'activité sur les résines est très faible et on note également une augmentation de la masse correspondant aux asphaltènes.

Le genre *Arthrobacter* et les groupes nocardioforme et coryneforme sont représentés chacun par une seule souche.

Tableau 19 et Histogrammes 9. Taux de biodégradation du genre *Arthrobacter* et des groupes nocardioforme et coryneforme (Grignon)

	T	S	A	R	AS
<i>Arthrobacter</i> GC01	13.6	24.6	12.1	00	-17.3
nocardioforme GC31	9.7	26.2	3.2	2.3	-17.8
coryneforme GT01	15.7	38.4	00	2.9	-20

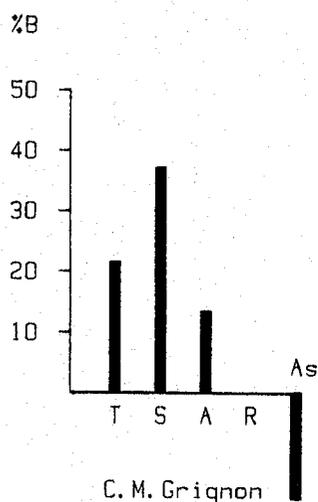


Les trois souches sont actives sur les saturés, alors que les aromatiques ne sont significativement attaqués que par la souche d'*Arthrobacter* GC01. La fraction asphaltique n'est pas dégradée.

En culture mixte, l'activité de l'ensemble des souches est représentée dans le tableau et figure suivants :

Tableau 20 et Histogramme 10. Taux de biodégradation obtenus par la culture mixte des souches du sol agricole de Grignon

	T	S	A	R	AS
Culture mixte (Grignon)	21.6	37.2	13.4	00	-17.5



On constate que les souches mises en culture mixte ne dégradent pas mieux le pétrole que les souches individuelles.

Comme dans le sol de jardin, les souches *Rhodococcus* représentent presque la moitié des souches actives isolées du sol agricole de Grignon. Les autres souches actives isolées sont des actinomycètes appartenant aux genres *Nocardia*, *Arthrobacter* et aux nocardioformes et coryneformes.

Les souches de Grignon ne présentent pas toutes la même capacité de dégradation et on note une grande variabilité individuelle de l'activité. On confirme l'assimilation préférentielle des saturés par rapport aux aromatiques.

Dans l'ensemble, la fraction asphaltique résiste à l'attaque bactérienne et seules quelques rares souches (*Rhodococcus* GT32, *Nocardia* GC-7, GC-6, GC-4) attaquent faiblement les résines (6 - 9%), tandis que l'on note en général au contraire une augmentation systématique de la masse des asphaltènes (cf. Discussion).

L'étude des capacités dégradatives des souches bactériennes actives vis-à-vis des HC de sols agricoles de zone tempérée a montré la prédominance dans ce biotope des actinomycètes : *Rhodococcus*, *Arthrobacter* et *Nocardia*, ou autres (coryneforme et nocardioforme).

On peut considérer que globalement les souches les plus nombreuses et les plus actives appartiennent aux genres *Rhodococcus* et *Nocardia* dans les deux sols.

Dans les conditions idéalisées et reproductibles du laboratoire, nous avons constaté qu'en général les souches les plus actives en culture pure atteignent toutes des taux de biodégradation tout-à-fait comparables, et cela indépendamment de leur biotope d'origine.

La fraction saturée est la plus dégradée : elle est assimilée par *Rhodococcus* (17 à 45%), *Arthrobacter* (25 à 40%), *Nocardia* (16 à 52%), le groupe des nocardioformes (16 à 38%) et celui des coryneformes (26 à 28%).

Le taux maximum de biodégradation sur la fraction aromatique est de 16%, soit trois fois moins que celui obtenu pour les saturés. Certaines souches (GT01, GC08, MC15, MC16), appartenant à tous les genres cités, sont même inactives sur les aromatiques.

Les résines résistent à l'attaque bactérienne, elles ne sont très légèrement dégradées (12%) que par quelques souches de *Rhodococcus* et *Arthrobacter*.

Les asphaltènes ne seraient faiblement attaqués que par une seule souche du groupe des nocardioformes : MC34.

En fait, comme nous le détaillerons plus tard (cf. IV, 3), l'augmentation de la masse des asphaltènes souvent observée est liée aux techniques de culture et de dosage employée. En effet, le traitement à l'hexane du résidu entraîne non seulement la précipitation des asphaltènes pétroliers, mais également celle de produits intermédiaires du métabolisme qui s'accumulent en milieu fermé.

2. SOUCHES ORIGINAIRES D'INDONESIE

Nous avons étudié et comparé les capacités dégradatives des microflores bactériennes isolées de milieu terrestre (sol et rivière) et de milieu marin (eau et sédiment).

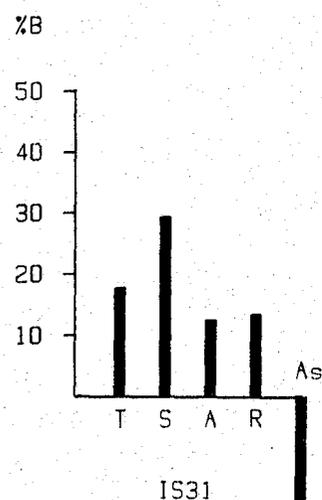
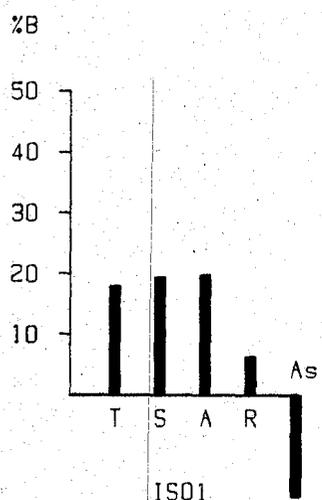
Les échantillons pour étude ont été prélevés dans plusieurs zones soumises à l'impact de rejets chroniques d'hydrocarbures d'origine pétrolière. Nous présentons ci-après les résultats des mesures des capacités dégradatives de ces souches tropicales, regroupées par genre pour chaque biotope d'origine.

2.1 Sol forestier

Le tableau 21 et l'histogramme 11 rapportent les taux de biodégradation obtenu par les quatre souches retenues après l'essai préliminaire.

Tableau 21 et Histogrammes 11. Taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par les bactéries du sol forestier d'Indonésie

	T	S	A	R	AS
<i>Rhodococcus</i> IS01	18	19.4	19.8	6.4	-16.7
<i>Micrococcus</i> IS31	17.7	29.3	12.4	13.3	-18
<i>Pseudomonas</i> sp. IS02	<5	-	-	-	-
<i>Pseudomonas</i> sp. IS03	<5	-	-	-	-



Les deux souches de *Pseudomonas* ne montrent aucune activité significative vis-à-vis du pétrole. *Rhodococcus* IS01 et *Micrococcus* IS31 présentent le même taux global de biodégradation, bien qu'elles n'aient pas la même activité vis-à-vis des fractions. *Rhodococcus* IS01 assimile les saturés et les aromatiques avec la même efficacité et attaque peu les résines. *Micrococcus* IS31 métabolise plus les saturés que les aromatiques et fait preuve d'une certaine activité sur les résines.

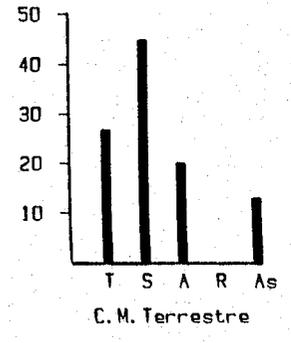
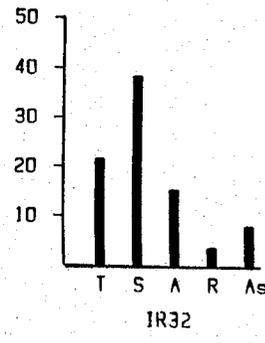
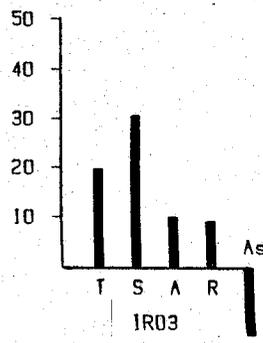
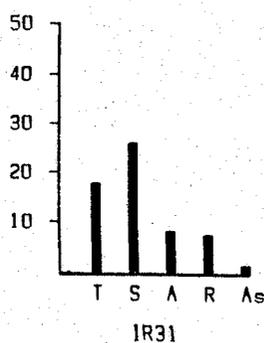
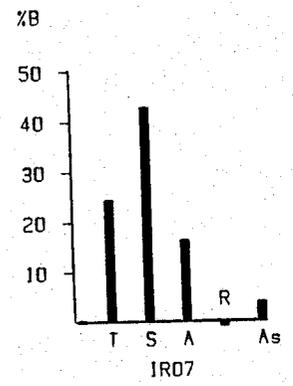
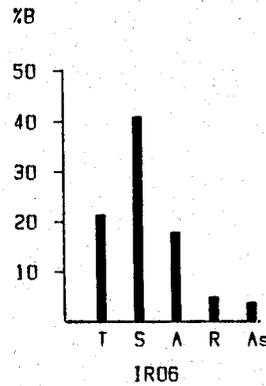
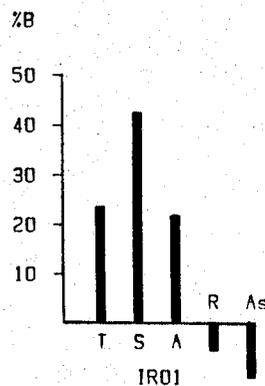
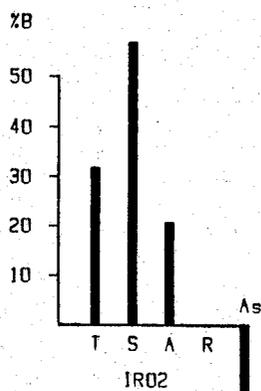
La masse des asphaltènes augmente de la même façon chez les deux souches actives.

2.2 Rivière

Les résultats de biodégradation du BAL 150 par les souches isolées du sédiment du lit de rivière sont donnés dans le tableau et histogramme suivant.

Tableau 22 et Histogrammes 12. Taux de biodégradation du pétrole brut et de ses fractions par les souches d'une rivière d'Indonésie

	T	S	A	R	AS
coryneforme					
IR02	31.8	56.8	20.8	00	-13
IR01	23.5	42.4	21.7	- 5.6	-11
IR06	21.2	40.8	17.8	4.8	3.7
Acinetobacter					
IR07	24.3	42.7	16.3	- 1.2	3.7
IR33	<5	-	-	-	-
Bacillus					
IR31	17.7	26	8.2	7.5	1.6
IR05	<5	-	-	-	-
Rhodococcus					
IR03	19.6	30.6	10	9.2	-13
Pseudomonas putida					
IR32	21.5	38.4	15.4	3.8	8.2
Enterobacteriaceae					
IR08	<5	-	-	-	-
Culture mixte	26.7	44.8	20	00	13



A part *Arthrobacter* IR33, *Bacillus* IR05 et l'entérobactérie IR08 qui ont une activité négligeable, toutes les autres souches sont actives, et le taux le plus élevé (32%) est atteint par le coryneforme IR02. L'activité sur les saturés varie entre 26 et 57% et entre 8 et 22% pour les aromatiques.

Aucun genre bactérien de la rivière ne présente d'activité sur la fraction asphaltique et on constate souvent une légère augmentation de la masse des asphaltènes.

Les souches isolées du sol sont moins nombreuses et moins actives que celles isolées de la rivière. Elles appartiennent aux genres *Rhodococcus* et *Micrococcus*, alors que les souches originaires de la rivière appartiennent à 4 genres différents : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Bacillus* et au groupe des coryneformes.

Les souches les plus performantes originaires de la rivière dégradent plus les saturés (38 à 57%) que les aromatiques (15 à 22%). Les résines ne sont significativement attaquées que par *Micrococcus* IS31 (13%) et aucune souche ne dégrade réellement les asphaltènes.

2.3 Eau de mer

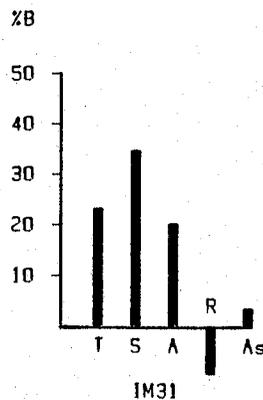
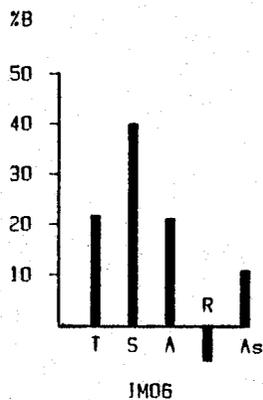
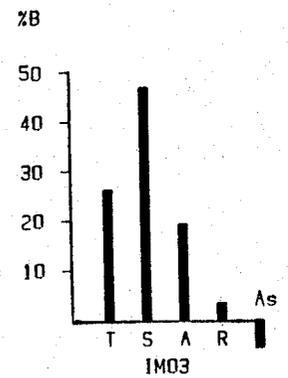
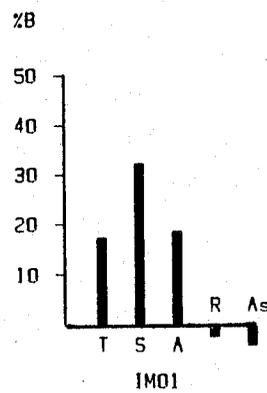
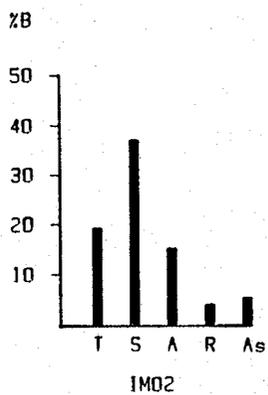
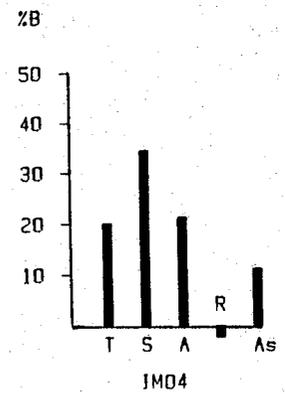
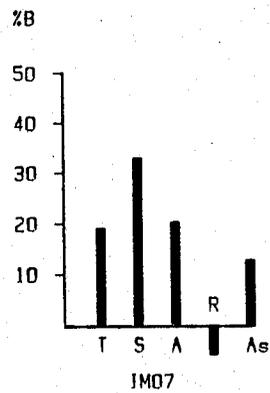
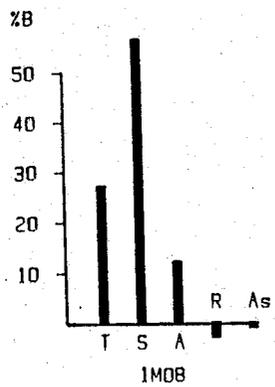
Les souches ont été isolées à partir de l'eau de mer prélevée au voisinage d'une plateforme pétrolière d'exploitation offshore.

La microflore bactérienne active dans ce biotope est composée essentiellement d'espèces appartenant au genre *Pseudomonas*. Les genres *Micrococcus*, *Alcaligenes* et le groupe coryneforme sont moins représentés.

Les tableaux et histogrammes suivants donnent les taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par les souches étudiées.

Tableau 23. Taux de biodégradation du pétrole par les souches de *Pseudomonas* d'eau de mer d'Indonésie

	T	S	A	R	AS
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>					
IM08	27.2	56.6	12.2	- 3	- 1.1
IM07	19.1	33	20.4	- 5.6	13
<i>Pseudomonas diminuta</i>					
IM04	20	34.4	21.2	- 2.3	11.1
IM02	19.2	37.1	15.2	4.2	5.6
IM01	17.2	32.3	18.6	- 2	- 3.7
IM32	<5	-	-	-	-
<i>Pseudomonas sp.</i>					
IM03	26.2	46.8	19.2	3.4	- 5.6
IM06	21.7	40	21.2	- 6.8	11.1
IM09	<5	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>					
IM31	23.2	34.7	20.3	- 9.2	3.7



Histogrammes 13. Taux de biodégradation du pétrole par les souches de *Pseudomonas* d'eau de mer d'Indonésie

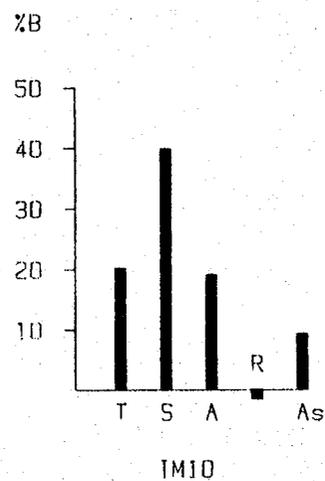
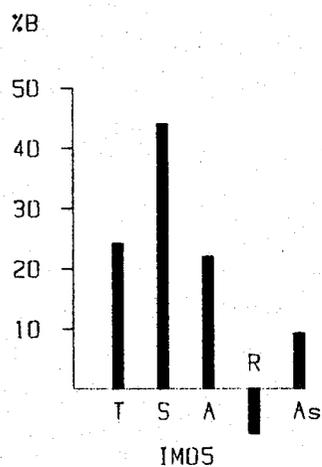
La majorité des souches de *Pseudomonas* testées sont actives, elles dégradent les saturés (32 à 57%) mieux que les aromatiques (12 à 21%).

Mis à part *P. diminuta* IM04, *P. alcaligenes* IM07 et *Pseudomonas* sp. IM06 qui semblent avoir une activité sur les asphaltènes (11 à 13%). Les autres souches ne dégradent pas significativement la fraction asphaltique (résines + asphaltènes).

Autres genres

Tableau 24 et Histogrammes 14. Taux de biodégradation du pétrole des souches IM05, IM10 et IM12 de l'eau de mer d'Indonésie

	T	S	A	R	AS
<i>Alcaligenes f.</i> IM05	24.2	44	22	- 7.5	9.3
<i>Micrococcus</i> IM10	20.2	39.8	19.1	- 1.5	9.3
coryneforme IM12	<5	-	-	-	-



Micrococcus IM10 et *Alcaligenes* IM05 dégradent le pétrole et les fractions de la même façon, et leur activité est identique à celle des souches actives du genre *Pseudomonas*.

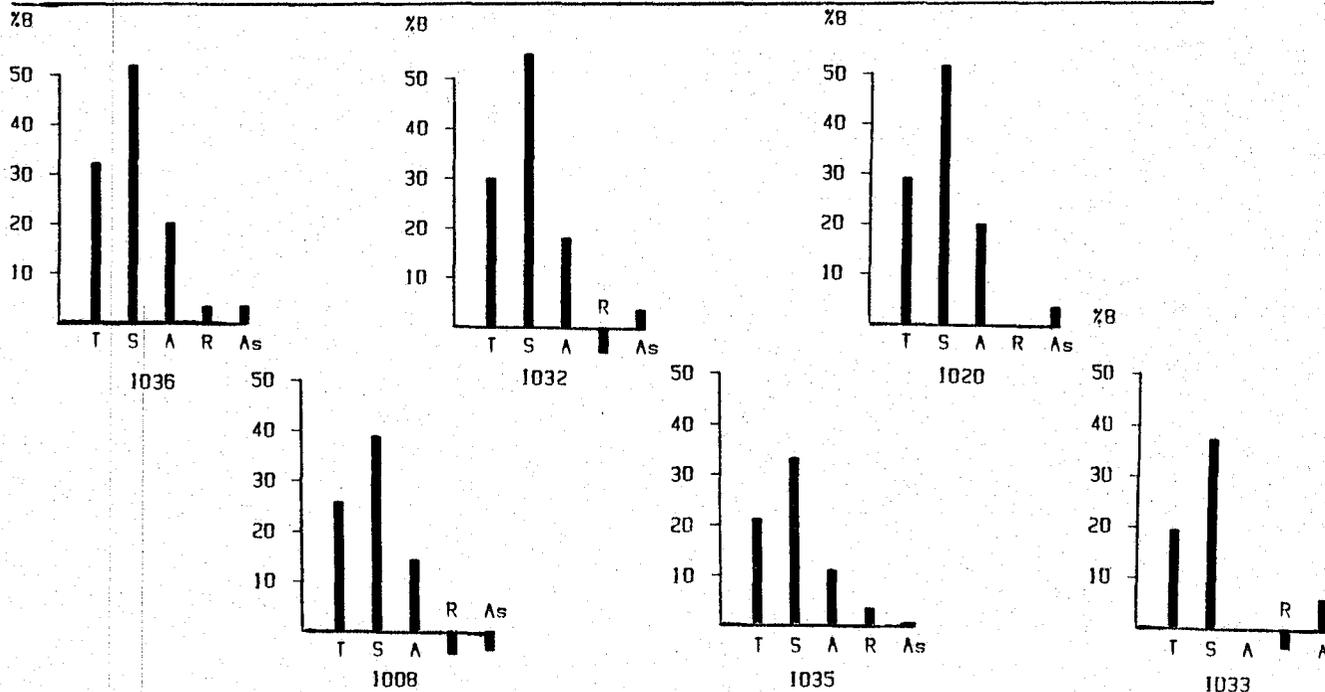
2.4 Sédiment marin

Ces souches ont été isolées à partir des sédiments marins littoraux qui subissent des rejets chroniques émanant d'une station de stockage.

Moins de la moitié des souches retenues après le test de croissance sur pétrole se sont avérées actives. Ces souches appartiennent aux genres : *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* et *Aeromonas*.

