

**BIODEGRADATION DU PETROLE BRUT EN MER PAR :
ENTEROBACTER CLOACAE, *ESCHERICHIA COLI* ET
*PSEUDOMONAS SPP.***

A. OULD BOUDIA*, K. HAMMADI

Universite Abdelhamid Ibn Badis, Departement de Sciences de la mer et Ressources Halieutiques, Laboratoire de Microbiologie, Mostaganem, Algerie.

Auteur correspondance : boudia1978@hotmail.com Tel : +213 776294366

RESUME

La pollution de la mer méditerranéenne par les rejets industriels d'origine pétrolière est l'un des problèmes de santé marine qui menace les ressources aquatiques ; parmi de nombreuses raffineries qui sont situées le long des côtes algériennes, la raffinerie d'Arzew au Nord-Ouest de l'Algérie. Le but de ce travail est la mise en évidence d'une méthode de lutte contre la pollution en utilisant des moyens biologiques représentés par le phénomène de biodégradation et ceci par la sélection des microorganismes hétérotrophes efficaces dans le traitement des effluents et des nappes d'hydrocarbures en cas d'accidents en eau de mer.

L'estimation de taux de biodégradation du pétrole par les microorganismes est basée sur l'utilisation d'un respiromètre de Warburg qui permet l'analyse de la biodégradation d'échantillons via la mesure : CO_2 dégagé = DCO de l'oxygène consommé lors de la réaction.

Au bout du 12^{ème} jour, nous observons des valeurs élevées pour les souches *Enterobacter cloacae* et *Pseudomonas spp.*, par contre pour la souche *Escherichia coli*, ces valeurs sont nulles. Nous notons que le taux de fermentation le plus élevé de pétrole brute est obtenu au 12^{ème} et au 16^{ème} jour d'incubation, est relié individuellement à la souche de *Enterobacter cloacae*. La comparaison de taux de CO_2 , a indiqué que: *Enterobacter cloacae* > *Pseudomonas spp.* > *Escherichia coli*. Ceci montre que dans

toutes les populations bactériennes étudiées, sauf la bactérie *Enterobacter cloacae*, sont capables d'assimiler les substances pétrolières.

Mots clés : biodégradation, bactéries, eau de mer, Warburg, CO₂, pétrole brut, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas* spp.

INTRODUCTION

Le rejet des hydrocarbures d'origine pétrolifère dans l'environnement constitue l'un des phénomènes de pollution les plus préoccupants en ce sens que ces hydrocarbures sont toxiques pour l'homme, la faune et la flore (Belhaj et al., 2000).

Le rejet des produits pétroliers dans les milieux marins ou terrestres entraîne une prolifération des microorganismes aptes à se développer sur les hydrocarbures et leurs produits de dégradation. Leur nombre est beaucoup plus important dans les zones polluées de façon chronique et s'accroît après un apport d'hydrocarbures dans les sites dépourvus de contamination (Soltan, 2004). Les études de Chang et al. (2001) mettent en évidence le potentiel de dégradation anaérobie du phénanthrène par des bactéries sulfato-réductrices dans des sédiments.

L'élimination du pétrole de l'environnement marin nécessite l'intervention de différents facteurs biotiques et abiotiques. Parmi ces facteurs, la biodégradation par les microorganismes et en particulier les bactéries est le processus naturel le plus important dans la dépollution de l'environnement marin (Soltani, 2004). Cependant parmi les microorganismes aptes à se développer sur les hydrocarbures, les bactéries restent qualitativement et quantitativement prépondérantes pour métaboliser ces substrats (MacNaughton et al., 1999). Des travaux scientifiques récentes indiquent que les bactéries ont développé des mécanismes de dégrader ces substances organiques (Spain, 1995 ; Freeman & Sutherland, 1998 ; Hawari et al., 2001 ; Ralebitso et al., 2002).

