

**DIVERSITE DES BACTERIES CAPABLES DE DEGRADER LES
HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES ET
RESISTANTES AUX METAUX ET AUX ANTIBIOTIQUES
ISOLEES A PARTIR DES SEDIMENTS DE LA LAGUNE DE
BIZERTE, TUNISIE.**

**Olfab BEN SAID,^{1,2,3} Marisol GOÑI URRIZA,¹ Monia EL BOUR,²
Robert DURAN,¹ and Patricia AISSA³**

¹Equipe Environnement et Microbiologie – UMR IPREM 5254 - IBEAS – Université de Pau et des Pays de l'Adour - France. nourelimen@yahoo.fr

² Laboratoire de Bactériologie – Pathologie, Institut National des Sciences et Technologies de la Mer INSTM– Salammbô - Tunisie.

³ Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement, Faculté des Sciences de Bizerte - Tunisie.

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu voir le jour sans l'aide scientifique de tout le personnel du Laboratoire d'Écologie Moléculaire de l'Université de Pau et des pays de l'Adour (France) et celui du Laboratoire de Bactériologie – Pathologie de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (Salammbô). Nous exprimons nos plus vifs remerciements au MRSTDC pour son soutien financier.

RESUME

Malgré les rejets continus de xénobiotiques, la lagune de Bizerte en Tunisie possède une stabilité biologique qui montre sa capacité autoépuration. Afin d'estimer le rôle des microorganismes dans cette stabilité, nous avons étudié l'impact des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), des métaux lourds ainsi que l'effet des paramètres du milieu sur la diversité bactérienne dans les eaux et les sédiments. Nous avons utilisé des approches de culture microbienne et de biologie moléculaire dans notre étude de la diversité bactérienne des sédiments lagunaires. Ainsi, nous avons isolé des bactéries capables de dégrader les HAPs, par des enrichissements sur milieu minéral contenant du fluoranthène. Ces bactéries ont été caractérisées par des tests morphologiques et biochimiques. Les bactéries qui présentent à la fois une résistance aux antibiotiques et aux métaux lourds ont été retenues. A partir des sédiments faiblement à moyennement contaminés, nous avons isolé (6%), contre (42%) à partir des sédiments les plus contaminés. Par ailleurs, la diversité bactérienne des différentes stations de prélèvement a été estimée par T-RFLP (*Terminal-restriction fragment Length Polymorphism*) basée sur l'analyse des gènes qui codent pour les ARNr 16S. Les analyses statistiques combinées des paramètres hydrobiologiques, de la teneur en HAPs et des empreintes génétiques des communautés bactériennes par T-RFLP ont montré que la communauté bactérienne des sédiments de la station la plus contaminée par les HAPs se différencie clairement de celles des autres ; celle-ci apparaît nettement influencée par la présence de HAPs.

Mots clés : Auto-épuration, HAPs, métaux lourds, diversité bactérienne.

INTRODUCTION

La pollution des mers constitue l'un des problèmes environnementaux majeurs par son impact sur la biosphère et la santé humaine DCE/60 (2000). Les zones côtières

reçoivent les eaux usées urbaines, industrielles, hospitalières et agricoles. Les apports en polluants y sont, en dehors d'accidents ponctuels, de nature diffuse et chronique Gillan *et al.* (2005). Parmi les nombreux composés arrivant dans le milieu marin, les micropolluants, composés métalliques et organiques présents à l'état de traces, sont susceptibles d'avoir une action toxique pour les organismes présents Schwarzenbach *et al.* (2006). Bien que ces molécules soient présentes à de faibles concentrations, certains composés récalcitrants, en raison de leur nature et de leurs propriétés, peuvent alors s'accumuler dans les sédiments, pour devenir persistants dans l'environnement et fortement bioaccumulables au travers de la chaîne trophique. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), les métaux lourds et les antibiotiques sont parmi les polluants les plus fréquemment rencontrés dans ces environnements côtiers Córdova-Kreylos *et al.* (2006).

Les microorganismes jouent naturellement un rôle capital dans le devenir et la dégradation des polluants dans les écosystèmes. L'utilisation des communautés microbiennes présentes dans les sédiments marins constitue un processus clé de l'atténuation naturelle, de plus en plus couramment envisagé comme une alternative aux procédés actifs pour la réhabilitation de sites contaminés Ballerini et Vandecasteele (1996).

La lagune de Bizerte, située au nord de la Tunisie, reçoit des quantités importantes d'eaux usées urbaines des villages avoisinants ainsi que des rejets industriels. L'activité industrielle sur son pourtour étant très développée et diversifiée (industries pétrolières, aciéries, cimenteries...), cette lagune est chroniquement exposée à des xénobiotiques tels les HAPs, les métaux lourds et les antibiotiques Yoshida *et al.* (2002) ; Trabelsi et Driss (2005).

