

COMMUNAUTE FRANÇAISE DE BELGIQUE
ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITE DE LIEGE – GEMBLoux AGRO-BIO TECH

Dépollution des sédiments d'une mangrove de l'estuaire
du Wouri : évaluation du potentiel de microflores

Firmin SEMBOUNG LANG

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en sciences agronomiques et ingénierie biologique

Promoteurs :

Pr. Marc ONGENA

Pr. Philippe THONART

Pr. Jacqueline DESTAIN

2017

Copyright. Aux termes de la loi belge du 30 juin 1994, sur le droit d'auteur et les droits voisins, seul l'auteur a le droit de reproduire partiellement ou complètement cet ouvrage de quelque façon et forme que ce soit ou d'en autoriser la reproduction partielle ou complète de quelque manière et sous quelque forme que ce soit. Toute photocopie ou reproduction sous autre forme est donc faite en violation de la dite loi et des modifications ultérieures

Firmin Semboung Lang (2016). Dépollution des sédiments d'une mangrove de l'estuaire du Wouri : évaluation du potentiel de microflores. Thèse de doctorat. Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech (Belgique). 163 p., 10 tableaux, 35 figures.

Résumé :

L'importance des écosystèmes de mangroves n'est plus à démontrer dans l'équilibre naturel des côtes des régions tropicales. Elles constituent un écosystème particulier et jouent un rôle important dans la production de la biomasse. Mais l'exploitation excessive du bois des palétuviers, les pollutions diverses suite à l'exploitation pétrolière et gazière, sont autant de facteurs qui contribuent à la dégradation des forêts de mangroves. Ainsi, entre 1980 et 2000, environ 35% de la superficie mondiale des mangroves a disparu. La pollution a entraîné une dégradation considérable des mangroves. Une quantité grandissante de déchets résultant des activités urbaines, industrielles et agricoles et de l'exploitation en mer du pétrole et du gaz est rejetée sans aucun traitement dans la mer et se retrouve au niveau des mangroves. Les déversements accidentels d'hydrocarbures en mer entraînent une grave pollution des mangroves et la pollution marine provenant des navires est une menace qui va sans doute s'accroître avec le développement de l'exploitation pétrolière. L'objectif de cette thèse était de mettre au point une méthode de dépollution par voie biologique des sédiments de mangroves pollués par les hydrocarbures. Il s'agissait plus précisément d'évaluer les capacités intrinsèques de dégradation de la microflore spécifique endogène, de comparer le potentiel de dégradation de cette microflore avec d'autres souches pures connues pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures et enfin d'évaluer les différentes techniques de biodégradation adaptées pour l'élimination des hydrocarbures dans les sédiments de mangroves. Des procédés biologiques adaptés ont été mis en œuvre au cours de ce travail pour restaurer les écosystèmes de mangroves. Différentes techniques de traitements biologiques impliquant la microflore spécifique endogène ont été mises en œuvre. L'évaluation du potentiel de dégradation de cette microflore a été réalisée par rapport à trois souches pures exogènes. Les résultats obtenus ont montré que le potentiel de dégradation de la microflore spécifique est comparable à celui de *Rhodococcus erythropolis* lorsqu'on augmente sa concentration dans les sédiments (10^7 CFU.g⁻¹ de matière sèche). La croissance de cette microflore est accélérée avec la présence des nutriments tels l'azote et le phosphore. Ce qui relève davantage le taux de dégradation des hydrocarbures. Le taux de dégradation obtenu en combinant les traitements par bioaugmentation de la microflore spécifique endogène et biostimulation (86%) nous ont amené à proposer cette méthode pour dépolluer les sédiments de mangroves. L'utilisation de la microflore spécifique endogène évite de travailler avec des souches exogènes qui nous exposent aux problèmes écologiques et éthiques liés à leur utilisation.

Mots clés : Mangroves, bioremédiation, biodégradation, microorganismes, réhabilitation.

Semboung Lang Firmin (2016). Remediation of mangrove sediments of estuary Wouri: evaluation of potential of microbiota. PhD thesis. Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech (Belgique). 163 p., 10 tables, 35 figures.

Abstract:

The importance of mangrove ecosystems is well established in the natural balance of the tropical coasts. They are a particular ecosystem and play an important role in the production of biomass. However, an excessive logging of mangroves and various pollution sources (oil, gas, etc.) are all factors that contribute to the degradation of mangrove forests. Thus, between 1980 and 2000, about 35% of the world's mangrove area has disappeared. Pollution has led to a considerable degradation of mangroves. A growing amount of waste resulting from urban, industrial and agricultural activities and from the exploitation of oil and gas at sea is discharged without any treatment process into the sea and is accumulated at the mangrove level. Accidental oil spills at sea cause severe pollution in mangroves and marine pollution from ships is a threat that tends to increase with the development of oil exploitation. The objective of this thesis was to develop a biological depollution method applicable to the sediments of mangroves polluted by hydrocarbons. More specifically, it aimed to evaluate the intrinsic capabilities of degradation of an endogenous specific microflora, to compare the degradation potential of this microflora to other pure strains known to be able to degrade hydrocarbons and finally to evaluate different biodegradation techniques adapted to the removal of hydrocarbons in mangrove sediments. Appropriate biological processes have been implemented in this work to restore mangrove ecosystems. Different techniques of biological treatments involving the endogenous specific microflora have been implemented. The evaluation of the degradation potential of this microflora was compared to the one obtained with three exogenous pure strains. The results showed that the degradation potential of the specific microflora is comparable to that of *Rhodococcus erythropolis* when increasing its concentration in sediments (10^7 CFU.g⁻¹ dry matter). The growth of this microflora was accelerated with the presence of nutrients (nitrogen and phosphorus). This further increased the rate of hydrocarbon degradation. The degradation rate (86%) obtained by combining treatments by bioaugmentation of the specific endogenous microflora and biostimulation led us to propose this method for decontaminating mangrove sediments. The use of the endogenous specific microflora avoids working with exogenous strains that cause ecological and ethical problems.

Key words: Mangroves, bioremediation, biodegradation, microorganisms, rehabilitation

DEDICACE

A mon papa, feu ACHEMETYAE Etienne Marcel

A ma maman BANGDANG Julienne

Remerciements

Au terme de ce travail de recherche, je voudrais remercier sincèrement toutes les personnes qui ont contribué à le rendre possible. Je remercie tout d'abord le jury particulièrement le Professeur Marie-Laure Fauconnier, présidente du jury, qui a bien voulu malgré son programme très chargé, trouver un temps pour présider ce jury. Dans le même ordre d'idée, je remercie tous les membres du jury pour leur disponibilité à faire partir de ce jury.