Une grande variété des bactéries est capable d'utiliser les hydrocarbures comme seule source de carbone. Ce processus est d'un grand intérêt pour la préservation de

l'environnement naturel en réduisant la quantité de contaminants liés au pétrole (Pijanowska et *al.*, 2007). Certaines souches bactériennes peuvent produire leur propre agent de surface, qui contribue à l'assimilation efficace/absorption d'hydrocarbure (Prabhu et Phale, 2003). Quelques expériences ont expliqué le mécanisme d'oxydation et également le co-métabolisme de ces matériaux (Gibson et *al.*, 1975 ; Juhasz et *al.*, 1997) et d'autres rapports ont montré que les bactéries isolées du sol contaminé pourrait utiliser certains HAP comme seule source de carbone (Mueller et *al.*, 1989; Walter et *al.*, 1991; Kastner et *al.*, 1994). Des réactions métaboliques des bactéries et d'autres microorganismes qui sont naturellement présents dans les milieux marins sont couramment appelées mécanismes de biodégradation.

L'objectif de cette étude est l'isolement des microorganismes marins capables d'éliminer les substances pétrolières en cas des déchets pétroliers.

MATERIEL ET METHODES

1. Caractérisation et identification des souches

Cette étape nous permet de mettre en évidence la microflore existante dans l'eau de mer de la zone industrielle contaminée par les fluides des rejets.

À partir d'un échantillon de l'eau de mer (port de zone industrielle ARZEW) prélevé dans le période printemps au mois de Mai et Juin 2009, nous procédons à l'ensemencement sur un milieu GN (gélose nutritive +sources carboniques). L'aspect des colonies (diamètre, élévation, contour, surface, consistance, pigmentation) a été déterminé après croissance sur la gélose nutritive additionnée à 1ml de sources carbonique (Arabian light) en boîtes de pétri après 24 h d'incubation à température ambiante.

La sélection est basée sur l'aspect macroscopique des colonies : la couleur, la forme, le diamètre, l'opacité.... Un échantillon de chaque type de colonie est prélevé ensuite purifié par repiquage successif selon la méthode de stries (Austin, 1988).

L'indentification biochimique a été fait par l'API system (20E et 10S) ; la morphologie 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.

2. Evaluation du taux de biodégradabilité

L'objectif de cette approche est d'estimer l'activité respiratoire par le taux de biodégradation du pétrole par les microorganismes.

La mesure de la quantité d'oxygène consommée par une population microbienne dégradant un substrat a pour but l'identification des paramètres de cinétique biologique, indispensables à la mise en place de modèles dynamiques intégrant la biodégradation. Ces essais ont été intégralement réalisés dans un respiromètre disponible au laboratoire : la méthode Warburg (figure1).

L'appareil Warburg est un respiromètre qui permet le suivi et l'analyse de la biodégradation d'échantillons via la mesure : CO_2 dégagé = DCO de l'oxygène consommé lors de la réaction. Cette technique consiste à mesurer DCO oxydée (minéralisée en CO_2 et se traduisant par une consommation d'oxygène) consommation cumulée d'oxygène associée à la dégradation de la matière organique. Cette mesure est réalisée dans des fioles closes contenant 1,9 ml de solution de polluantensemencées avec un inoculum bactérien de 100 UFC/ml et une quantité de KOH 0,1 ml à [20%^a p/v d'hydroxyde de potassium dans l'eau distillée] au réservoir central. L'oxygène est fourni par unmanomètre au fur et à mesure de sa disparition de l'air présent au dessus du liquide. Cet appareil permet d'étudier la biodégradabilité d'un effluent et les cinétiques de dégradation.

Chaque flacon de mesure est relié à un système manométrique. Les flacons sont agités pendant la période d'incubation pour homogénéisation. La quantité d'oxygène absorbée par les microorganismes pour dégrader le composé à tester, est remplacée par

l'air au-dessus de l'échantillon dans le flacon, et le CO₂ produit est capté par un absorbant (la soude caustique KOH). Il est nécessaire de rajouter deux flacons témoin à 3 ml de tampon sans étalonnée (témoin thermo barométrique).