Dans le présent travail, nous avons choisi l'essentiel des stations autour de la lagune de Bizerte (partie septentrionale de la Tunisie) afin d'isoler des souches

bactériennes capables de dégrader les HAPs, résistantes aux métaux lourds et aux antibiotiques, d'étudier l'impact des HAPs, des métaux lourds ainsi que l'effet des paramètres du milieu sur la diversité bactérienne.

MATERIELS ET METHODES

Localisation des stations d'échantillonnages

Les 14 stations d'échantillonnages se situent dans la lagune de Bizerte (figure 1), dans des zones polluées, industrielles et des oueds Ben Said *et al.* (2008). La lagune de Bizerte étant fortement affectée par de multiples pressions anthropiques, reçoit des quantités importantes d'eaux usées urbaines des villes et villages avoisinants ainsi que des rejets industriels. L'activité industrielle sur son pourtour étant très développée et diversifiée (industries pétrolières, aciéries, cimenteries...), ce milieu lagunaire est chroniquement exposé à des xénobiotiques tels les hydrocarbures Trabelsi et Driss (2005), les métaux lourds Chouba *et al.* (1996) ; Yoshida *et al.* (2002).

Echantillonnage

Des échantillons d'eaux et de sédiments ont été prélevés en mai 2004 à chaque site. Les prélèvements d'eau de fond ont été réalisés dans des bouteilles stériles et destinés à la quantification de la matière en suspension, de la teneur en oxygène dissous et à la réalisation des dosages des nutriments (nitrites et nitrates, phosphates) et de la chlorophylle a. Les prélèvements de sédiments ont été réalisés à l'aide d'une benne et récupérés dans des récipients stériles puis transportés à 4°C. Ces échantillons sont destinés aux dosages des HAPs et des métaux lourds ainsi qu'aux isollements bactériens.

Les mesures des paramètres physiques (pH, température, salinité et oxygène dissous) ont été effectuées *in situ*. La teneur en chlorophylle a au niveau du fond a été évaluée par la technique de Richards (1952). Le dosage de l'azote nitreux (N-NO₂) a été effectué avec la méthode de Bendschneider et Robinson (1952) légèrement modifiée

Koroleff (1973) in FAO. (1975). La méthode décrite par Koroleff (1973) est directement utilisable pour la mesure de l'azote nitrique (N-NO₃). La méthode colorimétrique de Murphy et Riley (1962) a servi pour évaluer le phosphore inorganique. La détermination de la matière organique en suspension MES dans l'eau a été effectuée par filtration.

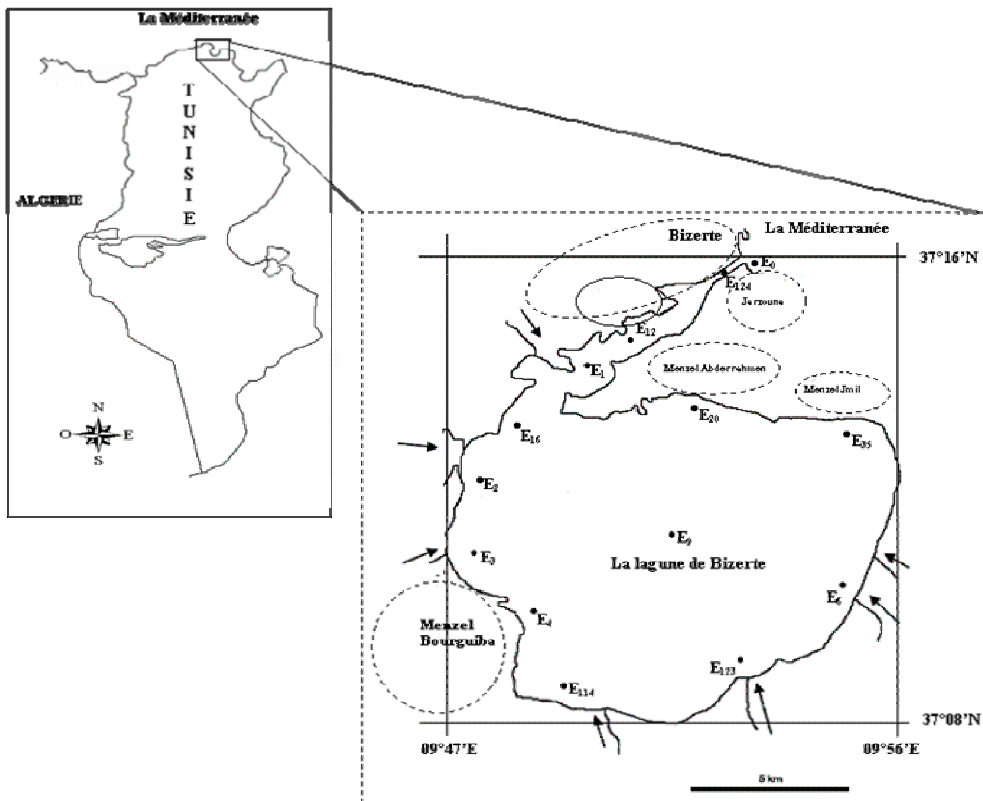


FIGURE 1 : Localisation des stations d'échantillonnage (1 à 14) dans la lagune de Bizerte d'après Yoshida *et al.* (2002).