Je remercie mes promoteurs pour avoir accepté de diriger cette thèse. Monsieur le Professeur Philippe THONART, pour m'avoir accepté au sein de l'unité Bio-industries. Il a su donner au début de ce travail une orientation aux recherches dont les résultats ont abouti à ce document. Il fallait faire de la cellule l'élément central pour venir à bout de la pollution par les hydrocarbures. Je garde de vous cette citation « De la cellule au produit fini ». Madame le Professeur Jacqueline DESTAIN, tous les mots du monde ne sauraient exprimer toute mon admiration et ma reconnaissance à votre égard. C'est grâce à vous que j'ai appris la liberté du chercheur et la considération des détails sans lesquels on aurait pu parler de l'originalité dans ce travail. Votre implication personnelle à travers les conseils, les critiques sans jamais se lasser de corriger plusieurs fois et de fond en comble chaque manuscrit. La rigueur sur la qualité et la présentation des résultats a été capitale dans l'atteinte des objectifs fixés. Vous avez contribué à me faire entrer dans ce domaine très restreint de la recherche. En tout honnêteté, votre bic rouge va beaucoup me manquer. Monsieur le Professeur Marc ONGENA, vous avez accepté de codiriger ce travail malgré votre charge déjà très importante. Je vous en suis infiniment reconnaissant.

Je tiens à remercier également tout le staff de l'unité MiPi (Microbial Process and Interaction) Messieurs les Professeurs Philippe JACQUES, Frédéric FICKERS et Frank DELVIGNE pour m'avoir supporté durant toutes ces années au sein de l'unité.

Je voudrais également remercier ici tout le personnel du laboratoire MiPI, particulièrement Martine ALLEGAERT, Annick SALVE, Cathy HELMUS, Samuel TELEK, Benoît MASSAUX, Olivia DENIES, Aurelien LEGRAS, Thibault LEGROS, Danielle DUBALLET et le personnel administratif Mesdames Marina CHANET et Marguerite DEMI pour leur disponibilité. Leur expérience m'a servi à plus d'un titre.

Je tiens à remercier tous mes collègues Cédric Tarayré, Romain Kinet, Marie Vandermies, Serge Kouhondé, Parent Zihahirwa, Jean Noël Mputu, Michel Mussoni, Hosni Sassi, Mounir Majid, Tahiri Abdelghani, Anissa Delepierre, Tamara Pilawski, Patricio Walter, Antoine Vassaux, Jonathan Baert, Sébastien Gofflot, Wafae Ettahiri avec qui j'ai passé de très bons moments dans nos différents laboratoires et dans les bureaux.

Je vais adresser un merci particulier au personnel de la bibliothèque, Mesdames Stéphanie DAVISTER, Anne WILLOCQ et Sarah TRAÜTES, Messieurs Bernard POCHE, Jacques MIGNON et Robert De GROOF, pour leur sympathie à mon égard et pour avoir mis à ma disposition de la documentation et un ordinateur comme matériel de travail.

Ce travail a également été rendu possible grâce au soutien de ma famille spirituelle dans le Seigneur Jésus Christ. Je tiens à remercier l'Apôtre le Dr. Daouda Kouadio et son épouse pour leur marque d'affection et leur prière à mon égard. Je remercie également toute la communauté, les sœurs et les frères de l'église MGN (Ministère pour la Guérison des Nations) à Namur, pour leur implication et leur soutien dans les prières. Veuillez trouver en ce travail toute ma reconnaissance et ma gratitude. Que Dieu vous le rende au centuple et vous bénisse abondamment.

Je remercie sincèrement Aline Umuhoza, et les enfants Thierry, Lewis et Grâce pour tout leur soutien, leur affection et leur attention.

Je remercie également toute ma famille restée au Cameroun. J'ai pu apprécier durant ces longues années passé loin de vous, combien vous m'avez manqué. Je vous remercie pour votre patience, votre soutien et toutes vos prières à mon égard.

Je ne saurai terminer sans dire toute ma reconnaissance envers MISEREOR, particulièrement à Vincent Neussl et à Ulrike Bikel et à la FOCARFE particulièrement M. Ndoumbé Nkotto qui était à la base de mon départ du Cameroun à travers une bourse d'étude pour le Master Complémentaire en Génie Sanitaire. Je vous remercie sincèrement.

Abréviations et acronymes

FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations
OIBT	: Organisation Internationale des Bois tropicaux
ITOFF	: International Tanker Owners Pollution Federation Limited
IPIECA	: International Petroleum Industry Environmental Conservation Association
DDT	: Dichlorodiphényltrichloroéthane
PCB	: Polychlorobiphényles
HAP	: Hydrocarbures aromatiques polycycliques
PAHs	: Polycyclic aromatic hydrocarbons
CO ₂	: Gaz carbonique
O ₂	: Oxygène
US-EPA	: United States Environmental Protection Agency
CFU	: colony-forming unit
C/N/P	: Rapport carbone-azote-phosphore
CRA-W	: Centre wallon de recherches agronomiques
P	: Phosphore
K	: Potassium
N	: Azote
C	: Carbone
ADN	: Acide désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
ATP	: Adénosine triphosphate
S	: Soufre
POM	: Particulate Organic Matter
DOM	: Dissolved Organic Matter
DIN	: Dissolved Inorganic Nitrogen
DIP	: Dissolved Inorganic Phosphorus
DBO	: Demande Biochimique en Oxygène
C/N	: Rapport carbone-azote
C/P	: Rapport carbone-phosphore
MSM	: Mineral saline medium
pH	: Potentiel d'hydrogène
T°C	: Température
Ppm	: Partie par million
HCl	: Acide Chlorhydrique
NaOH	: Soude
TPH	: Total Petroleum Hydrocarbons

CFDA : Carboxyfluoresceindiacetate
PI : Propidium Iodide
PBS : Phosphate buffered saline
GC : Gas Chromatography
HPLC : High performance liquide chromatography
DNA : Deoxyribonucleic acid
FSC : Forward scatter
FL3 : Red fluorescens
Ant : Anthracène
Phe : Phénanthrène
Flt : Fluoranthène
Pyr : Pyrène
ANOVA : Analyse of variance

Production scientifique

Semboung Lang Firmin (2016). Remediation of mangrove sediments of estuary Wouri: evaluation of potential of microbiota. PhD Thesis. Université de Liège, Gembloux Agro-Bio Tech (Belgique). 163p., 10 tables, 35 figures.

Semboung Lang F., Destain J., Campanella B., Delvigne F., Druart P., Thonart P., (2014). Overview of current knowledge management of pollution by oil mangroves. *Biotechnology Agronomy Society Environment* **18**(3), 422-435.

Semboung Lang F., Destain J., Delvigne F., Druart P., Ongena M., Thonart P., (2016). Microorganisms in maintaining balance and rehabilitation of polluted mangrove ecosystem by oil. A review. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, **10**(5): 2268-2284.