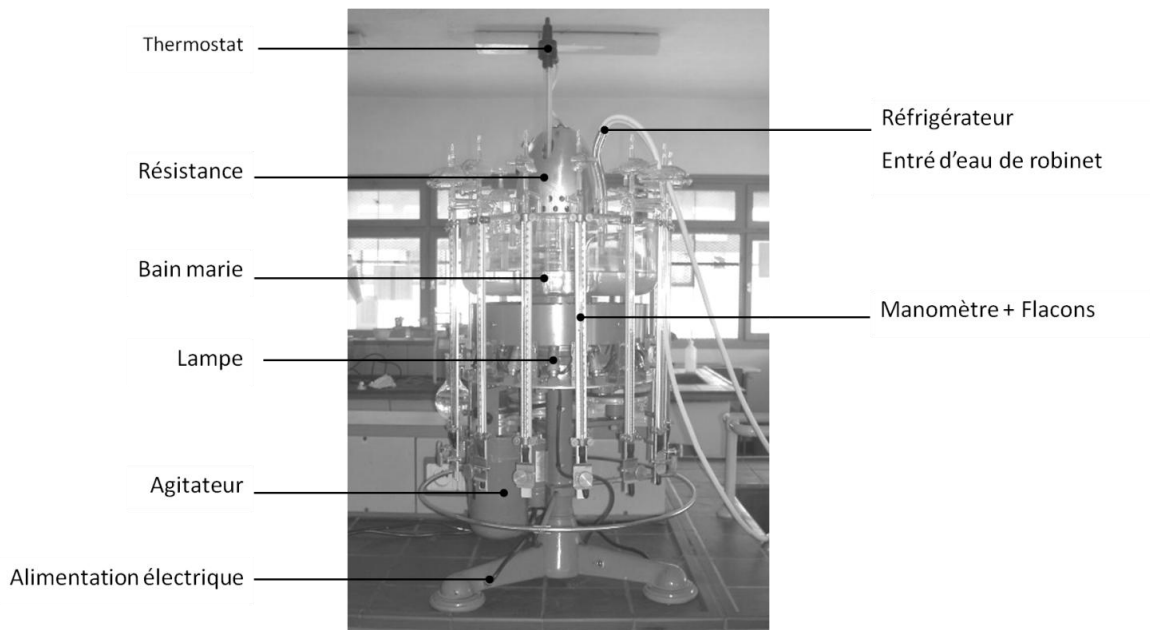


Figure 1. Appareil respiromètre de Warburg

Pour maintenir les conditions les plus adéquates en termes d'ajouts de nutriments, de maintien du pH et d'inhibition de la nitrification, les flacons sont remplis selon les conditions rassemblées dans le tableau 1.

3. Préparation de la solution mère

Il s'agit de l'eau de mer naturelle prélevée dans une zone non polluée. Une quantité d'un litre est filtrée sur papier Whatman. A été ensuite rajoutés du chlorure d'ammonium (2 g/l) comme source d'azote et du phosphate de sodium (0,1 g/l) comme source de phosphore. Ce milieu est agité magnétiquement et conservé à 4° C à l'obscurité. Le pH est ajusté à 8 (Boutefnoucht et *al.*, 2006).

Tableau 1 : Conditions opératoires : quantité ajoutée dans un flacon rempli de liquide (essais de biodégradabilité liquide dans le Warburg) (Umbreit et al., 1964).

	<i>Compartiment principal</i>	<i>Réservoir central</i>
Flacons d'épreuve endogène	1,9 ml de tampon de pétrole ou xylène et 1,0 ml de suspension cellulaire étalonnée (bactéries)	0,1 ml de solution de KOH à 20% ^a
Flacon témoin thermo barométrique	3,0 ml de tampon de de pétrole ou xylène	-

20%^a (p/v) d'hydroxyde de potassium dans l'eau distillée

La source de carbone additionnée au milieu de culture est un dérivé du pétrole brut (Arabian light) d'Arzew « Oran » et le xylène commercial comme témoin. Etant donné, que la source de carbone est une fraction pétrolière légère, une espèce bactérienne serait capable à elle seule de dégrader cette source de carbone. Les bactéries utilisées pour l'inoculation de notre test sont séparé et des bacilles proviennent de notre isolement et identification aux tests bactériologiques de la première partie de notre expérimentation.

