

**Zeitschrift:** Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles  
**Band:** 97 (2018)

**Artikel:** Dégradation d'hydrocarbures d'origine pétrolière par des bactéries isolées de l'eau des ports de la Ville de Morges  
**Autor:** Gerber, Marie / Genet, Bastien / Castiglioni, Patrik  
**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-813308>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 16.10.2024

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

# Dégradation d'hydrocarbures d'origine pétrolière par des bactéries isolées de l'eau des ports de la Ville de Morges

Marie GERBER<sup>1,\*</sup>, Bastien GENET<sup>2,\*</sup>, Patrik CASTIGLIONI<sup>3</sup>, Tanya DUBOIS<sup>3</sup>, Valérie DEVAUD<sup>3</sup>, Antonella DEMARTA<sup>4</sup>, Sylvia MAÎTRE<sup>3</sup> & Davide STAEDLER<sup>3,5,‡</sup>

GERBER M., GENET B., CASTIGLIONI P., DUBOIS T., DEVAUD V., DEMARTA A., MAÎTRE S. & STAEDLER D., 2018. Dégradation d'hydrocarbures d'origine pétrolière par des bactéries isolées de l'eau des ports de la Ville de Morges. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 97: 47-59.

## Résumé

Les activités humaines qui ont lieu dans deux des ports de la Ville de Morges, le Port du Château et le Port du Petit-Bois génèrent une faible pollution de l'eau par des hydrocarbures d'origine pétrolière. En effet, la présence à faible concentration des additifs de l'essence méthyl tert-butyl éther (MTBE) et éthyl tert-butyl éther (ETBE) ainsi que de fioul lourd (hydrocarbures linéaires à 10-40 atomes de carbone) a été détectée dans l'eau de ces ports. Il s'agit vraisemblablement d'hydrocarbures issus de l'exploitation de bateaux à moteur. Ce type d'environnement est favorable au développement de souches de bactéries indigènes qui, sous la pression écologique induite par la présence de polluants et en absence d'autres sources de carbone, peuvent développer la capacité à les dégrader et les utiliser notamment comme source de carbone. Il s'agit de microorganismes qui jouent un rôle important dans le maintien d'écosystèmes exposés à des pollutions. Le but de cette étude est d'isoler des souches indigènes des ports de la Ville de Morges qui soient capables de proliférer en présence d'hydrocarbures d'origine pétrolière, de les identifier et de quantifier leur capacité de réduction de la concentration des polluants. Les souches isolées doivent pouvoir se cultiver facilement en laboratoire, pour qu'elles aient un potentiel à être exploitées dans des projets biotechnologiques. Ce travail a permis d'isoler des souches de *Delftia sp.*, *Exiguobacterium sp.* et *Pseudomonas sp.* Parmi ces trois souches, *Pseudomonas sp.* et *Delftia sp.* sont celles qui, lors des essais en laboratoire, ont réduit la concentration des hydrocarbures ETBE, MTBE et C10-C40 de 50 % et plus. *Delftia sp.* est la souche qui a retenu le plus d'intérêt car elle est la seule qui a montré des capacités à réduire les hydrocarbures volatils, non-volatils et cycliques. Ce n'est pas fréquent d'isoler des souches capables de métaboliser des hydrocarbures si différents en termes de structure moléculaire et de nombre d'atomes de carbone. La souche de *Delftia sp.* isolée dans cette étude est facilement cultivable en laboratoire et présente donc un grand intérêt potentiel pour des applications biotechnologiques dans le domaine de la bio-remédiation, notamment pour des applications locales. En effet, il s'agit d'une souche indigène, donc déjà bien adaptée à l'environnement du Lac Léman. Cette étude a été menée dans le cadre d'un travail de maturité gymnasiale (Gymnase de Marcellin, Morges).

**Mots-clés:** bactéries indigènes, Lac Léman, dégradation d'hydrocarbures, bio-remédiation, applications biotechnologiques.

<sup>1</sup> chemin de Pra-Riondet 19, 1163 Etoy, Suisse

<sup>2</sup> chemin des chaux 8, 1128 Reverolle, Suisse

<sup>3</sup> Scitec Research SA, Avenue de Provence 18-20, 1000 Lausanne 20

<sup>4</sup> Laboratory of Applied Microbiology, Department for Environmental Constructions and Design, University of Applied Sciences and Arts of Southern Switzerland (SUPSI), via Mirasole 22a, Bellinzona, Suisse

<sup>5</sup> TIBIO Sagl, Via Valle 11, 6949 Comano, Suisse

\*ces auteurs ont contribué de manière égale. ‡ Correspondance: dstaedler@scitec-research.com

GERBER M., GENET B., CASTIGLIONI P., DUBOIS T., DEVAUD V., DEMARTA A., MAÎTRE S. & STAEDLER D., 2018. Degradation of hydrocarbons from fuel by bacteria isolated from the water of the ports of the city of Morges. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 97: 47-59.

### Abstract

Human activities impact the quality of the water in two ports of the City of Morges, the Port du Château and the Port du Petit-Bois. Indeed, hydrocarbons from fuel, in particular the gasoline additives MTBE (Methyl tert-butyl ether) and ETBE (Ethyl tert-butyl ether) and the petroleum hydrocarbons (hydrocarbons C10-C40) were found at low concentration in water of both sites. These particular conditions are extremely favourable to induce selection and growth of indigenous bacteria able to degrade this kind of pollutants. These microorganisms play a crucial role in the preservation of the environment using hydrocarbons as carbon source for their growth. The aim of this work is to isolate and identify these microorganisms, and assess their ability to reduce the concentration of these pollutants. Moreover, to be potentially relevant for biotechnological applications, bacterial strains need to be easily cultivated in laboratory conditions. Three strains were isolated and identified: *Delftia* sp., *Exiguobacterium* sp. and *Pseudomonas* sp. In particular *Delftia* sp. and *Pseudomonas* sp. showed the highest potential reduction, in particular against ETBE, MTBE and C10-C40 hydrocarbons. Furthermore, *Delftia* sp. results indicate the capability to reduce the concentration of volatile compounds, non-volatile compounds and cyclic hydrocarbons. This polyvalence to reduce the concentration of so structurally different hydrocarbons by one strain, could be key for further exploitation in the environmental field in particular for bioremediation activities at the local scale.