Semboung Lang F., Destain J., Delvigne F., Druart P., Ongena M., Thonart P., (2016). Characterization and evaluation of the potential of a diesel-degrading bacterial consortium isolated from fresh mangrove sediment. *Water Air and Soil Pollution*, 227:58. DOI 10.1007/s11270-016-2749-7

Semboung Lang F., Destain J., Delvigne F., Druart P., Ongena M., Thonart P., (2016). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments under different strategies: natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation with *Rhodococcus erythropolis* T 902.1. *Water Air and Soil Pollution*, 227: 297. DOI 10.1007/s11270-016-2999-4

Semboung Lang F., Destain J., Delvigne F., Druart P., Ongena M., Thonart P., (2016). The effect of nutrients on the degradation of hydrocarbons in mangrove ecosystems. Accepted for publication in *International Journal for Environmental Research*.

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE.....	8
CHAPITRE I : APERÇU DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA GESTION DE LA POLLUTION DES MANGROVES PAR LES HYDROCARBURES.....	13
I.1 Les mangroves dans le monde et leur importance	14
I.2 Quelques polluants présents dans les zones de mangroves	17
I.2.1 Les hydrocarbures pétroliers	17
I.2.2 Techniques de traitement des sols pollués par les hydrocarbures	19
I.2.3 Cas particulier de la rhizosphère des mangroves	21
I.3 Mécanisme de dégradation des hydrocarbures par les bactéries.....	22
I.3.1 Voies de dégradation des alcanes et des HAP.....	22
I.3.2 Revue de différentes études de gestion de la pollution des mangroves	24
I.4 Facteurs accélérant la biodégradation dans les mangroves	27
I.5 Conclusion	29
CHAPITRE II : LES MICROORGANISMES DANS LE MAINTIEN DE L'EQUILIBRE ET LA REHABILITATION DES ECOSYSTEMES DE MANGROVE POLLUES PAR LES HYDROCARBURES. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	35
II.1 Introduction.....	36
II.2 Transformation de la matière organique par les microorganismes	37
II.3 Transformation des nutriments par les microorganismes dans un écosystème de mangrove.....	38
II.4 Rôle des microorganismes dans l'équilibre et la survie de la production des écosystèmes de mangroves	39
II.4.1 La fixation de l'azote dans les écosystèmes des mangroves.....	39
II.4.2 La solubilisation du phosphate par les bactéries.....	40
II.4.3 Les bactéries sulfato-réductrices.....	41
II.4.4 Les bactéries photosynthétiques anoxygéniques	41
II.4.5 Les bactéries méthanogènes.....	42
II.4.6 Les champignons	42
II.5 Impacts de la pollution pétrolière sur un écosystème de mangrove	43
II.6 Influence des éléments nutritifs sur la biodégradation des hydrocarbures	44
II.7 Les nutriments dans les écosystèmes de mangroves.....	44
II.8 Apport des nutriments dans le processus de biodégradation des hydrocarbures	48
II.9 Conclusion	50
CHAPITRE III : OBJECTIFS ET CADRE CONCEPTUEL DE RECHERCHE.....	58
III.1 Objectifs de recherche	58

III.2 Stratégie de recherche	58
CHAPITRE IV: CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE POTENTIAL OF A DIESEL-DEGRADING BACTERIAL CONSORTIUM ISOLATED FROM FRESH MANGROVE SEDIMENT	61
IV.1 Introduction	62
IV.2 Materials and Methods	63
IV.2.1 Soil and Diesel	63
IV.2.2 Development of the Consortium Bacterial Starter	64
IV.2.3 Biodegradation Experiments	65
IV.2.4 Cytometric Assays.....	67
IV.2.5 Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) Analysis and Rate of Diesel Reduction	68
IV.2.6 Quality Control and Statistical Analyses.....	69
IV.3 Results and Discussion.....	69
IV.3.1 Sediment Characteristics	69
IV.3.2 Counting of Bacteria in Sediment	70
IV.3.3 Consortium Production in Bioreactor.....	71
IV.3.4 Biodegradation of Diesel in Mangrove Sediment by Bacterial Consortium in Flasks.....	72
IV.3.5 Percentage of Diesel Degradation and Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) in a Greenhouse.....	74
IV.3.6 Characterization of the Consortium by Flow Cytometry in Flasks Experiment	82
IV.4 Conclusion.....	85
CHAPITRE V: BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN MANGROVE SEDIMENTS UNDER DIFFERENT STRATEGIES: NATURAL ATTENUATION, BIOSTIMULATION AND BIOAUGMENTATION WITH <i>RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS</i> T902.1	92
V.1 Introduction	93
V.2 Materials and Methods	94
V.2.1 Mangrove Sediments and PAH Analysis of Sediments	94
V.2.2 Microorganisms	94
V.2.3 Polycyclic Aromatics Hydrocarbons	95
V.2.4 Biodegradation Studies.....	95
V.2.5 Enumeration of Total Aerobic Heterotrophs and PAH-Degrading Bacteria.....	96
V.2.6 Statistical Analysis	97
V.3 Results	97
V.3.1 Experiments with Sterilized Mangrove Sediments and Exogenous Rhodococcus.....	97
V.3.2 Degradation of Mixed PAHs Under Two Strategies in Sterile Sediments	99
V.3.3 Experiments with mangrove sediments with or without exogenous Rhodococcus.....	100
V.4 Discussion.....	106

V.5. Conclusion.....	110
CHAPITRE VI: THE EFFECT OF NUTRIENTS ON THE DEGRADATION OF HYDROCARBONS IN MANGROVE ECOSYSTEMS BY MICROORGANISMS.....	118
VI.1 Introduction.....	119
VI.2 Materials and methods	120
VI.2.1 Sea water, mineral salt medium (MSM) and diesel	120
VI.2.2 Consortium bacterial starter	120
VI.2.3 Biodegradation experiments.....	120
VI.2.4 Ammonium and phosphate assays	121
VI.2.5 Cytometric assays.....	121
VI.2.6 Total petroleum hydrocarbon (TPH) analysis and rate of diesel degradation.....	121
VI.2.7 Metabolic characterization by Biolog ECO microplates®.....	122
VI.2.8 Quality Control and Statistical Analyses.....	122
VI.3 Results and Discussion.....	122
VI.3.1 Evolution du pH	122
VI.3.2 Evolution of consortia in the flasks	123
VI.3.3 Assessment of consortium evolution by flow cytometry	124
VI.3.4 Biodegradation of diesel in mangrove sediment by bacterial consortium in flasks	127
VI.3.5 Metabolic assessment of the bacterial consortium	129
VI.4 Conclusion.....	131
CHAPITRE VII : DISCUSSION GENERALE	137
VII.1 La biodégradation et la bioremédiation	137
VII.2 La microflore spécifique isolée sous forme de consortium bactérien.....	137
VII.3 La microflore spécifique dans le processus de biodégradation des hydrocarbures.....	138
VII.3.1 La microflore spécifique dans le traitement par atténuation naturelle	138
VII.3.2 La microflore spécifique dans le traitement par biostimulation.....	139
VII.3.3 La microflore spécifique dans le traitement par bioaugmentation.....	141
VII.3.4 La microflore spécifique dans le traitement combinant bioaugmentation et biostimulation	141
VII.4 Les effets des hydrocarbures sur la microflore spécifique : Analyse par cytométrie en flux	142
VII.5 Mise au point d'une technique de réhabilitation d'un écosystème de mangroves	143
VII.5.1 Connaissances du milieu.....	143
VII.5.2 Cas pratique de dégradation des sédiments pollués dans un écosystème de mangrove..	146
VII.5.3 Intérêt de cette méthode	146
VII.5.4 Application pratique.....	147
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	153