4. Méthode analytique

Le taux de dégradation est déterminé chaque 4jour grâce aux analyses du taux de dégagement de CO₂ dans le milieu par rapport à la quantité de substrat consommé dans les essais et celle présente dans les témoins abiotiques pendant une période de 16 jours d'incubation à la température de 25°C. Le rendement de minéralisation est le rapport entre le nombre de moles de carbones dégagés sous forme de CO₂.

La mesure a été effectuée chaque 4 jour pendant une période de 16 jours. On calcule le taux de CO₂ dégagé, selon la formule (Waes, 1971):

$$x = h.KCO_2$$

$$KCO_2 = \frac{Vg \frac{273}{T} + Vf\alpha}{P_0}$$

X : Représentant la quantité de gaz en μl (0°C , 760 mHg)

h : Représentant la modification en mm du bras ouverts du manomètre

KCO Représentant la constante du flacon

z :

Vf : Représentant la quantité en μl , de liquide dans le flacon

Vg : Représentant la différence, en μl , entre le volume total du manomètre et du flacon et le nombre de μl de liquide du flacon

T : Représentant 273 + la température d'opération (27°C)

α : Représentant la solubilité du CO_2 dans les solutions, en $\mu\text{l CO}_2/\mu\text{l solution}$

P_0 : Représentant la pression standard exprimée en fonction de la solution manométrique

La valeur α utilisée est la valeur α du CO_2 dans l'eau, qui est de 0,759 à 25°C .

La solution manométrique est la solution connue de Brodie à densité 1,033, de sorte que

P_0 :

$$P_0 = 760 \times \frac{13,6}{1,033} = 10000$$

RESULTATS ET DISCUSSION

1. Isolement et identification des souches

D'après l'étude macroscopique, les souches S1 et S2 apparentées à la famille des *Enterobacteriaceae* et présentent les caractéristiques suivantes: une forme bacillaire, sont à Gram négatif, aéro-anaérobie facultatives, catalase positive et à métabolisme fermentatif.

En se basant sur les tests biochimiques de cette souche, LDC et uréase négatives, citrate positif et fermentant le glucose avec production de gaz, nous avons supposé que la souche S2 appartiendrait à l'espèce *Enterobacter cloacae* (Akmouci-Toumi, 2009).

La souche S3 a été rattachée au genre *Pseudomonas*. Celle-ci forme de petites colonies circulaires, lisses et brillantes avec une pigmentation jaune.

La souche a une forme de bacillaire, avec les caractéristiques suivantes: Gram négatif, oxydase négative, catalase positive. Ces bactéries ont un caractère aérobie stricte, ADH et citrate positif (Bergey, 1984 ; Akmouci-Toumi, 2009), nous permettrait de supposer qu'il s'agit de *Pseudomonas*spp.

