

## Potentiel de biodégradation de corynébactéries isolées d'une zone polluée par les hydrocarbures du pétrole

Abdelhaq BELHAJ <sup>1\*</sup>, Claudine ELMERICH <sup>2</sup>, Mohamed ISMAILI <sup>1</sup>,  
Mimoun ZOUHDI <sup>3</sup> & Moulay Abderrahmane ALAOU <sup>3</sup>

(Reçu le 23/01/2001 ; Accepté le 23/07/2001)

**قدرة التبيد الهيدروكربوني للكورنباكتريوم الناتج من محطة ملوثة بالهيدروكربونات البترولية**  
إن عملنا هذا استهدف قياس مدى تلوث بقايا مصفاة البيترولول لسيدي قاسم، وكذلك مياه وادي "ردوم" حيث مصب هاته البقايا. ولهذا الغرض قمنا بدراسة المقاييس الفيزيائية و الكيميائية بكل من البقايا والمياه خلال سنة 1997، وتبين لنا من خلال التلوث الكبير الناتج عن مصب هاته البقايا، قمنا بتحليل لمعرفة نوع البكتيريات من صنف "غرامايجابي" التي تعيش في الأماكن الملوثة لبقايا المصفاة، وتبين لنا أنها من نوع "كورينباكتريوم". استعملنا ما يعرف بـ "PCR" لمقارنة بعض أجنة هاته البكتيريات "séquences ERIC" وتبين لنا أن هاته الأجنة منتشرة بطريقة مماثلة داخل صنف "Espèces" وتختلف مع اختلاف الصنف. إن الدراسة حول التبيد البيولوجي للهيدروكربونات أثبتت أن البكتيريات من نوع "كورينباكتريوم" قادرة على تبيد الهيدروكربونات البترولية، وأن مدى هذا التبيد يصل إلى نسبة تصل إلى 40%.

**الكلمات المفتاحية:** البترول الخام- التلوث بالهيدروكربونات- التطهير الحيوي- كورنباكتريوم- الطلب الكيميوحيوي للاكسجين

### Potentiel de biodégradation de corynébactéries isolées d'une zone polluée par les hydrocarbures du pétrole

Le degré de pollution engendré par l'effluent de la raffinerie de pétrole de Sidi Kacem (Maroc) a été estimé pendant l'année 1997. La détermination de l'oxygène dissous, de la demande chimique et biochimique en oxygène, ainsi que d'autres caractères physico-chimiques, a montré que l'effluent brut de la raffinerie est fortement pollué et que cette pollution se répercute sur la qualité des eaux de l'oued Rdom recevant cet effluent. Une collection de souches bactériennes capables de croître en présence du pétrole brut comme seule source de carbone a été isolée à partir de différentes stations de la zone polluée. L'identification des bactéries à Gram positif a été réalisée à l'aide de galeries d'identification. L'utilisation de la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) et les Primers "ERIC" a montré que les bactéries isolées possèdent les séquences consensus inversées répétées. Ces séquences engendrent un profil en accord avec l'identification de quatre espèces appartenant au genre *Corynebacterium*: *C. diptheriae*, *C. fascians*, *C. pseudotuberculosis*, *C. xerosis*, d'une souche de *Rhodococcus equi* et d'un *Actinomyces*. Le pourcentage de biodégradation du pétrole brut a été déterminé, il est de l'ordre de 40 % en quatre semaines pour les corynébactéries et la souche de *Rhodococcus* et il est inférieur à 10 % pour la souche d'*Actinomyces sp.* Ces résultats sont en faveur d'un rôle de la flore à Gram positif dans la bioremédiation du site pollué.

**Mots clés :** Pétrole brut - Pollution par les hydrocarbures - Biorémédiation - *Corynebacterium* - Demande biochimique en oxygène

### Biodegradation potential of corynebacteria from a site polluted with petroleum hydrocarbons

The level of pollution generated by the raw effluent of the petroleum refinery of Sidi Kacem city (Morocco) has been estimated. This study revealed that the effluent was highly polluted and that pollution reached Rdom river close to the refinery station. Bacterial strains were isolated from different locations of soil and water of the polluted site on the basis of their ability to grow with crude oil as the only carbon source. Identification of the Gram positive bacteria was performed and phylogenetic comparison was achieved after PCR amplification using ERIC primers. Isolates belonging to four species of *Corynebacterium*: *C. diptheriae*, *C. fascians*, *C. pseudotuberculosis* and *C. xerosis*, as well as a strain of *Rhodococcus equi* and a strain of *Actinomyces* were identified. Biodegradation rate of crude oil was in the range of 40 % or more after four weeks of growth for all strains, except for the *Actinomyces sp.* of which the rate was less than 10 %. These findings suggest that the Gram positive flora and in particular the *Corynebacteria* have a good potential for bioremediation of the polluted environment.