Liste des tableaux

Tableau I.1: Composition of petroleum products	18
Tableau I.2: Bioremediation treatment technologies	20
Tableau IV.1: Physicochemical properties of Wouri mangroves sediments	70
Tableau IV.2: Production of consortium in bioreactor	72
Tableau IV.3: Masse balance of diesel, amount remained (ppm) and percentages of total hydrocarbons (input) in sterile control sediments after 5 weeks	81
Tableau V.1: Mass balance of PAHs amount remained (ppm) and percentages in each fraction to total PAHs added (input) in nonsterile sediments after 5 weeks of degradation	105
Tableau VI.1: Heat map of similarity rates calculated on the basis of the metabolism of C and N sources by the bacterial consortium	131
Tableau VII.1: The numbers of total bacteria and PAH-degrading bacteria in some mangrove sediments	138
Tableau VII.2 : Quantités de nutriments nécessaires pour assurer une bonne dégradation des hydrocarbures	140
Tableau VII.3 : Comparaison des résultats (exprimés en pourcentages de diesel dégradé) des différents traitements de bioremédiation impliquant le consortium endogène et d'autres souches pures exogènes	142

Liste des figures

Figure I.1: Evolution des superficies des mangroves de certains pays en Afrique de 1980 à 2005 – Evolution of the area of mangroves in some countries in Africa from 1980 to 2005 (FAO, 2007)	15
Figure I.2: HAP cancérigènes (1, 2 et 3) et potentiellement cancérigènes (4, 5 et 6) pour l'homme – Carcinogenic PAHs (1,2 and 3) and potentially carcinogenic (4,5 and 6) for humans	19
Figure I.3: Voie de dégradation des alcanes par les bactéries (Müller, 1992) – Pathway for the bacterial degradation of alkanes (Müller, 1992)	22
Figure I.4: Proposed fluorene degradation pathways by the mangrove enriched bacterial consortium. Solid arrow indicates a single reaction while broken arrow represents two or more transformation steps. The compound with the asterisk symbol denotes it is a novel metabolite (Luan et al., 2006) ...	23
Figure I.5: Proposed phenanthrene degradation pathways by the mangrove enriched bacterial consortium. Solid arrow indicates a single reaction while broken arrow represents two or more transformation steps. The compound with the asterisk symbol denotes it is a novel metabolite	24
Figure I.6: Proposed pyrene degradation pathways by the mangrove enriched bacterial consortium. Solid arrow indicates a single reaction while broken arrow represents two or more transformation steps. The compound with the asterisk symbol denotes it is a novel metabolite	24
Figure II.1: Modèle conceptuel des principaux flux de carbone induits par des bactéries hétérotrophes dans un écosystème de mangroves. POM, DOM: particulate and dissolved organic matter; DIN, DIP: Dissolved Inorganic Nitrogen and Phosphorus (Bano et al., 1997)	46
Figure II.2: Modèle conceptuel des interactions microbiennes dans un écosystème de mangrove (Holguin et al., 2001). Conceptual model of microbial interactions in a mangrove ecosystem (Holguin et al., 2001)	47
Figure III.1: Cadre conceptuel de recherche	59
Figure IV.1: Biodegradation experiment in flasks	66
Figure IV.2: Biodegradation experiment in greenhouse	67
Figure IV.3: Total microflora and active microflora in the mangrove sediment	71
Figure IV.4: Percentage of diesel degradation in mangrove sterile sediments using bacterial consortium	73
Figure IV.5: Percentage of diesel degradation in mangrove non-sterile sediments using bacterial consortium	73
Figure IV.6: Percentage of diesel degradation by consortium in a sterile mangroves sediments	74
Figure IV.7: Percentage of degradation of diesel by consortium using natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation methods	76
Figure IV.8: Percentage of degradation of diesel by endogenous bacterial using natural attenuation and biostimulation methods	77
Figure IV.9: Percentage of biodegradation of diesel using natural attenuation and bioaugmentation methods	77

Figure IV.10: Percentage of diesel degradation using two methods combined biostimulation and bioaugmentation	79
Figure IV.11: Cytograms presenting evolution of microorganisms in mangrove sterile sediment over 21 days (A = Sterile sediments + Consortium; B = Sterile sediments + Consortium + Nutrient solution)	83
Figure IV.12: Cytograms presenting evolution of microorganisms in mangrove non-sterile sediments	84
Figure V.1: Evolution of pH in mangrove sterile sediments after 5 weeks under two strategies	97
Figure V.2: Evolution of microorganisms in mangrove sterile sediments after 5 weeks according to two strategies (presence or absence of nutrients)	98
Figure V.3: Biodegradation percentage of anthracene (Ant), phenanthrene (Phe), pyrene (Pyr), and fluoranthene (Flt) in mangrove sterile sediments during 5 weeks	100
Figure V.4: Evolution of pH in mangrove nonsterile sediments under different strategies	101
Figure V.5: Evolution of microorganisms in mangrove nonsterile sediments over 5 weeks under different strategies	102
Figure V.6: Biodegradation rate of anthracene (Ant), phenanthrene (Phe), pyrene (Pyr), and fluoranthene (Flt) in mangrove nonsterile sediments during 5 weeks degradation according to different strategies	103
Figure VI.1: Evolution of pH during the degradation of hydrocarbons	123
Figure VI.2: Evolution of cells counted by flow cytometry during the biodegradation of hydrocarbons	124
Figure VI.3: Percentage of microorganisms that does not color the PI	125
Figure VI.4: Cytograms with the consortium's behavior into the flasks	127
Figure VI.5: Pourcentage de dégradation du diesel dans les différentes fioles	128
Figure VI.6: First (Z1) and second (Z2) principal components calculated on the basis of the metabolism of C and N sources by the bacterial consortium	130
Figure VII.1: Rôle spécifique de la microflore bactérienne dans le développement des mangroves	145
Figure 2 : Application d'un procédé de bioremédiation <i>in situ</i> dans un écosystème de mangroves polluées par les hydrocarbures	147

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les mangroves sont des écosystèmes intertidaux boisés qui occupent des milieux côtiers tropicaux abrités et riches en sédiments. Entre deux tiers et trois quarts environ des littoraux tropicaux sont bordés de mangroves. D'une manière générale, les mangroves sont constituées d'arbres et d'arbustes qui poussent en dessous du niveau des plus hautes marées. Les systèmes racinaires sont de ce fait régulièrement inondés d'eau saline, parfois diluée par les ruissellements d'eau douce de surface. Les marées nourrissent donc la forêt des mangroves, tandis que les sédiments, charriés par les fleuves et chargés en minéraux, l'enrichissent et servent d'ancrage aux palétuviers. Ainsi, les mangroves doivent leur forme et leur nature à des influences aussi bien marines que terrestres (FAO, 1980).

