

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

Marie Gerber^{1,*}, Bastien Genet^{2,*}, Patrik Castiglioni³, Tanya Dubois³, Valérie Devaud³, SUPSI⁴, Sylvia Maître³ et Davide Staedler^{3,5,†}

5 ¹chemin de Pra-Riondet 19, 1163 Etoy

²chemin des chaux 8, 1128 Reverolle

³Scitec Research SA, Avenue de Provence 18-20, 1000 Lausanne 20

⁵TIBIO Sagl, Via Valle 11, 6949 Comano

*ces auteurs ont contribué de manière égale

10 †correspondance : dstaedler@scitec-research.com

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, 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
25 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
30 celles qui, lors des essais en laboratoire, ont réduit la concentration des hydrocarbures
ETBE, MTBE et C10-C40 dans la proportion la plus importante. *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
35 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
40 Léman.

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
45 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 identify and isolate 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 cultured 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 bio-remediation activities at the local scale.

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

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 de pollution locaux 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
75 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,
80 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
85 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
90 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
95 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
100 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
105 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
110 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
115 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 Chateau, dont la construction définitive date du XVIIIème 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
120 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 isolation 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 impacter le développement des bactéries. Les échantillons pour l'analyse des hydrocarbures C10-C40 ont été prélevés dans des bouteilles en verre de 1000 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 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, Biomériex), 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'isolation des souches d'intérêt (protocole d'enrichissement) et pour l'essai de croissance en présence d'hydrocarbures

Deux cent mL de chaque échantillon 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 (capsules de Petri, 100 µL par capsules). Les capsules 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 CFU. 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.

170 *Protocole pour les essais de dégradations des hydrocarbures*

Les bactéries ont été inoculées à 2000 CFU/mL dans 200 mL d'eau du Lac Léman stérile. Cents µL d'une solution standard d'alcane C10-C40 et 50 µL d'essence sans plomb 95 octanes employés comme combustible pour bateaux ont été rajoutés aux solutions contenant les bactéries. Un milieu de contrôle contenant les hydrocarbures
175 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.

180 *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) est introduit dans un récipient contenant du sulfate de sodium anhydre calciné (Sigma-
185 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 prise 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-
190 624Sil (Restek), via un injecteur robotique (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

195 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
200 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
205 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
210 gène 16S rDNA a été amplifié par PCR en utilisant les amorces spécifiques universelles UniL (5' ATTCTAGAGTTTGATCATGGCTCA 3') et UniR (5' ATGGTACCGTGTGACGGGCGGTGTGTA 3'). L'amplification a été effectuée dans un thermocycleur (Applied Biosystem, 2700) en utilisant le DNA Polymerase Kit (Qiagen). L'amplification est obtenue par dénaturation de l'ADN (15 min à 95°C), suivie par 35
215 cycles d'amplification (30s à 95°C, 2 min à 52°C, 2 min à 72°C, 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). En bref, 30 µl du produit de la PCR ont été ajoutés à la colonne de Sephadex et filtrés par centrifugation (3 min. à 2700 rpm). Les fragments purifiés ont été quantifiés par absorbance avec un Nanodrop ND-1000 (Thermofisher) et conservés à 4°C.

Séquençage des fragments amplifiés

Les fragments purifiés ont été amplifiés pour séquençage en utilisant le kit BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (ThermoFisher Scientific). 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 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 Château. 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 chronique 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.

Isolation des souches d'intérêt

Après la phase d'enrichissement qui a duré 7 jours, le nombre total de bactéries isolées sur agar (CFU) ainsi que de colonies morphologiquement différentes 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 de la colonie d'intérêt (Tableau 2). Ceci a mené à l'isolation 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
270 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
275 leur capacité à dégrader les hydrocarbures d'origine pétrolière. Les autres souches
n'ont pas été retenues pour la suite de l'étude.

Séquençage des souches isolées

Les séquences des souches isolées ont été comparées aux séquences 16S rDNA de
280 la banque de données NCBI. Les relations évolutives des différents taxa ont été
obtenues par le programme MEGA 7 (Figure 2). Les distances ont été calculées par
la méthode Maximum Composite Likelihood (MCL) et correspondent au nombre de
substitutions de bases par site. La souche 2551.02 D présente la même séquence
partielle du 16S rDNA que des souches de *Pseudomonas putida*. Cette espèce
285 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*
290 *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
295 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 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
300 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
305 inoculées dans de l'eau du lac stérile contaminée aux hydrocarbures. Après la période
d'incubation de sept jours, le contenu d'hydrocarbures a été quantifié et comparé au
contrôle sans bactéries. Le seul BTEX pour lequel une diminution significative de la
concentration a été détectée est l'o-Xylène (Figure 3a) après exposition à *Delftia sp.*,
la concentration des autres BTEX n'a pas été affectée par le traitement avec les
310 bactéries. Le traitement avec *Delftia sp.* est le seul qui a permis de réduire de manière
significative la concentration de MTBE, alors que les trois souches ont réduit la
concentration de ETBE dans l'eau (Figure 3a). 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
315 due soit à un phénomène indirect d'évaporation dû à l'activité microbienne, soit à une
dégradation directe des composés organiques par les bactéries. Pour 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, alors qu'aucun effet n'a été

déecté en présence d'*Exiguobacterium* sp. (Figure 3b). La cinétique de réduction de
320 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).