**Keywords:** indigenous bacteria, Lake Geneva, hydrocarbon degradation, bioremediation, biotechnological applications.

## INTRODUCTION

La présence dans l'environnement d'hydrocarbures d'origine pétrolière est associée directement à la présence passée ou présente d'activités humaines, telles que la fabrication de biens, le prélèvement de ressources, la production d'énergie, l'urbanisation, le transport de biens et de personnes, et les activités de loisir. Ceci engendre des phénomènes locaux de pollution qui peuvent être aigus ou chroniques (KEPLEIS *et al.* 2001). Depuis quelques décennies, s'est affirmée une volonté politique déterminée à monitorer ces phénomènes et à les assainir lorsque nécessaire. Les assainissements sont effectués notamment pour les sites très pollués ou à la suite de problématiques aiguës. Ces opérations impliquent le prélèvement des matériaux contaminés suivi par un traitement dans des entreprises spécialisées, ou un traitement *in-situ* par voie chimique ou biologique (LOMBI & HAMON 2005). Les interventions *in-situ* par voie biologique incluent les traitements avec des végétaux (phytoremédiation) et ceux basés sur l'emploi de microorganismes (bioremédiation) (SEMPLE *et al.* 2001, LOMBI & HAMON 2005, SURRIYA *et al.* 2015). Les processus de bioremédiation se font par stimulation de l'activité de microorganismes indigènes ou alors par apport de microorganismes supplémentaires (SEMPLE *et al.* 2001). Plusieurs études montrent que dans les environnements pollués de manière chronique mais à faible dose - et qui donc ne nécessitent pas forcément un assainissement - on observe le développement de microorganismes indigènes capables de dégrader les hydrocarbures et de contribuer au maintien de l'écosystème (ANTIC *et al.* 2006, AUGUSTYNOWICZ *et al.* 2008, HU *et al.* 2017). Il s'agit de microorganismes naturellement sélectionnés, qui ont su mettre en place des stratégies métaboliques pour dégrader les hydrocarbures en les utilisant

notamment comme source de carbone et en contribuant ainsi à la détoxification de l'environnement (KIM *et al.* 1998, FAYOLLE *et al.* 2001, SINGH & FULEKAR 2010). En effet, la pression écologique induite par les polluants favorise le développement d'espèces indigènes spécialisées, qui appartiennent le plus souvent aux phylums *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* et *Proteobacteria* (MARGESIN & SCHINNER 1997, LANDMEYER *et al.* 2001, PENDASHTEH *et al.* 2010, PENG *et al.* 2015). Il est alors possible d'isoler des microorganismes ou des communautés de microorganismes de ces environnements, et de les valoriser dans le domaine de la biotechnologie, notamment pour les activités de bioremédiation et de dégradation de polluants (ADEBUSOYE *et al.* 2007, AUGUSTYNOWICZ *et al.* 2008). Cette approche est couramment utilisée pour obtenir et produire des microorganismes destinés à décontaminer des sites pollués, sols ou eaux, qui se trouvent dans la même zone de distribution naturelle que les microorganismes d'origine (PENDASHTEH *et al.* 2010, ALTHALB & IAN 2017). En effet, les microorganismes indigènes sont bien adaptés à leur environnement et peuvent donc plus facilement modifier leur métabolisme pour répondre à des situations de stress liées à la présence de polluants. Le but de cette étude est d'isoler des bactéries capables de dégrader des hydrocarbures d'origine pétrolière issues de l'eau du Lac Léman, dans le Canton de Vaud (Suisse), et de vérifier en laboratoire leur capacité de dégradation sur une série d'hydrocarbures et d'éthers d'alkyle de composition et de poids moléculaire différents. En particulier, sera examinée la biodégradation de composés organiques volatils du groupe des BTEX (Benzène, Toluène, Éthylbenzène et Xylènes), des additifs de l'essence méthyl tert-butyl éther (MTBE) et ethyl tert-butyl ether (ETBE) ainsi que des hydrocarbures linéaires à 10-40 atomes de carbone (fioul lourd). Ces hydrocarbures sont des composés connus pour être présents dans les eaux de surfaces (SCHMIDT 2003, RAMBARRI *et al.* 2004). Les prélèvements d'eau pour cette étude ont été effectués dans deux des ports de la Ville de Morges, le Port du Château (Vieux Port) et le Port du Petit-Bois (Nouveau Port). Le Port du Château, dont la construction définitive date du XVIII<sup>e</sup> siècle, a joué un rôle essentiel dans les transports et les activités commerciales sur le Lac Léman (BÉRANECK 1939). De nos jours le port est employé essentiellement pour des activités de loisir et touristiques, avec près de 200 emplacements pour embarcations. Le Port du Petit-Bois est plus récent et offre une capacité d'accueil pour plusieurs centaines d'embarcations. Ces deux ports sont très fréquentés, notamment lors de la saison printanière et estivale. La présence de plusieurs embarcations équipées de moteurs à combustion dans l'espace confiné du port permet d'émettre l'hypothèse qu'il s'agit d'environnements soumis à pollution chronique par la présence de faibles doses d'hydrocarbures d'origine pétrolière - donc des environnements idéaux pour isoler des microorganismes capables de dégrader ces composés (ADEBUSOYE *et al.* 2007, AUGUSTYNOWICZ *et al.* 2008). Cette étude se concentre sur des bactéries qui sont facilement cultivables en laboratoire et qui, potentiellement, pourraient être produites à plus large échelle pour être appliquées dans des activités de bio-remédiation notamment au niveau local.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Prélèvement des échantillons et isolement des bactéries

Les échantillons pour les analyses microbiologiques ont été prélevés dans des bouteilles stériles contenant du thiosulfate de sodium (concentration finale : 20 mg/L). Le thiosulfate de sodium a pour but de neutraliser toute présence de dérivés actifs du chlore qui pourraient inhiber la

croissance des bactéries. Les échantillons pour l'analyse des hydrocarbures C10-C40 ont été prélevés dans des bouteilles en verre de 1 000 ml ; les échantillons pour l'analyse des hydrocarbures volatils (BTEX, MTBE, ETBE) ont été prélevés dans des flacons en verre de 40 ml avec bouchon en téflon et remplis à ras bord pour éviter toute interférence due à une éventuelle présence d'air. Un échantillon de contrôle d'eau du Lac Léman a été prélevé au large de la plage de Buchillon (Canton de Vaud, Suisse). Le lieu de prélèvement a été atteint en kayak de manière à éviter toute nouvelle contamination de l'eau due aux moteurs à essence des bateaux.

### **Milieu de culture et agar pour la croissance des bactéries**

Les bactéries ont été cultivées sur agarose solide type Trypticase soy agar (TSA, Biomérieux), préparé selon les indications du fournisseur. Pour les tests de dégradation des hydrocarbures, les bactéries ont été inoculées dans de l'eau du Lac Léman filtrée grossièrement à la laine de verre et stérilisée à 121 °C pendant 20 minutes.