Les palétuviers, globalement composés par les genres *Avicennia* et *Rhizophoreae* sont présents dans toutes les mangroves du monde (à quelques rares exceptions près) où ils représentent les espèces végétales dominantes. Ces arbres présentent des adaptations particulières à la survie en milieu salé (pneumatophores pour l'oxygénation des systèmes racinaires et compensation de l'augmentation de pression osmotique intracellulaire, etc.). Contrairement à la plupart des végétaux terrestres, les palétuviers sont vivipares et présentent une dissémination des plantules par voie d'eau.

Les mangroves renferment une faune sauvage très diversifiée : reptiles, amphibiens, mammifères, poissons, mollusques, crustacés, oiseaux, insectes, etc. Celle-ci leur sert d'abri, de zone de reproduction et/ou de source de nourrissage. Toutefois, les mangroves abritent un nombre relativement important d'espèces qui leur sont propres, par suite d'adaptations nécessaires à leur subsistance dans ce milieu particulier. En outre, les dernières populations de certaines espèces très menacées ne sont plus présentes que dans cet écosystème, qui leur offre un abri difficilement accessible aux prédateurs.

La disparition des mangroves suscite de graves préoccupations au niveau mondial et particulièrement pour de nombreux pays en développement, tant au plan environnemental qu'économique. En effet, constituant l'interface entre la mer et la terre, les mangroves jouent un rôle fondamental dans la modération des crues des moussons et la protection des côtes. Dans le même temps, leur production primaire fait vivre de nombreuses espèces d'animaux et oiseaux sauvages et alimente des pêcheries estuariennes et côtières. La dégradation et l'épuisement continus des mangroves auront pour effets de réduire les productions terrestre et aquatique ainsi que les habitats de la faune et de la flore sauvage. La stabilité écologique des forêts côtières, qui fournissent une protection aux cultures agricoles et aux villages de l'intérieur des terres, sera également gravement compromise, ce qui est encore plus inquiétant.

Les rôles écologiques de la mangrove sont multiples et agissent à différents niveaux, qu'ils soient physiques, chimiques ou biologiques. Les fonctions des mangroves relevées dans le rapport de la FAO (2007) illustrent cette diversité : protection des côtes contre les vagues et l'érosion due au

vent; modération des effets des tempêtes et des cyclones côtiers ; piégeage des sédiments ruisselant des hautes terres, la protection des récifs côtiers et contrôle de la turbidité de l'eau; effet de réservoir à nutriments et réduction des quantités excessives de polluants ; enfin, abri et habitat d'une faune diversifiée, notamment l'avifaune.

Cependant, les mangroves sont largement perçues à travers le monde comme des dépotoirs. Elles sont réputées pour être des nids à moustiques propageant de nombreuses maladies, dont le paludisme. L'intérêt de protéger les mangroves fait suite à une série d'études menées où il est apparu que les mangroves sont des écosystèmes marginaux et vulnérables, qui non seulement abritent une faune et une flore à fort intérêt patrimonial avec de nombreuses espèces endémiques ou très menacées, mais qui offrent également de très importantes ressources cruciales pour des millions de gens.

D'un point de vue socio-économique, Les mangroves offrent aussi des opportunités en matière d'enseignement, de recherche scientifique, de loisirs et d'écotourisme. Suite à ces études il est possible de réaliser davantage la valeur des ressources et des services que les mangroves fournissent. Ces études montrent qu'à l'échelle mondiale, la plupart des bénéfices tirés des mangroves résultent de la pêche, de l'exploitation du bois pour la construction et le chauffage, du tourisme et de la protection du littoral.

Les mangroves, qui sont les plus productifs des écosystèmes terrestres en terme de biomasse, sont aussi des ressources naturelles renouvelables menacées de toutes parts. Les équilibres écologiques et physiques qui ont permis l'installation des mangroves sont modifiés et les mangroves peuvent être détruites par des travaux réalisés parfois très loin sur les bassins versants (modifications hydrauliques : construction de barrages, détournement de rivières, développement de l'agriculture et de l'aquaculture dans la zone intertidale, flux de pollution, remblais, etc.). D'importantes surfaces sont transformées en rizières, aménagées pour l'aquaculture, d'autres enfin sont consacrées à l'établissement d'industries et à diverses utilisations autres que la production de bois.

D'un point de vue général, les sources de dégradations des mangroves proviennent d'abord d'une pression démographique grandissante sur la zone côtière. 90 % des mangroves étant situées dans des pays pauvres ou émergents (Din & Blasco, 2003), cette pression démographique est accompagnée de pauvreté, de « développement » rapide et d'un manque de gestion appropriée. Dans beaucoup d'endroits, l'importance des mangroves n'est pas prise en compte et n'est même pas reliée aux biens et services divers qu'elles procurent.

Les pollutions agricoles, industrielles et urbaines caractérisées par le rejet de déchets solides, de composés chimiques toxiques, de polluants persistants, les hydrocarbures, de nutriments, altèrent les communautés de mangroves. Ces substances peuvent provenir d'une ou plusieurs sources, comme l'industrie, les égouts domestiques, les forages, les effluents des bassins, et les rejets agricoles et urbains. Leurs effets vont de la destruction complète au dysfonctionnement des écosystèmes. Ils aboutiront à l'empoisonnement chronique des palétuviers et de la faune associée et à la perte de la biodiversité et de la productivité de l'écosystème.

Dans certains cas, le flux de la marée et les processus biologiques des composants de la mangrove pourront avoir la capacité d'assimiler et de transformer les polluants, agissant ainsi en filtre naturel. Pourtant, les limites auxquelles la toxicité devient dommageable ne sont pas connues.

Les produits pétroliers présents dans les écosystèmes de mangroves constituent une des causes du dépérissement des mangroves. L'origine de ces produits pétroliers est anthropique. Ils proviennent des opérations d'exploration et d'exploitation des hydrocarbures, les déversements accidentels d'hydrocarbures dus au chargement des navires dans les plateformes pétrolières, au transport par pipelines et au nettoyage des cuves des navires en haute mer. Les effluents liquides non traités issus des raffineries pétrolières et des zones urbaines entraînent avec eux des hydrocarbures dans les mangroves situées à proximité. La pollution est également causée par les nappes de pétrole issues du naufrage de navires au large des côtes.