Tableau 25 et Histogrammes 15. Taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions atteint par les souches du genre *Bacillus* du sédiment marin d'Indonésie

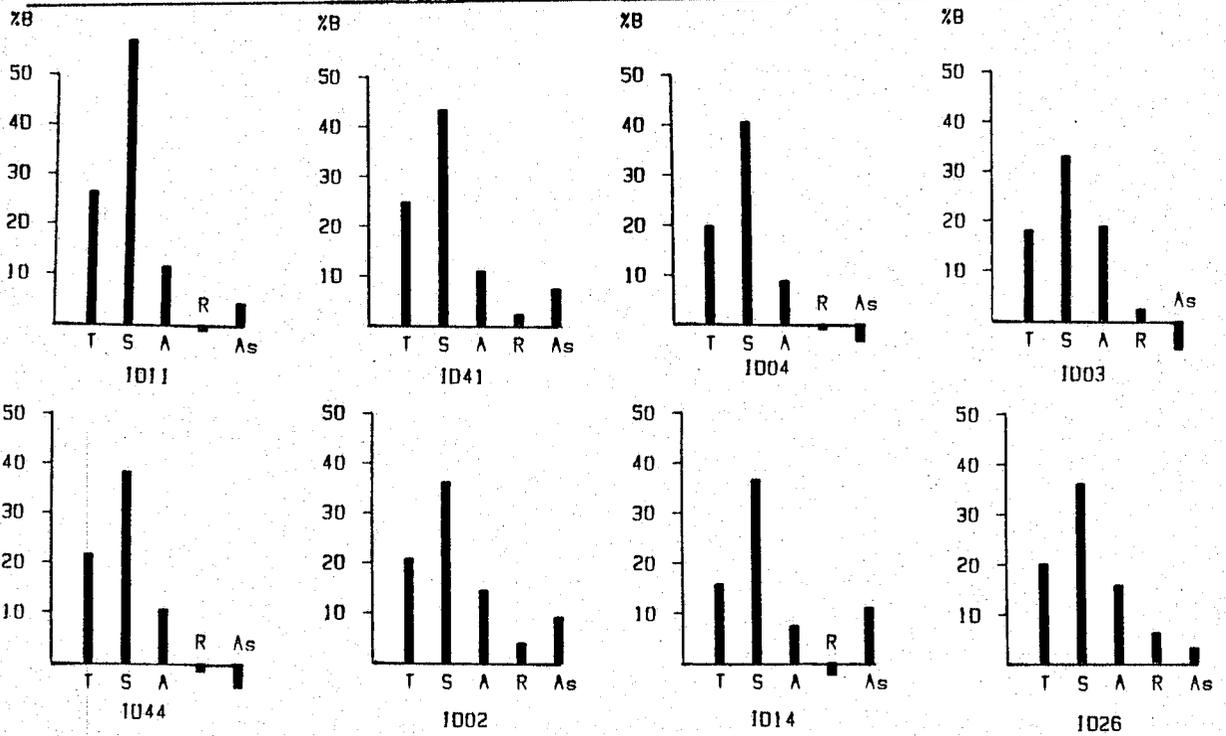
Genre <i>Bacillus</i>	T	S	A	R	AS
ID36	32.2	52	20.3	3.5	3.7
ID32	30	55	18.2	5	3.7
ID20	29.1	51.8	20.2	00	3.7
ID08	25.7	38.8	14.2	4.7	3.8
ID35	21.2	33.2	11	3.5	00
ID33	19.5	37.4	00	3.5	6.3
13 autres souches du même genre	<5	-	-	-	-



Les résultats donnés dans les tableaux et figures précédents montrent que les 2/3 des souches du genre *Bacillus* ne manifestent aucune activité vis-à-vis du pétrole. Les autres souches sont très actives sur la fraction saturée (33 à 55%) et on note une activité variable sur les aromatiques (0 à 20%). On ne constate pas d'augmentation dans la masse pondérale de la fraction asphaltique.

Tableau 26 et Histogrammes 16. Taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par les souches de *Pseudomonas* du sédiment marin d'Indonésie

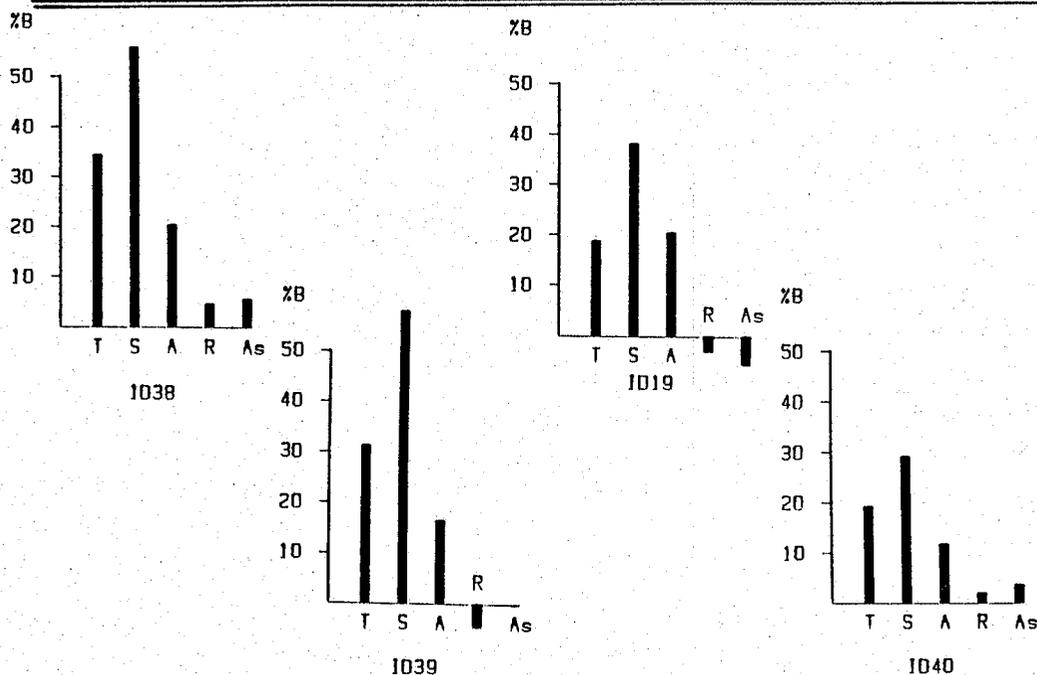
	T	S	A	R	AS
<i>Pseudomonas diminuta</i>					
ID11	26.5	57.2	11.7	- 1.1	4.6
ID41	24.7	43.3	11	- 2.3	7.4
ID04	19.7	40.4	8.7	- 1.1	- 3.4
ID03	18	33	18.8	2.3	- 5.6
ID42	<5	-	-	-	-
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>					
ID44	21.6	38.3	10.6	- 1.5	- 4.6
ID02	20.8	36.2	14.5	4.1	9.3
ID12	20.3	51.2	00	- 3.8	7
ID16	<5	-	-	-	-
<i>Pseudomonas sp</i>					
ID14	15.7	36.6	7.5	- 2.3	11.1
ID45	<5	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putida</i>					
ID26	20	36	15.7	6.3	3.3



L'activité du genre *Pseudomonas*, élevée, est comparable à celle des souches appartenant au genre *Bacillus*.

Tableau 27 et Histogrammes 17. Taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par les souches des autres genres dans le sédiment marin d'Indonésie

	T	S	A	R	AS
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>					
ID38	34.3	55.7	20.3	4.6	5.6
ID19	18.7	38.1	20.4	- 3	- 5.6
<i>Flavobacterium</i>					
ID39	31.3	58	16.5	- 4.6	00
<i>Aeromonas salmonicida</i>					
ID40	19.2	29.1	11.8	2	3.7
<i>Enterobacteriaceae</i>					
ID09	<5	-	-	-	-
coryneforme					
ID15	<5	-	-	-	-
ID34	<5	-	-	-	-
<i>Micrococcus</i>					
ID23	<5	-	-	-	-
<i>Rhodococcus</i>					
ID25	<5	-	-	-	-

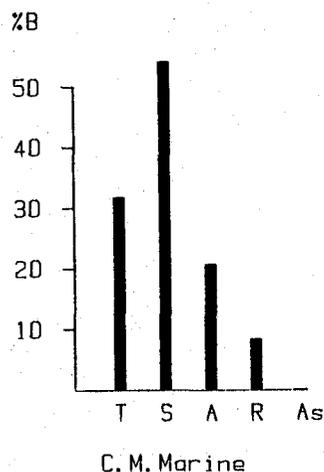


Les souches les plus actives appartiennent aux genres *Acinetobacter*, *Flavobacterium* et *Aeromonas*. Les souches des genres *Micrococcus* et *Rhodococcus*, ainsi que les coryneformes marins isolés ne présentent aucune activité.

Toutes les souches d'origine marine (eau + sédiment) ont été cultivées ensemble. L'activité de cette culture mixte reste comparable à celle des souches actives en culture pure (Tableau 28 et histogramme 28).

Tableau 28 et Histogramme 18. Taux de biodégradation de la culture mixte des souches du milieu marin (eau + sédiment)

	T	S	A	R	AS
Culture mixte Milieu marin	31.7	54	20.6	8.3	00



Comme déjà évoqué (Chap. III, 3.2), on a pu isoler plus de genres différents dans le sédiment (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* et *Aeromonas*) que dans l'eau (*Pseudomonas*, *Alcaligenes* et *Micrococcus*).

Pseudomonas est présent aussi bien dans l'eau de mer que dans les sédiments, tandis que *Bacillus* n'a été isolé qu'à partir des sédiments.

Les taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions par les souches originaires de l'eau de mer sont similaires à ceux atteints par les bactéries du sédiment marin, malgré une composition spécifique différente observée dans les deux compartiments du milieu marin.

La fraction saturée est plus dégradée (29 à 58%) que la fraction aromatique (0 à 22%). Les résines confirment leur résistance à la biodégradation, le taux n'excédant pas 9%. En ce qui concerne les asphaltènes, on note une légère biodégradation par des souches du genre *Pseudomonas*.

Contrairement au cas des actinomycètes du sol (cf. § 1), on ne note pas d'augmentation de la masse des asphaltènes, ce qui implique des métabolismes différents suivant les genres (cf. Discussion).

3. DISCUSSION

Dans tous les biotopes étudiés, nous avons pu isoler des souches actives vis-à-vis des hydrocarbures, ce qui confirme l'ubiquité de ces microorganismes (Oudot 1984; Neilson et al. 1985).

On sait que des bactéries adaptées sont présentes dans pratiquement tous les milieux naturels, même non contaminés par des produits pétroliers (Buckly et al. 1976; Fusey et al. 1983; Oudot 1984; Oudot et al. 1986), et qu'un influx d'hydrocarbures se traduit non pas par une modification des capacités dégradatives préexistantes des souches potentiellement actives, mais bien par la prolifération de ces souches, qui deviennent prédominantes dans la microbiocénose (Oudot 1975; Rivière et Gatellier 1976; Sextone 1978; Jones 1977; Odu 1977).

3.1 Activité des souches

Une proportion de souches isolées et jugées positive après la culture préliminaire présente des taux de biodégradation très bas ou nul dans les essais suivants (cf. tableaux). Ceci peut s'expliquer dans certains cas par une perte rapide d'activité lors des repiquages successifs. Il est également possible que certaines souches ayant présenté un trouble à l'examen visuel préliminaire se soient en fait développées à partir de contaminants du milieu de culture, mais non à partir des hydrocarbures. Egalement certaines cultures ont pu ne pas démarrer faute d'une densité d'inoculum suffisante (cf. Chap. VII, 4).

Il est important de remarquer qu'il n'existe pas, pour une souche donnée, de relation entre l'activité de biodégradation et les autres caractéristiques métaboliques testées (tableaux 8, 9). Si l'on compare le taux de biodégradation moyen des phénons et le nombre de caractères positifs (activité enzymatique et utilisation des sources de carbones), on obtient la droite de régression de la figure 12, dont la pente est statistiquement nulle, preuve d'une absence de corrélation.

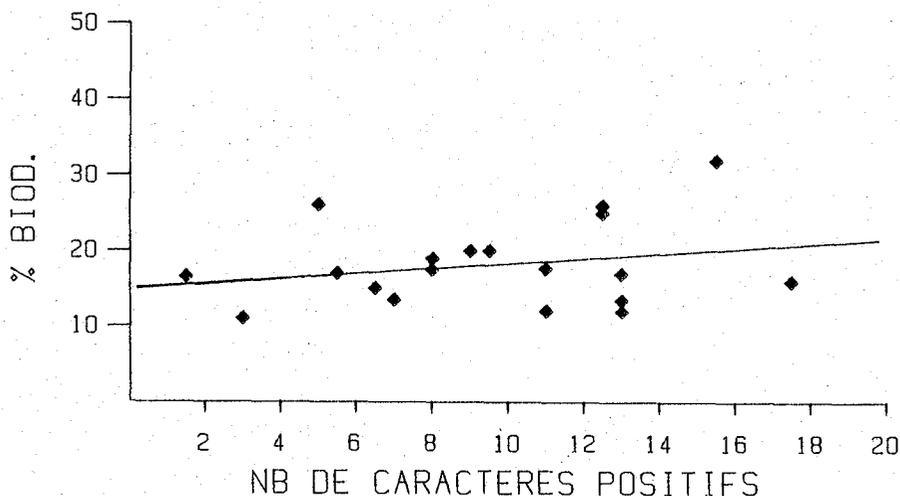


Figure 12. Relation entre l'activité de biodégradation et les autres caractéristiques métaboliques

Les capacités dégradatives de *Pseudomonas diminuta* groupes 35-36 (1 ou 2 caractères positifs), ou des coryneformes groupe 7 et 8 (2 et 3 caractères positifs) sont aussi élevés que celles des nocardioformes du groupe 15 ou des *Bacillus* du groupe 16 (18 ou 16 caractères positifs).

Lorsque les souches sont actives, on observe systématiquement que l'activité de biodégradation porte en priorité sur les saturés. Les aromatiques sont moins dégradés, tandis que les résines et els asphaltènes ne sont, à de rares exceptions près, pas attaqués.

Si l'on considère tous les résultats concernant les capacités dégradatives de l'ensemble des souches, on constate qu'il existe une excellente corrélation entre les taux de biodégradation du pétrole total (% B TOT) et le pourcentage de biodégradation de la fraction saturée (% B SAT) (Fig. 13).

On a la relation :

$$\% \text{ B SAT} = 2.9 + 1.7\% \text{ B TOT avec } r = 0.908 > r_{99} = 0.39 \text{ (n = 52)}$$

De la même façon (Fig. 14), le taux de biodégradation des aromatiques (% B ARO) est corrélé de façon linéaire avec le taux de biodégradation du pétrole total, selon l'équation :

$$\% \text{ B ARO} = 0.13 + 0.68\% \text{ B TOT avec } r = 0.769 > r_{99} = 0.38 \text{ (n = 43)}$$

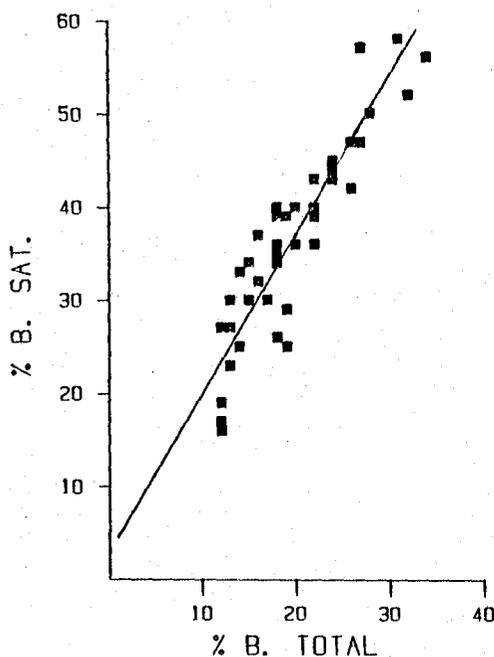


Figure 13. Corrélation entre les taux de biodégradation du pétrole totale et le pourcentage de biodégradation de la fraction saturée

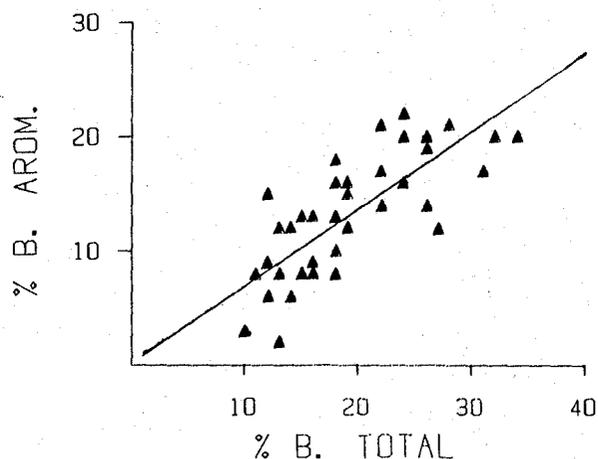


Figure 14. Corrélation entre les taux de biodégradation du pétrole totale et le pourcentage de biodégradation de la fraction aromatique

A titre d'exemple, si une souche présente un taux de biodégradation global de 10%, le pourcentage de biodégradation des saturés serait de 20% et celui des aromatiques de 7%.

Ces relations ne sont évidemment valables que pour une hypothétique souche moyenne, qui représenterait l'ensemble des individus testés. En réalité, les souches individuelles se répartissent de part et d'autre de ces valeurs théoriques.

Si l'on considère une microbiocénose mixte, ce qui est le cas dans le milieu naturel, la relation peut valablement s'appliquer : deux populations dont l'activité globale est différente auront en fait un écart d'activité identique sur les deux fractions.

Ceci implique qu'une différence dans le potentiel de biodégradation de deux populations est beaucoup plus liée à leur niveau général d'activité qu'à une différence dans leur spectre.

Ce point est confirmé par le fait que dans toutes les études de biodégradation *in situ*, on a relevé une remarquable constance dans le processus, où l'on note la dégradation systématique des mêmes composés, et la persistance des mêmes structures moléculaires (Oudot 1984).

Sur l'ensemble des souches individuelles, les plus actives sur le pétrole total sont, par ordre décroissant :

Acinetobacter ID38 (34.3%), *Bacillus* ID36 (32.2%), coryneforme IR02 (31.8%), *Flavobacterium* ID39 (31.3%), *Pseudomonas alcaligenes* IM08 (27.2%), le plus actif des actinomycètes identifié est *Nocardia* GC06 (22.2%).

Sur les saturés, l'activité maximale a été relevée chez :

Flavobacterium ID39 (58.5%), coryneforme IR02 (56.8%), *Pseudomonas alcaligenes* IM08 (56.6%), *Acinetobacter colcoeticus* ID38 (55.7%), *Bacillus* ID36 (52%) et *Nocardia* GC06 (51.8%).

Au niveau des aromatiques, les souches les plus performantes sont :

Alcaligenes faecalis IM05 (22%), *Pseudomonas* sp. IM06 (21.2%), coryneforme IR02 (21%), *Pseudomonas alcaligenes* IM07 (20.4%), *Bacillus* ID36 (20.3%), *Bacillus* ID20 (20.2%), *Rhodococcus* IS01 (20%).

Sur les résines, un nombre restreint de souches seraient actives :

Micrococcus luteus IS31 (13%), *Arthrobacter* MT04 (11.6%), *Rhodococcus* MC31 (10%), GT32 (9.4%) et IR03 (9%).

Pseudomonas alcaligenes IM07 (13%), *Pseudomonas diminuta* IM04 (11%), *Alcaligenes* IM05 (9.3%), *Micrococcus luteus* IM10 (9.3%) seraient les quelques rares souches attaquant légèrement les asphaltènes. La nette augmentation de la masse de cette fraction presque systématiquement observée chez les actinomycètes est surtout due au fait que des produits du métabolisme précipitent avec l'hexane en même temps que les asphaltènes pétroliers.

Ces produits pourraient soit dériver plus ou moins directement des hydrocarbures (bioconversion) ou être des composés constitutifs de la cellule synthétisés par les actinomycètes au cours de leur croissance et peut-être liés aux parois cellulaires de ces bactéries particulières (Bergey's).

Ce point mériterait une étude plus approfondie. Toujours est-il qu'il existe des différences entre les actinomycètes et les autres genres, liées à une biologie de développement et à un métabolisme différent.

Il faut aussi signaler que cette augmentation de masse de la fraction asphaltène a pour cause le protocole expérimental utilisé qui ne permet pas de séparer efficacement les produits polaires du métabolisme et les produits pétroliers. Ce facteur gêne l'observation de l'éventuelle dégradation d'une partie des asphaltènes, et il n'est pas exclu que dans certains cas une dégradation réelle soit masquée par une accumulation équivalente ou supérieure de produits du métabolisme. Ce n'est que lorsque l'on mesure une diminution de la masse de la fraction que l'on peut conclure à une réelle biodégradation, vraisemblablement alors sous-estimée, de la fraction. Ceci n'a été observée que chez les quelques rares souches individuelles signalées plus haut.

On ne confirme pas ici l'activité sur les asphaltènes de certaines souches de *Nocardia* qui avait été précédemment observée (Oudot et al. 1986).

En tout état de cause, l'activité sur la fraction asphaltique devrait être vérifiée, et les études approfondies dans ce domaine.

On remarque que les souches les plus actives proviennent presque toutes du milieu marin tropical, et surtout que les performances sur toutes les fractions peuvent être extrêmement voisines chez des espèces taxonomiquement très éloignées.

Il est très intéressant de noter que pratiquement un représentant de chaque genre est présent dans le palmarès des souches les plus performantes. Ceci pourrait indiquer que le pool génétique correspondant à l'activité enzymatique sur les hydrocarbures est largement diffusé à l'intérieur du nombre assez restreint de genres actifs, même si l'on sait que des bactéries différentes empruntent souvent des voies métaboliques distinctes pour l'assimilation d'un même hydrocarbure (Walker et al. 1974; Atlas 1984).

Il faut aussi noter que les cultures mixtes sont au maximum aussi actives, mais pas plus, que la souche la plus active qui en fait partie. C'est ce qui explique que les performances des cultures mixtes d'Indonésie sont supérieures à celles des sols tempérés, puisqu'il en est de même au niveau des souches individuelles les plus performantes de chaque biotope.

3.2 Relations taxonomie/capacité dégradative

Pour chaque genre représenté par un nombre suffisant d'individus, nous avons regroupé l'ensemble des souches actives, sans tenir compte de leur origine, et nous avons comparé par l'analyse de variance les capacités dégradatives des différents genres vis-à-vis du pétrole total et de ces fractions. Le tableau 29 et l'histogramme 19 indiquent la moyenne et l'écart-type du taux de biodégradation de chacune des fractions.