### **Protocole pour l'isolement des souches d'intérêt (protocole d'enrichissement) et pour l'essai de croissance en présence d'hydrocarbures**

Deux cent mL de chaque échantillon d'eau ont été mélangés à 150 µL d'une solution standard d'alcane C10-C40 (Sigma Aldrich) et 75 µL d'essence sans plomb 95 octanes employée comme combustible pour bateaux (qualité commerciale). Les solutions ainsi obtenues ont été incubées à 25 °C dans un incubateur rotatif à 180 rpm pendant 7 jours. Après incubation, 100 µL de chaque solution ont été prélevés, dilués 1/100 et 1/1000 et étalés sur des agars (boîtes de Petri, 100 µL par boîte). Les boîtes avec les agars ont été incubées à 25 °C pendant 4 jours. Les colonies ont été différenciées selon leur morphologie en se basant sur la forme, l'élévation et la marge (SOUSA *et al.* 2015). Le nombre de colonies morphologiquement différentes par capsule a été compté. Une colonie par type a été repiquée et inoculée dans 100 ml d'eau du Lac Léman stérile avec 50 µL d'une solution standard d'alcane C10-C40 (Sigma Aldrich) et 100 µL d'essence sans plomb 95 octanes. La croissance bactérienne a été monitorée sur 7 jours par comptage des UFC (Unité Formant Colonie). Les trois souches qui ont montré la croissance la plus élevée ont été isolées pour identification et employées pour les essais de dégradation d'hydrocarbures.

### **Protocole pour les essais de dégradations des hydrocarbures**

Les bactéries ont été inoculées à 2000 UFC/mL dans 200 ml d'eau du Lac Léman stérilisée. Cents µL d'une solution standard d'alcane C10-C40 et 50 µL d'essence sans plomb 95 octanes employées comme combustible pour bateaux ont été rajoutés aux solutions contenant les bactéries. Un milieu de contrôle contenant les hydrocarbures mais sans bactérie a aussi été préparé. Les solutions ont été incubées à 25 °C dans un incubateur rotatif à 180 rpm pendant 7 jours. Après la période d'incubation, les solutions ont été utilisées pour l'analyse des composés volatils et des hydrocarbures C10-C40. Les essais ont été réalisés en triplicat.

### **Analyse des composés volatils (BTEX, MTBE, ETBE)**

L'analyse des composés volatils a été effectuée selon la norme EPA 524.2. Cette technique se base sur le prélèvement des gaz dans l'espace de tête au-dessus de l'échantillon dans un flacon étanche (head-space). Un volume d'échantillon (15 ml de liquide) est introduit dans un récipient contenant du sulfate de sodium anhydre calciné (Sigma-Aldrich). Le récipient est fermé

hermétiquement et incubé à 85 °C, sous agitation pour établir un équilibre entre la phase gazeuse et la phase aqueuse ou solide. Une aliquote du gaz est ensuite prélevée et analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GCMS, Agilent 6890 MSD 5973 avec le logiciel Agilent pour la gestion des paramètres) équipée d'une colonne type Rxi-624Sil (Restek), via un injecteur automatique (Gerstel Multipurpose MPS2). Les composés volatils sont quantifiés à l'aide de courbes obtenues avec des solutions standards d'ETBE (Merck), MTBE (Merck), et Mix VOC standard pour EPA 524.2 (Absolute standard).

### **Analyse des hydrocarbures C10-C40**

L'analyse des hydrocarbures C10-C40 a été effectuée selon la norme ISO9377-2. Ce protocole se base sur une extraction liquide-liquide avec un mélange d'acétone et d'hexane (Honeywell) dans lequel est ajouté du décane C10 (Sigma-Aldrich) et du tétracontane C40 (Sigma-Aldrich) pour la définition de la fenêtre d'intégration des hydrocarbures de longueur de chaîne de C10 à C40. L'extrait est ensuite purifié sur colonne de Florisil (60-100 mesh, Fluka) puis concentré par évaporation à 40 °C/250 mbar dans un évaporateur rotatif (Buchi). L'échantillon finalement est analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur de flamme (GC-FID, Agilent 9860 avec le logiciel Agilent) équipée d'une colonne Rxi-5Sil MS 15m 0.25mm (Restek). La concentration d'hydrocarbures C10-C40 est calculée sur la base d'une courbe obtenue avec une solution standard (set commercial de Diesel Oil and Mineral Oil without additives, D. Ehrenstorfer).

### **Extraction de l'ADN, amplification et purification du gène 16S rDNA**

L'ADN des souches bactériennes a été extrait en utilisant le kit InstaGene (Biorad). Le gène 16S rDNA a été amplifié par PCR. Le produit d'amplification fait environ 1400 paires de bases et correspond à la partie du gène 16S d'*Escherichia coli* de la position 3 à 1392. L'amplification a été effectuée dans un thermocycleur (Applied Biosystem, 2700), le HotStar Taq Kit (Qiagen), le dNTP Mix (Sigma Aldrich) et les amorces UniL et UniR (Microsynth). L'amplification est obtenue par dénaturation de l'ADN (15 min à 95 °C), suivie par 35 cycles d'amplification (30s à 95 °C, 2 min à 52 °C, 2 min à 72 °C) et terminée par un traitement de 10 min à 72 °C. Les produits de l'amplification ont été contrôlés par migration électrophorétique dans un gel d'agarose à 1 %. Ensuite, la purification des fragments a été faite sur colonne Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich).

Les fragments amplifiés et séquencés couvrent la portion 82-870 du gène 16S de *E. coli* qui contient les régions variables V2, V3 et V4.

### **Séquençage des fragments amplifiés**

Les fragments purifiés ont été amplifiés pour séquençage en utilisant le kit BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix et l'amorce UniL. La réaction de séquençage a été faite sur 25 cycles (10s à 96 °C, 5s à 50 °C, 4 min à 60 °C). La purification des fragments ainsi obtenus a été faite sur colonne Sephadex G-50 (Sigma-Aldrich). Cinq µl de HiDi Formamide (Applied Biosystems) ont été ajoutés dans la solution de fragments purifiés avant de procéder au séquençage (séquenceur ABI3500, Applied Biosystems 3500 Genetic Analyser). Les séquences et les électrophérogrammes ont été analysés en utilisant le programme MEGA 7 (KUMAR *et al.* 2016).