2. Essai de biodégradation

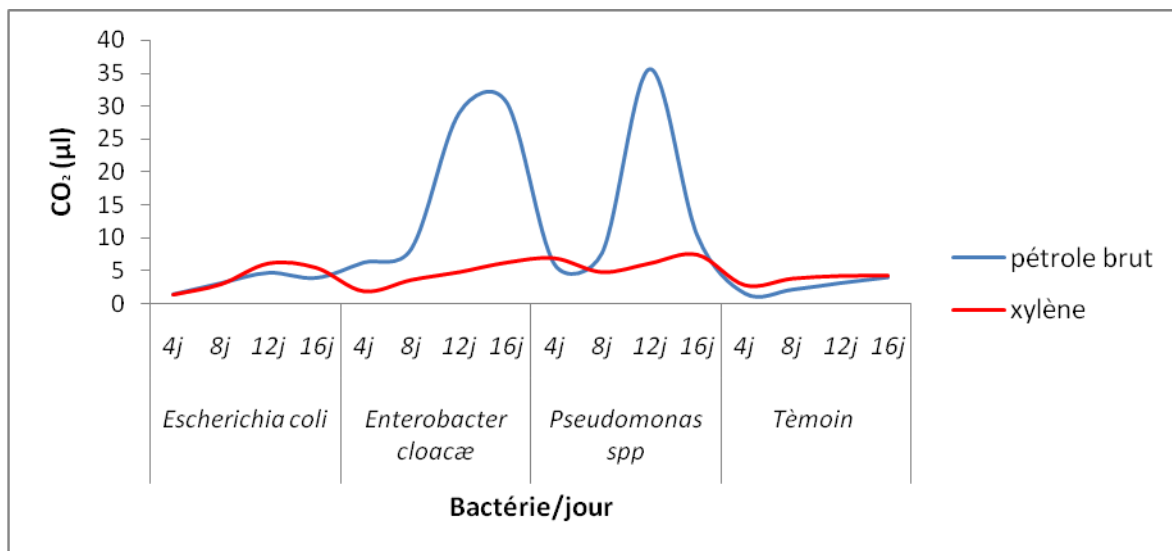


Figure 3 : Profils de minéralisation du pétrole et xylène en μl .

La figure 3 illustre les variations de la concentration CO_2 en sortie, ainsi que le rendement d'élimination de pétrole brut et xylène en fonction du temps pour les 4 phases.

La présence de pétrole dès le début de la fermentation va influencer la croissance des deux souches (**figure 3**). Au début des phases 2 et 3, les concentrations de CO₂ ont augmenté, les concentrations en sortie ont été mesurées entre 8,45 et 35,62 µl. On constate cependant nettement sur la figure 3 que ces concentrations augmentent progressivement entre les phases 2 et 3 pour *Enterobacter cloacae* et *Pseudomonas* spp. qui montrent une activité de biodégradation de pétrole et une rapide élimination dans la première quinzaine de traitement (Namkoong et al. 2002). Ceci indique que globalement les molécules sélectionnées sont très bien éliminées dans le procédé biologique, bien que ceci n'indique en rien par quel processus d'élimination. Dans une période d'inhibition sévère de la biomasse (la mesure d'activité respiratoire a augmenté de 75 % durant les phases 3 et 4), les concentrations résiduelles augmentent mais le rendement d'élimination reste élevé.

Selon Vandecasteele (2001) qui montre que *Pseudomonas* dégradant les hydrocarbures aromatiques via des dioxygénases, ce germe bactérien à un pouvoir exceptionnell'adaptation. Il habite les sols, marais et milieux littoraux, peut dégrader une foule de composés (phénols, hydrocarbures, halodérivés) (Pelmont, 2005), par exemple *n*-alcanes comme source de carbone (Witholt et al., 1990 ; Pijanowska et al., 2007). Aono et al. (1994) ont observé une situation semblable en suivant la croissance de la souche *Escherichia coli* K-12 JA 300 dans un milieu contenant de l'hexane. Cependant, avec l'ajout de *p*-xylène, les cellules ont été immédiatement tuées. Après l'addition du *p*-xylène, aucune cellule viable n'a été détectée au bout de cinq minutes. On peut donc supposer que l'absence de l'activité biodégradable de la souche *Escherichia coli* est due à la mort des cellules dès qu'elles sont mises en contact avec le pétrole et xylène.

Richard et Vogel (1999) en cultivant des souches bactériennes et en utilisant le pétrole comme seule source de carbone et d'énergie, ont rapporté que le taux de biodégradation atteint 90% après 50 jours d'incubation. D'autres auteurs (Suparna et al.

2004) ont testé la biodégradation du diesel avec une population bactérienne isolée des sédiments marins, sous des conditions aérobies, ces auteurs ont constaté après 8 jours d'incubation, un taux de disparition de fuel de 39% avec une perte de 80% des constituants aliphatiques.

Par ailleurs, il est connu que la flore microbienne a besoin d'éléments minéraux pour sa croissance, en particulier d'azote, dont les proportions optimales, généralement admises, sont de 10g d'azote et 1g de phosphore pour 100 g de carbone (Ballerini, 1999). Ces éléments rentrent dans l'édification des constituants cellulaires lors de la multiplication des microorganismes (synthèse d'ADN, protéines...ect.). Prince et *al.* (2003) rapportent que dans les environnements aérobies, les éléments limitant les plus susceptibles sont l'azote et le phosphore.