Tableau 29 et Histogrammes 19. Taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par les genres bactériens les plus représentés

	<i>Nocardia</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Pseudomonas</i>
Pétrole brut	15.4 ± 3.8	16.7 ± 3.4	17.2 ± 3.2	23.4 ± 7	21.2 ± 3.2
Saturés	31.7 ± 10.8	34.5 ± 6.1	32.8 ± 6.7	40.1 ± 11.6	40.2 ± 7.8
Aromatiques	11.1 ± 3.1	10.2 ± 6	12.5 ± 3.8	14.3 ± 5.1	15.4 ± 4.5
Résines	2 ± 5.6	- 0.2 ± 8.8	1.1 ± 6.6	0 ± 4.2	- 0.8 ± 4.1
Asphaltènes	-16.3 ± 13.4	-18.7 ± 12.3	-22.9 ± 9.3	2 ± 3.2	3.9 ± 6.4

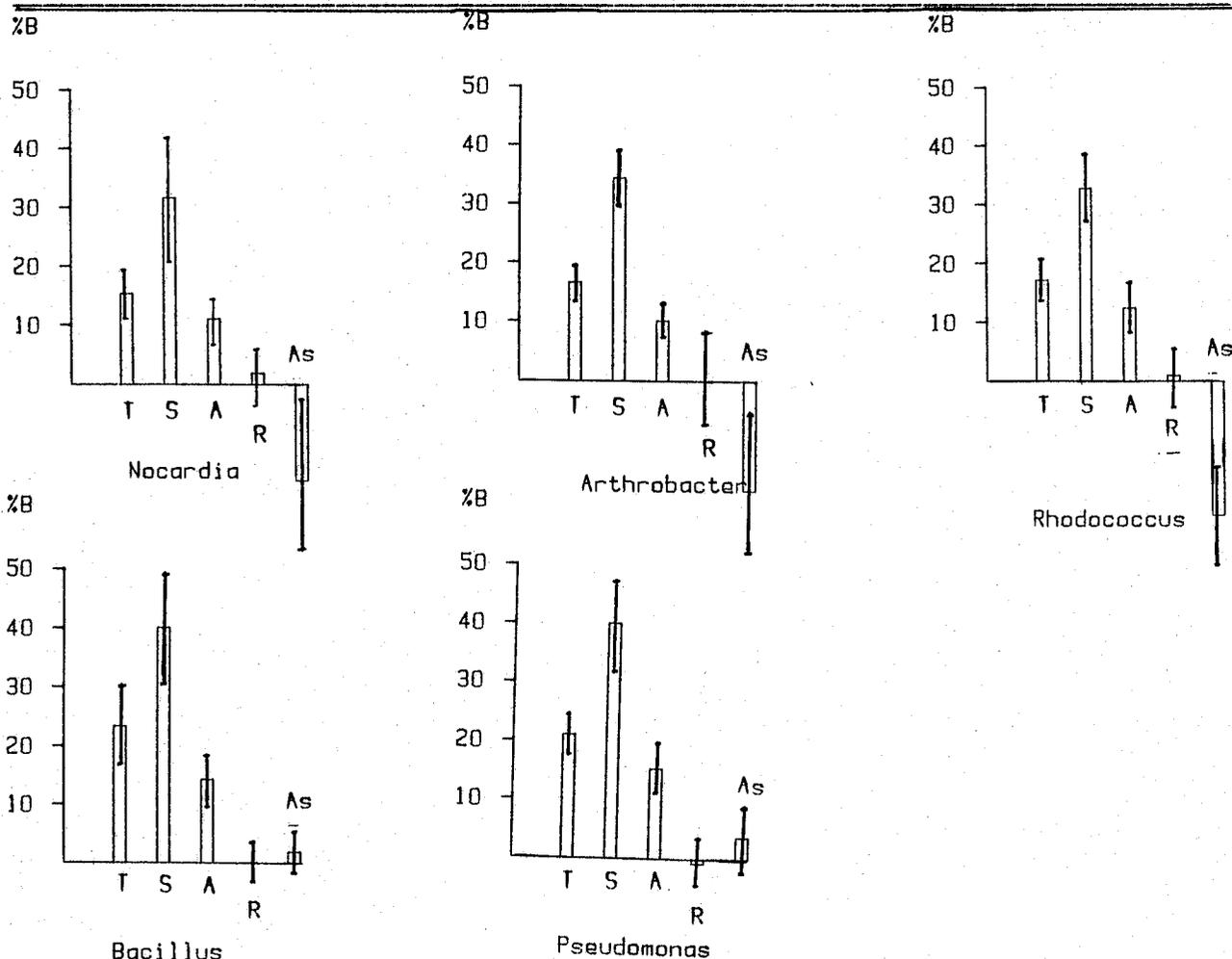


Tableau 30. Comparaison de l'activité des genres vis-à-vis du pétrole total et de ses fractions

Pétrole brut	:	<i>Bacillus</i>	=	<i>Pseudomonas</i>	>	<i>Rhodococcus</i>	=	<i>Arthrobacter</i>	=	<i>Nocardia</i>
Saturés	:	<i>Bacillus</i>	=	<i>Pseudomonas</i>	>	<i>Arthrobacter</i>	=	<i>Rhodococcus</i>	=	<i>Nocardia</i>
Aromatiques	:	<i>Pseudomonas</i>	=	<i>Bacillus</i>	>	<i>Rhodococcus</i>	=	<i>Nocardia</i>	=	<i>Arthrobacter</i>
Résines	:	<i>Pseudomonas</i>	=	<i>Bacillus</i>	=	<i>Rhodococcus</i>	=	<i>Nocardia</i>	=	<i>Arthrobacter</i>
Asphaltènes	:	<i>Pseudomonas</i>	=	<i>Bacillus</i>	>	<i>Nocardia</i>	=	<i>Arthrobacter</i>	=	<i>Rhodococcus</i>

= différence non significative P>0,05

> différence significative 0,01<P<0,05

L'analyse de variance sépare deux groupes de genres : d'une part les actinomycètes : *Rhodococcus*, *Arthrobacter* et *Nocardia* qui forment un groupe homogène, et d'autre part les genres *Pseudomonas* et *Bacillus* auxquels on peut adjoindre *Acinetobacter* non inclus dans l'analyse de variance.

Au niveau du pétrole total et des saturés, les genres *Acinetobacter*, *Pseudomonas* et *Bacillus* sont significativement plus actifs que les actinomycètes.

En ce qui concerne les aromatiques, *Pseudomonas* et *Acinetobacter* sont les genres les plus actifs et *Arthrobacter* le moins efficace, l'écart d'activité étant plus restreint.

Aucun genre ne dégrade significativement les résines. On relève aussi une nette différence au niveau des asphaltènes. Chez les genres *Acinetobacter*, *Pseudomonas* et *Bacillus*, l'activité serait statistiquement nulle, alors que l'augmentation de cette fraction, déjà évoquée, est la règle chez les actinomycètes.

S'il existe bien des différences génériques statistiques dans les capacités dégradatives des grands groupes bactériens (Actinomycètes, *Bacillus*, *Pseudomonas*), les écarts entre les performances individuelles des souches à l'intérieur d'un genre donné ou même d'une espèce ne permettent pas d'attribuer une valeur de critère taxonomique au caractère "biodégradation des hydrocarbures".

3.3 Influence du biotope

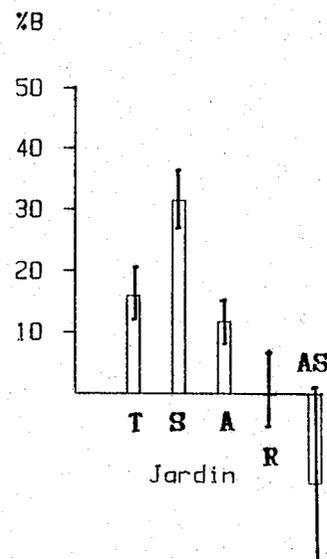
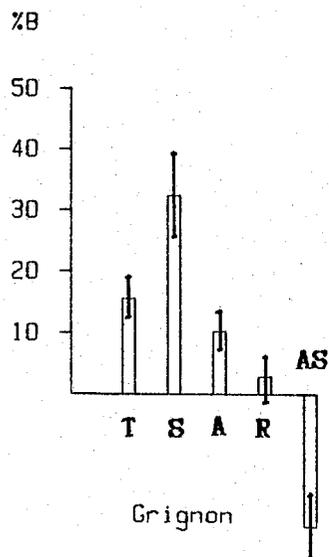
De la même façon, on a comparé par l'analyse de variance les moyennes des performances de biodégradation des souches, regroupées cette fois en fonction de leur origine, indépendamment de leur position taxonomique.

- Comparaison Grignon-Jardin (Tableau 31)

Tableau 31 et Histogrammes 20. Biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par les souches actives des deux sols (valeurs moyennes \pm écart type)

	PB	S	A	R	AS
Grignon	15.6 \pm 3.7	32.4 \pm 8.6	10.3 \pm 3.8	2.9 \pm 4	-21.7 \pm 5.3
M.N.H.N.	16 \pm 4	31.5 \pm 7.1	11.8 \pm 3.3	-0.24 \pm 7.5	-14.8 \pm 15.8
Test F	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S

N.S : différence non significative

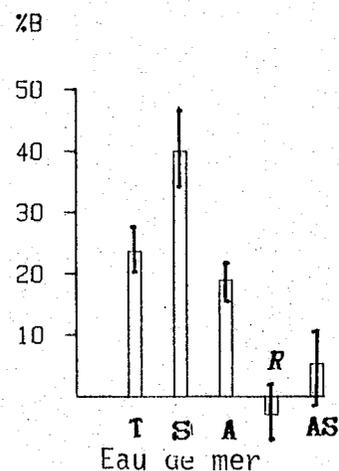
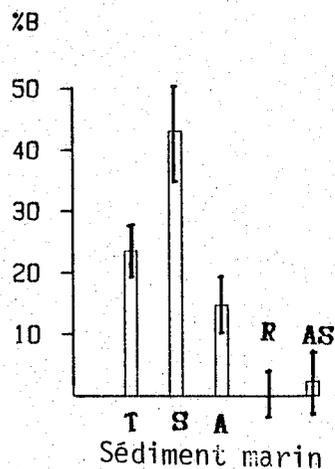


L'analyse statistique sur l'ensemble des données individuelles montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les taux de biodégradation du pétrole et de ses classes obtenus par les souches isolées du jardin et celles originaires du sol agricole ($P < 0.05$).

- Milieu marin tropical : comparaison sédiment-eau de mer

Tableau 32 et Histogrammes 21. Biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par les souches du sédiment marin et d'eau de mer (valeurs moyennes \pm écart-type)

	PB	S	A	R	AS
Sédiment	23.6 \pm 5.5	43.2 \pm 9.4	14.8 \pm 4.4	- 0.1 \pm 3.6	2.4 \pm 5.1
Eau	21.8 \pm 3.3	40 \pm 7.6	18.9 \pm 3	- 3 \pm 4.4	5.3 \pm 6.7
Test F	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S

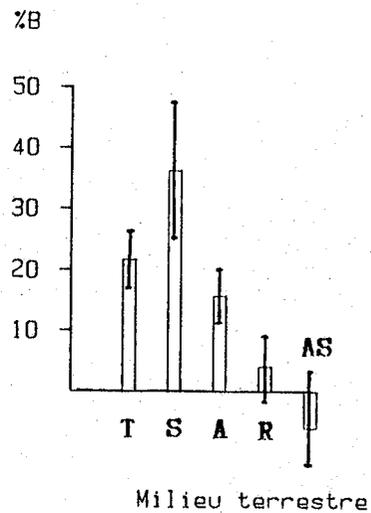
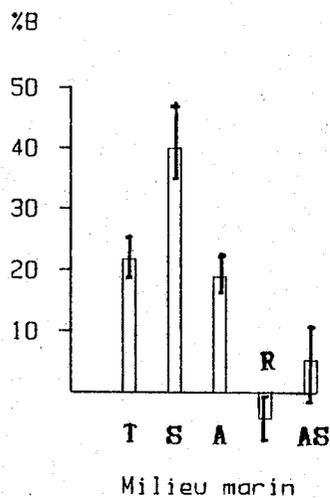


L'analyse de variance n'indique pas de différence significative entre les deux compartiments du milieu marin.

Zone tropicale : Comparaison milieu marin - milieu terrestre

Tableau 33 et Histogrammes 22. Taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions obtenus par les souches du milieu terrestre et du milieu marin (valeurs moyennes \pm écart-type)

	PB	S	A	R	AS
Marin	21.8 \pm 3.3	40 \pm 7.6	18.9 \pm 3	- 4.3 \pm 3.8	5.3 \pm 6.7
Terrestre	21.7 \pm 4.5	36.3 \pm 11.2	15.8 \pm 4.8	4.2 \pm 5.8	- 6.1 \pm 10.2
Test F	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S



On ne note pas dans ce cas non plus de différence significative.

- Comparaison générale

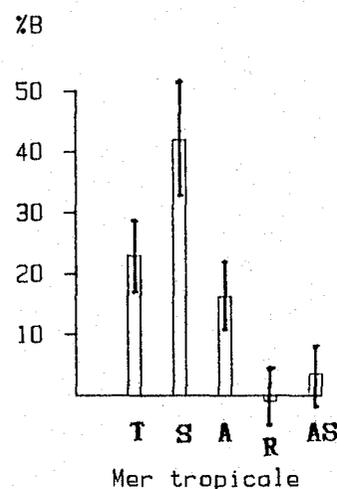
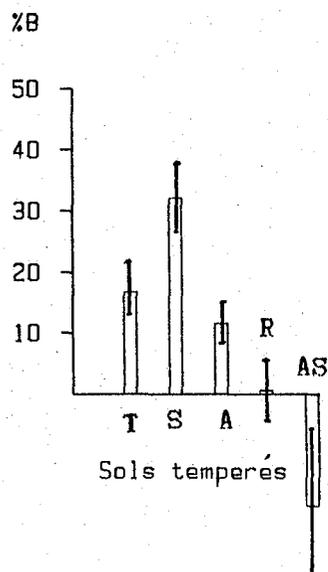
Si l'on regroupe tous les résultats précédents, on relève une différence significative entre l'ensemble du sol tempéré et l'ensemble du milieu marin tropical qui constituent ainsi deux groupes statistiques séparés et homogènes (Tableau 34 et Histogramme 23). Globalement, les souches du milieu marin sont significativement plus actives sur le pétrole total (23 contre 16%), sur les saturés (42 contre 32%) et sur les aromatiques (16% contre 11%). L'activité sur les résines est nulle dans tous les cas. En ce qui concerne les asphaltènes, on ne note pas de dégradation dans le milieu marin tropical et une augmentation de leur masse dans les sols tempérés.

En fait, ces résultats ne font que confirmer l'influence de l'activité relative des différents genres, et l'on se souvient que la population des sols est surtout constituée d'actinomycètes tandis que *Bacillus* et *Pseudomonas*, significativement plus actifs, prédominent dans le milieu marin.

Tableau 34 et Histogrammes 23. Taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions par l'ensemble des souches de la zone tempérée et celles originaires du milieu marin tropical (valeurs moyennes \pm écart-type)

	T	S	A	R	AS
Sols de zone tempérée	16.08 \pm 3.68	32.15 \pm 7.84	11.58 \pm 3.29	0.71 \pm 6.08	-18.31 \pm 12.76
Milieu marin tropical	22.93 \pm 4.8	41.97 \pm 8.87	16.26 \pm 4.29	- 1.04 \pm 3.91	3.53 \pm 5.75
Test F	**	**	**	N.S.	**

** différence hautement significative (P < 0.01)



Ainsi, nos travaux ont permis de mettre en évidence une différence significative d'activité entre les différents genres, malgré tout insuffisante pour en tirer des implications taxonomiques. Au plan de l'écologie microbienne, on confirme aussi l'influence du biotope sur la composition spécifique de la micropopulation.

En revanche, nous ne pouvons pas tirer de conclusion en ce qui concerne l'éventuelle influence du climat (zone tempérée - zone tropicale), car les mêmes biotopes n'ont pas été étudiés dans les deux zones. Le seul biotope commun est le sol, mais si de nombreuses souches d'actinomycètes ont pu être isolées dans les sols tempérés, le nombre très restreint de souches isolées du sol tropical ne permet pas de comparer valablement les deux écosystèmes en terme d'éventuel impact écologique du climat sur l'activité de biodégradation.

On peut cependant noter que si les espèces de *Rhodococcus* d'Indonésie ont globalement la même activité que celles provenant des sols tempérés, certaines souches tropicales de coryneformes non identifiées (IR01, IR02, IR06) ont des capacités dégradatives particulièrement élevées.

Il faut bien considérer que nous avons déterminé les capacités dégradatives des souches dans des conditions favorables et reproductibles de laboratoire, mais que l'activité *in situ* de ces souches (qui définit le pouvoir autoépurateur du milieu) est très largement conditionnée par les conditions écophysologiques de l'environnement local (Rivière et al. 1976; Oudot 1984).

Ainsi il a été observé sur le terrain que le rythme d'élimination des hydrocarbures était 2 à 3 fois plus élevé dans le sol de Grignon que dans les sédiments de la mangrove indonésienne, bien que les souches potentiellement les plus actives aient été isolées dans ce dernier biotope. Le relatif ralentissement de la biodégradation est attribué aux faibles teneurs en azote disponible dans le sédiment de la mangrove (Oudot et al. 1989).

Les points les plus marquants de cette partie de l'étude sont les suivants :

- Les souches isolées présentent plutôt des niveaux d'activité de biodégradation différents que des spectres d'activité distincts.
- Les souches les plus actives ont des capacités dégradatives identiques; on les trouve dans tous les genres étudiés et elles sont aussi efficaces sinon plus que les cultures mixtes (Oudot et al. 1986).
- Il n'existe pas de relation systématique entre la capacité des souches à dégrader les hydrocarbures et les aptitudes métaboliques de ces mêmes souches vis-à-vis des autres sources de carbone.
- Les capacités dégradatives vis-à-vis des hydrocarbures n'ont pas de valeur systématique nette, même s'il est possible de séparer statistiquement les genres par niveau d'activité. La variabilité intragénérique de cette aptitude diffère selon les genres, les actinomycètes (*Rhodococcus*, *Nocardia*, *Arthrobacter*), ainsi que *Pseudomonas* se montrent beaucoup plus homogènes que *Bacillus*.

Il apparaît également que si le nombre de souches actives distinctes est élevé, le nombre (supposé) d'espèces (phénons) et en tous cas le nombre de genres concernés est finalement restreint.

C H A P I T R E V

BIODEGRADATION DES ALCANES : SPECIFICITE ET ACTIVITES-TYPES

Les travaux précédents rapportaient les résultats des mesures globales des capacités dégradatives, déterminées uniquement par la masse des résidus des fractions. Une étude plus détaillée du métabolisme de la fraction saturée a pu être entreprise grâce à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse à haute résolution des résidus de biodégradation de cette fraction.

Cette étude a porté sur les souches individuelles jugées les plus représentatives par rapport à leurs performances gravimétriques de biodégradation et réparties entre les différents genres.

D'autre part, on a aussi déterminé les spectres moyens d'activité de chacun des groupes taxonomiques (phénons) définis au chapitre "identification". Ces chromatogrammes moyens ont été obtenus en mélangeant les résidus de biodégradation de plusieurs souches de chaque phénon, en ne retenant à cet effet que les souches présentant une activité voisine sur la base chiffrée des travaux précédents.

Dans certains cas, plusieurs phénons ont été regroupés jusqu'au niveau du genre. Egalement, les spectres d'activité des cultures mixtes ont aussi été déterminés par cette technique.

Il n'est pas possible de représenter dans ce travail tous les chromatogrammes ainsi obtenus et nous avons défini quatre types distincts de chromatogrammes, correspondant à des spectres ou des niveaux d'activité légèrement différents. Nous avons ensuite réparti toutes nos analyses entre ces quatre types de référence.

1. DEFINITION DES SPECTRES-TYPES D'ACTIVITE

Les quatre spectres-types sont caractérisés par les paramètres distinctifs rapportés dans le tableau 35. Ces caractères sont estimés par rapport au témoin stérile (type 0), et concernent la disparition ou la persistance relative des n-alcane à moyenne et à longue chaîne, des iso-alcane, des isoprénoides pristane et phytane, et des marqueurs biologiques stéranes, triterpanes.

Tableau 35. Paramètres chromatographiques caractéristiques pour la définition des types de biodégradation

Type	n-alcane C ₁₆ -C ₂₀	n-alcane C ₂₁ -C ₄₀	iso-alcane	pristane phytane	stéranes terpanes	UCM
0	++	+++	+++	+++	+++	+++
1	+	+	++	+	+++	+++
2	-	++	+	++	++	++
3	-	-	+	++	++	+
4	-	-	-	-	+	+

Légende : ++ persistence à 100%
 ++ " 80%
 + " 30%
 - " <30%

Pour chacun des types, un chromatogramme caractéristique est représenté dans les figures 15, 16, 17, 18, 19.

- Le chromatogramme initial (témoin) est rappelé à la figure 15.

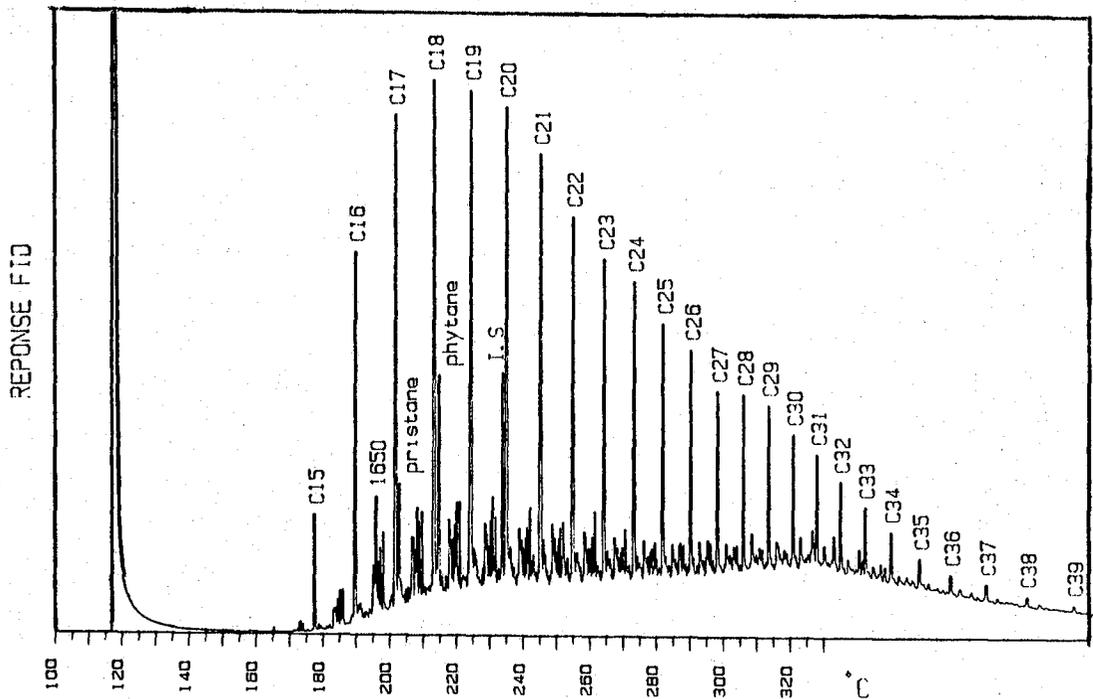


Figure 15. Chromatogramme caractéristique (Type 0)

- Type I : Le modèle retenu est celui de la souche coryneforme MC01 (figure 16). On relève en particulier une nette persistance des n-alcanes dans toute la gamme des poids moléculaires.