Bien que l'impact varie selon la nature des hydrocarbures, le type d'exposition et les espèces exposées, les palétuviers par leur emplacement ainsi que la faune qu'ils abritent sont extrêmement vulnérables et sensibles à la contamination par les hydrocarbures dans les eaux côtières. Le recouvrement des systèmes racinaires aériens par des hydrocarbures peut bloquer l'arrivée d'oxygène et causer leur mort. Les composants toxiques des hydrocarbures, notamment des produits raffinés légers, perturbent les systèmes de régulation de la salinité des végétaux, affectant ainsi leur tolérance à l'eau salée. Les organismes qui vivent dans les mangroves peuvent subir à la fois les effets directs des hydrocarbures et indirects avec la perte de leur habitat.

Si le rétablissement naturel de l'écosystème complexe des mangroves peut demander beaucoup de temps, diverses mesures de réhabilitation offrent un réel potentiel d'accélération. Différentes techniques permettent de traiter les sites pollués par les hydrocarbures. Si les procédés physico-chimiques offrent des options rapides pour le traitement de certains sites pollués, les procédés biologiques dont la biodégradation apparaissent plus adaptés aux écosystèmes de mangroves de par leur complexité. La dégradation par voie biologique *in situ* permet d'éliminer ou de réduire les hydrocarbures présents dans les zones de mangroves. Ces procédés biologiques offrent en plus l'avantage d'être moins coûteux que les procédés physico-chimiques.

Pour mettre en œuvre une méthode de dépollution par voie biologique des écosystèmes de mangroves en vue de leur réhabilitation, quatre stratégies ont été étudiées. Ces stratégies constituent les axes majeurs ou chapitres de cette thèse.

La première partie qui renvoie à la bibliographie comporte deux chapitres, met en exergue la problématique de la pollution des écosystèmes de mangroves dans le monde, les expériences réalisées pour dégrader les hydrocarbures et les résultats obtenus.

La deuxième partie essentiellement expérimentale comporte trois chapitres où des essais sont mis en place en laboratoire et en serre et dont l'objectif est d'utiliser les capacités dégradatives des microorganismes pour éliminer les hydrocarbures contenus d'une part dans les sédiments de mangroves et d'autre part dans l'eau de mer artificielle.

Dans le premier chapitre expérimental (voir chapitre 3), tenant compte des informations obtenues dans la bibliographie, nous avons isolé des microorganismes d'intérêts c'est-à-dire une microflore apte à dégrader les hydrocarbures. Cette microflore endogène sous forme de consortium a été caractérisée en fioles dans les sédiments stériles et non stériles pour évaluer son aptitude à métaboliser le diesel. Des essais en serre ont ensuite été réalisés dans les microcosmes contenant des sédiments de mangroves pollués de façon artificielle. Nous avons utilisé dans ce cas en plus du consortium, trois souches bactériennes connues pour leur aptitude à métaboliser les hydrocarbures. L'objectif ici était de comparer le taux de dégradation du diesel du consortium à ceux de trois autres souches dont *Rhodococcus erythropolis*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas fluorescens*. Au cours de cette expérience, des techniques de dépollution comme l'atténuation naturelle, la biostimulation, la bioaugmentation ou encore la combinaison de biostimulation et bioaugmentation ont été mises en exergue. Nous avons également par la technique de la cytométrie en flux observé le comportement du consortium soumis au stress du diesel en fonction du temps d'application de ces différentes techniques. Les résultats obtenus au cours de cette expérience, nous ont permis à poursuivre les essais avec le consortium isolé de nos sédiments de mangrove et une souche exogène pure *Rhodococcus erythropolis*.

Dans le deuxième chapitre expérimental (voir chapitre 4), l'étude a été réalisée en fioles. Au cours de cette expérience, nous avons soumis le consortium et *Rhodococcus erythropolis* à la dégradation d'hydrocarbures beaucoup plus lourds comportant au moins 2 noyaux benzéniques. Dans cette expérience, des techniques portant sur l'atténuation naturelle, la biostimulation, la bioaugmentation ou encore la combinaison de biostimulation et bioaugmentation ont été mises en exergue.

Le troisième chapitre expérimental (voir chapitre 5), ressort la problématique des facteurs limitants de la biodégradation. Le pH et la température étant contrôlés dans les deux premières expériences, l'intérêt de l'ajout de nutriments tels que l'azote et le phosphore à travers une solution nutritive a été mis en évidence.

Ce travail s'achève par une discussion générale et des perspectives visant à parfaire la biodégradation dans les écosystèmes des mangroves pollués.

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

La synthèse bibliographique comporte deux chapitres. Le premier chapitre donne un aperçu général des écosystèmes de mangroves et les différents problèmes qui entraînent leur dépérissement. Un accent particulier est mis sur la pollution des mangroves par les hydrocarbures et les différents traitements de biodégradation appliqués. Certaines expériences de biodégradation et les résultats obtenus au cours des recherches précédentes sont présentés. Cette synthèse permet de relever les insuffisances sur l'utilisation des microorganismes endogènes dans les processus de biodégradation. Le deuxième chapitre de synthèse décrit en détail le fonctionnement et le rôle des microorganismes des mangroves. Il montre la particularité de chaque espèce de microorganisme et met en exergue les liens qui existent entre ces microorganismes. Ce chapitre a permis de comprendre la relation d'interdépendance qui existe entre ces microorganismes et les mangroves.

CHAPITRE I : APERÇU DES CONNAISSANCES ACTUELLES SUR LA GESTION DE LA POLLUTION DES MANGROVES PAR LES HYDROCARBURES - OVERVIEW OF CURRENT KNOWLEDGE MANAGEMENT OF POLLUTION BY OIL MANGROVES

Firmin Semboung Lang ⁽¹⁾, Jacqueline Destain ⁽¹⁾, Bruno Campanella ⁽²⁾, Franck Delvigne ⁽¹⁾, Philippe Druart ⁽³⁾, Philippe Thonart ⁽¹⁾ (2014). Overview of current knowledge management of pollution by oil mangroves. *Biotechnology Agronomy Society Environment*, **18**(3), 422-435.

(1) Université de Liège - Gembloux Agro Bio-Tech. Centre Wallon de Biologie Industrielle. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique). E-mail : langsemb@yahoo.fr (2) Service Public Régional de Bruxelles. Cellule Site MRBC - Direction des Monuments et Sites. Région de Bruxelles. Boulevard du Jardin Botanique, 20. B-1035 Bruxelles (Belgique). (3) Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W). Chaussée de Namur, 24. B-5030 Gembloux (Belgique).

Résumé:

Les forêts de mangrove revêtent une importance capitale en termes de production de la biomasse et du maintien de l'équilibre naturel dans les zones côtières des régions tropicales. Cependant, les mangroves sont sujettes à une pollution causée par les activités anthropiques. La pollution par les hydrocarbures est l'une des causes qui entraînent le dépérissement de cette forêt qui ne représente que 1 % de la superficie de l'ensemble des forêts tropicales du monde. Plusieurs techniques de dépollution des zones contaminées par les hydrocarbures existent. La biodégradation semble être la mieux adaptée aux écosystèmes des mangroves, seulement cette technique reste confinée au niveau du laboratoire. Des essais *in situ* en milieu naturel, doivent être réalisés pour évaluer les résultats obtenus en laboratoire.