**Key words :** Crude oil - Hydrocarbons pollution - Bioremediation - *Corynebacterium* - Biochemical demand in oxygen

<sup>1</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences, Univ. Moulay Ismail, BP 4010, Beni M'Hamed, Meknès, Maroc

<sup>2</sup> Unité de Microbiologie et Environnement et URA CNRS 2172, Département des Biotechnologies, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris cedex 15, France

<sup>3</sup> Laboratoire de Bactério-Sérologie et d'Hygiène, Hôpital Ibn Sina, CHU de Rabat, Maroc

\* Auteur correspondant ; e-mail : belhaj@fsmek.ac.ma

## INTRODUCTION

Le rejet occasionnel ou accidentel d'hydrocarbures dans l'environnement est préjudiciable à la faune et à la flore. Ce rejet peut devenir toxique pour l'Homme dans le cas de pollution de l'eau ou des aliments.

De nombreux travaux ont été consacrés à la pollution des océans et des zones côtières suite aux naufrages de bâtiments pétroliers (Bartha & Atlas, 1977 ; Prince, 1993 ; Swannell *et al.*, 1996 ; Harayama *et al.*, 1999). Par contre, on dispose de peu d'informations sur la pollution des zones terrestres.

La composition du pétrole brut est très complexe. Il comprend quatre fractions : les saturés, les aromatiques, les asphaltènes et les résines. Les saturés, qui comportent les alcanes saturés linéaires et branchés (paraffines et isoparaffines) ainsi que les cyclo-alcanes, constituent la fraction la plus grande du pétrole brut. Les alcanes linéaires et les aromatiques simples sont les composés les plus facilement biodégradables par la flore indigène de bactéries et de champignons du sol et des eaux (Atlas, 1981 ; Crow *et al.*, 1974 ; Leahy & Colwell, 1990). En revanche, les asphaltènes et les résines sont très souvent des composés récalcitrants à la dégradation.

Sidi Kacem, ville située dans le Nord-Ouest du Maroc, est surtout à vocation agricole, une partie de sa région étant irriguée par les eaux de l'oued Rdom.

Ce travail concerne la pollution engendrée au niveau du sol et des eaux de l'oued Rdom par les rejets de la raffinerie de Sidi Kacem.

Dans un premier temps, on a mesuré les paramètres physico-chimiques qui permettent d'estimer le degré de pollution de la zone étudiée.

Ensuite, on a entrepris l'isolement et l'identification de souches bactériennes indigènes capables de dégrader le pétrole brut afin d'envisager leur utilisation à des fins de dépollution.

On s'est intéressés plus particulièrement à la flore des bactéries à Gram positif qui s'est avérée être constituée d'une majorité d'espèces appartenant au genre *Corynebacterium*.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. Paramètres physico-chimiques

Pour mesurer le degré de pollution des rejets de la raffinerie et des eaux de l'oued Rdom, on a eu recours à l'étude de paramètres physico-chimiques suivants : température, pH, matières en suspension (MES), matières volatiles en suspension (MVS), azote Kjeldahl (NTK), azote ammoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ), phosphate total, oxygène dissous, demande chimique en oxygène (DCO) et demande biochimique en oxygène en cinq jours ( $\text{DBO}_5$ ). Les prélèvements de liquide en vue de cette étude ont été effectués au niveau des stations 1, 2, 3 et 4 indiquées sur la figure 1. À l'exception de la température et du pH qui ont été mesurés sur le terrain, tous les autres paramètres ont été étudiés au laboratoire selon les techniques de Rodier (1984).