## RÉSULTATS

### **Analyse de la présence d'hydrocarbures dans l'eau des ports de la Ville de Morges et du Lac Léman**

L'eau a été prélevée dans 3 points au total à l'intérieur des deux ports de la Ville de Morges au cours du mois de juin 2018, quand l'exploitation de bateaux était intense et la température de l'eau suffisamment élevée pour permettre la prolifération des micro-organismes indigènes. Des échantillons d'eau issus des trois endroits différents ainsi qu'un échantillon prélevé au milieu du lac ont été utilisés pour la quantification de BTEX, MTBE, ETBE et hydrocarbures C10-C40. Les résultats des analyses sont résumés dans le tableau suivant (tableau 1). De l'ETBE et du MTBE ont été retrouvés dans tous les échantillons de l'eau des ports, ainsi que des hydrocarbures C10-C40 dans l'échantillon 2551.01 Port du Petit-Bois, secteur F. Ces hydrocarbures sont vraisemblablement issus du carburant employé pour les bateaux mais leur présence reste confinée à l'eau du port. En effet, l'échantillon d'eau du Lac Léman contient seulement une faible présence de toluène. La présence de ces composés dans les eaux des deux ports a été testée en comparant le prélèvement de juin 2018 avec une campagne de prélèvement effectuée lors du mois de mai 2018 et qui a donné des résultats pratiquement identiques.

### **Isolement des souches d'intérêt**

Après la phase d'enrichissement qui a duré 7 jours, le nombre total de bactéries isolées sur agar (UFC) ainsi que le type de colonies ont été énumérés (tableau 2). Les souches isolées depuis les trois échantillons sont morphologiquement identiques entre échantillons. Ceci n'est pas surprenant car les échantillons ont été prélevés à des endroits relativement proches les uns des autres. De plus, le nombre de bactéries environnementales qu'il est possible d'isoler sur agar est faible (KAEBERLEIN *et al.* 2002). Une colonie par type a été prélevée et ceci depuis les échantillons qui ont montré visuellement la plus grande abondance du type de colonie d'intérêt (tableau 2). Ceci a mené à l'isolement de deux colonies morphologiquement différentes par échantillon. Ces colonies ont été inoculées sur boîte de Petri. Toutes les colonies se sont développées sur agarose, à l'exception de la colonie 2551.01A qui n'a montré aucune croissance après ré-inoculation. Cette colonie a donc été abandonnée car l'étude se focalise sur les bactéries qui sont facilement cultivables en laboratoire.

### **Croissance des souches isolées en présence d'hydrocarbures**

Une fois les cinq colonies pures obtenues, les souches ont été repiquées et inoculées pour l'essai de dégradation des hydrocarbures en milieu liquide. Après 7 jours d'incubation, seulement les colonies 2551.02C, 2551.02D et 2551.03E ont montré une croissance détectable (figure 1). La souche 2551.02C est celle qui a montré le taux de croissance le plus élevé, suivie par 2551.03E et 2551.02D. Ces trois souches ont donc été ré-isolées sur agarose pour séquençage et employées pour quantification de leur capacité à dégrader les hydrocarbures d'origine pétrolière. Les autres souches n'ont pas été retenues pour la suite de l'étude.

### **Analyses des séquences 16S rDNA des souches isolées**

Les séquences des souches isolées ont été comparées aux séquences 16S rDNA de la banque de données NCBI. Les relations évolutives des différents taxa ont été obtenues par le programme

Tableau 1. résultats des analyses chimiques pour la quantification d'hydrocarbures C10-C40 et des composés volatils BTEX, MTBE, ETBE sur l'eau du lac Léman et du port de Morges.

Nom de l'échantillon:	Port du Petit-Bois - F	Port du Petit-Bois - H	Port du Château	Lac Léman
N° d'échantillon:	2551.01	2551.02	2551.03	2551.04
Zone de prélèvement:	Port du Petit-Bois, secteur F	Port du Petit-Bois, secteur H	Côté Nord / Quai de Mont-Blanc	Au large de la plage de Buchillon (environ 200 m)
Composés				
Benzène	< 0.1 µg/L	< 0.1 µg/L	< 0.1 µg/L	< 0.1 µg/L
Ethyl tert-butyl éther (ETBE)	1.1 µg/L	0.4 µg/L	<b>1.4 µg/L</b>	< 0.1 µg/L
Ethylbenzène	< 0.1 µg/L	< 0.1 µg/L	< 0.1 µg/L	< 0.1 µg/L
m/p-Xylène	< 0.1 µg/L	< 0.1 µg/L	< 0.1 µg/L	< 0.1 µg/L
Méthyl tert-butyl éther (MTBE)	<b>0.2 µg/L</b>	<b>0.5 µg/L</b>	<b>0.4 µg/L</b>	< 0.1 µg/L
o-xylène	< 0.1 µg/L	< 0.1 µg/L	< 0.1 µg/L	< 0.1 µg/L
Toluène	< 0.1 µg/L	< 0.1 µg/L	< 0.1 µg/L	<b>0.2 µg/L</b>
Hydrocarbures C10-C40	<b>0.11 mg/L</b>	< 0.05 mg/L	< 0.05 mg/L	< 0.05 mg/L

Tableau 2. Énumération du nombre de bactéries vivantes (UFC) ainsi que du nombre de colonies morphologiquement différentes après la phase d'enrichissement. Colonies isolées: ombre de types morphologiques des colonies considérées pour l'isolement.

Échantillon	Zone de prélèvement	Bactéries/mL	Colonies isolées	Code des souches
2551.01	Port du Petit-Bois - F	8'900	6	2551.01A 2551.01B
2551.02	Port du Petit-Bois - H	18'000	5	2551.02C 2551.02D
2551.03	Port du Château	15'000	6	2551.03E 2551.03F

MEGA 7 (figure 2). La souche 2551.02 D présente la même séquence partielle du 16S rDNA que des souches de *Pseudomonas putida*. Cette espèce bactérienne est bien connue pour sa capacité à dégrader les hydrocarbures (FAYOLLE *et al.* 2001, SINGH & FULEKAR, 2010). Ces bactéries sont notamment connues pour cliver les molécules d'hydrocarbures pour obtenir des composés clés du métabolisme cellulaire, tels que le pyruvate et l'acétaldéhyde (KIM *et al.* 1998). La souche 2551.02 C ne se différencie pas des séquences du gène ribosomal 16S d'isolats de *Delftia tsuruhatensis* ou *lacustris*. Des souches de *D. tsuruhatensis* ont été décrites comme des bactéries isolées de sols capables de dégrader le pétrole (WEDULO *et al.* 2014) tandis que certaines souches de *D. lacustris* sont capables d'utiliser plusieurs types de composés organiques cycliques, tels que le naphthalène, le 2-methylnaphthalène, le benzène et le toluène, comme source unique de carbone (VACCA *et al.* 2005). Cette dernière espèce est aussi connue pour être très résistantes aux métaux lourds comme Cr (VI), Hg (II), Pb (II) et Cd (WU *et al.* 2016). L'isolat 2551.03 E présente la