Mots clés: Mangroves, pollution, hydrocarbures, biodégradation.

Abstract:

Mangrove forests are vital in terms of biomass production and maintenance of the natural balance in coastal areas in the tropics. However, mangroves are subject to pollution from human activities. Oil pollution is one of the causes that lead to the decline of this forest, which represents only 1% of the area of all the world's tropical forests. Several remediation techniques of oil contaminated areas exist. Biodegradation appears to be best suited to mangrove ecosystems, however this technique remains confined to the laboratory. Field tests *in situ* must be conducted to evaluate the results obtained on laboratory.

Keywords: Mangroves, pollution, hydrocarbon, biodegradation.

I.1 Les mangroves dans le monde et leur importance

Les mangroves sont peuplées de plantes ligneuses que l'on retrouve à l'interface entre la mer et les terres dans les zones tropicales et sub-tropicales (Kathiresan et al., 2001). Ce sont des formations sempervirentes qui poussent en dessous du niveau de la mer et sont étroitement liées à la dynamique hydrique du milieu qui les caractérise (Dupuy et al., 1999). Les mangroves couvrent seulement 1% de la superficie de l'ensemble des forêts tropicales, 75% des côtes tropicales du monde (FAO, 2007). Les espèces végétales, peu nombreuses, sont sujettes à une immersion temporaire en milieu halophile. Les espèces ligneuses les plus importantes sont les palétuviers, du genre *Rhizophora* et *Avicennia* (Marius, 1977). Le genre *Rhizophora* se caractérise par des racines échasses qui s'allongent depuis la partie inférieure du tronc, d'abord horizontalement puis s'infléchissent vers la vase dans laquelle elles pénètrent. Elles forment un enracinement profond et dense de racelles fibreuses. Le genre *Avicennia* se caractérise par la présence de pneumatophores qui forment un véritable tapis autour des arbres et leurs feuilles sont toujours recouvertes d'une couche de sel. L'organe de dissémination ou de propagation est une propagule (viviparité) (Dupuy et al., 1999). Les limites latitudinales de cet écosystème sont établies avec la température (isotherme 24 °C) et l'aridité (Saenger, 1998). A l'échelle mondiale, les formations arborées de mangroves occupent une superficie estimée à 181.680 km². En Afrique, les mangroves sont principalement localisées sur la façade atlantique du continent (83 %), et représentent 18% des mangroves à l'échelle mondiale (Guiral et al., 1999). Ces plantes, les microorganismes associés (bactéries, champignons) et la faune, constituent ce qu'on appelle les "forêts de mangrove" ou "mangal". Le mangal et les facteurs abiotiques associés constituent l'écosystème de mangrove. Dans la littérature, pour éviter toute confusion, il a été proposé que "mangal" devrait se référer à la communauté forestière (Guiral et al., 1999) tandis que les "mangroves" doivent se référer aux espèces végétales uniquement (Kathiresan et al., 2001).

Des points de vue écologique, économique et social, l'importance des mangroves n'est plus à démontrer et leur dégradation rapide est devenue une préoccupation majeure. Sur le plan écologique, les mangroves sont en effet les écosystèmes les plus productifs de biomasse (Saenger, 2003), assurant le maintien d'une bonne qualité de l'eau en retenant les charges alluviales, en filtrant et en retenant les polluants. La litière est à la base d'un réseau trophique détritique complexe où intervient une succession d'organismes reliés par des relations de types syntrophiques (Guiral et al., 1999). Les mangroves constituent des stabilisateurs efficaces pour certaines zones côtières fragiles car elles contribuent à la résilience écologique des écosystèmes après les cyclones et les tsunamis (Saenger, 2003). Les mangroves sont à la base de la vie de plusieurs espèces halieutiques, fauniques et aviaires vivant dans ce milieu ou migratrices car elles constituent des habitats terrestres et marins qui sont des milieux de reproduction, de conservation et de développement de ces espèces (Tanaka et al., 2007).

Sur le plan social, la productivité des mangroves définit la survie d'un grand nombre de communautés locales et des populations riveraines qui y pratiquent plusieurs activités telles que l'agriculture, la chasse et la pêche. Elles s'en servent surtout dans la construction (toitures, décorations,

boîtes, pontons, ustensiles traditionnels de pêche, etc.) et pour la production de charbon. Les mangroves sont également pour ces populations une source de produits forestiers non ligneux tels que les tannins, etc. (FAO, 2007).

Sur le plan économique, les populations locales bénéficient aussi des retombées touristiques. Malgré leurs potentialités remarquables, les mangroves manquent de protection (Aijiki, 2000).

En 2007, la FAO a publié une étude mettant en exergue la diminution des surfaces des mangroves dans certains pays en Afrique et dans le monde. Au Cameroun par exemple, la superficie des mangroves est passée de 272 000 ha en 1980 à 250 000 ha en 2005, soit un taux de dépérissement de 8% (fig.1). Au cours de la même période, les mangroves du Gabon (de 218 500 ha à 150 000 ha), de la République Démocratique du Congo (63700 ha à 19500 ha), de la Guinée Bissau (276000 ha à 210000 ha), du Sénégal (16900 ha à 10000 ha), de la Sierra Léone (167700 ha à 100000 ha), de la Tanzanie (152000 ha à 125000 ha), etc., ont connu des taux de dépérissement importants. En Indonésie, 75% des grandes villes de plus de 100 000 habitants sont situées sur les zones côtières dont la majorité abritait des mangroves. En 1990, environ 269 000 ha de mangroves y ont été convertis à la pisciculture. Même dans de petits pays comme Fidji, les mangroves ont dû faire place à l'urbanisation à grande échelle. Aux Philippines, 169 852 ha de mangroves ont disparu entre 1967 et 1976. La forêt de mangrove de la Thaïlande est passée de 360 000 ha en 1960 à 174 000 ha en 1991 et celle de la Malaisie de 505 300 ha à 269 000 ha entre 1980 et 1990.