Discussion

Les environnements qui sont chroniquement pollués à faible dose abritent souvent des
325 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 détoxiquer les polluants (KIM *et al.* 1998, FAYOLLE *et al.* 2001,
PENDASHTEH *et al.* 2010, SINGH & FULEKAR 2010). On parle alors de phénomènes de
330 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.*
et al. 2015). L'hypothèse émise dans l'introduction, c'est-à-dire que l'eau des deux ports
considérés dans le cadre de cette étude soit faiblement mais chroniquement
335 contaminée aux hydrocarbures, 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
340 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
345 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 &
350 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*. 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).
355 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
360 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
365 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
370 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-alcanes à 10-40 atomes de carbone par ce type de
bactéries sont aussi décrites et impliquent des hydroxylations par des alcanes
375 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 un co-métabolisme de plusieurs types d'hydrocarbures. Le co-métabolisme
380 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
385 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
390 *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
395 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). Etant donné qu'il s'agit d'une souche indigène, donc déjà bien adaptée à
400 l'environnement local, elle pourrait être employée pour des procédés de bio-
remédiation à l'échelle régionale ou lors de procédés de bio-stimulation pour
décontaminer des zones polluées dans le Lac Léman.

Conclusion

Cette étude a permis d'isoler trois souches de bactéries qui ont des capacités à réduire
405 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 bio-remédiation et de dépollution,
410 notamment au niveau local. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour mieux
comprendre ses activités métaboliques de dégradation des hydrocarbures.

Bibliographie

ADEBUSOYE S. A., ILORI M. O., AMUND O. O., TENIOLA O. D., OLATOPE O. S., 2007.
415 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

- 420 Potential Inocula for Soil Bioremediation. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation* 5(1):8-17.
- ANTIĆ M. P, JOVANCICEVIC B., VRVIĆ M., SCHWARZBAUER JAN, 2006. Petroleum Pollutant Degradation by Surface Water Microorganisms. *Environmental Science and Pollution Research* 13:320.
- 425 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.
- 430 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.
- 435 BERANECK J., 1939. Le port de Morges : sa fondation et son histoire. *Revue historique vaudoise* 47 :1.
- 440 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.
- 445 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.
- 450 KAEBERLEIN T., LEWIS K., EPSTEIN S. S., 2002. Isolating "Uncultivable" Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science* 296 (5570): 1127-1129.
- 455 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.
- 460 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.

- 465 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., CHAPELLE F. H., HERLONG H. H., BRADLEY P. M., 2001. Methyl tert-Butyl Ether Biodegradation by Indigenous Aquifer Microorganisms under Natural and
470 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.
- 475 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.
- 480 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*
485 *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.
- 490 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
495 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
500 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
505 reactor by a consortium of isolated halophilic microorganisms. *Environmental Technology* 31:11.

- 510 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. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 22:776-784.
- 515 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.
- 520 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.
- 525 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.
- 530 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.
- 535 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
- 540 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.
- 545 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.

550

Tableaux, figures et graphiques

Tableau 1)

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	1.4 µg/L	<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)	0.2 µg/L	0.5 µg/L	0.4 µg/L	<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	0.2 µg/L
Hydrocarbures C10-C40	0.11 mg/L	<0.05 mg/L	<0.05 mg/L	<0.05 mg/L

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.

555 Tableau 2)

Echantillon	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

Tableau 2 : énumération du nombre de bactéries vivantes (CFU) ainsi que du nombre de colonies morphologiquement différentes après la phase d'enrichissement.

Figure 1)