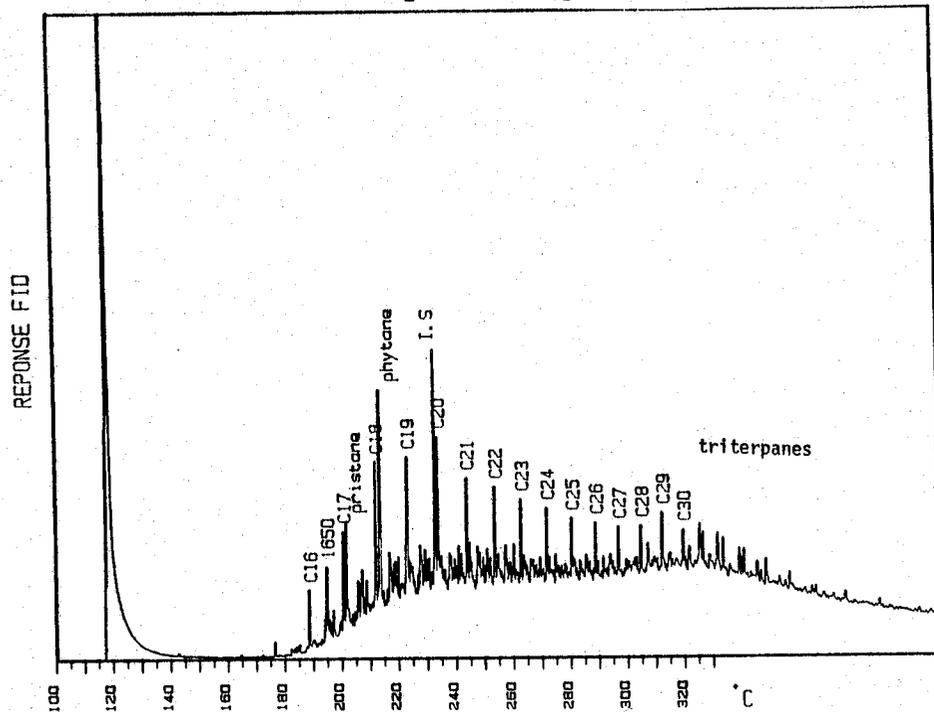


Figure 16. Chromatogramme caractéristique (type I)

- Type II : Modèle *Nocardia* MC05 (Fig. 17). Il est à noter la dégradation préférentielle des alcanes à longue chaîne.

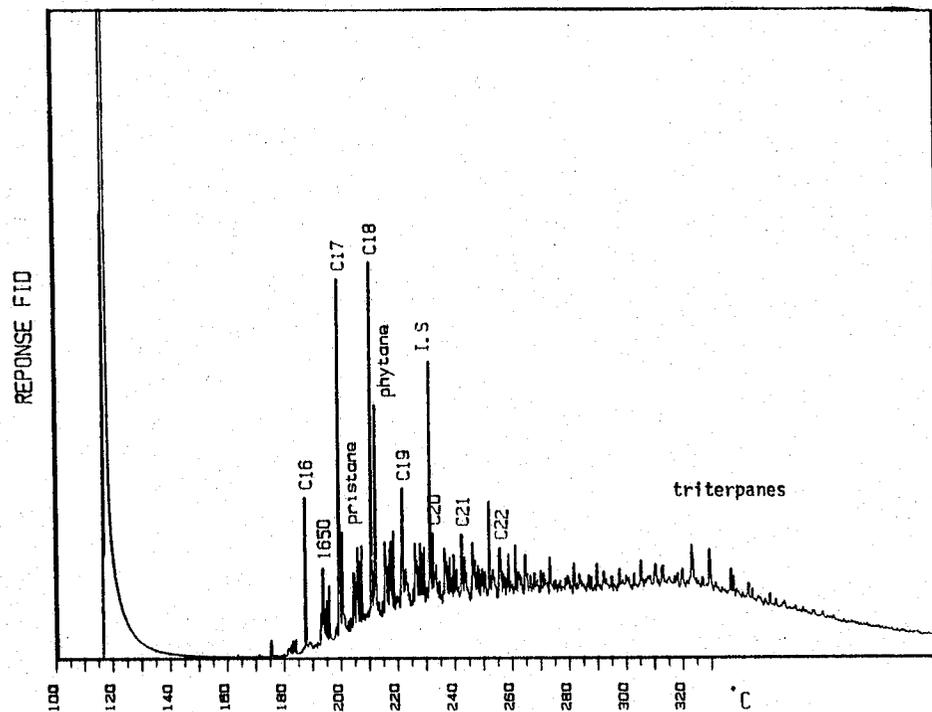


Figure 17. Chromatogramme caractéristique (Type II)

- Type III : Exemple *Aeromonas salmonicida* ID40. Les seuls composés non dégradés sont les isoprénoïdes pristane/phytane et les marqueurs biologiques (Fig. 18).

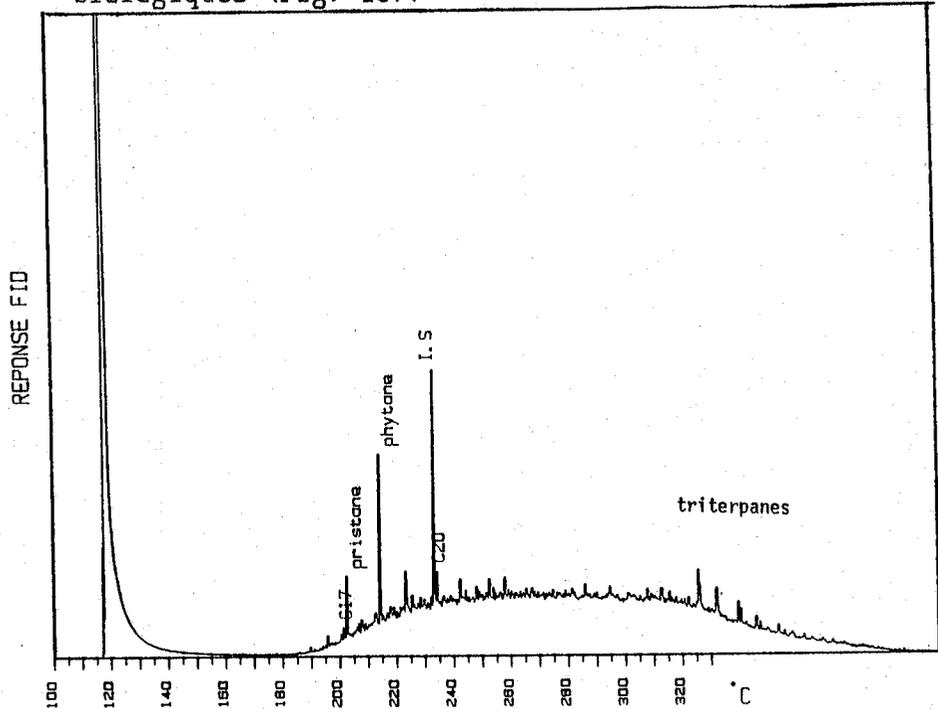


Figure 18. Chromatogramme caractéristique (Type III)

- Type IV : L'exemple est *Bacillus* ID08. Seuls les marqueurs biologiques résistent à la biodégradation (Fig. 19).

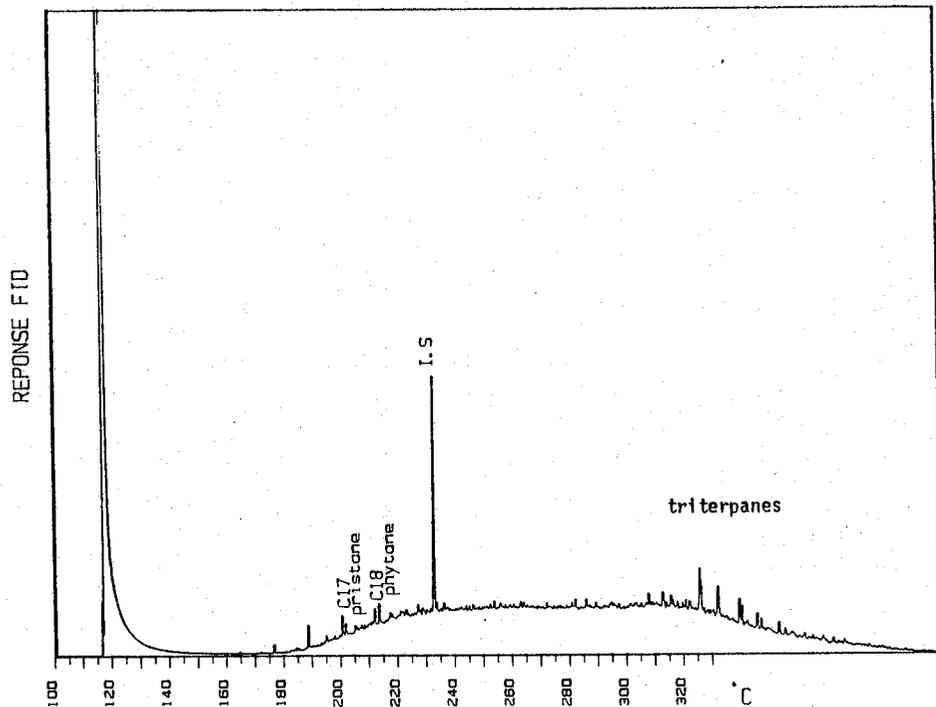


Figure 19. Chromatogramme caractéristique (Type IV)

2. POSITION TAXONOMIQUE ET ACTIVITES-TYPES

L'ensemble des résultats des analyses chromatographiques, traduits selon ces critères, est exposé dans le tableau 36 qui indique le type de biodégradation des souches individuelles des phénons et dans certains cas des genres. En complément, un rappel synthétique de l'ensemble des caractères de chacune des souches étudiées est présenté à l'Annexe.

Tableau 36. Type de biodégradation de la fraction saturée par les genres et par les souches individuelles

Phénon	Groupes ou Genre	Type	Souche individuelle	Type
1-2-3-5-6	<i>Rhodococcus</i>	3	IS01	4
			GT04	3
			MC02	3
			MC15	3
			MT04	3
4	<i>Arthrobacter</i>	3	MC15	3
			MT04	3
Coryneforme			MC01	1
Coryneforme			IR01	4
11	<i>Micrococcus luteus</i>		IM10	3
12-13	<i>Nocardia</i>	3/4	MC07	2
			GC06	3
			GC05	4
15	Nocardioforme	3	MC34	4
1-6	<i>Bacillus</i>		ID36	4
17	<i>Nocardia</i>	2	MC05	2
19-20	<i>Bacillus</i>		ID33	1
			ID08	4
			ID32	4
<i>Aeromonas</i>			ID40	3
32	<i>Pseudomonas putida</i>	3	IM31	3
<i>Alcaligenes</i>			IM05	3
34	<i>Acinetobacter colcoacticus</i>	4	ID38	4
35-36	<i>Pseudomonas diminuta</i>	3	IM04	3
			IM01	3
37	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	4	ID44	3
<i>Flavobacterium</i>			ID39	4
Culture mixte sol-rivière				4
Culture mixte milieu marin				4
Culture mixte jardin				3

Le type III apparaît largement prédominant, il est caractéristique d'une forte activité de biodégradation concernant pratiquement tous les composés de la gamme séparée par GC2. Ce type se retrouve dans presque tous les genres étudiés.

Le type IV correspond à une activité encore plus élevée, qui conduit à l'élimination totale du pristane et du phytane. Ce type est relevé aussi bien chez des représentants du genre *Nocardia* que chez *Bacillus*, *Acinetobacter* et *Flavobacterium*.

En revanche, le type I traduit un niveau général d'activité plus faible sur tous les composés, visible chez certaines souches de coryneforme, de *Micrococcus* et de *Bacillus* (Annexe 1).

Le type II est caractéristique de souches de *Nocardia* dont l'activité globale est la plus faible. Il traduit chez ces souches un équipement enzymatique spécifiquement efficace sur les n-alcanes à longue chaîne, et déficient sur les alcanes courts.

3. DISCUSSION

Nous confirmons que chez les souches les plus actives, un équipement enzymatique complet est présent qui leur permet d'attaquer toute la gamme des composés biodégradables du pétrole avec une efficacité tout aussi élevée que les cultures mixtes. De plus, on n'observe pas une spécificité d'action sur une classe ou une catégorie particulière d'hydrocarbures. Cette constatation va à l'encontre d'une idée autrefois largement répandue qui considérait que les cultures mixtes étaient systématiquement plus actives que les cultures pures (Miget et al. 1973; Shelton et Tiedje 1984; Guerin et Jones 1988). En fait, les écarts de performances souvent évoqués entre différentes souches actives sont relevés dans des essais de culture sur des hydrocarbures purs. Les phénomènes de cooxydation n'avaient alors pas la possibilité de s'exprimer, comme lorsque le substrat est un pétrole brut total. Ce n'est que chez les souches réellement très peu actives que l'on met en évidence un déficit d'efficacité sur des catégories précises de composés. C'est alors la preuve d'un équipement enzymatique incomplet. Très généralement, les différences relevées entre les souches moyennement actives reflètent plus des différences dans des niveaux d'activité que des spectres d'activité distincts.

Un autre point important à souligner est que le pool génétique correspondant à cette activité complète est très largement réparti dans des groupes bactériens taxonomiquement très éloignés, ce qui laisse supposer qu'il s'agit d'une capacité métabolique certainement très ancienne sur le plan phylogénique.

Enfin, si certains genres, tels *Rhodococcus*, ou espèces comme chez *Pseudomonas*, sont remarquablement homogènes dans cette activité métabolique, la variabilité observée par exemple chez *Nocardia* ou *Bacillus* confirme bien que l'on ne peut pas accorder de valeur taxonomique fiable à ce caractère.

C H A P I T R E VI

CINETIQUE DE LA BIODEGRADATION

Toutes les mesures précédentes des capacités dégradatives ont été effectuées sur des cultures âgées de un mois. Or on sait que la biodégradation évolue en fonction du temps d'incubation (Oudot 1984). Pour apporter des informations complémentaires, nous avons suivi l'évolution du taux de biodégradation en fonction du temps, du pétrole et de ses fractions, dans des cultures non renouvelées d'une durée maximum de trois mois. Cette étude de la cinétique de la biodégradation a porté sur 4 souches d'actinomycètes originaires du sol de Grignon, et répartie dans quatre phénons taxonomiques distincts : deux *Rhodococcus* (GT04 et GT32) et deux *Nocardia* (GC05 et GC06).

Chaque souche a été testée en culture pure et leur activité a été comparée à celle de la culture mixte de ces quatre souches. Les taux de biodégradation ont été mesurés après 4, 8, 15, 30, 60 et 90 jours.

1. PERFORMANCES INDIVIDUELLES DES SOUCHES

Les résultats de l'évolution de l'activité dégradative des deux souches de *Rhodococcus* en fonction du temps sont rapportés dans le tableau 37 et ceux correspondant aux deux souches de *Nocardia* dans le tableau 38.

Tableau 37. Cinétique de biodégradation des deux souches du genre Rhodococcus

	Jours	T	S	A	R	AS
<i>Rhodococcus</i> GT04	4	9.6	22.5	8.8	8.2	- 8.3
	8	9	21.2	9.5	5.4	- 5.4
	15	15.7	24.5	8.5	4.6	-13.3
	30	15.8	36.4	10	7.8	-10.6
	60	16	37.8	11	8.1	- 8.7
	90	17.2	34.5	11.7	3.7	4.7
<i>Rhodococcus</i> GT32	4	8.5	19	7.2	7.3	-25
	8	10	18.3	8.5	4.5	-17.6
	15	15	31	9.6	8.5	-18.7
	30	13.3	32.8	7	5	-20.7
	60	14.4	34.2	8.6	5.7	-12.2
	90	14.6	35.1	9.5	3	- 3.5

Tableau 38. Cinétique de biodégradation des deux souches de *Nocardia*

	Jours	T	S	A	R	AS
<i>Nocardia</i> GC05	4	9.8	25.7	8.4	- 2.7	-32.5
	8	15.1	33.2	7.5	- 1.7	-15.4
	15	17	40.3	8.1	- 2	-16.9
	30	17	40.2	8.4	- 6.4	-19.7
	60	17.7	47.2	6.1	- 7.1	-13
	90	20	50.7	7.6	- 9	-15
<i>Nocardia</i> GC06	4	12.8	26.6	14.1	4.6	-25
	8	12.7	31.8	14	- 9.8	-29.5
	15	15.4	42.5	9.6	- 8.5	-12.4
	30	19	42.5	14.8	- 6.8	-18.5
	60	22.4	48.4	15.3	- 9.2	-15.4
	90	23.5	53.7	16.7	-10.8	- 6

La cinétique de la culture mixte est estimée dans le tableau 39.

Tableau 39. Cinétique de biodégradation de la culture mixte

	Jours	T	S	A	R	AS
Culture mixte	4	7.2	-	7.4	8.5	- 9.5
	8	11	27	8.2	7.4	-13.5
	15	15	32.6	12.2	8	-12.6
	30	16	34.3	13.4	11.8	-13
	60	15.8	35.8	15	10.6	-15.2
	90	18	33.4	14.2	13.6	-18.8

Un point à noter est que les valeurs mesurées au bout d'un mois sont tout à fait comparables aux résultats obtenus par les mêmes souches dans des cultures précédentes (cf. Chap. IV, 1).

Dans tous les cas, on note une évolution similaire dans les taux de biodégradation. L'activité sur toutes les fractions est sensible dès le quatrième jour, elle augmente régulièrement pour atteindre son niveau maximum entre le quinzième et le trentième jour.

On ne relève pas de différence significative d'activité entre les deux souches d'un même genre. *Nocardia* GC05 et GC06 d'une part, et *Rhodococcus* GT04 et GT32 d'autre part se comportent de façon remarquablement semblable. Cependant, et pour les souches considérées, *Nocardia* est plus actif que *Rhodococcus* sur les saturés. L'activité est identique sur les aromatiques et seul *Rhodococcus* se montre faiblement actif sur les résines.

On peut remarquer que les performances de la culture mixte sont plus proches de celles de *Rhodococcus* que de *Nocardia* et l'on peut en déduire que *Rhodococcus* a été dominant dans la compétition au cours de développement des souches dans la culture mixte. Ce point a été confirmé par des étalements sur plaques de gélose nutritive en fin de culture, qui comportaient à l'examen visuel une majorité de *Rhodococcus*.

2. CINÉTIQUE MOYENNE

Les performances des souches individuelles et de la culture mixte étant assez voisines, il est possible de tracer la courbe moyenne de la cinétique de la biodégradation sur l'ensemble des données (Tableau 40 et figure 20).

Cette courbe est représentative de la cinétique de la biodégradation de quelques actinomycètes du sol, en cultures non renouvelées.

Tableau 40. Cinétique moyenne de biodégradation

Jours	T	S	A	R	AS
4	9.6 ± 2.1	23.5 ± 3.4	9.2 ± 2.8	5.2 ± 4.6	-20.1 ± 10.6
8	11.6 ± 2.6	26.3 ± 6.5	9.5 ± 2.6	1.8 ± 6.8	-16.3 ± 8.7
15	15.6 ± 0.8	34.2 ± 7.3	9.6 ± 1.6	2.1 ± 7.3	-14.8 ± 2.8
30	16.2 ± 2.1	37.2 ± 4	10.7 ± 3.3	2.3 ± 8.5	-16.5 ± 4.4
60	17.3 ± 3.1	40.7 ± 6.6	11.2 ± 4	1.6 ± 9	-12.9 ± 2.7
90	18.7 ± 3.3	41.5 ± 9.8	11.9 ± 3.6	0.1 ± 10.1	- 7.7 ± 9.3

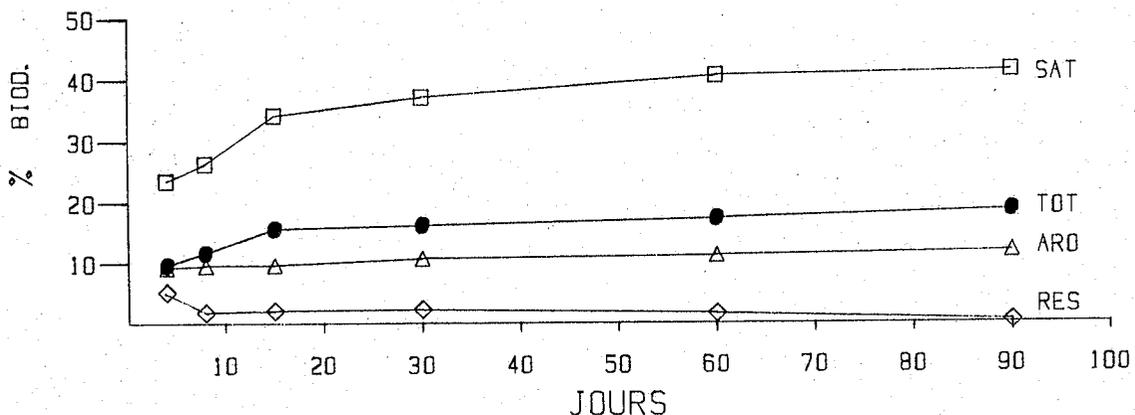


Figure 20. Courbe moyenne de la cinétique de biodégradation

La biodégradation est rapide au début de l'essai (entre 0 et 8 jours), elle ralentit progressivement et se stabilise par la suite. La biodégradation totale atteint environ 20%, la fraction saturée est la plus dégradée (42%). La biodégradation des aromatiques plafonne aux alentours de 12%, tandis que les résines ne sont pas significativement attaquées, non plus que les asphaltènes. Ces valeurs ne sont pas parmi les plus élevées enregistrées, et on rappelle que certaines souches individuelles présentaient au bout d'un mois des performances nettement supérieures (cf. Chap. IV, 3.1).