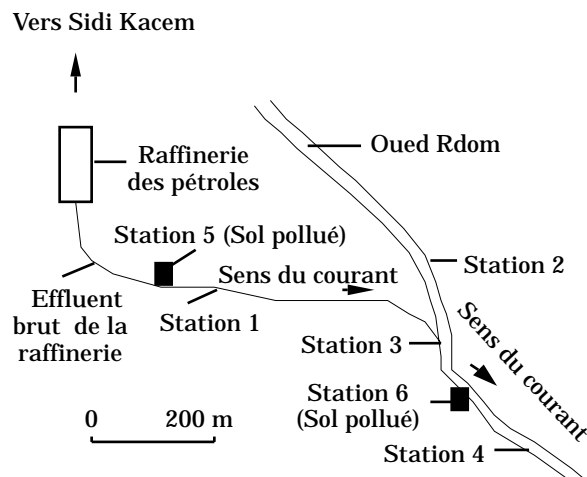


Figure 1. Représentation schématique de la zone étudiée et des stations d'échantillonnage

### 2. Isolement des bactéries dégradant le pétrole brut

Le milieu minimal synthétique (MMS) utilisé est celui de Fusey & Oudot (1976), gélosé à 15 g/l et additionné de pétrole brut à 5 g/l, comme unique source de carbone. Les pétroles utilisés sont le "Bonny Light" et l'"Arabian Light", aimablement fournis par le Chef du Laboratoire de la Raffinerie de Mohammedia (Maroc). Les bactéries contenues dans les échantillons d'eau sont isolées directement sur le milieu gélosé au pétrole. Les échantillons de sol sont préalablement mis en suspension dans de l'eau distillée stérile, et après décantation, l'isolement est fait à partir du surnageant. Les colonies bactériennes, obtenues

après 24 à 48 h d'incubation à 30°C, sont purifiées sur le milieu de Luria-Bertani (LB) gélosé, puis reprises pour l'identification. Cependant, à défaut d'identification immédiate, les colonies bactériennes sont conservées à température 4°C dans de la gélose molle.

### 3. Identification des souches bactériennes

Les souches bactériennes sont tout d'abord classées par la coloration de Gram. Dans ce travail, on s'est intéressés uniquement aux bactéries à Gram positif. L'identification et les propriétés des bactéries à Gram négatif feront l'objet d'un autre manuscrit (en préparation). Les souches bactériennes à Gram positif sont identifiées sur la base de leur spectre d'oxydation des substrats carbonés avec les galeries du commerce "Rapid Gram Positif ID System / RGP" (BBL CRYSTAL), et ce, après incubation à température 30°C pendant 24 à 48 h. Chaque spectre d'oxydation des substrats donne lieu à un nombre composé de 10 chiffres auquel correspond, dans le catalogue analytique RGP, une espèce bactérienne donnée.

### 4. Amplification de l'ADN génomique par PCR

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir d'une colonie bactérienne selon la méthode de Walsh *et al.* (1991). Les amplifications sont réalisées dans un "minicycler" thermique (MJ Research). On a utilisé environ 50 ng d'ADN, 50 pmoles de chacun des deux oligonucléotides :

ERIC 1R: 5' ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3'  
ERIC 2 : 5' AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3'  
(Versalovic *et al.*, 1991), 1,25 mM de chaque désoxyribonucléotide triphosphate et 5 unités de Taq polymérase (Amersham). Le programme d'amplification est celui préconisé par De Bruijn (1992) : 95°C pendant 7 min, suivi de 30 cycles de 94°C pendant 1 min, 52°C pendant 1 min, 65°C pendant 8 min, et enfin un cycle à 65°C pendant 16 min. Dix µl de chaque produit d'amplification sont déposés dans les puits d'un gel d'agarose à 1,5 %. Les échantillons migrent sous une tension de 20 V pendant 1 h, puis 75 V pendant 3 h. Les gels sont ensuite colorés au Bromure d'éthidium, visualisés à l'aide d'un trans-illuminateur, puis pris en photos.

### 5. Potentiel de biodégradation

Les souches bactériennes sont inoculées dans des fioles d'Erlenmeyer contenant 100 ml de milieu

MMS additionné de 0,5 g de pétrole brut. Les fioles sont ensuite incubées avec agitation (140 rpm) à 30°C. Des témoins non inoculés sont réalisés dans les mêmes conditions, pour déterminer la quantité de pétrole évaporé au cours de l'expérience. Après 14, 21 et 28 jours, on examine l'aspect des cultures et on procède à l'extraction du pétrole résiduel. L'extraction est faite deux fois avec 70 ml de chloroforme dans une ampoule à décanter. La phase organique (pétrole résiduel et chloroforme) est filtrée à travers du sulfate de sodium anhydre et recueillie dans un Becher. Ce dernier est placé à l'obscurité à température ambiante pendant 4 à 5 jours, jusqu'à évaporation totale du solvant. Le pétrole résiduel est pesé et le pourcentage de biodégradation est déterminé selon la formule (Fusey & Oudot 1976) :

$$\% \text{ Biodégradation} = \frac{(P_i - P_{ev}) - P_r}{(P_i - P_{ev})}$$

$P_i$  = Poids du pétrole initial

$P_{ev}$  = Poids du pétrole du à l'évaporation

$P_r$  = Poids du pétrole résiduel.