Notre test de la biodégradabilité nous a permis de constater que le xylène est très peu biodégradable dans ces conditions d'expérimentation. A titre de comparaison, un pétrole brut Arabian light est dégradé à plus de 70% (Oudot, 1984 et 2000). Cela est dû probablement à la nature de pétrole, qui est composé de plusieurs types d'hydrocarbures constitués de différentes familles assimilables par les microorganismes et qui provoque un accroissement significatif au taux de minéralisation du carbone (*Enterobacter cloacae* > *Pseudomonas spp* > *Escherichia coli*).

CONCLUSION

Au terme de cette étude, lors des expériences de biodégradation, nous nous sommes placés dans des conditions où les éléments nutritifs, notamment le milieu riche en azote et en phosphore.

L'objectif fixé de notre travail est de contribuer à la biodégradation du pétrole brute à l'aide de microorganismes isolés à partir de l'eau de mer susceptible de le dégrader.

D'après l'allure de la courbe de la variation de taux de dégradation au cours du

temps pour *Enterobacter cloacae* et *Pseudomonas* spp., nous remarquons qu'aux premiers jours le taux de CO₂ est élevée dans les phases 2 et 3 ; ce qui montre une dégradation élevée, mais dans la phase 4, no

us observons que la tolérance biodégradable d'*Enterobacter cloacae* et supérieur à *Pseudomonas* spp. par contre presque nulle pour la souche *Escherichia coli* dans tout les phases d'incubation. Belhaj et al. (2000) ont signalé une corrélation entre la composition chimique d'un pétrole brut, et son potentiel de biodégradation en ce sens que, les pétroles à fortes teneurs en alcanes sont plus sensibles aux phénomènes des dégradations microbiennes.

La comparaison les taux de CO₂ a indiqué l'ordre de biodégradabilité suivant : *Enterobacter cloacae* > *Pseudomonas* spp. > *Escherichia coli*. Ceci montre que la souche d'*Enterobacter cloacae* est capable de mieux assimiler les substances pétrolières.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akmouci-Toumi S. (2009)** : Contribution à l'étude des boues de forage : Isolement et évaluation de la capacité de quelques souches microbiennes à dégrader le gasoil. Mémoire de magister. Université M'Hamed BougaraBoumerdes.
- Aono R., Kobayashi H., Joblin KN. & Horikoshi K. (1994)**: Effects of organic solvents on growth of *Escherichia coli* K-12. Biosci. Biotech. Biochem., 58: 2009-2014.
- Austin DF. (1988)**: The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweetpotatoes and related wild species. In: P. Gregory (ed.). Exploration, maintenance, and utilization of sweetpotato genetic resources, pp. 27-60. CIP, Lima, Peru.
- Ballerini D. & Vandecasteele JP. (1999)** : La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques. In : Biotechnologie, coordinateur R. Scriban, 5ème édition, Edition Tech et Doc, pp. 835- 865.

- Ballerini D. (1999)** : Traitements biologiques des sols. Technique de l'ingénieur, traité Environnement, G2 620, pp. 1- 6.
- Belhaj A., Elmerich C., Ismaili M., Zouhdi M., Hajjam Z., Assafi M. & Alaoui M.A. (2000)** : Bacilles à Gram positif : identification et potentiel de biodégradation des hydrocarbures. BIOLOGIE INFECTIOLOGIE, VI (1).
- Bergey, DH. (1984)**: Bergey's manual of systematic bacteriology. 9^{ème} édition, p. 964.
- Boutefnouchet N., Bouzerna N. & Chettibi H. (2006)** : Biodégradation des hydrocarbures en eau de mer : Cas de la Naphta B. Scientific Study & Research, Vol VII : 1582-540X
- Cardoso da Silva JRG., Carlos E. & de Carvalho Lange I. (2003)**: Hydrogeology of study of mangrove area around Guanabara bay, Rio de Janeiro, Brazil, Unuaro do Instituto de Geociencias, UFRJ, 26, 92.
- Chang BV., Shiung L.C. & Yuan SY. (2001)**: Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. Chemosphere, 48 : 717 – 724.
- Freeman DL. & Sutherland KW. (1998)**: Biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) under nitrate-reducing condition. Water Science and Technology, 38, 33–40.
- Gibson DT., Venkatanayarana M., Jerina DM., Yagi H. & Yeh H. (1975)**: Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium. Science 189:295–297.
- Hawari J., Halasz A., Beudet S., Paquet L., Ampleman G. & Thiboutot S. (2001)**: Biotransformation routes of octahydro-1,3,5,7-tetraazido-1,3,5,7-tetrazocine by municipal anaerobic sludge. Environmental Science and Technology 35, 70–75.
- Juhasz AL., Britz ML. & Stanley GA. (1997)**: Degradation of fluoranthene, pyrene, benzo[a]anthracene and dibenz[a, h]anthracene by Burkholderiacepacia. J