On confirme ici que dans des fioles fermées, le taux maximum de biodégradation est effectivement pratiquement atteint au bout d'un mois, ce qui justifie le protocole expérimental utilisé dans la mesure des capacités dégradatives (Oudot 1979). On rappelle que la limitation de la biodégradation en fiole fermée due à l'auto-intoxication du milieu de culture serait levée par des techniques de culture continue (Pritchard et al. 1976; Bertrand et al. 1983; Oudot 1984), qui permettraient d'atteindre des taux significativement plus élevés.

L'allure logarithmique des courbes qui représentent la biodégradation du pétrole total, des saturés et des aromatiques traduit la nécessité pour les microorganismes d'utiliser des substrats de plus en plus complexes et plus longs à métaboliser. Le rythme rapide du départ correspond à l'assimilation aisée des hydrocarbures très dégradables, tels les n- et iso-alcanes et monoaromatiques.

Ces points sont confirmés par l'analyse chromatographique des résidus saturés après 4, 15 et 20 jours d'incubation (Fig. 21).

Les n-alcanes sont totalement dégradés avant 4 jours; il persiste encore une partie des iso-alcanes, les isoprénoides PR et PH et les marqueurs biologiques. Au quinzième jour, on n'observe plus que des traces de PR et PH, avec les marqueurs biologiques qui sont les seuls composés encore visibles au bout de trois mois. Le spectre chromatographique à 3 mois est identique à ce qu'on observe déjà au bout d'un mois chez les souches les plus actives (types III et IV, cf. Chap. V, 1). On confirme bien qu'entre un et trois mois, la biodégradation n'évolue pratiquement plus dans les cultures non renouvelées, du fait des limitations précédemment évoquées.

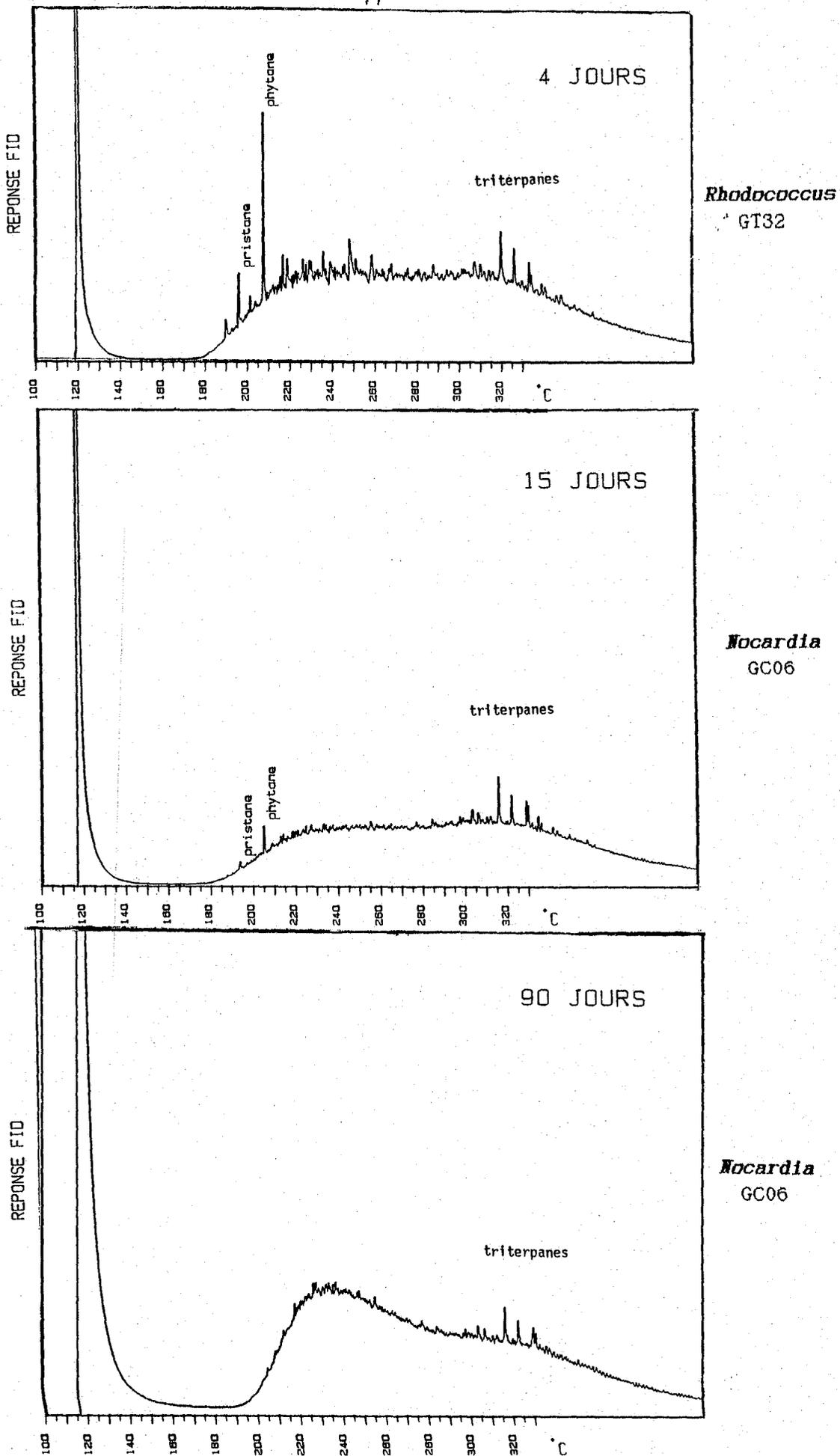


Figure 21. Chromatogrammes des résidus de la fraction saturée du BAL 150 après 4, 15 et 90 jours d'incubation

C H A P I T R E VII

STABILITE DES CAPACITES DEGRADATIVES

Les travaux précédents ont montré qu'il existait, dans tous les milieux étudiés, des souches capables d'assimiler les hydrocarbures. Cette capacité métabolique met en jeu un équipement enzymatique particulier, diversifié en fonction des types moléculaires d'hydrocarbures métabolisés, et dont seuls quelques éléments sont connus avec précision (cf. Chap. I, 3).

Dans ce chapitre, nous avons voulu étudier la stabilité de cette capacité de biodégradation pour une souche donnée, c'est-à-dire si ces potentialités métaboliques se conservaient après une assez longue période de conservation et un nombre élevé de repiquages, qui peuvent être la cause d'une dérive génétique.

Nous n'avons pas abordé le problème d'un point de vue génétique ni enzymatique, mais nous avons étudié la conservation de l'expression de l'activité par l'analyse des résidus de la biodégradation des produits pétroliers.

On peut envisager qu'au cours de cultures successives de la même souche, et selon la nature de l'équipement enzymatique, on puisse observer soit le maintien, soit une augmentation, soit une diminution des capacités dégradatives.

Il est également possible que ces capacités puissent varier selon que le milieu de culture ou de conservation contienne ou non des hydrocarbures.

1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Pour vérifier ces points, on a procédé à des repiquages successifs sur une longue période de souches individuelles, en les maintenant en parallèle soit sur le milieu complet dépourvu d'hydrocarbures, soit sur un milieu synthétique contenant du pétrole comme unique source de carbone (cf. Chap. II, 2.1).

Pour la conservation sur milieu complet, les souches ont été repiquées dans des tubes contenant le milieu gélosé complet M I. L'autre ligne de conservation a été réalisée par des repiquages en tube de culture sur le milieu liquide M III. En effet, des essais préliminaires avaient montré que la croissance des souches était difficile lorsque l'on utilisait le milieu M III gélosé.

Une étude complète a porté sur les premières souches actives que nous avons isolées : les actinomycètes du sol agricole de Grignon. Une étude complémentaire, d'une durée plus courte, a concerné les autres genres actifs originaires d'Indonésie.

2. STABILITE CHEZ LES ACTINOMYCETES DU SOL

Dans ce cas, les repiquages sur les deux milieux ont été effectués une fois par mois, pendant une période de 20 mois. Les capacités dégradatives ont été mesurées après 10 et 20 repiquages selon les méthodes précédemment décrites : extraction et fractionnement du résidu et analyse par GC2 des fractions saturée et aromatique.

L'étude a porté sur les souches suivantes : *Rhodococcus* (GC03, GT03, GC08, GT02, GC02, GT32, GT04), *Nocardia* (GC06, GC04, GC07, GC05), *Arthrobacter* (GC01), nocardioforme (GT01) et coryneforme (GC31).

Les résultats sont donnés au bout de 10 et 20 mois, les souches étant classées par genre et par ordre d'activité décroissante.

- Activité après dix repiquages

Les résultats sont rapportés dans les tableaux 41, 42, 43 et histogrammes 24, 25, 26 qui comparent l'activité des souches conservées d'une part sur un milieu complet (MC) et d'autre part sur un milieu synthétique (MS).

Tableau 41 : Activité de biodégradation après 10 repiquages du genre *Rhodococcus*

<i>Rhodococcus</i>	T		S		A		R		AS	
	MC	MS	MC	MS	MC	MS	MC	MS	MC	MS
GC03	19.3	22	42.8	48.3	7.3	4.2	7.2	4	-24	-32
GT03	19.3	20	41.6	39.5	14.3	9.5	4	4.4	-18	-26
GC08	15.8	19.3	34.1	37.6	5	7.3	8.8	4	-27	-17
GT02	13.1	13.6	32.8	24.4	9.2	8.3	6.5	7.4	-30	-27.8
GC02	10.2	11.1	26.5	24.1	8.7	2.4	-8	3.3	-30	-26.1
GT32	11.3	9.2	34.2	29.5	6	8	6	7.3	-30.7	-27.2
GT04	14.8	13.3	30.7	27.7	9.5	10.3	6	4.8	-17.8	-21

Histogrammes 24. Activité de biodégradation après 10 repiquages du genre *Rhodococcus*

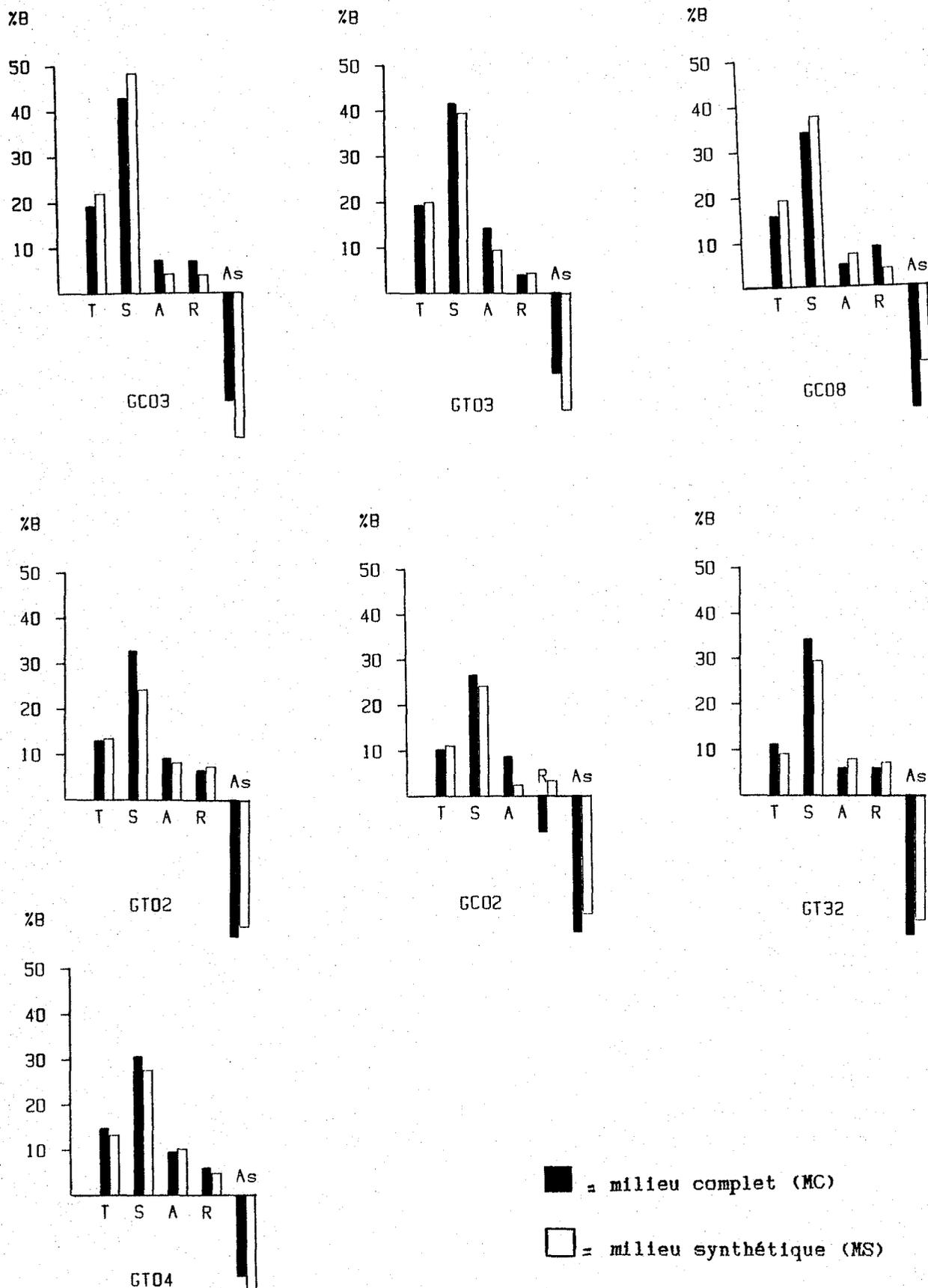
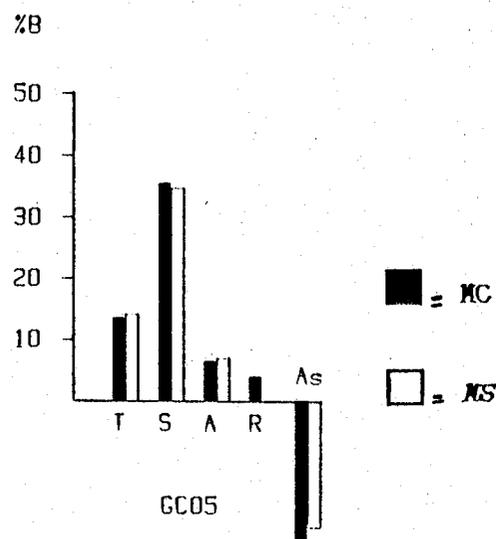
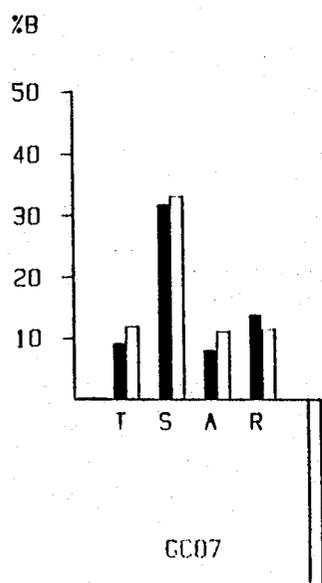
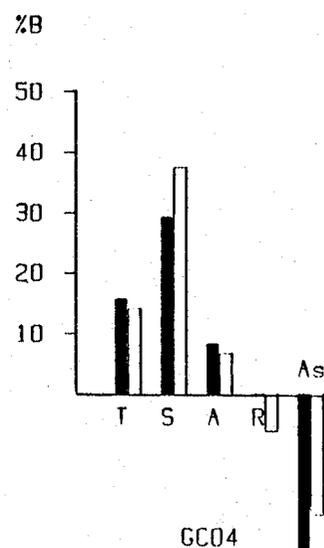
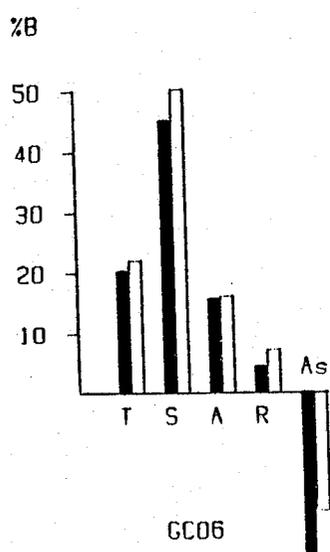


Tableau 42 et Histogrammes 25. Activité de biodégradation après 10 repiquages du genre *Nocardia*

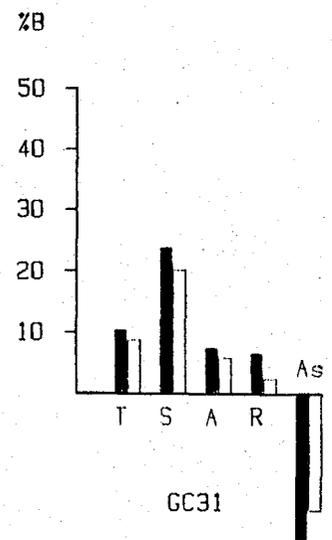
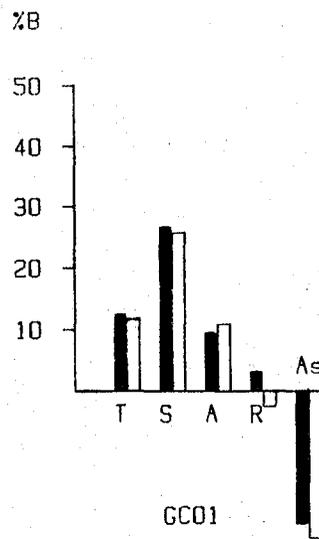
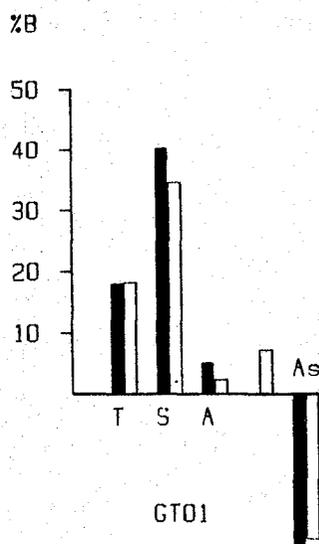
<i>Nocardia</i>	T		S		A		R		AS	
	MC	MS	MC	MS	MC	MS	MC	MS	MC	MS
GC06	20.3	22	45.2	50.3	15.7	16.1	4.4	7.2	-27	-19.3
GC04	15.7	14.2	29.3	37.6	8.3	6.8	0	-6	-25.8	-19.5
GC07	9.1	14	31.8	33.2	8	11.2	13.8	11.6	-	-30.6
GC05	13.5	14.3	35.5	34.8	6.5	7.1	4	0	-23.4	-20.8



■ = MC
□ = MS

Tableau 43 et Histogrammes 26. Activité de biodégradation après 10 repiquages des autres genres

	T		S		A		R		AS	
	MC	MS	MC	MS	MC	MS	MC	MS	MC	MS
nocardioforme										
GT01	17.9	18.2	40.2	34.5	5	2.4	-	7.2	-24.8	-23.2
Arthrobacter										
GC01	12.5	11.9	26.7	25.8	9.5	11	3.2	-2.5	-21.7	-24
coryneforme										
GC31	10.3	8.8	23.7	20.1	7.4	5.9	6.5	2.5	-23.6	-19



■ = MC

□ = MS

- Activité après vingt repiquages

Les tableaux (44, 45, 46) et histogrammes (27, 28, 29) illustrent les performances des souches conservées sur milieu complet et sur milieu synthétique, après vingt repiquages successifs.