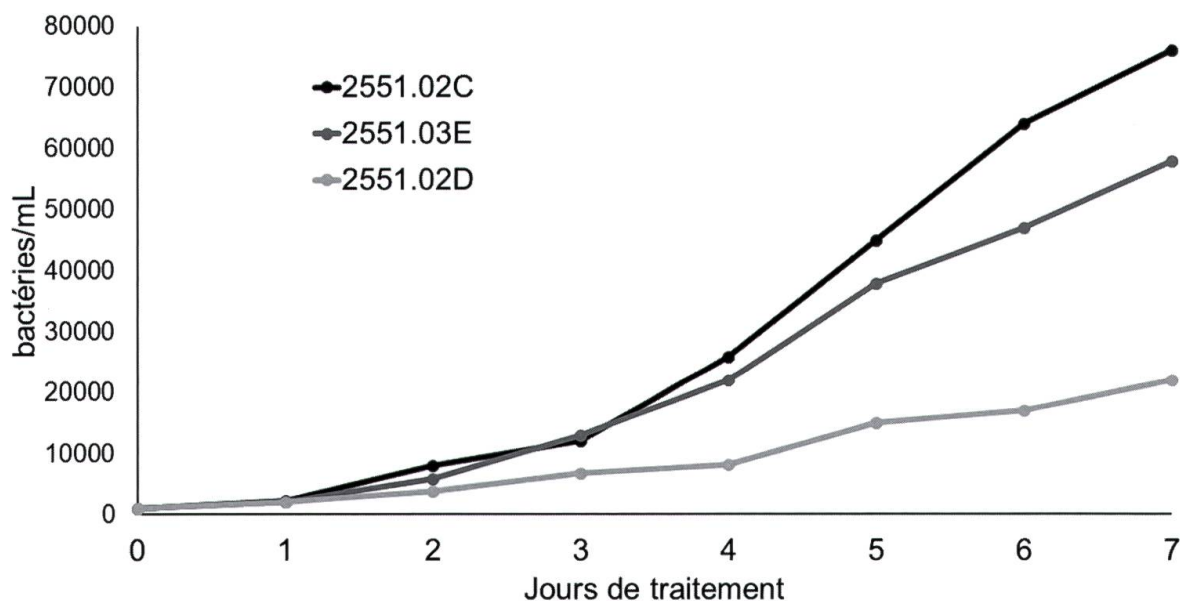


Figure 1. Énumération de la concertation journalière de bactéries par mL pour chaque souche isolée.

séquence partielle du gène ribosomal 16S identique à celle de souches appartenant au genre *Exiguobacterium*. Certaines souches de ce genre bactérien ont été décrites pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures (SARKAR *et al.* 2016) et sont capables de dégrader efficacement les n-alcanes avec un large spectre d'atomes de carbone (MOHANTY & MUKHERJI 2008).

### Essais de dégradation des hydrocarbures d'origine pétrolière

Les souches de *Delftia sp.*, *Exiguobacterium sp.*, et *Pseudomonas sp.* ont été inoculées dans de l'eau stérilisée du lac contaminée aux hydrocarbures. Après la période d'incubation de sept jours, le contenu d'hydrocarbures a été quantifié et comparé au contrôle sans bactéries (figure 3). Les contenus ont tous été comparés entre eux au moyen d'un t de Student. Les trois souches ont réduit la concentration de ETBE dans l'eau ( $t = 7.49$ , d.f. = 5;  $p < 0.001$ , figure 3a). La souche *Delftia sp.* a réduit la quantité ETBE plus que les deux autres ( $t = 8.21$ , d.f. = 5;  $p < 0.001$ ), pour lesquelles la réduction est comparable ( $t = 1.24$ , d.f. = 5;  $p > 0.05$ ), alors que le traitement avec *Delftia sp.* est le seul qui a permis de réduire de manière significative la concentration de MTBE ( $t = 4.92$ , d.f. = 5;  $p < 0.01$ , figure 3b). Le seul BTEX pour lequel une diminution significative de la concentration a été détectée est l'*o*-xylène ( $t = 7.51$ , d.f. = 5;  $p < 0.001$ , figure 3c) après exposition à *Delftia sp.* La concentration des autres BTEX n'a pas été affectée par le traitement avec les bactéries. Globalement, *Delftia sp.* est la souche de bactéries qui a été en mesure de réduire la concentration des composés volatils de manière la plus efficace. La réduction de la concentration de ces composés peut être due soit à un phénomène indirect d'évaporation due aux conditions de culture aérobie, soit à une dégradation directe des composés organiques par les bactéries. En ce qui concerne le fioul lourd, le traitement avec *Pseudomonas* et *Delftia sp.* a permis une réduction significative de la concentration d'hydrocarbures C10-C40 ( $t = 5.12$ , d.f. = 5;  $p < 0.01$ ), alors qu'aucun effet n'a été détecté en présence d'*Exiguobacterium sp.* (figure 3d). Le taux de réduction de la concentration de ces composés est comparable aux résultats cités dans la littérature pour des études similaires (WEDULO *et al.* 2014, SINGH *et al.* 2015).

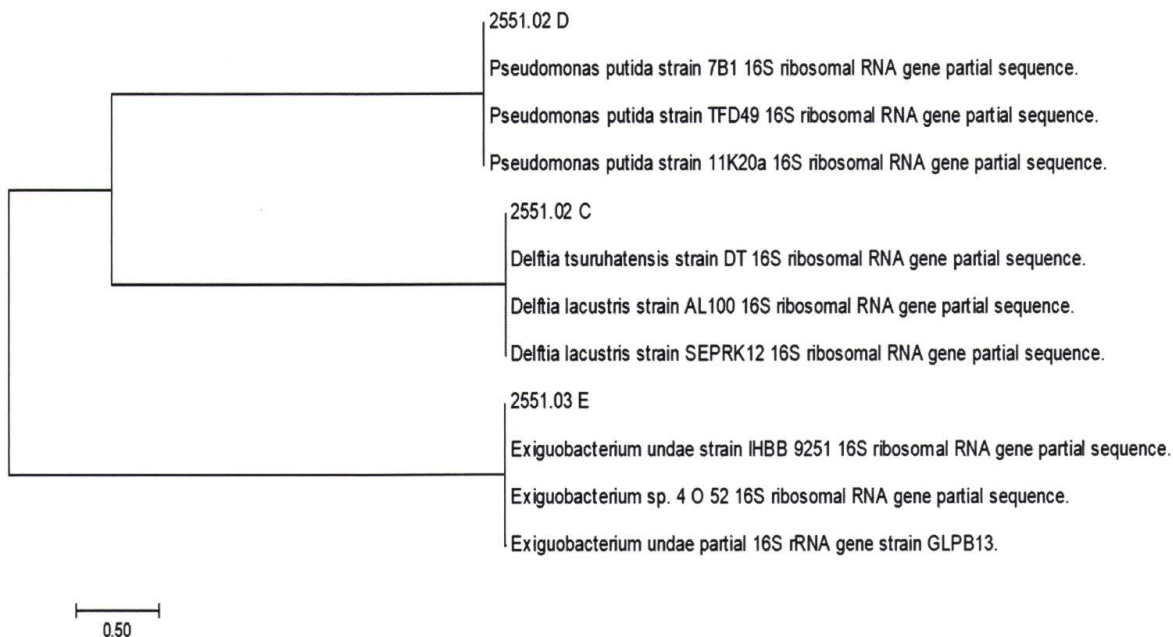


Figure 2. Relations évolutives des différents taxa correspondant aux souches isolées. Les distances, calculées par la méthode Maximum Composite Likelihood (MCL), correspondent au nombre de substitutions de bases par site.