○ Zones polluées

○ Zones industrielles

→ Oueds

Teneur des sédiments en HAPs

Les 16 HAPs retenus comme polluants prioritaires par l'*American Environmental Protection Agency U S EPA* (1990) ont été dosés. Le dosage des HAPs a été réalisé en 4 étapes : extraction par ASE 200 (extracteur au solvant automatisé), purification, séparation des différentes fractions, enfin l'analyse des fractions obtenues par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG/SM).

Isolement des souches

Les souches bactériennes capables de dégrader des HAPs ont été isolées par des enrichissements dans un milieu Minéral Salin de Base [MSB, par litre, 8.8 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3 g de KH_2PO_4 , 1 g de NH_4Cl , 0.5 g de NaCl , 1 ml de 1 mol/l de MgSO_4 (pH 7)] additionné de fluoranthène à raison de 100 mg/l. 1g de sédiment ont été incubés dans 9 ml de solution de Ringer à 30°C sous agitation. Après une nuit d'incubation, 2 ml du surnageant ont été utilisés pour inoculer un volume de 18 ml de MSB additionné de fluoranthène. A partir de cette préculture, l'inoculum a été rajouté à 10 % v/v dans un nouveau milieu. Cette opération a été répétée à chaque épuisement du milieu nutritif. La croissance bactérienne a été suivie par spectrophotométrie UV (Densité Optique de 600 nm). Les cultures ont été arrêtées après 30 jours d'incubation à 30°C. A partir des étalements des cultures sur milieu solide complet, les colonies différant morphologiquement ont été isolées et purifiées par la méthode de repiquage en stries et conservées à -80 °C par congélation en double Bastiaens *et al.* (2000) ; Daane *et al.* (2001).

Caractérisation préliminaire des souches isolées

L'aspect des colonies (diamètre, élévation, contour, surface, consistance, pigmentation) a été déterminé après croissance sur milieu Plat Count Agar (PCA) en boîtes de Pétri après 24 h d'incubation à 30°C ; la morphologie cellulaire (forme,

mensurations, arrangement cellulaire) a été examinée au microscope sur des cellules après croissance sur bouillon nutritif en notant l'aspect de la culture. La coloration de Gram a été effectuée sur des cellules jeunes.

La mobilité des colonies a été étudiée par observation microscopique à l'état frais sur cultures dans une goutte d'eau distillée stérile entre lame et lamelle, et confirmée par repiquage sur milieu spécifique : milieu mannitol-mobilité.

Pour la caractérisation biochimique, les tests enzymatiques ont été réalisés sur des cultures incubées pendant 18 à 24h à 30°C sur milieu PCA.

L'oxydase a été recherchée sur papier filtre selon la technique de Kovacs (1956) : une colonie est étalée sur un disque imprégné de diméthyl-p-phénylène diamine préalablement trempé dans de l'eau distillée stérile. La catalase a été révélée par H₂O₂ à 10 volumes sur les colonies en boîtes de Pétri.

La recherche de l'uréase, de la production d'indole et de la tryptophane désaminase a été faite à partir du milieu de Ferguson ensemencé par une culture pure prélevée sur milieu gélosé ensuite incubé à 30°C pendant 24 à 48 heures.

La présence de l'indole a été révélée par la formation d'un anneau rouge dans la partie supérieure du milieu après addition de quelques gouttes du réactif de Kovacs, tandis que celle de la tryptophane désaminase (TDA) a été réalisée en ajoutant une goutte de perchlorure de fer dilué au 1/3 dans de l'eau Bergey's Manual of Systematic Microbiology (1994).

La fermentation des sucres (glucose, lactose) ainsi que la production de H₂S ont été recherchées sur le milieu d'identification combiné : milieu lactose-glucose H₂S ou milieu de Hajna-Kligler en ensemencant abondamment la surface par des stries ou par inondation, puis le culot par simple piqûre avant de les mettre à l'étuve pendant 24h à 30°C.

La production éventuelle d'un pigment fluorescent a été déterminée sur les milieux de King *et al.* (1954).

Profils de la résistance aux antibiotiques

Les antibiogrammes ont été effectués sur des géloses Müller - Hinton (MH) par la méthode de diffusion en gélose à partir de disques pré-imprégnés et incubés en aérobiose à 30°C pendant 18 à 24 h. Les antibiotiques testés correspondent au panel utilisé en routine en milieu hospitalier (Pénicilline, Amoxicilline, Oxacilline, Céfoxitine, Streptomycine, Néomycine, Sulfamides, Tétracycline).