Tableau 44 et Histogrammes 27. Activité de biodégradation après 20 repiquages du genre *Rhodococcus*

<i>Rhodococcus</i>	T		S		A		R		AS	
	MC	MS	MC	MS	MC	MS	MC	MS	MC	MS
GC03	18.3	19.3	44.5	44	7.5	8.2	3.1	3.1	-21	-30
GT03	15.4	16	28.3	27	14	13	5.1	-4.2	-18	-29
GC08	22.5	21.6	42.7	40.4	5.3	6.5	-1.3	4.4	-27	-23
GT02	14.1	14.3	29	26.4	11.5	12	2.2	4.4	-22	-21
GC02	12.1	14.3	31.5	35	5	0	4.4	-3.6	-28.5	-23.9
GT32	12.6	8.2	21.8	20	7	10	-1	6	-28.2	-31.3
GT04	15.1	13.8	34.4	32.4	8.2	5.3	9	5.8	-19	-27

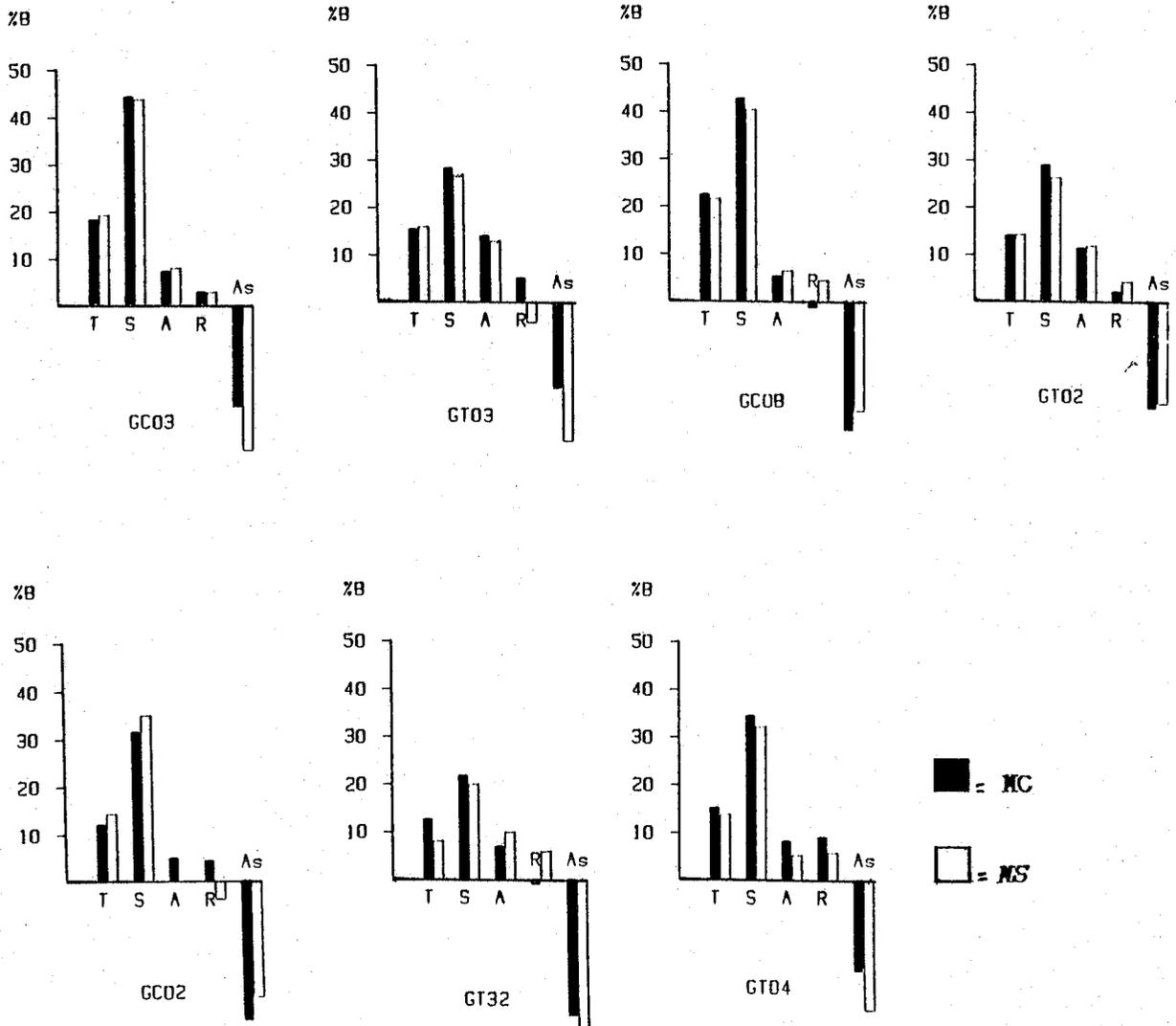


Tableau 45 et Histogrammes 28. Activité de biodégradation après 20 repiquages du genre *Nocardia*

<i>Nocardia</i>	T		S		A		R		AS	
	MC	MS	MC	MS	MC	MS	MC	MS	MC	MS
GC06	24.3	21.3	39.8	38.4	14	10.3	4.4	7.1	-22	-21
GC04	16.8	17	28.2	21.7	11	14	5.8	3.6	-27	-18.8
GC07	13.6	10.4	26.3	25.6	10.6	13.5	13.3	9.8	-25.4	-33.1
GC05	14.2	15	38.3	34.5	5.6	-	3.6	-	-22	-

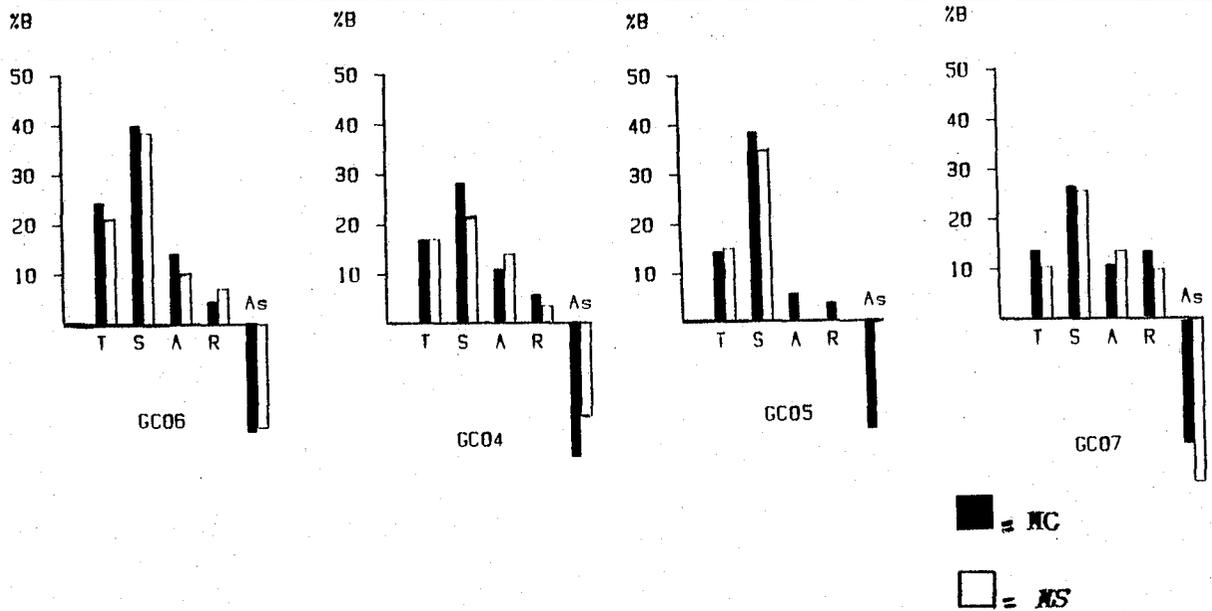
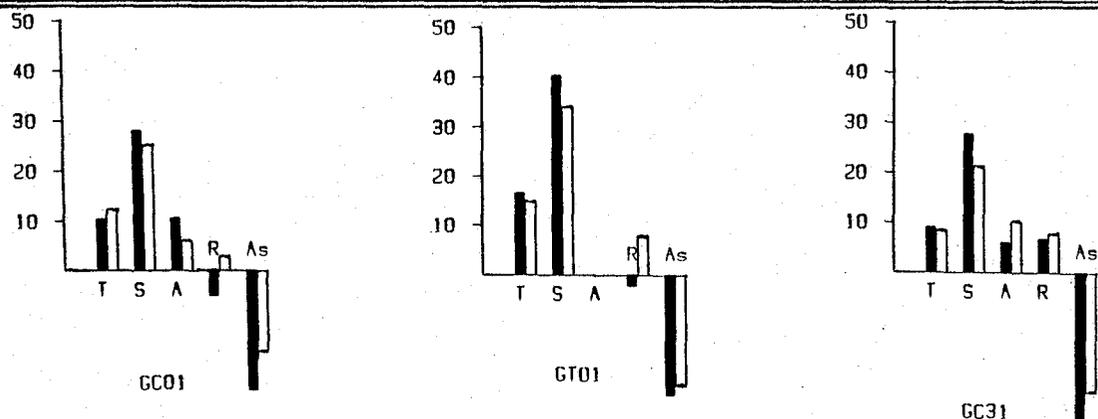


Tableau 46 et Histogrammes 29. Activité de biodégradation après 20 repiquages des autres genres

	T		S		A		R		AS	
	MC	MS	MC	MS	MC	MS	MC	MS	MC	MS
nocordioforme										
GT01	16.5	15	40.4	34.3	0	0	-2.2	8	-23.8	-22
Arthrobacter										
GC01	10.3	12.4	28	25.4	10.5	6	-5	3	-23.8	-16.4
coryneforme										
GC31	9	8.5	27.7	21.4	6	10.3	6.7	7.8	-30	-24



Le tableau 47 récapitule les performances de chaque souche individuelle vis-à-vis du pétrole total. On compare les valeurs initiales obtenues dans un premier temps lors des essais de détermination des capacités dégradatives (Chap. IV, 1.2) à celles relevées après conservation sur le milieu complet, au bout de 10 et 20 repiquages. En fait, les cultures dites initiales de l'essai du chapitre IV ne sont pas les toutes premières cultures réalisées, puisque les étapes de purification ont nécessité pour chaque souche plusieurs passages successifs sur le milieu complet.

Tableau 47. Tableau récapitulatif des performances de chaque souche individuelle vis-à-vis du pétrole total

	Valeur initiale	10 ^e repiquage	20 ^e repiquage
<i>Rhodococcus</i>			
GG03	20	19.3	18.3
GI03	19	19.3	15.4
GC08	21	15.8	22.5
GI02	14	19.1	14.1
GC02	12	10.2	12.1
GI32	13	11.3	12.6
GI04	20	14.8	15.1
<i>Nocardia</i>			
GG06	22	20.3	24.3
GC04	17	15.7	16.8
GC07	15	9.1	13.6
GC05	15	13.5	14.2
<i>nocardioforme</i>			
GI01	16	17.9	16.5
<i>Arthrobacter</i>			
GC01	14	12.5	10.3
<i>coryneforme</i>			
GC31	10	10.3	9

En dépit de quelques variations individuelles, non systématiques, on constate pour chaque souche une remarquable constance du taux de biodégradation du pétrole total, identique quel que soit le temps de conservation considéré.

3. STABILITE CHEZ LES AUTRES GENRES

Elle a été étudiée sur le représentant le plus actif de chacun des genres que nous avons isolés plus tard, à savoir *Acinetobacter calcoaceticus* (ID38), *Pseudomonas alcaligenes* (ID44), *Pseudomonas putida* (IR32), *Pseudomonas* sp. (IM03), *Bacillus* (ID36), *Bacillus* (ID32), *Bacillus* (ID20), *Flavobacterium* sp. (ID39).

On rapporte dans le tableau 48 les résultats de biodégradation atteints juste après l'isolement, puis après 12 repiquages lors de la mesure des capacités dégradatives (cf. Chap. V, 2).

Tableau 48. Taux de biodégradation du pétrole et de ses fractions chez les autres genres (valeurs initiales et au bout d'un an)

Souche	T		S		A		R		AS	
	I	1 an	I	1 an						
ID38 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	37	34	60	58	16.5	20	4	5	5	6
ID20 <i>Bacillus</i>	32	29	51.5	52	15	20	00	00	10	4
IM03 <i>Pseudomonas</i> sp.	31.4	26	46.6	47	20	19	-4	3	-14	-6
ID39 <i>Flavobacterium</i>	31	31	58.8	58	8.3	16	-3	-5	-8	00
ID36 <i>Bacillus</i>	30.4	32	50	52	19	20	10.3	3	-4	4
ID32 <i>Bacillus</i>	30.3	30	56	55	10.8	18	-2	-5	-4	-3.4
IR32 <i>Pseudomonas putida</i>	29.2	21	38.4	38	18	15	4	3	8	8
ID44 <i>Pseudomonas alcaligenes</i>	21.6	22	40	38	00	-	00	-1	6	-5

Comme précédemment, on relève une remarquable stabilité dans les scores de biodégradation observés sur le pétrole total et sur les fractions saturée et aromatique, qui restent très élevés par rapport à l'ensemble des souches considérées dans notre travail. Ainsi, quelque soit le niveau d'activité initial des souches, celui-ci se maintient même après une relativement longue période de conservation.

4. DISCUSSION

Pour compléter ces résultats, nous avons utilisé les techniques de l'analyse de variance dans le but de mettre en évidence une éventuelle influence du milieu de conservation ou du nombre de repiquages sur les capacités dégradatives des souches. Cette comparaison a été faite au niveau des actinomycètes du sol, où le nombre de données est suffisant.

4.1 Influence du milieu de conservation

Pour avoir une vue synthétique globale de l'éventuel effet de l'influence du milieu de conservation, le tableau 49 donne les valeurs moyennes et les variations des taux de biodégradation obtenues par les 14 souches d'actinomycètes, sur le pétrole total et sur les fractions, en regroupant les données du 10ème et du 20ème repiquage, et en séparant les deux milieux.

Tableau 49. Effet du milieu de conservation sur la stabilité des capacités dégradatives

Milieu de conservation	T	S	A	R	AS
Complet	14.9	33.4	8.7	4.1	-24.5
	± 3.9	± 6.6	± 3.1	± 4.8	± 3.8
Synthétique	14.8	31.9	8.1	4.1	24.2
	± 4.2	± 8.2	± 4.1	± 4.2	± 4.7
Test F	NS	NS	NS	NS	NS

L'analyse de variance effectuée sur l'ensemble des données ne met pas en évidence de différence significative entre les deux milieux, complet ou synthétique, quelle que soit la fraction considérée.

Le milieu de conservation n'a donc pas d'influence sur la stabilité des capacités dégradatives des actinomycètes testés, et il n'est pas nécessaire que le milieu de conservation des souches contienne des hydrocarbures pour que cette activité métabolique soit conservée.

4.2 Influence du nombre de repiquage

A partir des mêmes données, il est possible de comparer les taux de biodégradation obtenus par les mêmes souches d'actinomycètes, après 10 et 20 repiquages, cette fois-ci indépendamment du milieu de conservation (Tab. 50).

Tableau 50. Effet du nombre de repiquage sur la stabilité des capacités dégradatives

Nombre de repiquage	T	S	A	R	AS
10	14.8 ± 4	33.7 ± 7.4	8 ± 2.2	4.4 ± 4	-24.5 ± 3.7
20	15.1 ± 4	32.2 ± 6.7	8.2 ± 4.1	4.6 ± 3.8	-24.1 ± 3
Test F	NS	NS	NS	NS	NS

On ne note pas non plus dans ce cas de variation significative des capacités dégradatives entre 10 et 20 repiquages pour aucune des fractions.

Ces résultats démontrent que l'activité de biodégradation des bactéries vis-à-vis du pétrole et de ses fractions chez les souches testées apparaît remarquablement constante, après 10 et 20 repiquages successifs, et que le milieu de conservation contienne ou non du pétrole.

Le fait que les capacités dégradatives soient très stables (pas d'augmentation ou de diminution) est en faveur de l'hypothèse d'un équipement enzymatique stable et qui serait vraisemblablement essentiellement codé par le chromosome. On sait cependant que certaines voies dégradatives peuvent être codées par des plasmides (gènes OCT, TOL, NAH - cf. Chap. I, 2.1). Si tel est le cas chez les souches étudiées, on ne met pas en évidence de perte de ces plasmides, même sur le milieu sans pétrole.

Nos résultats sont bien entendu valables pour les souches étudiées et pour la période de temps considérée. La stabilité des capacités dégradatives n'est pas toujours aussi grande chez d'autres espèces. Par exemple, Iizuka et Komagata (1964) ont montré que des espèces de bactéries à Gram négatif, en particulier des *Pseudomonas*, perdent définitivement leur aptitude à utiliser le kérosène, si elles sont cultivées sur gélose nutritive. A l'inverse, ces mêmes auteurs constatent que des souches des genres *Brevibacterium* et *Corynebacterium* conservent l'aptitude à métaboliser le kérosène après cinq années de conservation. Par ailleurs, Fredricks (1966) a établi qu'une souche de *Pseudomonas fluorescens* et une espèce de *Corynebacterium* dégradent des n-alcanes avec une intensité constante malgré des repiquages successifs sur glucose. Cet auteur en déduisit que le métabolisme de ces composés chez ces bactéries n'est pas lié à des phénomènes d'induction, mais à un système enzymatique constitutif.

Pour notre part, si la majorité des souches que nous avons isolées sont très stables, nous avons également signalé que certaines souches qui s'étaient révélées actives après la culture préliminaire en tube n'ont pas confirmé ces capacités lors de cultures ultérieures (cf. Chap. IV). Plusieurs hypothèses sont possibles à cet égard :

- soit ces souches ont perdu très rapidement leur activité, et de ce fait, leur équipement enzymatique n'était pas constitutif, mais codé par des plasmides instables;
- soit ces souches étaient en fait, dès le départ, inactives vis-à-vis du pétrole et se développaient aux dépens d'impuretés carbonées du milieu de culture. On n'a pas à ce niveau vérifié s'il y avait biodégradation réelle du pétrole, puisque seul le trouble du milieu était observé et considéré comme témoin de l'activité;
- soit certaines cultures ont péri à la suite de repiquage où la densité de l'inoculum était insuffisante.

Il est possible qu'au cours d'une culture certaines cellules isolées perdent le ou les plasmides dégradatifs impliqués, mais au niveau de la population des cellules d'une culture donnée, les plasmides stables se maintiennent et sont transférés à chaque repiquage.

En tout état de cause, la stabilité des capacités dégradatives apparaît finalement beaucoup plus grande que ce que l'on a parfois estimé, et il est très possible que cette capacité métabolique, qui remonte aux origines même de la vie, se maintienne aisément dans toutes les communautés microbiennes. C'est ce qui expliquerait, au moins en partie, que l'on trouve des bactéries adaptées aux hydrocarbures même dans des environnements non soumis au contact d'hydrocarbures pétroliers.

C O N C L U S I O N

Cette étude apporte des précisions sur plusieurs points jusqu'alors peu étudiés du problème général de la dégradation microbienne des hydrocarbures.

Sur le plan taxonomique, nous avons pu montrer que les souches actives qui peuvent au demeurant comporter un nombre très élevé de représentants dans les biotopes contaminés, se répartissent finalement entre quelques genres, ou taxons, bien définis du monde bactérien. La grande diversité de genres, et encore plus d'espèces, nommées dans la littérature est à relier aux difficultés qu'il y a à classer et à identifier les bactéries. Les dizaines, voire centaines, de noms différents cités pourraient bien se résoudre en fait à un nombre beaucoup plus restreint d'espèces réellement distinctes, mais très ubiquistes.

Sur le plan de l'écologie microbienne, nos travaux indiquent que les actinomycètes (*Rhodococcus*, *Nocardia*, *Arthrobacter*) prédominent dans les sols, tandis que *Pseudomonas* et *Acinetobacter* forment le groupe actif des eaux tropicales, et que les seules souches actives de *Bacillus* que nous avons isolées sont inféodées aux sédiments marins tropicaux.

L'examen des capacités dégradatives individuelles des souches les plus efficaces révèle le fait étonnant que le spectre d'activité vis-à-vis des différents types structuraux moléculaires d'hydrocarbures est remarquablement analogue chez des souches pourtant taxonomiquement très éloignées. Cette constatation permet de supposer qu'un équipement enzymatique complet, mais pas forcément identique, existe chez des souches que tout sépare : la position taxonomique, l'écologie et la géographie. C'est ce qui fait que l'activité catabolique de biodégradation des hydrocarbures constitue un bien pauvre outil taxonomique, d'autant que règne une assez forte variabilité intraspécifique.

Mais c'est aussi cette remarquable analogie métabolique dont on a montré qu'elle était parfaitement stable à moyen terme, qui fait que des bactéries potentiellement actives vis-à-vis des hydrocarbures existent dans tous les biotopes étudiés, même lorsqu'ils ne sont pas contaminés par des produits pétroliers. Car cette aptitude, à coup sûr très ancienne sur le plan phylogénétique, est inscrite depuis fort longtemps dans le génome bactérien, les hydrocarbures étant peut-être les premiers composés organiques formés.

Et il est heureux qu'il en soit ainsi car pour l'instant, l'intervention naturelle des microorganismes est de très loin le mécanisme le plus efficace pour épurer les milieux contaminés par les déchets pétroliers liés aux activités humaines.

ANNEXE

Tableau récapitulatif
Identification et capacités dégradatives (souches individuelles et phénons)

GRAM positifs/variables

IDENTIFICATION		code	% BIOD.					TYPE	% BIOD. (moy phénon)					TYPE
phénon	souche		TOT	SAT	ARD	RES	ASP		TOT	SAT	ARD	RES	ASP	
1	Rhodococcus	IR03	20	31	10	9	-13	4	19	25	15	8	-15	3
	Rhodococcus	IS01	18	19	20	6	-17		18	35	13	1	-24	
	Rhodococcus	ID25	-	-	-	-	-		16	32	-	0	-13	
2	Rhodococcus	GT02	14	29	12	5	-20	3	15	34	13	-9	-34	3
	Rhodococcus	GT03	19	37	14	-2	-33		19	39	16	-2	-18	
	Rhodococcus	GC03	20	41	-	2	-31		21	40	15	7	-21	
	Rhodococcus	GT04	16	32	-	0	-13		20	36	10	7	-33	
3	Rhodococcus	MC02	11	35	8	-11	-33	3	15	30	8	3	-21	3
	Rhodococcus	MC11	14	32	13	-12	-37		16	32	13	-3	-30	
	Rhodococcus	MC04	18	38	14	-4	-32		16	32	13	-3	-30	
4	Arthrobacter	MC15	16	39	0	-13	-6	3	16	30	16	4	-24	1
	Arthrobacter	MT04	21	38	16	12	-29		21	41	18	5	4	
	Arthrobacter	MC12	21	40	15	7	-21		21	40	15	7	-21	
5	Rhodococcus	MC35	19	35	9	5	-10	1	18	29	12	13	-18	1
	Rhodococcus	MC31	21	45	16	10	-19		13	28	9	-3	4	
	Rhodococcus	MC14	17	31	14	-2	-6		10	26	3	2	-18	
	Rhodococcus	MC33	20	36	10	7	-33		10	26	3	2	-18	
6	Rhodococcus	GC08	21	38	0	-6	-25	1	12	27	6	0	-7	1
	Rhodococcus	GC02	12	17	6	3	-19		12	27	6	0	-7	
	Rhodococcus	GT32	13	34	9	9	-18		10	26	3	2	-18	
	Rhodococcus	MT32	16	32	13	-3	-30		10	26	3	2	-18	
	Rhodococcus	MC13	16	30	16	4	-24		10	26	3	2	-18	
7	coryneforme	ID15	-	-	-	-	-	1	23	42	22	-6	-11	4
	coryneforme	IM12	-	-	-	-	-		32	57	21	-0	-13	
	coryneforme	ID34	-	-	-	-	-		23	42	22	-6	-11	
	Rhodococcus	MC13	16	30	16	4	-24		23	42	22	-6	-11	
	coryneforme	IR06	21	41	18	5	4		32	57	21	-0	-13	
Micrococcus roseus	IS31	18	29	12	13	-18	1	18	29	12	13	-18	1	
8	coryneforme	MC01	13	28	9	-3	4	1	12	27	6	0	-7	1
	coryneforme	GC31	10	26	3	2	-18		10	26	3	2	-18	
9	coryneforme	IR01	23	42	22	-6	-11	4	28	50	21	-7	-12	4
	coryneforme	IR02	32	57	21	-0	-13		28	50	21	-7	-12	
10	Arthrobacter	MC32	14	36	6	-8	-35	3	14	33	6	-3	-20	4
	Arthrobacter	MC16	14	29	2	-4	-4		14	33	6	-3	-20	
11	Micrococcus luteus	ID23	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	3
	Micrococcus luteus	IM10	20	40	19	-1	9		-	-	-	-	-	
	Staphylococcus	MC17	-	-	-	-	-							