ApplMicrobiol 83:189–198.

Kastner M., Breuer-Jammali M. & Mahro B. (1994): Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). ApplMicrobiolBiotechnol 41:267–273.

Namkoong W., Hwang EY., Park JS. & Choi JY. (2002): Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. Environmental Pollution, Vol. 119, No. 1, pp. 23- 31.

Oudot J. (1984): Rate of microbial degradation of petroleum components as determined by computerized capillary gas-chromatography and computerized mass-spectrometry. Mar. Environ. Res. 13, 277-302.

Oudot J. (2000) : Biodégradation du fuel de l'Erika. Life Science, 323, 945-950.

Pelmont J.(2005) : Biodégradations et métabolismes, Les bactéries pour les technologies de l'environnement. Collection Grenoble Sciences, Edition EDP Science. P : 8-9.

Pijanowska A., Kaczorek E., Chrzanowski L. & Olszanowski A. (2007) : Cell hydrophobicity of *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* spp. bacteria and hydrocarbon biodegradation in the presence of Quillay saponin. World J MicrobiolBiotechnol (2007) 23:677–682.

Prabhu Y., Phale PS. (2003): Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas* sp. Strain PP2: novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. ApplMicrobiolBiotechnol 61:342–351

Prince RC., Bare RE., Garrett RM., Grossman MJ., Haith CE., Keim LG., Lee K., Holtom GJ., Lambert P., Sergy GA., Owens EH., Guénette CC. (2003): Bioremediation of stranded oil on an Arctic shoreline. Spill Science and Technology Bulletin (this volume).

Ralebitso TK., Senior E., & Van Verseveld HW. (2002): Microbial aspects of

strazine degradation in natural environments. *Biodegradation* 13, 11–19.

Richard JY., & Vogel TM. (1999): Characterization of Soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *Internat. Biodeteriorat. and Biodegradat.*, 44, 93-100.

Soltani M. (2004) : Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. These de doctorat de l'Université Paris 6.

Spain JC. (1995): Bacterial degradation of nitroaromatic compound under aerobic conditions, In *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds*. Environmental Science Research, vol. 49, eds Spain, J.C. pp. 19–35, New York: Plenum Press, N.Y. ISBN 0-306-45014-3.

Suparna M., Sheeja J., Gita M., & Avinash V. (2004): Biodegradation of Diesel Oil by an Arabian Sea Sediment culture Isolated from Vicinity of an Oil Field, *Biores. Technol.*, 95:281-286.

Umbreit WW., Burris RH., & Stauffer JF. (1964): *Manometric Techniques*, p. 132. Minneapolis : Burgess Publishing Co.

Vandecasteele JP., & Ballerini D. (2001) : Biodégradation des hydrocarbures et xenobiotiques et biorestauration des eaux et des sols pollués. *Bull.Soc.Fr.Microbio.*, 16 (3) : 183.

Waes G., (1971). La production d'acide carbonique par les ferments lactiques. *Le Lait*, 51, 123.

Walter U., Beyer M., Klein J., & Rehm HJ. (1991): Degradation of pyrene by *Rhodococcus sp.* UW1. *Appl Microbiol Biotechnol* 34:671–676.

Witholt B., De Smet MJ., Kingma J., Van Beilen JB., Kok M., Lageveen RG. & Eggink G. (1990): Bioconversions of aliphatic compounds by *Pseudomonas oleovorans* in multiphase bioreactors: background and economic potential. *Trends Biotechnol* 8: 46–52.