Les résultats obtenus ont été interprétés selon les critères du comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie Société française de Microbiologie (1998) et comparés aux phénotypes de sensibilité naturelle définis pour les souches dites « sauvages » appartenant à la même espèce bactérienne Société française de Microbiologie (2005).

Profils de la résistance aux métaux lourds

Huit métaux lourds ont été étudiés : Chrome (Cr), Cobalt (Co), Fer (Fe), Nickel (Ni), Cadmium (Cd), Zinc (Zn), Cuivre (Cu) et Plomb (Pb).

Dans le but d'évaluer qualitativement l'effet de ces métaux (inhibition ou non de la croissance de la souche en question), nous avons eu recours à une méthode de diffusion en gélose à partir de puits de 1 cm de diamètre et de 4mm de profondeur remplis de diverses solutions aqueuses métalliques [CoCl₂, NiCl₂, CdCl₂, CrCl₃, FeCl₃, ZnCl₂, CuCl₂, Pb(NO₃)₂] Hassen *et al.* (1998).

Etude de la diversité des communautés bactériennes par T-RFLP (Terminal restriction fragment Length Polymorphism)

Les extractions des ADN génomiques des sédiments ont été réalisées par Kit Ultra Clean Soil DNA Isolation (MoBio) en suivant les recommandations du

fournisseur. Les produits issus de l'amplification par PCR de la séquence codant pour l'ARN ribosomique 16S avec des amorces marquées ont été digérés par l'endonucléase de restriction HaeIII. Les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse capillaire. La taille des différents fragments terminaux (TRFs) a été déterminée par le logiciel GeneScan Bordenave *et al.* (2007). Après normalisation, les analyses multivariées des données de T-RFLP ont été réalisées par le logiciel MVSP. Les analyses canoniques de correspondance (ACC) ont permis de comparer d'une part les communautés bactériennes entre elles et d'autre part de voir l'influence des paramètres environnementaux sur la structure des communautés bactériennes.

RESULTATS

Les microorganismes isolées capables de dégrader les HAPs appartiennent à différents groupes de bactéries à Gram positifs (30%) et à Gram négatifs (70%). Parmi celles-ci les bacilles à Gram négatifs (74%) sont prédominants. Un faible nombre de souches (6%) dégradant les HAPs a été isolé à partir des sédiments faiblement à moyennement contaminés, contre un nombre élevé de bactéries résistantes aux métaux lourds et aux antibiotiques à partir des sédiments les plus contaminés (42%). Les souches ont été majoritairement isolées des stations E₁ et E₃₅ (9%), E₃ et E₆ (8%), E₂₀ (6%) et des stations E₁₂₄, E₁₁₄, E₄ et E₁₂₃ (2%). Parmi les souches isolées, 26 souches ont été sélectionnées pour leur résistance aux métaux lourds et aux antibiotiques. Elles sont issues majoritairement de la station E₁ (30%), alors que seulement 2 souches proviennent des stations E₃₅, E₁₁₄ et 1 seule des stations E₆, E₂₀ et E₄. A partir des profils de T-RFLP, l'analyse canonique des correspondances avec les paramètres environnementaux montre que les communautés bactériennes de la station E₁₂ sont sous la dépendance de la salinité et de divers éléments nutritifs comme les nitrates, les nitrites, le phosphore et l'azote (figure 2). De même, l'analyse canonique des

correspondances avec les concentrations en HAPs a montré que les communautés bactériennes des sédiments de la station E₁₂ sont influencées par la présence des HAPs (figure 3).