GRAM positifs/variables (suite)

12	Nocardia	MC07	20	41	10	-8	-30	2	18	39	13	3	-24	3
	Nocardia	GC04	16	25	13	6	-18							
	Nocardia	GC07	15	36	14	8	-25							
	Nocardia	GC06	22	52	15	7	-22	3						
13	Nocardia	GC05	15	32	7	3	-25	4	13	30	8	3	-23	
	Nocardia	GT31	11	24	8	3	-21							
	Nocardia	MC06	-	-	-	-	-							
14	Bacillus	ID31	-	-	-	-	-							
	Bacillus	ID48	-	-	-	-	-							
	Bacillus	MC09	-	-	-	-	-							
	Bacillus	IR31	18	26	8	7	2	3						
	Bacillus	ID43	-	-	-	-	-							
	Bacillus	ID07	-	-	-	-	-							
	Bacillus	MT31	12	27	9	-9	0	3						
15	nocardioforme	MC34	22	36	9	5	13	3	17	30	9	4	-3	3
	nocardioforme	MC36	12	16	9	3	0							
	nocardioforme	GT01	16	38	0	3	-20							
	nocardioforme	MT01	11	19	15	-4	-4							
	nocardioforme	MC03	-	-	-	-	-							
16	Bacillus	ID17	-	-	-	-	-							
	Bacillus	ID47	-	-	-	-	-							
	Bacillus	ID36	32	52	20	3	4	4						
	Bacillus	ID13	-	-	-	-	-							
	Bacillus	ID37	-	-	-	-	-							
17	Nocardia	MC05	11	22	12	-6	6	2	13	23	12	1	-1	2
	Nocardia	MT02	12	16	15	5	6							
	Nocardia	MC10	15	32	8	0	-16							
18	Bacillus	ID21	-	-	-	-	-							
	Bacillus	ID46	-	-	-	-	-							
	Bacillus	ID18	-	-	-	-	-							
19	Bacillus	ID20	29	52	20	0	4		24	45	10	-2	5	3
	Bacillus	ID33	19	37	0	-3	6	1						
	Bacillus	ID06	-	-	-	-	-							
20	Bacillus	ID08	26	39	14	-5	-4	4	26	42	14	-2	0	3
	Bacillus	ID35	21	33	11	3	0							
	Bacillus	ID32	30	55	18	-5	4	4						
	Bacillus	MC08	-	-	-	-	-							
21	Bacillus	IR05	-	-	-	-	-							
	Bacillus	ID22	-	-	-	-	-							
	Arthrobacter	GC01	14	25	12	0	-17							

ANNEXE (suite) GRAM négatifs

IDENTIFICATION		% BIOD.	TYPE					% BIOD. (moy phénon)					TYPE	
phénon	souche		TOT	SAT	ARO	RES	ASP	TOT	SAT	ARO	RES	ASP		
31	Pseudomonas	IM09	-	-	-	-	-							
	Pseudomonas	IM03	26	47	19	3	-6							
	Pseudomonas	IS03	-	-	-	-	-							
	Enterobacteriaceae	ID09	-	-	-	-	-							
	Enterobacteriaceae	IR08	-	-	-	-	-							
	Aero. salmonicida	ID40	19	29	12	2	4	3						
32	Ps. putida	ID26	20	36	16	6	3	22	36	17	0	6	3	
	Ps. putida	IM31	23	35	20	-9	4	3						
	Ps. putida	IR32	21	38	15	4	8							
33	Acineto. calcoacet.	IR33	-	-	-	-	-							
	Acineto. calcoacet.	IR07	24	43	16	-1	4	1						
	Alcaliq. faecalis	IM05	24	44	22	-7	9	3						
34	Acineto. calcoacet.	ID38	34	58	20	5	6	4	26	47	20	-1	0	1
	Acineto. calcoacet.	ID19	19	38	20	-3	-6							
	Pseudomonas	ID14	16	37	7	-2	11							
	Pseudomonas	ID45	-	-	-	-	-							
	Pseudomonas	IS02	-	-	-	-	-							
	Pseudomonas	IM06	22	40	21	-7	11							
	Flavobacterium	ID39	31	58	16	-5	0	4						
	Pseudomonas	ID11	26	57	12	-1	5							
35	Ps. diminuta	ID42	-	-	-	-	-	21	39	14	1	7	3	
	Ps. diminuta	IM32	-	-	-	-	-							
	Ps. diminuta	IM04	20	34	21	-2	11	3						
	Ps. diminuta	ID41	25	43	11	2	7							
	Ps. diminuta	ID04	20	40	9	-1	-3							
36	Ps. diminuta	IM01	17	32	19	-2	-4	3	18	34	17	1	-2	3
	Ps. diminuta	IM02	19	37	15	4	6							
	Ps. diminuta	ID03	18	33	19	2	-6							
37	Ps. alcaligenes	IM07	19	33	20	-6	13	22	43	14	-3	4	4	
	Ps. alcaligenes	IM08	27	57	12	-3	-1							
	Ps. alcaligenes	ID44	22	38	11	-1	-5	3						
	Ps. alcaligenes	ID12	20	51	0	-4	7							
	Ps. alcaligenes	ID16	-	-	-	-	-							
	Ps. alcaligenes	ID02	21	36	15	4	9							

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXANDER, M. (1979). Role of cometabolism. In **Microbial degradation of pollutants in marine environments** (W. Bourquin and P.H. Fritchard, Eds.)
- ALEXANDER, M. (1981). Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science** 211 : 132-138.
- ANDERSON, M.S., HALL, R.A. & GRIFFIN, M. (1980). Microbial metabolism of alicyclic hydrocarbons: Cyclohexane catabolism by a pure strain of *Pseudomonas* sp. **J. Gen. Microbiol.** 1, 89-94.
- ATLAS, R.M. (1975). Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. **Appl. Microbiol.** 3, 396-403.
- ATLAS, R.M. (1977). Stimulated petroleum biodegradation. **C.R.C. Crit. Rev. Microbiol.** 4, 371-386.
- ATLAS, R.M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons : an environmental perspective. **Microbiol. Rev.** 1, 180-209.
- ATLAS, R.M. ed. (1984). **Petroleum Microbiology.** Mac Millan. New York.
- ATLAS, R.M. & BARTHA, R. (1973). Inhibition by fatty acids of the biodegradation of petroleum. **Antonie van Leenwenhoek J. Microbiol. Serol.** 39, 257-271.
- ATLAS, R.M.; BOEHM, P.D. and CALDER, J.A. (1981). Chemical and biology weathering of oil from the Amoco Cadiz oil spilling in the littoral zone. **Est. marine coastal Shelf Sci.** 12 : 589-608.
- AUSTIN, B., CALOMIRIS, J.J., WALKER, J.D. & COLWELL R.R. (1977). Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. **Appl. Environment. Microbiol.** 1, 60-68.
- AUSTIN, B.; COLWELL, R.R.; WALKER, J. and CALOMIRIS, J. (1977). The application of numerical taxonomy to the study of petroleum-degrading bacteria isolated from the aquatic environment. **Dev. Ind. Microbiol.** 18, 685-695.
- BARLL, K.D.; LEE, M.L. and WISE, S.A. (1981). Modern analytical methods for environmental polycyclic aromatic compounds. **Chemical Society Review** 1, 113-158.
- BARNESLEY, E.A. (1975). The bacterial degradation of fluoranthene and benzo(a)pyrene. **Can. J. Microbiol.** 7, 1004-1008.
- BARTHA, R. & ATLAS, R.M. (1977). The microbiology of aquatic oil spills. **Adv. Appl. Microbiol.** 22, 225-266.

- BARTHA, R. & BOSSERT, I. (1984). The treatment and disposal of petroleum refinery wastes. In *Petroleum Microbiology* (R.M. Atlas, Ed.), pp. 553-577. Macmillan, New York.
- BEAM, H.W. & PERRY, J.J. (1973). Co-metabolism as a factor in microbial degradation of cycloparaffinic hydrocarbons. *Arch. Mikrobiol.* 91, 87-90.
- BEAM, H.W. & PERRY, J.J. (1974). Microbial degradation and assimilation of n-alkyl-substituted cycloparaffins. *J. Bacteriol.* 118, 394-399.
- BENKIRANE-BENNIS, S. (1981). Influence de la concentration et de la source d'azote sur la dégradation *in vitro* d'un pétrole brut par des microorganismes de sols et d'eaux douces. *Th. 3^e Cycle*. Univ. Paris 7
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984). Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986). Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
- BERNE, S. & BODENNEC, G. (1984). Evaluation of hydrocarbons after the Tanyo oil spill - a comparison with the Amoco Cadiz accident. *Ambio*. Vol. 13, 109-114.
- BERTRAND, J.C.; RAMBELOARISOA E.; RONTANI, J.F.; GIUSTI, G. & MATTEI, G. (1983). Microbial degradation of crude oil in seawater in continuous culture. *Biotechnol. Lett.* 8, 567-572.
- BERWICK, P.G. (1984). Physical and chemical conditions for microbial oil degradation. *Biotech. Bioeng.* XXVI, 1294-1305.
- BRIDIE, A.L. & BOS, J. (1971). Biological degradation of mineral oil in seawater. *J. Inst. Petr.* 57 (557), 270-277.
- BROWN, D.W.; RAMOS, L.S.; FIEDMAN, A.J. & MCLEOD, W.D. (1969). Analysis of trace levels of petroleum hydrocarbons in marine sediments using a solvent-stury extraction procedure. pp. 161-167. In *Trace organic analysis: a new frontier in analytical*. Special publication. N° 519. National bureau of standards Washington, D.C.
- BROWN, L.R. (1987). Oil-degrading microorganisms. *Chemical Engineering Progress*. p. 35-40.
- BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th Edition. Williams & Wilkins ed. Baltimore.
- BUCKLEY, E.N., JONAS, R.B. & PFAENDER., F.K. (1976). Characterization of microbial isolates from an estuarine ecosystem: relationship of hydrocarbon utilisation to ambient hydrocarbon concentrations. *Appl. Environment. Microbiol.* 2, 232-237.
- BURWOOD, R. & SPEERS, G. (1974). Photo-oxydation as a factor in the environmental dispersal of crude oil. *Est. & coastal Mar. Sci.* 2, 117-135.

- BUTTER, J.N.; LEVY E.M. (1978). Long term fate of petroleum hydrocarbons after spills. Compositional changes and microbial degradation. *J. Fish. Res. Board Canada*, 35, 5, p. 604-605.
- CALLEN, D.F. & LARSON, R.A. (1978). Toxic and genetic effects of fuel oil photoproducts and three hydroperoxides in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Toxicol. Environment. Health.* 6, 913-917.
- CAMEOTRA, S.S.; SINGH, H.D.; HAZARIKA, A.K. and BARAIAH, J.N. (1983). Mode of uptake of insoluble solid substrates by microorganisms. II. Uptake of solid n-alkanes by yeast and bacterial species. *Biotechnol. Bioeng.* 25 : 2945-2956.
- CERNIGLIA, C.E. and PERRY, J.J. (1974). Effect of substitute on the fatty acid composition of hydrocarbons-utilizing filamentous fungi which degrade hydrocarbons fuels. *Intern. Biodeg.* 22(4), 281-287.
- CERNIGLIA, C.E.; MORGAN, J.C. and GIBSON, D.T. (1979). Bacterial and fungal oxidation of dibenzofuran. *Biochem. Journ.*, 180, 175-185.
- CERNIGLIA, C.E., GIBSON, D.T. & VAN BAALEN, C. (1980). Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. *J. Gen. Microbiol.* 2, 495-500.
- CERNIGLIA, C.E., VAN BAALEN, C. & GIBSON, D.T. (1980). Metabolism of naphthalene by the cyanobacterium *Oscillatoria* sp., strain JCM. *J. Gen. Microbiol.* 2, 485-494.
- CERNIGLIA, C.E. (1984). Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv. Appl. Microbiol.* 50 : 81-90.
- CHAKRABARTY, A.M. (1972). Genetic basis of the biodegradation of salicylate in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.* 112, 815-823.
- CHAKRABARTY, A.M.; CHOU, G. & GUNSALUS, I.C. (1973). Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 1137-1140.
- CHAUDHRY, G.R.; HUANG, G.H. (1988). Isolation and characterization of a new plasmid from a *Flavobacterium* sp. which carries the genes for degradation of 2,4 - dichlorophenoxyacetate. *J. Bacteriol.* 3897-3902.
- CHET, I.; MITCHELL, R. (1976). *Nature*. 261, 308-309.
- CONNAN, J., RESTLE, A. & ALBRECHT, P. (1979). Biodegradation of crude oil in the Aquitaine basin. In *Advances in organic geochemistry*. 1-17. Douglas A.G. & Maxwell J.P. Ed.
- COONEY, J.J. & SUMMERS, R.J. (1976). Hydrocarbon-using microorganisms in three freshwater ecosystems. In J.M. Sharpley and A.M. Kaplan (ed.). *Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium*. 141-156. Appl. Sci. Publ., Ltd, Londres.
- CRIPPS, R.E. & WATKINSON, R.J. (1978). Polycyclic aromatic hydrocarbons : metabolism and environmental aspects. In J.R. Watkinson (ed.). *Developments in biodegradation of hydrocarbons- 1*. 113-134. Applied Science Publishers, Ltd, Londres.

- DALTON, H. and STIRLING, D.I. (1982). Cometabolism. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 297 : 481-496.
- DAVIES, J.S. & WESTLAKE, W.S. (1979). Crude oil utilization by fungi. *Can. J. Microbiol.* 25, 146-156.
- DAVIS, S.J., GIBBS, C.F. & PUGH, K.B. (1977). Quantitative studies on marine biodegradation of oil. III. Comparison of different crude oil residues and effects of sea water source. *Environment. Pollut.* 3, 203-215.
- DEAN-RAYMOND, D. and BARTHA, R. (1975). Biodegradation of some polynuclear aromatic petroleum compounds by marine bacteria. *Dev. Ind. Microbiol.* 16 : 97-110.
- DIBBLE, J.T. & BARTHA, R. (1976). Effect of iron on the biodegradation of petroleum in seawater. *Appl. Environment. Microbiol.* 4, 544-550.
- DONNELLY, K.C.; BROWN, K.W.; THOMAS, J.C. and DAVOL, P.; SCOTT, B.R.; KAMPBELL, D. (1985). Evolution of the hazardous characteristics of two petroleum wastes. Mary Ann Liebert, Inc. Publishers. V. 2 (2) pp. 191-208.
- DONOGHUE, N.A., GRIFFIN, M., NORRIS, D.G. & TRUDGILL, F.W. (1976). The microbial metabolism of cyclohexane and related compounds. In J.M. Sharpley and A.M. Kaplan (ed.), *Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium.* 43- 56. Applied Science Publishers, Ltd, Londres.
- DUMENIL, G.; MATTEI, G.; SERGENT, M.; BERTRAND, J.C.; LABET, M. and PHAN-TAN-LIU (1988). Application of a Doehlert experimental design to the optimization of microbial degradation of crude oil in sea water by continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27 : 405-409.
- DUNN, N.W.; DUNN, H.M., AUSTEN, R.A. (1980). Evidence for the existence of two catabolic plasmids coding for the degradation of naphthalene. *J. Gen. Microbiol.* 117 : 529-533.
- DUNN, N.W. and GUNSALUS, I.C. (1973). Transmissible plasmid coding early enzyme of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* 114 : 974-979.
- DUTTA, D.; GHOSH, D.K.; MISHRA, A.K. and SOMANTA, T.B. (1983). Induction of benzo a pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS evidences of multiple forms of cytochrome. p. 450. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 115, 692-699.
- EATON, R.W. and TIMMIS, K.N. (1984). Genetic of xenobiotic degradation. In *Current perspective in microbial ecology.* Klug M.J. and Reddy C.A. , edit. 694-703, A.S.M., Washington.
- FALL, R.R.; BROWN, J.L. and SCHAEFFER, T.L. (1979). Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38 : 715-722.
- FLOODGATE, G.D. (1984). The fate of petroleum in marine ecosystems. In : *Atlas, R.M. (ed.). Petroleum microbiology .* Mac Millan, New York, 335-397.

- FRANKLIN, H. & WILLIAMS, P. (1980) *Mol. Gen. Gen.* 177, 321-328.
- FRIDRICKS, K.M. (1966). Experiments in bacterial adaptation. *Nature*, 212, 539-540.
- FRIELLO, D.A., MYLROIE, J.R. & CHAKRABARTY, A.M. (1976). Use of genetically engineered multi-plasmid microorganisms for rapid degradation of fuel hydrocarbons. In J.M. Sharpley and A.M. Kaplan (ed.). Proc. of the Third International Biodegradation Symposium. 205-214. Applied Science Publishers, Ltd, Londres.
- FRIELLO, D.A., MYLROIE, J.R., GIBSON, D.T., ROGERS, J.E. & CHAKRABARTY, A.M. (1976). A nonconjugative xylene-degradative plasmid in *Pseudomonas* FXY. *J. Bacteriol.* 3, 1217-1224.
- FUSEY, P., BENKIRANE-BENNIS, S. & OUDOT, J. (1983). Influence de la concentration et de la source d'azote sur la dégradation in vitro d'un pétrole brut par des microorganismes de sols et d'eaux douces. *Mat. U. Org.* 2, 141-159.
- FUSEY, P., LAMPIN, M.F., OUDOT, J. (1975). Recherches sur l'élimination des hydrocarbures par voie biologique. *Mater. U. Organ.* 2, 109-147.
- FUSEY, P. & OUDOT, J. (1982). Dégradation bactérienne du pétrole brut dans des sédiments marins littoraux de la Bretagne Nord. *Publ. Cent. Natl. Exploit. Océans, Sér. Actes Colloques* 13, 151-160.
- FUSEY, P. & OUDOT, J. (1984). Relative influence of physical removal and of biodegradation in the depuration of petroleum-contaminated seashore sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 4, 136-141.
- FUSEY, P., OUDOT, J. & BENKIRANE-BENNIS, S. (1980). Influence de la vitamine B12, de l'extrait de levure et du magnésium sur le taux de dégradation bactérienne d'un pétrole brut. *Mater. U. Org.* 2, 149-159.
- GIBSON, D.T. (1971). The microbial oxidation of aromatic hydrocarbons. *Crit. Rev. Microbiol.* 1, 199-223.
- GIBSON, D.T. (1975). Oxidation of the carcinogens benzo(a)pyrene and benzo(a)anthracene to dihydrodiols by a bacterium. *Science.* 189, 295-297.
- GIBSON, D.T. (1976). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. In Proc. of the Third Int. Biodegradation Symposium. 57-66. Applied Science Publishers, Ltd, Londres.
- GOSH, D.K.; DUTTA, D.; SOMANTA, A.B.; MISHRA, A.K. (1983). Microsomal benzo(a)pyrene hydroxylase in *Aspergillus ochraceus* TS. Assay and characterization of the enzyme system. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 113 : 497-505.
- GRADY, C.P.L. (1985). Biodegradation : its measurement and microbiological basis. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 660-674.
- GUERIN, W.F. and JONES, G.E. (1988). Mineralization of phenanthrene by *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(4) : 937-944.

- GUNSALUS, I.C. and MARSHALL, V.P. (1972). Monoterpene dissimilation : chemical and genetic models. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 1, 291-310.
- HALLAS, L.E. and VESTAL, J.R. (1978). The growth of *Mycobacterium convolutum* on solid n-alkanes. *Microbiology* , 44 : 408-411.
- HARVEY, R.G. (1981). Activated metabolites of carcinogenic hydrocarbons. *Accounts of Chemical Research* . 14, 218-226.
- HORVATH, R.S. (1972). Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriol. Rev.* 36, 146-155.
- IIZUKA, H & KOMAGATA, K (1964). Microbiological studies on petroleum and natural gas. I. Determination of hydrocarbon-utilizing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 10, 207-221.
- JACOB, J.; SCHMOLDT, A.; KOHBROK, W.; ROAB, G. and GRIMMER, G. (1982). On the metabolic activation of benz(a)acridin and benz(c)acridine by rat liver and lung microsomes. *Cancer Letters* , 16, 297-306.
- JACOBY, G.A., ROGERS, J.E., JACOB, A.E. & MEDGES , R.W. (1978). Transposition of *Pseudomonas* toluene-degrading genes and expression in *Escherichia coli* . *Nature.* 5667, 179-180.
- JAMBU, M. (1978). Classification automatique par l'analyse des données - 1 - Méthodes et algorithmes. Dunod - Paris - 310 p.
- JANNASCH, H.W., EIMHJELLEN, K., WIRSEN, C.D. & FARMAIAN, A. (1971). Microbial degradation of organic matter in the deep sea. *Science* 171, 672-675.
- JOBSON, A., COOK, F.D. & WESTLAKE, D.W.S (1972). Microbial utilization of crude oil. *Appl. Microbiol.* 6, 1082-1089.
- JOBSON, A.M., COOK, F.D. & WESTLAKE, D.W.S. (1979). Interaction of aerobic and anaerobic bacteria in petroleum biodegradation. *Chem. Geol.* 3-4, 355-365.
- JONES, J.G. (1977). The long term effects of kerosine pollution on the microflora of a moorland soil. *J. Appl. Bacteriol.* 1, 123-128.
- KACHHOLZ, T. & REHM, H.J. (1977). Degradation of long chain alkanes by Bacilli. I. Development and product formation by Bacilli degrading alkanes in the presence of other carbon sources. *Europ. J. Appl. Microbiol.* 2, 101-110.
- KAWAKAMI, Y. & NISHIMURA, H. (1981). Nutrient limitations on biodegradation of n-hexadecane by *Bacillus* sp. , a candidate organism in seeding. *J.Chem. Eng.* 6, 473-478.
- KING, D.H. and PERRY, J.J. (1975). The origin of fatty acids in the hydrocarbon-utilizing microorganism *Mycobacterium vaccae* . *Can. J. Microbiol.* 21 : 85-89.
- KLUG, M.J. & MARKOVETZ, A.J. (1967). Thermophilic bacteria isolated on n-tetradecane. *Nature* 215, 1082-1083.