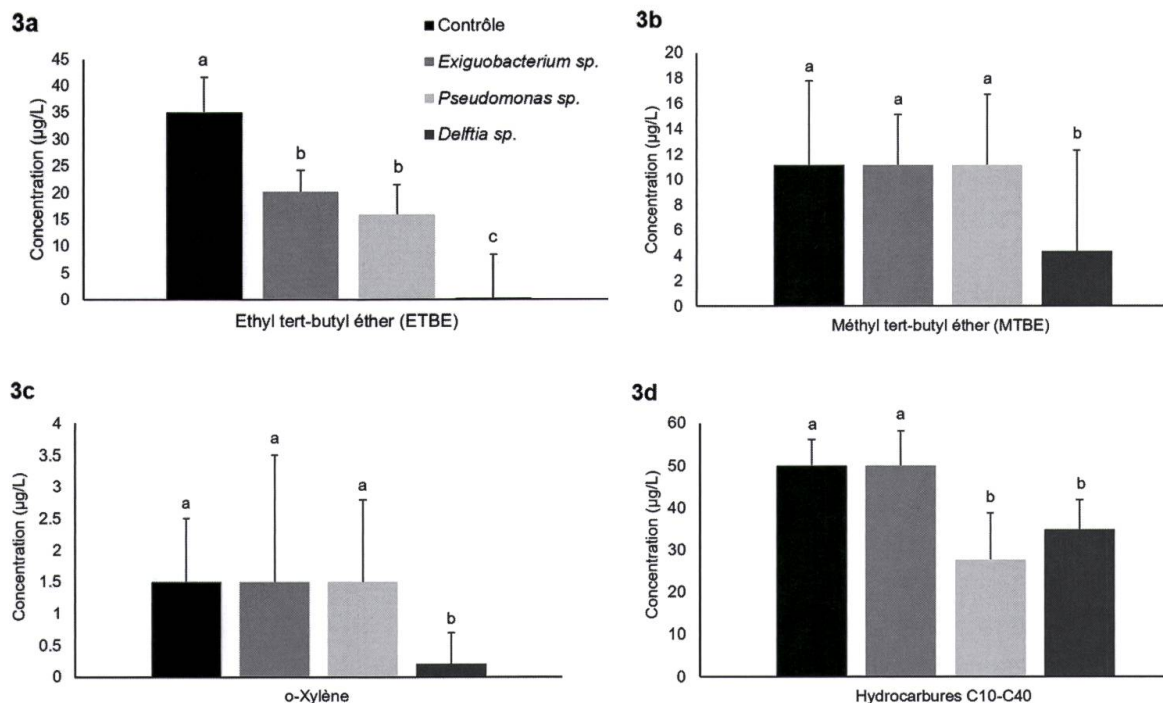


Figure 3. Concentrations (+ écart type) de (a) ETBE, (b) MTBE, (c) o-xylène et (d) des hydrocarbures C1-C40 dans les échantillons traités avec les souches isolées et le contrôle sans bactérie. Les différentes lettres au-dessus des colonnes indiquent des valeurs significativement différentes.

## DISCUSSION

Les environnements qui sont chroniquement pollués à faible dose abritent souvent des microorganismes capables de dégrader les composés toxiques présents (LANDMEYER *et al.* 2001, PENG *et al.* 2015). En effet, la sélection naturelle favorise le développement de souches de microorganismes qui ont su développer des adaptations métaboliques pour dégrader et détoxifier les polluants (KIM *et al.* 1998, FAYOLLE *et al.* 2001, PENDASHTEH *et al.* 2010, SINGH & FULEKAR 2010). On parle alors de phénomènes de microévolution (MEDINA *et al.* 2007). Ceci est notamment très fréquent pour les environnements pollués aux hydrocarbures d'origine pétrolière (LEAHY & COLWELL 1990, FAYOLLE *et al.* 2001, LANDMEYER *et al.* 2001, PENDASHTEH *et al.* 2010, PENG *et al.* 2015). L'hypothèse émise dans l'introduction, c'est-à-dire que dans l'eau des deux ports considérés dans le cadre de cette étude il y a présence d'hydrocarbures à faible dose a été confirmée. En effet, des additifs de l'essence ainsi que du fioul lourd ont été trouvés dans l'eau de ces deux ports de la Ville de Morges, ce qui est normal en raison des activités humaines liées à l'exploitation de bateaux à moteur. Les quantités détectées se situent en dessous des limites de la loi (Ordonnance sur la protection des eaux, état le 1er juin 2018) ainsi que des quantités citées dans la littérature pour les eaux de surface en zone urbaine (SQUILLACE *et al.* 1996, SCHIMDT 2003, OKEKE & FRANKENBERGER 2003). Ceci indique que, globalement, l'eau de ces deux ports de la Ville de Morges est peu polluée par des déversements accidentels de carburant pour bateaux. La présence de MTBE dans l'eau du Lac Léman en proximité des zones urbaines a d'ailleurs déjà été documentée (Rapport d'activité 2014 des sections distribution et inspection de l'eau, Service de la consommation et des affaires vétérinaires, Etat de Vaud). Plusieurs études montrent qu'il est possible d'isoler de l'environnement des bactéries capables de dégrader les additifs de l'essence MTBE et ETBE, ainsi que le fioul lourd. Ces microorganismes se retrouvent souvent dans les eaux et les sédiments (FAYOLLE *et al.*, 2001, OKEKE & FRANKENBERGER 2003, WEDULO *et al.* 2014). Lors de cette étude, il a été possible d'isoler trois souches de bactéries qui appartiennent aux genres *Delftia*, *Exiguobacterium* et *Pseudomonas* en se basant sur des critères de discrimination morphologique des colonies. Il s'agit de genres souvent décrits pour leur habilité à dégrader les hydrocarbures, notamment les genres *Pseudomonas* et *Delftia* (FAYOLLE *et al.* 2001, VACCA *et al.* 2005, SINGH & FULEKAR 2010, WEDULO *et al.* 2014). Ces deux genres appartiennent au phylum *Proteobacteria*, qui fait partie des phylums les plus fréquents dans des environnements pollués aux hydrocarbures (PENG *et al.* 2015), alors que le genre *Exiguobacterium* appartient au phylum *Firmicutes* et il est moins souvent décrit pour ces activités de dégradation de polluants (MOHANTY & MUKHERIJ 2008, PENG *et al.* 2015, SARKAR *et al.* 2016). Cette étude confirme qu'*Exiguobacterium sp.* n'est pas en mesure de réduire la concentration d'hydrocarbures d'origine pétrolière de manière efficace, comparée aux autres souches isolées. Les bactéries qui appartiennent au genre *Pseudomonas* et *Delftia* sont en revanche connues pour être capables de dégrader des hydrocarbures polycycliques tels que les hydrocarbures polycycliques aromatiques (HAP) et les polychlorobiphényles (PCB) (BOYLE *et al.* 1992, KIM *et al.* 1998, VACCA *et al.* 2005, WU *et al.* 2016). La dégradation de ce type de composés débute par une hydroxylation du noyau aromatique, suivie par des hydrolyses successives qui conduisent à des substrats qui seront métabolisés dans le cycle de Krebs (KIM *et al.* 1998, WU *et al.* 2016). Cette étude montre