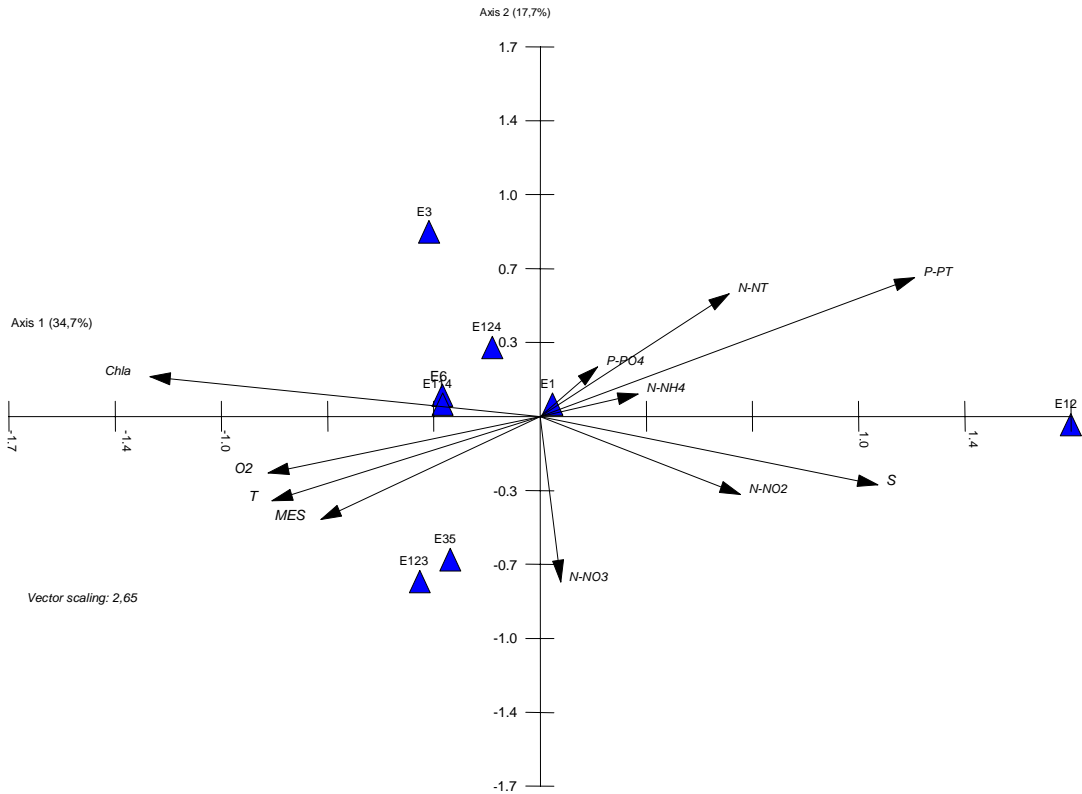


Figure 2 : Analyse canonique des correspondances entre les paramètres environnementaux et les communautés bactériennes des sédiments de différentes stations. Les communautés bactériennes ont été caractérisées par T-RFLP. E₁, E₃, E₄, E₆, E₁₂, E₂₀, E₃₅, E₁₁₄, E₁₂₃, E₁₂₄ : stations d'échantillonnage dans la lagune ; T: température ; MES: matière en suspension ; Chla : chlorophylle a ; PO₄ : phosphore ; N : azote ; NH₄ : ammonium ; NO₃ : nitrate ; NO₂ : nitrite.

L'analyse canonique des correspondances des T-RFs a permis de corrélérer certaines populations (T-RFs) avec la présence de polluant (figure 4). Les populations caractérisées par le T-RF de 56 pb sont fortement influencées par le fluoranthène et le pyrène. Toutefois, cette population est minoritaire dans les sédiments. Les populations caractérisées par le T-RF de 256 pb sont corrélées avec la présence de fluorène, de dibenzo(a,h)anthracène et de benzo(g,h,i)perylène. Ces populations se trouvent en majorité dans les communautés des sédiments des stations E₁₂₃ et E₃₅.