Chaque détermination est faite en double avec les deux types de pétrole.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 1. Estimation de la pollution

Des prélèvements d'eau ont été effectués au niveau de 4 stations (Figure 1), afin de déterminer et de comparer les paramètres physico-chimiques en fonction des quatre saisons de l'année 1997. La station 2 a été choisie comme zone témoin non-polluée par la raffinerie, car elle est située dans la rivière en amont du site où se déverse l'effluent.

La température au niveau des quatre stations était de l'ordre de 18-19°C en hiver et 22-23°C aux autres saisons. Le pH de la station 2, légèrement basique (de 8 à 8,4), était inférieur à celui de l'effluent brut et des autres stations (8,2 à 8,7). Les résultats concernant les autres paramètres étudiés sont consignés dans le tableau 1.

Les eaux de l'oued Rdom sont relativement chargées en matière en suspension. Cette charge est liée au potentiel érosif en ce sens qu'elle augmente en périodes de crues, mais aussi suite au déversement de l'effluent brut de la raffinerie. De même, la teneur en matières volatiles est plus importante dans les stations 3 et 4 en aval du déversement témoignant ainsi d'une pollution

organique provenant de l'effluent brut de la raffinerie. L'azote total est considéré comme un indicateur de pollution organique. De même, les composés phosphorés sont de bons indicateurs de la pollution aussi bien diffuse que ponctuelle. Il est clair que la mesure de ces paramètres indique un plus fort degré de pollution dans la rivière en aval du déversement de l'effluent.

On constate, comme on pouvait s'y attendre, que plus l'oxygène dissous est faible, plus la demande chimique en oxygène (DCO) est élevée, indiquant une pollution forte au niveau de la station 1 et des stations 3 et 4 dans la rivière, par rapport à la station en amont (station 2). Dans tous les cas où la DCO est élevée, la demande biochimique en oxygène (DBO<sub>5</sub>) l'est aussi, ce qui suggère qu'il existe une flore indigène capable d'oxyder la matière organique polluante.

**Tableau 1. Paramètres physico-chimiques des eaux des stations d'échantillonnage**

Matière en suspension (mg/l)				
Saisons	Station 1	Station 2	Station 3	Station 4
Automne	125	75	110	92
Hiver	201	210	260	190
Printemps	145	120	240	160
Été	102	60	90	45
Matière volatiles en suspension (mg/l)				
Saisons	Station 1	Station 2	Station 3	Station 4
Automne	88	40	95	76
Hiver	90	46	123	110
Printemps	85	55	118	85
Été	80	38	45	30
Oxygène dissous (mg/l)				
Saisons	Station 1	Station 2	Station 3	Station 4
Automne	0	5,4	1,75	1,8
Hiver	0	7,12	3,2	3,9
Printemps	0	6,4	1,94	2,4
Été	0	5,2	1,5	1,72
Demande chimique en oxygène (mg O <sub>2</sub> /l)				
Saisons	Station 1	Station 2	Station 3	Station 4
Automne	600	60	380	320
Hiver	180	18	35	25
Printemps	240	16	48	35
Été	650	80	432	325
Demande biochimique en oxygène (DBO <sub>5</sub> ) mg O <sub>2</sub> /l				
Saisons	Station 1	Station 2	Station 3	Station 4
Automne	210	35,2	90	60
Hiver	60	3,2	8	4,25
Printemps	100	5,25	11	6
Été	250	42	180	75

Phosphate total (mg/l)				
Saisons	Station 1	Station 2	Station 3	Station 4
Automne	11,5	1,46	3,7	3,01
Hiver	17	1,7	4,12	3,8
Printemps	12	1,5	3,92	3,01
Été	11	1,42	3,65	2,9
Azote Kjeldahl (NTK) (en mg N/l)				
Saisons	Station 1	Station 2	Station 3	Station 4
Automne	120	3,75	73,25	45,32
Hiver	158	10	99,29	70,25
Printemps	138	7	80	56,3
Été	126	3,25	74,25	52
Ions NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)				
Saisons	Station 1	Station 2	Station 3	Station 4
Automne	93	0,06	63	26,6
Hiver	132	0,12	69	44
Printemps	110	0,1	64,2	42
Été	90	0,02	65,52	4

