

DIVERSITÉ MOLECULAIRE DE LA MICROFLORE INDIGÈNE BACTÉRIENNE D'EAU DE MER POLLUÉE PAR LES HYDROCARBURES DANS LA ZONE DE JARZOUNA-TUNISIE

I. Zrafi-Nouira¹, Z. Ghénim-Khédér¹, R. Bahri¹, S. Chausson², S. Germezi², A. Bakrouf¹, D. Saidane^{1*}, A.G. Sghir²

¹ Laboratoire d'analyse et de contrôle des polluants chimiques et microbiologiques de l'environnement, Faculté de pharmacie de Monastir, Tunisie

² Laboratoire de Microbiologie, unité évolution des génomes, Centre national de séquençage "Génoscope", Evry France. - dalilla.saidane@fphm.rnu.tn

Résumé

Dans cette étude la composition d'une microflore bactérienne d'eau de mer polluée par les hydrocarbures a été étudiée en se basant sur l'analyse de la diversité du gène du 16S rDNA. Nos résultats ont montré une diversité importante de la microflore (MA) et une composition se répartissant sur quatre groupes bactériens (*les Protéobactérie, les Clostridia, les Flavobactérie et les Bactéroidètes*) avec dominance du sous groupe des *Beta-protéobactérie*. Sur les 94 clones analysés 59,2% sont affiliés à des représentants cultivables et 22,2% sont affiliés à des représentants non cultivables alors que 18,6% sont considérés comme des nouvelles séquences ayant moins de 97% de similarité avec les plus proches.

Mots clés : Bacteria, Genetics, Biodiversity, Pollution.

Introduction

Les microorganismes jouent un rôle important dans la bioremédiation des milieux pollués par les hydrocarbures. La plupart des études s'intéressent à un nombre limité d'espèces bactériennes cultivables connues par leurs capacités dégradatives. Cependant, il serait plus intéressant d'étudier la composition des écosystèmes bactériens complexes pour contribuer à la compréhension des phénomènes de dégradation des hydrocarbures. L'émergence des techniques moléculaires liée au développement de la phylogénie moléculaire basé généralement sur l'ADNr 16S comme marqueur évolutif universel [1] a contribué à l'amélioration des recherches dans ce thème.

Matériels et Méthode

Une approche moléculaire a été appliquée pour étudier la composition de la microflore bactérienne indigène adaptée à partir d'eau de mer polluée par les hydrocarbures pétroliers. La microflore adaptée (MA) a été utilisée dans des tests de dégradation *in vitro* d'un pétrole brut tunisien et les capacités dégradatives de cette microflore ont été déterminées. Une banque de clone a été construite après extraction d'ADN génomique, amplification par PCR du gène du 16S rDNA, clonage et séquençage. Le traitement des séquences (nettoyage et "contigage") a été effectué [2]. Les séquences chimériques sont au préalable recherchées [3]. Toutes les séquences ayant plus de 1200 nucléotides sont importées dans la base de données ARB, après avoir été comparées à la base de données GenBank grâce à une analyse de type BLAST. Lorsque le pourcentage d'homologie des séquences obtenues est supérieur ou égal à 97 %, ces séquences sont regroupées en OTUs (Unité Taxonomique Opérationnelle). La raréfaction de l'échantillon et les indices de diversités sont étudiés grâce au logiciel DOTUR.

Résultats et discussion

Les résultats de l'analyse de la composition de la microflore indigène acclimatée, obtenue par extraction directe des acides nucléiques totaux à partir d'eau de mer polluée par les hydrocarbures, a montré une hétérogénéité mise en évidence par la construction de la courbe de raréfaction relative aux séquences analysées. En effet l'analyse de cette courbe a montré que d'autant d'autre clone peuvent être séquencés. D'autre part, parmi les 94 clones analysés 59,2% sont affiliés à des représentants cultivables et 22,2% sont affiliés à des représentants non cultivables alors que 18,6% sont considérés comme des nouvelles séquences ayant moins de 97% de similarité avec les plus proches représentant dans la base GenBank.

Quatre divisions du domaine *Bacteria* ont été représentées dans cette microflore : les *Protéobactéries* (*Alpha-, Beta- et Gamma-protéobactéries*) respectivement avec 40,8 %, 18,5%, 14,8%; les *clostridia* qui contribue avec 18,5 % ; les *Actinobacteria* (3,7%) et les *Flavobactérie* avec aussi (3,7%). L'ensemble des clones analysés sont regroupés en 27 OTUs et les pourcentages de similarité avec les plus proches parents sont comprises entre (92,12 % et 100%). La prédominance des *Protéobactérie* dans les zones contaminées par les hydrocarbures a été constatée par d'autres travaux [4].

Cette analyse phylogénétique montre des affiliations des séquences obtenues avec des phylums connus comme colonisateurs des milieux pollués par les hydrocarbures comme les *Pseudomonas, Marinobacter*

et *Alcanivorax* [5]. Cependant plusieurs autres phylums sont considérés comme des nouvelles séquences qui n'ont jamais été cités dans la littérature et qui peuvent avoir un rôle non négligeable dans la dégradation des hydrocarbures.

Cette microflore a montré des hautes performances de biodégradation d'un pétrole brut de type zarzatine ; Ainsi après une dégradation de 28j les pourcentages de biodégradation sont respectivement : 92,6% pour les hydrocarbures saturés et insaturés non aromatiques (HNA) et 68,7% pour les hydrocarbures aromatiques (HCA).

Conclusion

Au terme de l'étude de la diversité bactérienne de la microflore indigène de l'eau de mer dans une zone polluée par les hydrocarbures pétroliers on peut conclure que l'analyse moléculaire de la diversité du gène 16S rDNA, dans le domaine *Bacteria*, permet une meilleure compréhension de la contribution directe ou indirecte des différents groupes bactériens dans les phénomènes de biodégradation. Ainsi la connaissance de la composition réelle de la microflore du milieu pollué constitue une étape préliminaire dans la sélection des espèces à haute performance de dégradation dans une éventuelle bioremédiation des sites pollués par les hydrocarbures.

Références

- 1 - Woese C. R et Fox G., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5088.
- 2 - Ewing B. et Green P., 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error Probabilities. *Genom. Res* 8, 189-194.
- 3 - Juretschko S., Loy A., Lehner A. et Wagner M. 2002. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst Appl Microbiol.* 25(1):84-99.
- 4 - Brakstad O.G. and Lodeng A.G. 2005. Microbial diversity during biodegradation of crude oil in seawater from the North Sea, *Microbial Ecology.* vol. 49, 94 -103.
- 5 - Harayama S, Kasai H, Hara A 2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15(3):205-14.