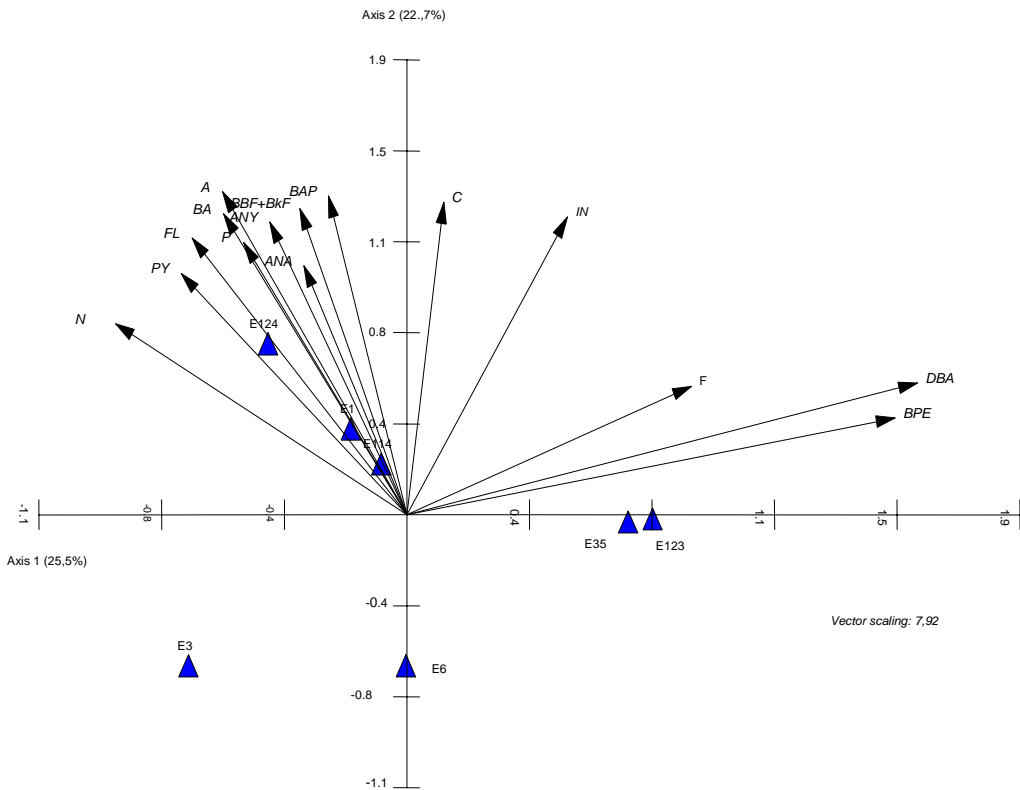


Figure 3 : Analyse canonique des correspondances entre les communautés bactériennes des sédiments de différentes stations et les concentrations en HAPs.

N, Naphtalène ; ANY, Acénaphtylène ; ANA, Acénaphtène ; F, Fluorène ; P, Phénanthrène ; A, Anthracène ; FL, Fluoranthène ; PY, Pyrène ; C, Chrysène ; BA, Benzo(a)anthracène ; BBF+BkF, Benzo[b+k]fluoranthène ; BAP, Benzo(a)pyrène ; IN, Indeno(1,2,3-cd)pyrène ; DBA, Dibenzo(a,h)anthracène ; BPE, Benzo(g,h,i)perylène.

Les communautés bactériennes ont été caractérisées par T-RFLP seul les stations sont représentées sur la figure.

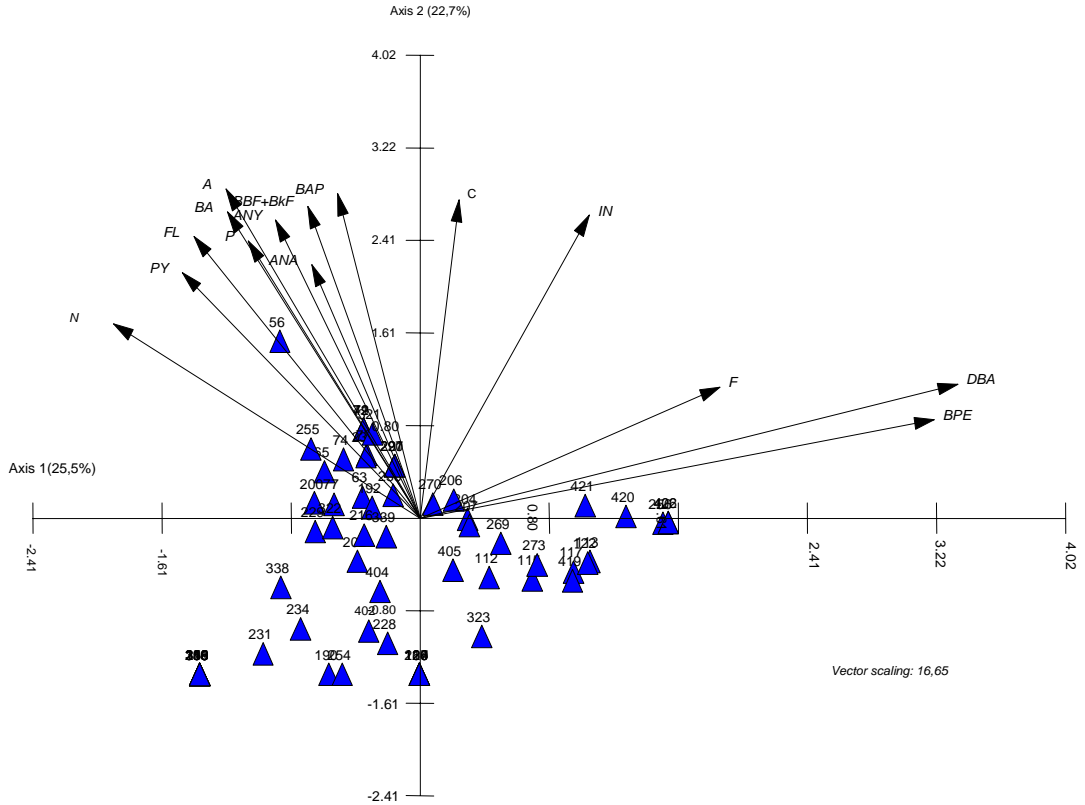


Figure 4 : Analyse canonique de correspondance entre les populations bactériennes (analyse T-RFLP) des sédiments de différentes stations de la lagune et les concentrations en HAPs dans ces sédiments. Seul les T-RFs sont représenté sur le graphe. N, Naphtalène ; ANY, Acénaphtylène ; ANA, Acénaphtène ; F, Fluorène ; P, Phénanthrène ; A, Anthracène ; FL, Fluoranthène ; PY, Pyrène ; C, Chrysène ; BA, Benzo(a)anthracène ; BBF+BkF, Benzo[b+k]fluoranthène ; BAP, Benzo(a)]pyrène ;IN, Indeno(1,2,3-cd)pyrène ; DBA, Dibenzo(a,h)anthracène ; BPE, Benzo(g,h,i)perylène.