## 2. Isolement et identification de la flore bactérienne à Gram positif

Les prélèvements effectués à partir d'eaux et de sols ont permis d'isoler une cinquantaine de souches bactériennes par sélection directe sur milieu gélosé contenant le pétrole brut, après 24 à 48 h d'incubation. Parmi les souches isolées, 12 sont à Gram positif. Le résultat de leur identification est présenté dans le tableau 2.

En dehors de la souche de *Rhodococcus equi* (UMI-98), qui provient de la station 1 la plus polluée, et de la souche d'*Actinomyces sp.* (UMI-106) de la station 4, toutes les autres souches appartiennent au genre *Corynebacterium*. La souche de *Rhodococcus equi* se présente sous forme de coccobacilles et les souches de *Corynebacterium* sous forme de bacilles de très petite taille, alors que la souche d'*Actinomyces sp.* se présente sous forme de bacilles filamenteux. Comme il n'y a pas eu d'enrichissement en milieu liquide avant l'isolement, il est probable que les souches provenant d'une même station soient différentes, d'autant plus que les isollements ont été effectués en 3 saisons différentes pendant l'année 1997.

D'autre part, il a été montré qu'on isole une plus grande variété d'espèces par la sélection directe sur milieu solide plutôt que par une étape préalable d'enrichissement en milieu liquide (Calomaris *et al.*, 1976). Il est intéressant de noter que les corynébactéries isolées représentent 4 espèces différentes. Les deux isolats appartenant à

**Tableau 2. Souches bactériennes à Gram positif isolées des stations d'échantillonnage**

Souches bactériennes	Identification probable	Stations
UMI-92, -99, -100, -101 et UMI-102	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	3
UMI-37 et UMI-38	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	1
UMI-50	<i>Corynebacterium fascians</i>	2
UMI-19 et UMI-58	<i>Corynebacterium xerosis</i>	Sol (Stations 5 et 6)
UMI-98	<i>Rhodococcus equi</i>	1
UMI-106	<i>Actinomyces sp.</i>	4

UMI = Université Moulay Ismail

l'espèce *C. xerosis* proviennent de deux prélèvements de sols (station 5 et station 6) distants de plusieurs centaines de mètres. Les cinq souches de *C. diphtheriae* proviennent de la station 3 dans la rivière. La souche de *C. fascians* provient de la station 2, tandis que les deux souches de *C. pseudotuberculosis* sont isolées de l'effluent brut de la raffinerie.

### 3. Profil d'ADN génomique obtenu par PCR et les primers "ERIC"

L'amplification de fragments d'ADN par PCR (réaction en chaîne de la polymérase) à des fins d'analyse phylogénétique a été effectuée avec comme amorce les oligonucléotides "ERIC" (Versalovic *et al.* 1991). Ces amorces sont basées sur la présence de séquences répétées inversées conservées chez les entérobactéries. Il a été montré qu'on pouvait les utiliser pour amplifier des fragments d'ADN, situés entre deux séquences répétées, à partir de toute une série de bactéries, principalement à Gram négatif, mais aussi à Gram positif (Versalovic *et al.*, 1991 ; De Bruijn, 1992). La taille des fragments majeurs obtenus dépend de la répartition des séquences conservées dans l'espèce concernée.

L'analyse des profils obtenus permet d'évaluer le degré de parenté de souches identifiées comme appartenant à la même espèce. La figure 2 présente un exemple des résultats obtenus.

Il est clair que les migrations correspondant aux 5 souches de *C. diphtheriae* sont relativement proches (92, 99, 100, 101 et 102) avec des bandes majeures à 250, 400, 750, 1100 et 1600 pb.

Toutefois, les souches 99 et 101 présentent des fragments supplémentaires, suggérant une certaine hétérogénéité des souches isolées à partir d'une même station.