que les souches de *Pseudomonas* et *Delftia* isolées de l'eau des ports de la Ville de Morges sont très efficaces aussi pour réduire la concentration d'hydrocarbures qui n'ont pas de noyaux aromatiques dans leur structure moléculaire, tels que le MTBE, l'ETBE et les hydrocarbures C10-C40. Les activités de dégradation des n-alcane à 10-40 atomes de carbone par ce type de bactéries sont aussi décrites et impliquent des hydroxylations par des alcanes hydroxylases de type cytochrome P450 (PAWLIK *et al.* 2017). La dégradation des éthers d'alkyle se fait en revanche par oxydations successives via des mono-oxygénases (LI & YAN 2014). Dans le cadre de cette étude, il est tout à fait probable que les souches isolées aient développé des adaptations métaboliques qui leur permettent une dégradation de de plusieurs types d'hydrocarbures. Le co-métabolisme dans le domaine de la bio-remédiation, c'est-à-dire la capacité à dégrader des composés qui ne sont normalement pas dégradables grâce à la présence dans le même environnement de composés dégradables (LI *et al.* 2016), est un processus qui est effectivement déjà décrit pour la dégradation des hydrocarbures tels que le ETBE, mais il se fait le plus souvent en combinaison avec des alcanes plus courts que les hydrocarbures C10-C40, typiquement à 5-8 atomes de carbone (NAVA *et al.* 2006, LI *et al.* 2016). Les souches isolées de l'eau des deux ports de la Ville de Morges ont vraisemblablement développé des capacités de co-métaboliser des hydrocarbures de nature très différente en termes de nombre d'atomes de carbone et de structure chimique. Ce type de co-métabolisme a déjà été décrit mais reste peu fréquent (BEILEN *et al.* 2003). Les microorganismes qui ont développé ces capacités jouent donc un rôle écologique majeur dans la dépollution des écosystèmes, ce qui est donc aussi le cas pour les environnements considérés dans le cadre de cette étude (BEILEN *et al.* 2003, LI *et al.* 2016). Parmi les souches isolées, *Delftia sp.* est celle qui est la plus intéressante du point de vue environnemental et biotechnologique. En effet, il s'agit de bactéries qui ne représentent aucun danger pour l'homme et pour l'environnement, qui sont capables de dégrader plusieurs sortes d'hydrocarbures d'origine pétrolière et qui, en plus, sont connus pour promouvoir la croissance végétale et donc favoriser la détoxification d'un environnement (VACCA *et al.* 2005, MOREL *et al.* 2016, PAWLIK *et al.* 2017). Étant donné qu'il s'agit d'une souche indigène, donc déjà bien adaptée à l'environnement local, elle pourrait être employée pour des procédés de bioremédiation à l'échelle régionale ou lors de procédés de bio-stimulation pour décontaminer des zones polluées dans le Lac Léman. Cependant, des études plus approfondies portant sur son métabolisme et son rôle écologiques seraient nécessaires pour envisager d'employer cette bactérie dans le cadre de travaux de bioremédiation. Ce type d'application devra aussi tenir compte du cadre légal et respecter notamment les ordonnances qui réglementent l'utilisation et la dissémination des microorganismes dans l'environnement tels que l'Ordonnance sur l'utilisation d'organismes dans l'environnement (ODE).

## CONCLUSION

Cette étude a permis d'isoler trois souches de bactéries qui ont des capacités à réduire la concentration d'hydrocarbures d'origine pétrolière dans l'eau douce. La souche *Delftia sp.* est tout particulièrement intéressante, car elle a montré la capacité à réduire simultanément la concentration d'hydrocarbures volatils, volatils cycliques et non volatils. Cette souche est facilement cultivable en laboratoire et pourrait donc être exploitée pour des activités biotechnologiques

de bioremédiation, notamment pour des dépollutions au niveau local. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre ses activités métaboliques de dégradation des hydrocarbures et pour confirmer la possibilité de l'employer pour des telles applications.

## REMERCIEMENTS

Ce projet ayant été fait dans le cadre d'un travail de maturité durant la moitié de la deuxième et dernière année de gymnase, nous tenons à remercier le Gymnase de Marcelin à Morges, et tout particulièrement Madame Rupp et Madame Pinazza, qui ont été les enseignantes dans le cadre de ce travail de maturité, pour leur soutien durant cette étude. Merci à Anna Paola Caminada et au Prof. Mauro Tonolla du Laboratory of Applied Microbiology (SUPSI, Bellinzona), pour l'aide dans les travaux d'identification des souches.