DISCUSSION

- **Isolement et caractérisation des souches dégradant le fluoranthène à partir des sédiments de la lagune de Bizerte**

Sachant que les méthodes microbiologiques classiques (isolement sur milieu de culture) ne permettent de détecter qu'une faible proportion des microorganismes présents, moins de 1% des bactéries sont cultivables Wards *et al.* (1990) ; Amann *et al.* (1995), la biodégradabilité du fluoranthène semble essentiellement le fait des bacilles gram négatifs. Ces résultats sont en accord avec ceux utilisant des souches pures Boonchan *et al.* (1998) ; Solano-Serena *et al.* (1999) ; Bastiaens *et al.* (2000) ; Danne *et al.* (2001). Cependant, quelques espèces bactériennes parmi les gram positifs capables de dégrader des HAPs ont été isolées Jimenez *et al.* (1996) ; Churchill *et al.* (1999). Nous avons par ailleurs constaté que la capacité de dégrader les HAPs des souches isolées dans la lagune de Bizerte est dans la majorité des cas associée à une résistance multiple aux métaux et /ou antibiotiques, à cela rien de bien singulier puisque les polluants organiques, les métaux lourds et les antibiotiques sont fréquemment présents dans les secteurs proches des zones urbanisées Bouchez *et al.* (2000).

- **Structure des communautés bactériennes des sédiments lagunaires**

Comme rapporté par Córdova-Kreylos *et al.* (2006), nos résultats soutiennent l'idée générale que « *les variables environnementales et les teneurs en polluants ont des effets remarquables sur la composition et la structure des communautés microbiennes des sédiments superficiels* ». C'est ainsi qu'un certain nombre de facteurs physico-chimiques, y compris la porosité, la salinité, les teneurs en ammonium et en oxygène, ont été impliqués dans la répartition des bactéries dans les sédiments Herbert (1999). Des analyses comparatives (ACC) ont permis de conforter nos hypothèses en mettant en évidence l'importance de certains paramètres hydrologiques sur la structure des communautés bactériennes, ainsi que celles des concentrations en certains HAPs. C'est ainsi que les populations bactériennes caractérisées par le TRF 56 pb (station E₁₂) sont apparues limitées

par le fluoranthène et le pyrène, celles caractérisées par le TRF 256 pb (stations E₃₅ et E₁₂₃) par le fluorène, le dibenzoanthracène et le benzo-pérylène. De ce fait, le TRF 256 pb pourrait correspondre à une souche isolée à partir des sédiments marins et appartenant au genre *Marinobacter* (N° d'accension : AB026946) capable de dégrader le poly (3-hydroxybutyrate) et /ou à des souches d'*Acinetobacter* sp. isolées à partir des mêmes sédiments lagunaires mais capables de dégrader le fluoranthène (N° d'accension : AM490039, AM490040) Ben Said *et al.* (2008). Nos résultats nous mènent aussi à penser à la présence de taxons bactériens impliqués dans la dégradation des hydrocarbures, les membres des γ -Protéobactéries s'étant avérés métaboliquement actifs et capables de dégrader des HAPs de faible et haut poids moléculaire dans des environnements pollués par les HAPs Ben Said *et al.* (2008). Or, Langworthy *et al.* (1998) ont montré que les communautés microbiennes des sédiments du fleuve de Scioto présentant des concentrations élevées en HAPs pouvaient adopter trois types de réponses : (i) augmentation du potentiel de dégradation des HAPs, (ii) changement de la structure de la communauté microbienne, (iii) augmentation dans la fréquence des séquences de gènes de dégradation. Nous avons effectivement observé un changement de la structure communautaire, marqué surtout au niveau de la station E₁₂. Les hypothèses (i) et (iii) de Langworthy *et al.* (1998) seront vérifiées ultérieurement.