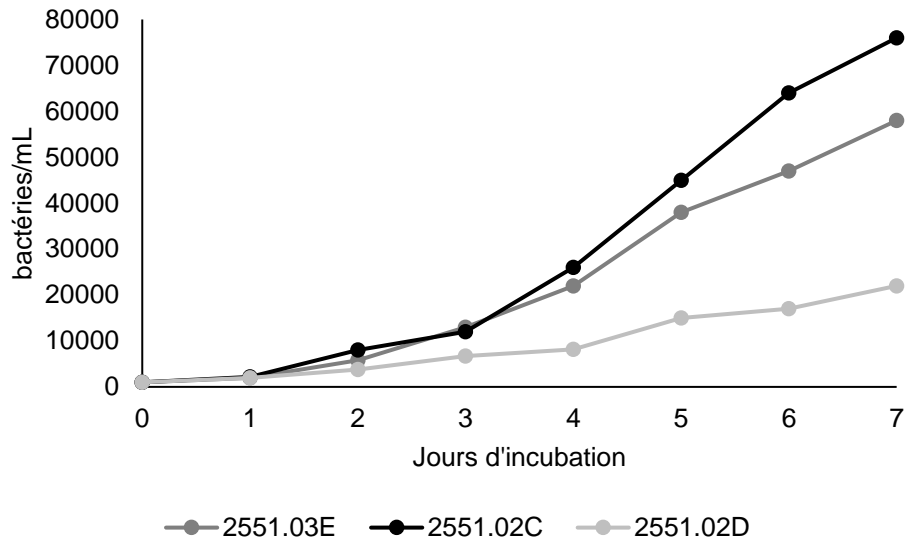


Figure 1 : énumération de la concertation journalière de bactéries par mL pour chaque souche lors de la phase d'enrichissement.

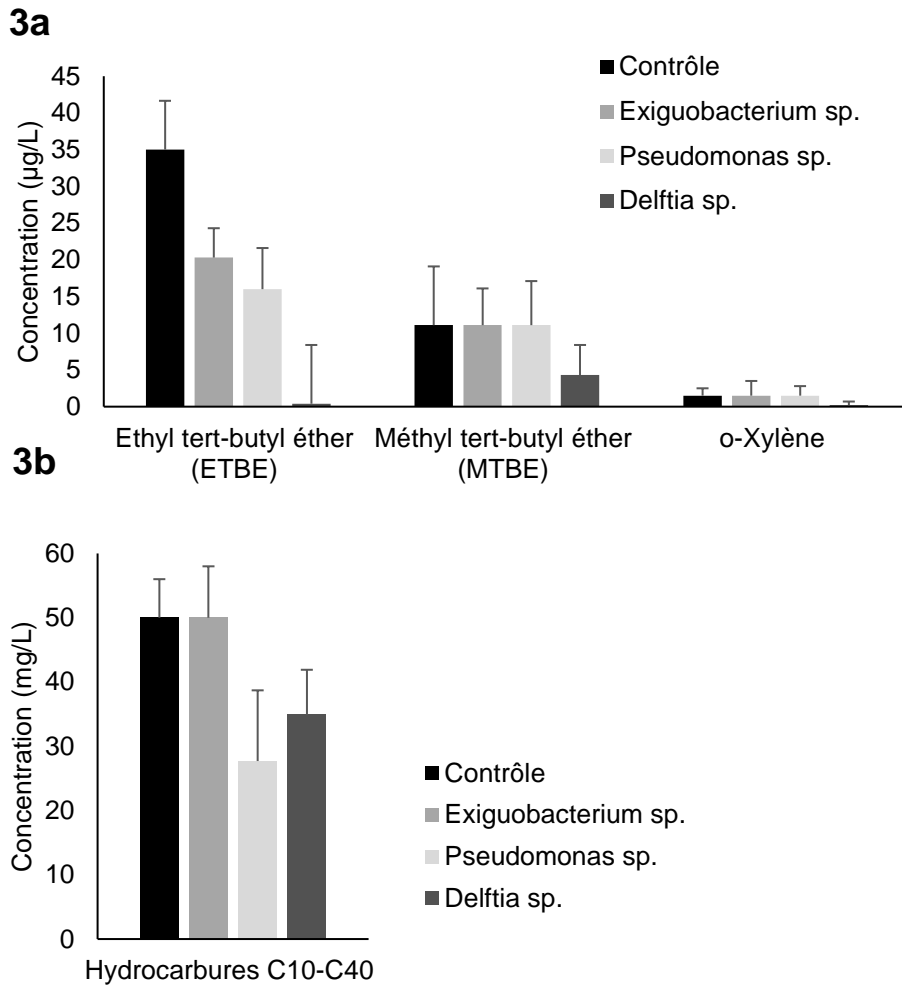
565 Figure 2)

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.

570

575

Figure 3a) et 3b)



580

585

590

Figure 2a) Concentration de ETBE, MTBE et o-Xylène dans les échantillons traités avec les souches isolées et le contrôle sans bactéries. Les résultats ont été comparés entre eux et au contrôle avec un test de Student. ETBE : toutes les souches réduisent la concentration de manière significative ($p < 0.001$). La souche *Delftia sp.* réduit la quantité ETBE plus que les deux autres (p < 0.001), pour lesquelles la réduction est comparable ($p > 0.05$). MTBE et o-Xylène : seule la souche *Delftia sp.* réduit la quantité de ce composé de manière significative ($p < 0.01$). Figure 2b) : Concentration des hydrocarbures C10-C40 dans les échantillons traités avec les souches isolées et le contrôle sans bactéries. Les résultats ont été comparés entre eux et au contrôle avec un test de Student.

Remerciement

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
600 été les professeurs de ce travail de maturité, pour leur soutien durant cette étude.