## BIBLIOGRAPHIE

- ADEBUSOYE S. A., ILORI M. O., AMUND O. O., TENIOLA O. D., OLATOPE O. S., 2007. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1149.
- ALTHALB H. A. & SINGLETON I., 2017. Isolation of Indigenous Hydrocarbon Transforming Bacteria from Oil Contaminated Soils in Libya: Selection for Use as Potential Inocula for Soil Bioremediation. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation* 5 (1): 8-17.
- ANTIĆ M. P., JOVANCICEVIC B., VRVIĆ M. & SCHWARZBAUER J., 2006. Petroleum Pollutant Degradation by Surface Water Microorganisms. *Environmental Science and Pollution Research* 13: 320.
- ARAMBARRI I., LASA M. L. GARCIA R. & MILLÁN E., 2004. Determination of fuel dialkyl ethers and BTEX in water using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detection. *Journal of Chromatography A* 1033: 193-203.
- AUGUSTYNOWICZ J., KASZYCKI P., KUŚ M., BIAŁECKA A. & KOŁOCZEK H., 2008. Optimized Methods for Stabilization of Microbial Communities Specializing in Biodegradation of Organic Environmental Contaminants. *Polish Journal of Environmental Studies* 17 (5): 655-664.
- BÉRANECK J., 1939. Le port de Morges: sa fondation et son histoire. *Revue historique vaudoise* 47: 1.
- BOYLE A. W., SILVIN C. J., HASSETT J. P., NAKAS J. P. & TANENBAUM S. W., 1992. Bacterial PCB biodegradation. *Biodegradation* 3 (2-3): 285-298.
- FAYOLLE F., VANDECASTEELE J.-P. & MONOT F., 2001. Microbial degradation and fate in the environment of methyl tert-butyl ether and related fuel oxygenates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56: 339-349.
- HU P., DUBINSKY E. A., PROBST A. J., WANG J., SIEBER C. M., TOM L. M., GARDINALI P. R., BANFILED J. F., ATLAS R. M. & ANDERSEN G. L., 2017. Simulation of Deepwater Horizon oil plume reveals substrate specialization within a complex community of hydrocarbon degraders. *PNAS* 114 (28): 7432-7437.
- KAEBERLEIN T., LEWIS K. & EPSTEIN S. S., 2002. Isolating "Uncultivable" Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science* 296 (5570): 1127-1129.
- KIM K., LEE S., LEE K. & DONGBIN L., 1998. Isolation and Characterization of Toluene-Sensitive Mutants from the Toluene-Resistant Bacterium *Pseudomonas putida* GM73. *Journal of Bacteriology* 180: 3692-3696.
- KLEPEIS N. E., NELSON W. C., OTT W. R., ROBINSONS J. P., TSANG A. M., SWITZER P., BEHAR J. V., HERN S. C. & ENGELMANN W. H., 2001. The National Human Activity Pattern Survey (NHAPS): a resource for assessing exposure to environmental pollutants. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 11: 231-252.
- KUMAR S., STECHER G. & TAMURA K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.
- LANDMEYER J. E., CHAPPELLE F. H., HERLONG H. H. & BRADLEY P. M., 2001. Methyl tert-Butyl Ether Biodegradation by Indigenous Aquifer Microorganisms under Natural and Artificial Oxidic Conditions. *Environmental Science & Technology* 35 (6): 1118-1126.

- LEAHY G. J. & COLWELL R. R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 54 (3): 305-315.
- LI S., WANG S & YAN W., 2016. Biodegradation of Methyl tert-Butyl Ether by Co-Metabolism with a *Pseudomonas* sp. Strain. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13 (9): 883-896.
- LOMBI E. & HAMON R. E., 2005. Remediation of polluted soils. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, Elsevier, New York. 379-385 p.
- MARGESIN R. & SCHINNER F., 1997. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. *Applied Environmental Microbiology* 63 (7): 2660-2664.
- MEDINA M. H., CORRE J. A. & BARATA C., 2007. Micro-evolution due to pollution: Possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere* 11: 2105-2114.
- NAVA V., MORALES M. & REVAH S., 2006. Cometabolism of methyl tert-butyl ether (MTBE) with alkanes. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*.
- OKEKEA B. C. & FRANKENBERGER W. T., 2003. Biodegradation of methyl tertiary butyl ether (MTBE) by a bacterial enrichment consortia and its monoculture isolates. *Microbiological Research* 158 (2): 99-106.
- PAWLIK M., CANIA B., THIJS S., VANGRONSVELD J. & PIOTROWSKA-SEGET Z., 2017. Hydrocarbon degradation potential and plant growth-promoting activity of culturable endophytic bacteria of *Lotus corniculatus* and *Oenothera biennis* from a long-term polluted site. *Environmental Science and Pollution Research* 24: 19640-19652.
- PENDASHTEH A. R., FAKHRU'L-RAZI A., CHUAH T. G., DAYANG RADIAH A. B., MADAENI S. S. & ZURINA Z. A., 2010. Biological treatment of produced water in a sequencing batch reactor by a consortium of isolated halophilic microorganisms. *Environmental Technology* 31: 11.
- PENG M., ZI X. & WANG Q., 2015. Bacterial Community Diversity of Oil-Contaminated Soils Assessed by High Throughput Sequencing of 16S rRNA Genes. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12 (10): 12002-12015.
- SCHIMDT T. C., 2003. Analysis of methyl tert-butyl ether (MTBE) and tert-butyl alcohol (TBA) in ground and surface water. *Trends in Analytical Chemistry* 22: 776-784.
- SEMPLEA K. T., REIDA B. J. & FERMORB T. R., 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution* 112 (2): 269-283.
- SINGH D. & FULEKAR M. H., 2010. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by *Pseudomonas putida* Strain MHF 7109. *Clean Soil Air Water* 28:781-786.
- SOUSA A. M., PEREIRA M. O., LOURENÇO A., 2015. MorphoCol: An ontology-based knowledgebase for the characterisation of clinically significant bacterial colony morphologies. *Journal of Biomedical Informatics* 55: 55-63.
- SQUILLACE P. J., ZOGORSKI J. S., WILBER W. G. & PRICE C. V., 1996. Preliminary Assessment of the Occurrence and Possible Sources of MTBE in Groundwater in the United States, 1993-1994. *Environmental Science & Technology* 30 (5): 1721-1730.
- SURRIYA O., SARAH S., KINZA S., ALVINA W. & KAZI G., 2015. Chapter 1 - Phytoremediation of Soils: Prospects and Challenges. *Soil Remediation and Plants*, Academic Press, Cambridge. 1-36 p.
- VACCA D. J., BLEAM W. F. & HICKEY W. J., 2005. Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic acid-sorbed phenanthrene. *Applied Environmental Microbiology* 71: 3797-3805.
- VAN BEILEN J. B., LI Z., DUETZ W.A., SMITS T.H.M. & WITHOLT B., 2003. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Science and Technology* 58 (4): 427-440
- WEDULO A., ATUHAIRE D. K., OCHWO A., MUWANIKA V., RWENDEIRE A. J. J. & NAKAVUMA J. L., 2014. Characterization and evaluation of the efficiency of petroleum degrading bacteria isolated from soils around the oil exploration areas in western Uganda. *African Journal of Biotechnology* 48: 4458-4470.
- WU W., HUANG H., LING Z., YU Z., JIANG Y., LIU P. & LI X., 2016. Genome sequencing reveals mechanisms for heavy metal resistance and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Delftia lacustris* strain LZ-C. *Ecotoxicology* 25: 234-247.