En conclusion, il semblerait que les communautés bactériennes des stations de canal (stations E₁₂, E₁₂₄, E₁) et celles autour de la lagune (stations E₄, E₆, E₃₅, E₁₁₄, E₁₂₃) sont soumises à des conditions environnementales différentes. Il apparaît que les communautés bactériennes des sédiments de la station E₁₂ sont fortement influencées par la présence d'HAPs suggérant que ces communautés bactériennes possèdent un potentiel important de dégradation des HAPs. La détermination par digestion prédictive des T-RFs des souches bactériennes isolées montre que les souches obtenues appartiennent à des populations majoritaires dans les profils T-RFLP.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Amann RL., Ludwig W., et Schleifer KH. (1995)** : Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59 : 143-169.
- Ballerini D. et Vandecasteele JP. (1996)** La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques. Pp : 836-865, *In. Biotechnologie.* Ed Scriban R. TEC et DOC. Paris.
- Bastiaens L., Springael D., Wattiau P., Harms H., De Wachter R., Verachtert H., et Diels L. (2000)** : Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-Sorbing carriers. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1834-1843.
- Bendshneider K. et Robinson RJ. (1952)** : A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.* 11: 87-86.
- Ben Said O., Goñi-Urriza MS., El Bour M., Dellali M., Aissa P., et Duran R. (2008)** : Characterization of aerobic polyaromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments, Tunisia. *J. Appl. Microbiol.* 104 : 987-997.
- Boonchan S., Britz ML., et Stanley GA. (1998)** : Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnol Bioeng.* 59 : 482-494.
- Bordenave S., Goñi-Urriza MS., Caumette P., et Duran R. (2007)** : Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Appl Environ Microbiol (In press)*.
- Bouchez T., Patureau D., Dabert P., Juretschko S., Dore J., Delegenes P., Moletta R., et Wagner M. (2000)** : Ecological study of bioaugmentation failure. *Environ. Microbiol.* 2 : 179–190.
- Churchill SA., Harper JP., et Churchill PF. (1999)** : Isolation and characterization of a *Mycobacterium* Species capables of degrading Three- and Four –Rings Aromatic and Aliphatic Hydrocarbons. *Appl. Envir. Microbiol.* 65 : 549-552.

- Córdova-Kreylos AL., Cao Y., Green PG., Hwang HM., Kuivila KM., LaMontagne MG., Van De Werfhorst LC., Holden PA., et Scow KM. (2006) :** Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California Salt Marsh Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 : 3357-3366.
- Chouba L., Amara H. et El Abed A. (1996) :** Etat de contamination par les éléments traces des sédiments de la lagune de Bizerte. *Bull. INSTM.* 6 : 128-131.
- Danne LL., Harjono I., Zylstra GJ., et Häggblom MM. (2001) :** Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 : 2683-2691.
- DCE. Directive 2000/60/CE** du Parlement européen. (2000) : Journal officiel de l'Union européenne. 1-73.
- FAO. (1975) :** Methods for detection, measurement and monitoring of water pollution. Pp : 137, *In* Manual of methods in aquatic environment research, Part 1. FAO. Fisheries Technical Paper. 238 p.
- Gillan DC., Danis B., Pernet P., Joly G., et Dubois P. (2005) :** Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 : 679-690.
- Hassen A., Jedidi N., Cherif M., M'hiri A., Boudabous A., et Cleemput OV. (1998) :** Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresour. Technol.* 64 : 7-15.
- Herbert RA. (1999) :** Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 23 : 563-590.
- Holt JG., Krieg NR., Sneath PHA., Staley JT., et Williams ST(ed.). (1994) :** Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th ed. Ed Williams and Wilkins Co. Baltimore. 1 : 964 p.
- Jimenez IY. et Bartha R. (1996) :** Solvent-augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 : 2311-2316.
- King EO., Ward MK. et Raney DE. (1954) :** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44 : 301-307.

- Kovacs N. (1956)** : Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*. 178-703.
- Langworthy DE., Stapleton RD., Sayler GS., et Findlay RH. (1998)** : Genotypic and phenotypic responses of a riverine microbial community to polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 3422–3428
- Murphy J. et Riley JP. (1962)** : A modified single solution method for the determination of phosphate in naturel waters. *Ana. Chem. Acta.* 27: 31-36.
- Richards FA. et Thompson TG. (1952)** : The estimation and characterization of plankton populations by analysis. 2 - A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigment. *J. Mar. Res.* 11 : 156-172.
- Schwarzenbach RP., Escher BI., Fenner K., Hofstetter TB. Johnson CA., Gunten, Urs von, et Wehrli B. (2006)** : The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. *Science.* 313 : 1072 – 1077.
- Société Française De Microbiologie. (1998)** : Communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* 13 : 243-258.
- Société Française De Microbiologie. (2005)** : Communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Société Française de Microbiologie. Edition 2005. 50 p.
- Trabelsi S. et Driss MR. (2005)** : Polycyclic aromatic hydrocarbons in superficial costal sediments from Bizerte Lagoon, Tunisia. *Mar. Pollut Bull.* 50 : 344-359.
- Ward DM., Weller R., et Bateson MM. (1990)** : 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a wellstudied thermal community. *FEMS Microbiol. Rev.* 6 : 105-115.
- Yoshida M., Hamadi K., et Ghrabi A. (2002)** : Solid waste landfills and soil/sediment contamination around Bizerte lagoon: Possible pollution sources. *In Study on Environmental Pollution of Bizerte Lagoon.* Ed Ghrabi A. and Yoshida M. INRST-JICA Publishers. 55 p.