- KUHN, E.P.; ZEYER, J.; EICHER, P. and SCHWARZENBACH, R.P. (1988). Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. *Applied and Environmental Microbiology* p. 490-496.
- LARSON, R.A., BOTT, T.L., HUNT, L.L. & ROGENMUSER, K. (1979). Photo-oxidation of products of a fuel oil and their antimicrobial activity. *Environment. Sci. Technol.* 8, 965-969.
- LEHR, R.E. and JERINA, D.M. (1983). Aza-polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogenicity: Predictions of reactivity of tetrahydrobenzoring epoxide derivatives *Tetrahydon letters* 24, 27-30.
- LEISINGER, T. (1983). Microorganisms and xenobiotic compounds. *Experientia* 39, 1183-1191.
- LE PETIT, J. (1975). Etude écologique, taxonomique et physiologique de microorganismes se développant sur hydrocarbures en mer. Thèse Doct. Sci. Univ. Marseille. AD. CNRS 11345.
- LE PETIT, J., BERTRAND, J.C., N'GUYEN, M.H., TAGGER, S. (1975). Etude taxonomique et physiologique de bactéries se développant sur hydrocarbures en milieu marin. *Ann. Microbiol.* 3, 367-380.
- LINDLEY, N.D.; PEDLEY, J.F.; KAY, S.P. and HEYDMAN, M.T. (1986). The metabolism of yeasts and filamentous fungi which degrade hydrocarbon fuels. *Intern. Biodet.* 22 (4) , 281-287.
- MAHLON, C.K. (1988). The effect of biodegradation on crude oil bulk and molecular composition oil. *Chemical Pollution* 4, 89-112.
- MALLET, L. (1972). Pollution des milieux vitaux par les hydrocarbures polybenzéniques du type benzo-3-4 pyrène. Paris, Maloine Ed.
- MATELES, R.I., BARUAH, J.N. & TANNENBAUM, S.R. (1967). Growth of a thermophilic bacteria on hydrocarbons: a new source of single-cell protein. *Science.* 157, 1322-1323.
- MCKENNA, E.J. & KALLIO, R.E. (1971). Microbial metabolism of the isoprenoid alkane, pristane *Proc. Natl. Acad. Sci.* 68, 1552-1554.
- MIGET, R.J. (1973). Bacterial seeding to enhance biodegradation of oil slicks. In : *Microbial degradation of oils pollutants* (D.G. Ahearn and S.P. Meyers, eds) pp. 291-307.
- MOUCAWI, J., FUSTEC, E., JAMBU, P., AMBLES, A. & JACQUESY, R. (1981). Biooxidation of added and natural hydrocarbons in soils: effect of iron. *Soil Biol. Biochem.* 5, 335-342.
- MULKINS-PHILLIPS, G.J. & STEWART, J.E. (1974). Effect of four dispersants on biodegradation and growth of bacteria on crude oil. *Appl. Microbiol.* 28, 547-552.
- MURPHY, G. and PERRY, J.J. (1983). Incorporation of chlorinated alkanes into fatty acids of hydrocarbon-utilizing mycobacteria. *J. Bacteriol.* 156 : 1158-1164.

- NAKAJIMA, K.; SATO, A.; TAKAHARA, Y. and IIDA, T. (1985). Microbial oxidation of isoprenoid hydrocarbon, I. Pristene. *Agt Biol. Chem.* 49, 2763-2765.
- NEILSON, A.H.; ALLARD, A.S. and REMBERGER, M. (1985). Biodegradation and transformation of recalcitrant compounds. In : *Handbook of Environmental Chemistry*, Vol. 2, 29-86, Hutzinger O., Edit. Springer Verlag, New York.
- NEUFELD, R.J.; ZAJIC, J.E. and GERSON, D.F. (1980). Cell surface measurements in hydrocarbon and carbohydrate fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 : 511-517.
- NYNS, E.J.; AUQUIERE, I.P. & WIAUX, A.L. (1986). Taxonomic value of property of fungi to assimilate hydrocarbons. *Antonie van Leeuwenhoek Microbiol. Serol.* 34, 441-457.
- ODU, C.T.I. (1977). Microbiology of soils contaminated with petroleum hydrocarbons. II. Natural rehabilitation and reclamation of soils affected. *Inst. Petroleum Paper.* 2, 1-21.
- ODU, C.T.I. (1977). Oil degradation and microbiological changes in soils deliberately contaminated with petroleum hydrocarbons. *Inst. Petroleum Paper.* 5, 1-11.
- ODU, C.T.I. (1978). The effect of nutrient application and aeration on oil degradation in soil. *Environment. Pollut.* 3, 235-240.
- OUDOT, J. (1979). Le bilan du carbone dans une expérience de biodégradation bactérienne d'un pétrole brut. *Environment. Pollut.* 3, 177-187.
- OUDOT, J. (1984). La dégradation microbienne des hydrocarbures. Etude du potentiel de biodégradation et de son expression dans le milieu. *Thèse Doct Etat, Univ. Paris VII. CNRS TD 12491.*
- OUDOT, J. (1984). Rates of microbial degradation of petroleum components as determined by computerized capillary gas chromatography and computerized mass-spectrometry. *Mar. Environ. Res.*
- OUDOT, J., FUSEY, P., VAN PRAET, M., FERAL, J.P. & GAILL, F. (1981). Hydrocarbon weathering in seashore invertebrates and sediments over a two-year period following the Amoco Cadiz oil spill: influence of microbial metabolism. *Environ. Pollut. A.* 2, 93-110.
- OUDOT, J.; AMBLES, A.; BOURGEOIS, S.; GATELLIER, C. & SEBYERA, N. (1989). Hydrocarbon infiltration and biodegradation in a landfarming experiment. *Environ. Pollut.* 58.
- OUDOT, J.; FUSEY, P.; ABDLEOUAHID, D.E.; HALOUI, S. & ROQUEBERT, M.F. (1986). Capacités dégradatives de bactéries et de champignons isolés d'un sol contaminé par un fuel. *Can. J. Microbiol.* 33(3), 232-243.
- PAREKH, V.R., TRAXLER, R.W. & SOBEK, J.M. (1977). n-alkane oxidation enzymes of a pseudomonad. *Appl. Environment. Microbiol.* 4, 881-884.

- PERRY, J.J. (1979). Microbial cooxidations involving hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59-72.
- PIRNICK, M.P. (1979). Microbial oxidation of methyl branched alkanes. *Crit. Rev. Microbiol.* 5, 413-422.
- PRITCHARD, P.H., VENTULLO, R.M. & SUFLITA, J.M. (1976). The microbial degradation of diesel oil in multistage continuous culture systems. In J.M. Sharpley and A.M. Kaplan (ed.). *Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium.* 67-78. Applied Science Publishers, Ltd, Londres.
- RAMBELDARISDA, E. (1983). Biodégradation d'un pétrole brut en milieu marin par une pollution bactérienne mixte. Thèse Doctorat, Univ. Aix-Marseille II
- RAMBELDARISDA, E.; RONTANI, J.F.; GIUSTI, G.; DUUNJAK, Z and BERTRAND, J.C. (1984). Degradation of crude oil by mixed culture of bacteria isolated from sea surface foams. *Mar. Biol.* , 83 : 69-81.
- RONTANI, J.F.; BOSSER-JOULAK, F.; RAMBELDARISDA, E.; BERTRAND, J.C.; GIUSTI, G. and FAURE, R. (1985). Analytical study of Asthart crude oil asphaltenes biodegradation. *Chemosphere* , 14 : 1413-1422.
- RASLOMANANA, J.L. et BALANDREAU, J. (1987). Rôle de la rhizosphère dans la biodégradation de composés récalcitrants : cas d'une rizière polluée par des résidus pétroliers. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* 1987, 24(3) : 443-457.
- RHEINWALD, J.G.; CHAKRABARTY, A.M.; GUNSALUS, I.C. (1973). A transmissible plasmid controlling camphor oxidation in *Pseudomonas putida* . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70 : 885-889.
- RIVIERE, J. & GATELLIER, C. (1976). Evolution de la microflore d'un sol imprégné d'hydrocarbures. *Ann. Agron.* 1, 85-99.
- RIVIERE, J., OUDOT, J., JONQUERES, J. & GATELLIER, C. (1974). Fixation d'azote atmosphérique par des bactéries utilisant l'hexadécane comme source de carbone et d'énergie. *Ann. Agron.* 4, 633-644.
- RUSANSKY, S.; AVIGARD, R.; MICHAELIS, S. and GUTNIK, D.L. (1987). Involvement of plasmid in growth on and dispersion of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* RA 57. *Applied and Environmental Microbiology* 53(8) : 1918-1923.
- SANTELLA, R.; KINOSHITA, T. and JEFFREY, A.M. (1982). Mutagenicity of some methylated benzo(a)pyrene derivatives. *Mutat. Res.* 104 : 209-213.
- SCHAEFFER, T.L., CANTWELL, S.G., BROWN, J.L. & FALL, R.R. (1979). Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environment. Microbiol.* 4, 742-746.
- SCHOCKEN, M.J. and GIBSON, D.T. (1984). Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphtane and acenaphtalene. *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 48 (1), 10-16.
- SCHINCK, B. (1985). Degradation of insaturated hydrocarbons by methagenic enrichment cultures. *FEM Microbiol. Ecol.* 31 : 69-77.

- SCOTT, B.F.; WADE, P.J. and TAYLOR, W.D. (1984). Impact of oil and oil-dispersant mixtures on the fauna of freshwater ponds. *Sci. Total. Environ.* , 35 : 191-206.
- SEXSTONE, A., GUSTIN, P. & ATLAS, R.H. (1978). Long term interactions of microorganisms and Prudhoe Bay crude oil in tundra soils at Barrow, Alaska. *Arctic* 3, 348-354.
- SHELTON, D.R. and TIEDJE, J.M. (1984). Isolation and partial characterization of bacteria in an anaerobic consortium that mineralizes 3-chlorobenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1448-1454.
- SIMS, P. and CROVER, P.L. (1974). Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis. *Adv. Cancer Res.* 20 : 165-274.
- SIMS, P. and CROUER, P.L. (1981). Involvement of dihydrodiols and diol epoxides in the metabolic activation of polycyclic hydrocarbons other than benzo(a)pyrene. In : *Polycyclic hydrocarbons and cancer* (H.V. Gelboin and P.P.P. Ts'0, eds), Vol. 3, pp. 117-181, Academic Press, New York.
- SOHNGEN, N. (1913). Benzin, petroleum, paraffinöl und paraffin als Kohlenstoff und energiequelle für microben. *Zentralblatt für Bakteriologie. Parasitenkunde und Infektionskrankheiten (Abteilung 2) originale* 37, 595-601 (cité par DAVIS, J.B. dans *Petroleum Microbiology*)
- SOLANAS, A.M.; PARES, R.; BAYONA, J.M. and ALBAIGES, J. (1984). Degradation of aromatic petroleum hydrocarbons by pure microbial culture. *Chemosphere* 13 (516), 593-601.
- STEPHENS, G.M.; SIDEBOTHAM, J.M.; MANN, N.H. and DALTON, H. (1989). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the toluene dioxygenase gene from *Pseudomonas putida* NCIB 11767. *FEMS Microbiology Letters* 57, 295-300.
- STIRLING, L.A. , WATKINSON, R.J. & HIGGINS, I.J. (1977). Microbial metabolism of alicyclic hydrocarbons: isolation and properties of a cyclohexane-degrading bacterium. *J. Gen. Microbiol.* 1, 119-125.
- STUCKI, G. and ALEXANDER, M. (1987). Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 292-297.
- SUBRAMANIAN, V., SUGUMARAN, M. & VAIDYANATHAN, C.S. (1978). Double hydroxylation reactions in microorganisms. *J. Indian Inst. Sci* 8, 143-178 .
- TISSOT, B.P. and WELTE, D.H. (1984). *Petroleum formation and occurrence, a new approach to oil and gas exploration.* 2nd edn. 699 p. Springer, Berlin.
- TITTMANN, U. and LENGENS, F. (1980). Degradation of biphenyl by *Arthrobacter simplex* , strain BPA. *FMS Microbiol. Lett.* 8 : 255-258.

- TRAXLER, R.W. (1973). Bacterial degradation of petroleum materials in low temperature marine environments. In D.G. Ahearn and S.P. Meyers (ed.). The microbial degradation of oil pollutants. F163-170 Publication n° LSU-SG-73-01. Louisiana State University.
- TRUDGILL, P.W. (1978). Microbial degradation of alicyclic hydrocarbons. In J.R. Watkinson (éd.). Developments in biodegradation of hydrocarbons-1. 47-84. Applied Science Publishers Ltd, Londres.
- WALKER, J.D. & COLWELL, R.R. (1974). Microbial petroleum degradation: use of mixed HC substrates. *Appl. Microbiol.* 6, 1056-1060.
- WALKER, J.D. & COLWELL, R.R. (1975). Some effects of petroleum on estuarine and marine microorganisms. *Can. J. Microbiol.* 3, 305-313.
- WALKER, J.D. & COLWELL, R.R. (1976). Measuring the potential activity of hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl. Environment. Microbiol.* 2, 189-197.
- WALKER, J.D. & COLWELL, R.R. (1976). Long-chain n-alkanes occurring during microbial degradation of petroleum. *Can. J. Microbiol.* 6, 886-891.
- WALKER, J.D., COLWELL, R.R. & PETRAKIS, L. (1975). Microbial petroleum degradation. Application of computerized mass spectrometry. *Can. J. Microbiol.* 11, 1760-1767.
- WALKER, J.D., COLWELL, R.R. & PETRAKIS, L. (1975). Degradation of petroleum by an alga, *Prothotheca zopfii*. *Appl. Microbiol.* 1, 79-81.
- WALKER, J.D.; COLWELL, R.R. & PETRAKIS, L. (1976). Biodegradation rates of components of petroleum. *Can. J. Microbiol.* 8, 1209-1213;
- WALKER, J.D., PETRAKIS, L. & COLWELL, R.R. (1976). Comparison of the biodegradability of crude and fuel oils. *Can. J. Microbiol.* 4, 598-602.
- WARD, D.M. & BROCK, T.D. (1976). Environmental factors influencing the rate of hydrocarbon oxidation in temperate lakes. *Appl. Environment. Microbiol.* 5, 764-772.
- WARD, D.M. & BROCK, T.D. (1978). Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 353-359.
- WESTLAKE, D.W.; JOBSON, S.A.; PHILIPPE, R. and COOK, F.D. (1984). Biodegradability and crude oil composition. *Can. J. Microbiol.* 20 : 915-928.
- WESTLAKE, D.W.S., JOBSON, A.M. & COOK, F.D. (1978). In situ degradation of oil in a soil of the boreal region of the northwest territories. *Can. J. Microbiol.* 3, 254-260.
- WORSEY, M.J. & WILLIAMS, P.A. (1975). Metabolism of toluene and xylene by *Pseudomonas (putida arvilla) MT-2*. *J. Bacteriol.* 1, 7-13.
- YEN, K.M.; GUNSALUS, I.C. (1982). Plasmid gene organization : naphthalene/salicylate oxidation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79 : 874-878.

- YEN, K.M. and GUNSALUS, I.C. (1985). *J. Bacteriol.*, 162 : 1008-1013.
- YOUNG BAE KIM REHM, H.J. (1982). Studies on a mixed culture of *Candida parapsilosis* and different Bacilli on alkane. I: Characterization of the mixed culture systems. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2, 105-111.
- ZAJIC, J.E., SUPPLISSON, B. & VOLESKY (1974). Bacterial degradation and emulsification of n°6 fuel oil *Environ. Sci. Technol.* 8, 664-668.
- ZILBER, I.K.; ROSENBERG and GUTNIK, D. (1980). Incorporation of P and growth of *Pseudomonas* UP-2 on n-tetracosane. *Appl. Environ. Microbiol.* 40 : 1086-1093.
- ZOBELL, C.E. (1946). Action of microorganisms on hydrocarbons. *Bacteriol. Rev.* 10, 1-49.
- ZOBELL, C.F. (1971). Sources and biodegradation of carcinogenic hydrocarbons. p. 441-451. In : Control of oil spills. American Petroleum Insitute, Washington D.C.
- ZOBELL, C.F. (1973). Bacterial degradation of mineral oils at low temperatures. p. 153-161. In : The microbial degradation of oil pollutants. Publication n° LS4-66-73-01. Center for wetland resources, Louisiana State University, Baton Rouge.

RESUME

Des souches de bactéries (≈ 110) utilisant les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie ont été isolées à partir de différents biotopes contaminés, ou non, par des produits pétroliers et situés dans une zone tempérée (sols agricoles de la région parisienne) et dans une zone tropicale (sols forestiers, eaux douces et milieu marin de l'île de Bornéo - Indonésie). Les souches actives sont classées par les techniques de la taxonomie numérique et identifiées au niveau du genre ou de l'espèce.

Les capacités dégradatives individuelles des souches vis-à-vis du pétrole total et de ses principales fractions constitutives (saturés, aromatiques, résines, asphaltènes) sont mesurées. La biodégradation de la fraction saturée est analysée en détail par chromatographie en phase gazeuse à haute résolution. Des relations sont établies entre les capacités métaboliques des souches, leur position taxonomique et leur biotope d'origine. La stabilité de l'activité de biodégradation est étudiée chez des souches représentatives des principaux genres actifs. A moyen terme, l'aptitude à dégrader les hydrocarbures est intégralement conservée, et ce caractère apparaît largement diffusé à l'intérieur d'un nombre assez restreint de genres, mais qui comportent des espèces très ubiquistes.

Mots-clés

Biodégradation
Hydrocarbures
Ecologie microbienne
Bactéries
Zone tropicale
Sol tempéré
Taxonomie

ABSTRACT

Bacterial strains (≈ 110) able to use hydrocarbons as sole carbon and energy source were isolated from different environments, which were either oil-free or contaminated by petroleum products. Samples were taken in temperate (agricultural soils) or tropical ecosystems (forest soils, fresh water and marine environments in Borneo island, Indonesia). The active strains were classified by numerical taxonomy techniques and identified at the genus or species level.

The degradative activities of individual strains were measured for total petroleum and for the main fractions (saturates, aromatics, resins and asphaltenes). The biodegradation of the saturated fraction was monitored by high resolution capillary gas-chromatography. Interrelations were shown between the biodegradation potential of the strains, and taxonomic and environmental parameters. The stability of the degradative activity was studied in some representative strains. The activity did not show any variation over a two year period, and this catabolic potential appears to be widespread in a relatively small number of genera, which include ubiquitous members.

Key-words

Biodegradation
Hydrocarbon
Microbial ecology
Bacteria
Tropical zone
Temperate soil
Taxonomy

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I EXPOSE BIBLIOGRAPHIQUE	2
1. LE PETROLE ET SES CONSTITUANTS	2
1.1 Hydrocarbures saturés	2
1.2 Hydrocarbures aromatiques	4
1.3 Fraction asphaltique	4
2. LA BIODEGRADATION DU PETROLE	4
2.1 Les microorganismes actifs	4
2.2 Les bactéries dégradant les hydrocarbures	5
3. LE METABOLISME DES HYDROCARBURES CHEZ LES BACTERIES	6
3.1 Dégradation des alcanes	6
3.2 Dégradation des aromatiques	7
3.3 Dégradation des asphaltiques	8
4. FACTEURS INFLUENCANT LA BIODEGRADATION	8
4.1 Nature et état physique des polluants pétroliers	9
4.2 Température	9
4.3 Oxygène	9
4.4 Eléments nutritifs	10
4.5 Autres facteurs	10
PROBLEMATIQUE ET PLAN DE TRAVAIL	11
CHAPITRE II MATERIEL ET METHODES	12
1. TERRAINS EXPERIMENTAUX ET SITES DE PRELEVEMENT	12
1.1 Zone tempérée	12
1.2 Zone tropicale	12
2. TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES	13
2.1 Isolement des souches	13
2.2 Test préliminaire d'utilisation des hydrocarbures	15
2.3 Identification des souches	16
2.3.1 Caractères étudiés	16
2.3.2 Classification numérique et identification	17
2.4 Cultures pour essais de biodégradation	17

3.	PETROLE UTILISE	18
3.1	Composition chimique générale	18
3.2	Analyse détaillée	18
4.	TECHNIQUES DE DOSAGE ET D'ANALYSE DES HYDROCARBURES	20
4.1	Extraction et fractionnement des hydrocarbures résiduels	21
4.2	Détermination du taux de biodégradation	22
4.3	Analyse par chromatographie en phase gazeuse	22
4.4	Validité des résultats	23
CHAPITRE III IDENTIFICATION DES SOUCHES ACTIVES		24
1.	SOUCHES ISOLEES	24
2.	IDENTIFICATION DES SOUCHES	25
2.1	Souches à Gram positif ou variable	26
2.2	Souches à Gram négatif	29
3.	DISCUSSION	31
3.1	Aspects taxonomiques	31
3.2	Aspects écologiques	32
CHAPITRE IV DETERMINATION DES CAPACITES DEGRADATIVES		34
1.	SOUCHES ORIGINAIRES DES SOLS DE LA ZONE TEMPEREE	34
1.1	Terreau de jardin - MNHN	34
1.2	Sol agricole - Grignon	41
2.	SOUCHES ORIGINAIRES D'INDONESIE	46
2.1	Sol forestier	46
2.2	Rivière	48
2.3	Eau de mer	49
2.4	Sédiment marin	52
3.	DISCUSSION	56
3.1	Activité des souches	56
3.2	Relations taxonomie/Capacité dégradative	59
3.3	Influence du biotope	61

CHAPITRE V	LA BIODEGRADATION DES ALCANES : SPECIFICITE ET ACTIVITES-TYPES	67
1.	DEFINITION DES SPECTRES-TYPES D'ACTIVITE	67
2.	POSITION TAXONOMIQUE ET ACTIVITES-TYPES	71
3.	DISCUSSION	72
CHAPITRE VI	CINETIQUE DE LA BIODEGRADATION	73
1.	PERFORMANCES INDIVIDUELLES DES SOUCHES	73
2.	CINETIQUE MOYENNE	75
CHAPITRE VII	STABILITE DES CAPACITES DEGRADATIVES	78
1.	PROTOCOLE EXPERIMENTAL	78
2.	STABILITE CHEZ LES ACTINOMYCETES DU SOL	79
3.	STABILITE CHEZ LES AUTRES GENRES	85
4.	DISCUSSION	86
	4.1 Influence du milieu de conservation	86
	4.2 Influence du nombre de repiquage	86
CONCLUSION	89
ANNEXE	90
BIBLIOGRAPHIE	93
RESUME	105
ABSTRACT	106