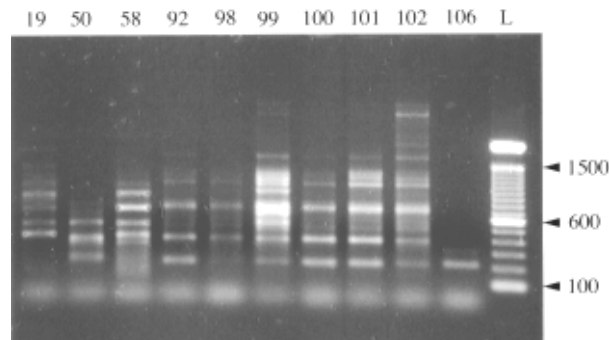
Ceci est en accord avec le fait que la souche 99 diffère des autres souches au niveau de la pigmentation des colonies. De même, les souches 19 et 58 toutes identifiées comme *C. xerosis* présentent des profils voisins.

En revanche, les résultats obtenus avec la souche 106 (*Actinomyces*) et 50 (*C. fascians*) sont très différents de ceux qui sont obtenus avec les autres souches. Le profil obtenu pour la souche 98, identifiée en tant que *R. equi* est proche de celui des *C. diphtheriae*.

La technique utilisée confirme la présence de séquences ERIC chez les corynébactéries et apparentées. Elle confirme les conclusions de Versalovic *et al.* (1991) sur la nature ubiquitaire de ces séquences.

### 4. Potentiel de biodégradation des bactéries à Gram positif

Afin de mesurer et de comparer l'efficacité relative des différentes souches bactériennes isolées, on a procédé à leur culture en condition axénique dans un milieu minéral, contenant une source d'azote et de phosphore non limitantes et du pétrole brut comme seule source de carbone. Deux types de



**Figure 2. Profil de l'ADN génomique des bactéries à Gram positif, après amplification par PCR avec les Primers ERIC et migration sur gel d'agarose à 1,5 %**

pétrole brut largement distribués au Maroc ont été utilisés : "Bonny Light" et "Arabian Light". Ils ont des caractéristiques physico-chimiques différentes, mais une composition chimique globale voisine. Certains auteurs (Westlake *et al.*, 1974 ; Walker *et al.*, 1976) ont montré qu'il y a une corrélation entre la teneur en alcanes du pétrole utilisé et le taux de dégradation par les souches bactériennes, les pétroles à forte teneur en alcanes étant mieux dégradés.

Les deux types de pétrole utilisés dans ce travail ont une teneur en alcanes voisine. Il est toutefois important de rappeler que la multiplicité et la complexité des molécules qui composent le pétrole est telle que sa composition réelle est inconnue.

L'évolution de la dégradation des deux types de pétrole au cours du temps est montrée par le tableau 3. Les quatre espèces de *Corynebacterium* ainsi que la souche de *Rhodococcus equi* présentent un bon potentiel de biodégradation vis-à-vis des deux pétroles (plus de 40 % après 3 semaines). La fraction dégradée par la souche d'*Actinomyces* est très faible. Ce résultat est en accord avec les observations de Bartha & Atlas (1977).

## CONCLUSION

La capacité de dégrader le pétrole est largement répandue chez les bactéries à Gram positif et Gram négatif puisqu'on en dénombre plus de 27 genres (Austin *et al.*, 1977 ; Leahy & Colwell, 1990 ; Venkateswaran *et al.*, 1991).

Actuellement, il n'y a que peu de données sur le potentiel des corynébactéries, qui par ailleurs suscitent un regain d'intérêt pour leur propriété de biodégradation des hydrocarbures (Bouchez-Naïtali *et al.*, 1999).

Les corynébactéries isolées dans ce travail présentent un bon potentiel de dégradation du pétrole brut, se situant entre 40 et 50 %. De plus, dans un même lieu géographique, on peut trouver jusqu'à quatre espèces différentes de *Corynebacterium*. Une certaine hétérogénéité est présente dans l'espèce *C. diphtheriae*.

Il est clair que la flore à Gram positif présente dans la zone polluée peut jouer un rôle dans l'élimination de la pollution.

## RÉFÉRENCES CITÉES

- Atlas R.M. (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons : an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45 : 180-209
- Austin B., Calomaris J.J., Walker J.D. & Colwell R.R. (1977) Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.* 34 : 60-68.
- Bartha R. & Atlas R.M. (1977) The microbiology of aquatic oil spills. *Adv. Appl. Microbiol.* 22 : 225-266
- Bouchez-Naïtali M., Rakatozafy H., Marchal R., Leveau J.Y. & Vandecasteele J.P. (1999) Diversity of bacterial strains degrading hexadecane in relation to the mode of substrate uptake. *J. Appl. Microbiol.* 86 : 421-428

**Tableau 3. Pourcentage de dégradation de deux pétroles bruts (Bonny Light & Arabian Light) par les bactéries à Gram positif, après 14, 21 et 28 jours d'incubation**

N°des souches bactériennes	Bonny light			Arabian light		
	Durée d'incubation			Durée d'incubation		
	J14	J21	J28	J14	J21	J28
UMI-19	24 ± 2	35 ± 1	41 ± 1	26 ± 2	39 ± 1	45 ± 1
UMI-37	31,5 ± 2,5	39 ± 1	41,5 ± 1,5	33 ± 3	40,5 ± 1,5	48
UMI-38	29 ± 1	38,5 ± 1,5	43 ± 1	23 ± 7	39 ± 1	46 ± 2
UMI-50	16,5 ± 1,5	32 ± 2	34 ± 2	23 ± 1	30 ± 2	32 ± 2
UMI-58	21,5 ± 1,5	34 ± 2	38 ± 2	22 ± 4	33 ± 3	44 ± 2
UMI-92	23 ± 3	35 ± 1	40 ± 2	23 ± 5	33 ± 1	40 ± 0,5
UMI-98	23 ± 5	43 ± 1	49 ± 1	28 ± 2	40 ± 2	46,5 ± 2,5
UMI-99	21,5 ± 1,5	30 ± 4	38 ± 2	19,5 ± 1,5	38	43 ± 1
UMI-100	21,5 ± 4,5	40 ± 2	41 ± 1	29 ± 1	43 ± 3	42,5 ± 3,5
UMI-101	21 ± 3	33 ± 4	39 ± 1	22 ± 2	31 ± 1	38,5 ± 3,5
UMI-102	25 ± 1	33 ± 3	40 ± 2	22 ± 4	40 ± 1	45,5 ± 1,5
UMI-106	1,5 ± 0,5	4	6 ± 2	2	2,5 ± 0,5	5 ± 1

- Calomaris J.J., Austin B., Walker J.D. & Colwell R.R. (1976) Enrichment for estuarine petroleum degrading bacteria using liquid and solid media. *J. Appl. Bacteriol.* 41:135-144
- Crow S.A., Meyers S.P. & Ahearn D.G. (1974) Microbiological aspects of petroleum degradation in the aquatic environment. *Mer.* 12 : 37-54
- De Bruijn F.J. (1992) Use of repetitive (Repetitive extragenic palindromic and Enterobacterial repetitive intergeneric consensus) Sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environm. Microbiol.* 58 : 2180-2187
- Fusey P & Oudot J. (1976) Comparaison de deux méthodes d'évaluation de la biodégradation des hydrocarbures in vitro. *Mater U Org.* 11 : 241-251
- Harayama S., Kishira H., Kasai Y. & Shutsubo K. (1999) Petroleum biodegradation in marine environments. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1 : 63-70
- Leahy J.G. & Colwell R.R. (1990) Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54 : 305-315
- Prince R.C. (1993) Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit. Rev. Microbiol.* 19 : 217-242
- Rodier J. (1984) L'analyse de l'eau. Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. 7<sup>ème</sup> édition. Dunod. Paris. 1365 p.
- Swannell R., Lee K. & McDonagh M. (1996) Field evaluation of marine oil spill bioremediation. *Microbiol. Rev.* 60 : 342-365
- Venkateswaran K., Iwabuchi T., Matsui Y., Toki H., Hamada E. & Tanaka H. (1991) Distribution and biodegradation potential of oil degrading bacteria in North Eastern Japanese coastal waters. *FEMS Microbiol. Ecology.* 86 : 113-122
- Versalovic J., Koeuth T. & Lupski J.R. (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in Eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl. Acids Res.* 19 : 6823- 6831
- Walker J.D., Colwell R.R. & Petrakis L. (1976) Biodegradation rates of components of petroleum. *Can. J. Microbiol.* 22 : 1209-1213
- Walsh P.S., Metzger D.A. & Higuchi R. (1991) Chelex R100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR -based typing from forensic material. *Biotechniques.* 10 : 506- 513
- Westlake D.W.S., Jobson A., Phillippe R. & Cook F.D. (1974) Biodegradability and crude oil composition. *Can. J. Microbiol.* 20 : 915 - 928