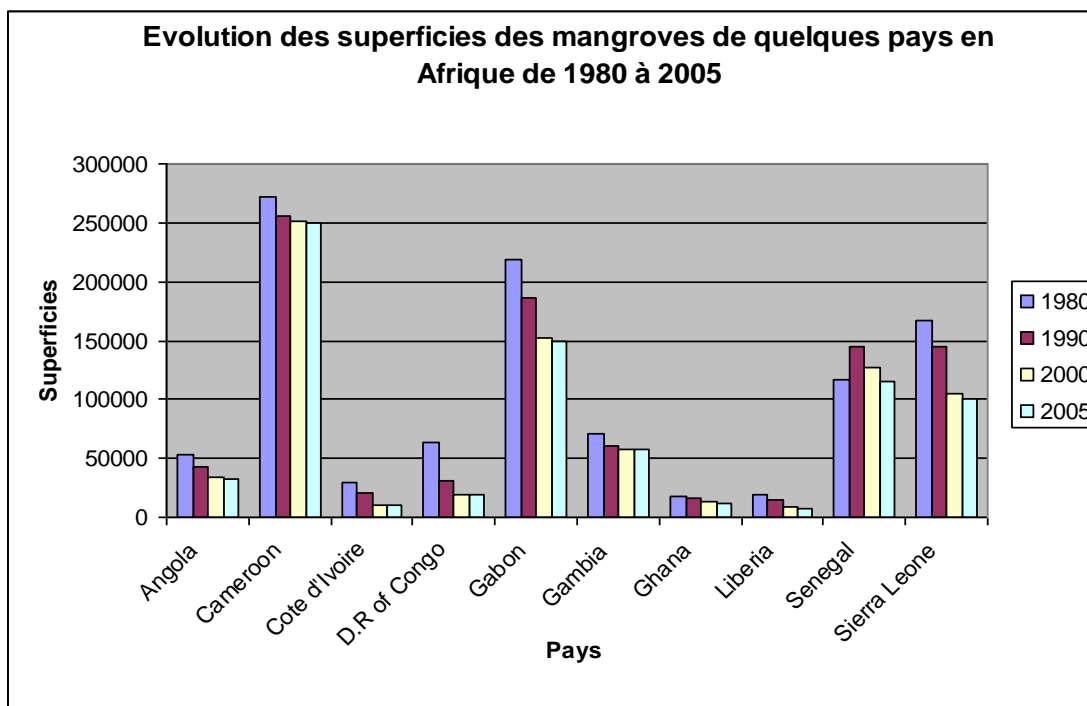


Figure 1: Evolution des superficies des mangroves de certains pays en Afrique de 1980 à 2005 – Evolution of the area of mangroves in some countries in Africa from 1980 to 2005 (FAO, 2007).

Entre les années 1980 et 2000, on a noté un dépérissement d'environ 35% de la superficie mondiale des mangroves (Valiela et al., 2001). Cette destruction a pour origine l'augmentation d'activités industrielles (aquaculture, barrages hydro-électriques, industries portuaire et pétrolière) et de l'urbanisation, elles-mêmes liées à une augmentation importante des populations vivant sur le littoral (FAO, 2007). Du fait de cette forte démographie, les mangroves sont sujettes à de fortes pressions qui ne sont pas que locales. Par exemple, la forte demande mondiale pour les crevettes entraîne l'installation de fermes aquacoles extensives en opposition avec une gestion à long terme du milieu côtier (Sathirathai et al., 2005). L'insuffisance des politiques et des législations (ou leur défaut d'application) contribue également à la destruction et la dégradation des mangroves (OIBT, 2002).

L'exploitation excessive du bois des palétuviers contribue aussi à la destruction des mangroves. Ces zones sont exposées aux pollutions engendrées par les rejets urbains de produits pétroliers, les émissions provenant de la combustion et des procédés industriels (Tam et al., 2008). L'exploration et l'exploitation pétrolière et gazière, les déversements accidentels d'hydrocarbures observés lors des opérations de chargement des tankers dans les plateformes pétrolières, le déballastage des cuves des navires qui s'effectue le plus souvent près des côtes continentales et le transport du brut au niveau des pipelines ont des incidences graves sur la flore et la faune des mangroves. Ces pollutions d'origines telluriques ou par lixiviation aboutissent toujours au niveau des mangroves. Les effets des hydrocarbures sur les mangroves, particulièrement sur les palétuviers, sont désastreux. Le rapport d'ITOPF (2013) indique que les déversements d'hydrocarbures peuvent avoir des répercussions sérieuses dans les zones intertidales des littoraux, tant par engluement physique particulièrement par les hydrocarbures et les produits pétroliers lourds (fiouls lourds, hydrocarbures très visqueux, etc.), que par toxicité s'il s'agit d'une pollution par les hydrocarbures et les produits pétroliers légers (essence, diesel, etc.). La sévérité de l'impact dépend généralement de la quantité et du type d'hydrocarbure déversé, des conditions ambiantes ainsi que de la sensibilité aux hydrocarbures des organismes touchés et de leurs habitats.

Les palétuviers dépendent généralement de l'apport de l'oxygène à travers les petits pores de leurs racines aériennes. Le recouvrement de ces pores par les hydrocarbures lourds avec la marée haute et les surfaces sédimentaires avec la marée sortante, bloque l'arrivée de l'oxygène et provoque la mort des palétuviers. Les hydrocarbures lourds et visqueux recouvrent les pneumatophores, étouffent les racines qui reçoivent normalement de l'oxygène par les pores aériens. Les composants toxiques des hydrocarbures, surtout les fractions aromatiques à faibles poids moléculaires, attaquent en profondeur les membranes cellulaires des racines. Ils perturbent les systèmes végétaux de régulation de la salinité et sont, ainsi, une source de stress pour eux. (IPIECA, 1993 ; ITOPF, 2013).

L'effet des hydrocarbures sur les palétuviers se voit avec l'assèchement et l'absence totale des feuilles sur les arbres des mangroves (IPIECA, 1993). D'autres pollutions concernent l'épandage excessif des engrais azotés et des pesticides non biodégradables dans les plantations agro-industrielles voisines des zones de mangroves.

La prise de conscience suite à la dégradation des mangroves s'est traduite d'une part à travers la convention de Ramsar (2002) qui a reconnu aux mangroves une valeur réelle sur le triple plan écologique, social et économique, d'autre part à travers une recherche scientifique visant à caractériser les facteurs de pollution et de dégradation des mangroves. Cette synthèse concerne la pollution des mangroves par les hydrocarbures et met en évidence les potentialités de biodégradation de ces polluants liées à cet écosystème.

I.2 Quelques polluants présents dans les zones de mangroves

Plusieurs types de polluants se retrouvent généralement dans les mangroves. Les éléments traces métalliques tels que le fer, le manganèse, le nickel, le cuivre, le cobalt, le zinc, le plomb, le cadmium et le chrome, les phosphates, les sulfates etc. sont présents dans les racines, les feuilles et dans les sédiments des mangroves. Macfarlane et al., 2003 ; Defew et al., 2005 ; Ray et al., 2006 ; Ramos e Silva et al., 2006 ont démontré que les activités anthropiques dans des zones côtières tropicales, sont responsables de la présence de fer, de zinc et plomb dans les sédiments de mangrove. Les polluants organiques tels que les hydrocarbures raffinés, les hydrocarbures chlorés (DDT, PCB), les phénols etc. sont également présents dans les sédiments des mangroves. Certains de ces polluants sont présents de façon naturelle et proviennent soit de la combustion de la matière organique soit de l'altération de la roche mère du sous-sol ; cependant, les concentrations les plus importantes dans les mangroves sont d'origine anthropique (Lemière et al., 2008). Les hydrocarbures pétroliers figurent parmi les principaux polluants rencontrés dans les écosystèmes de mangroves.

I.2.1 Les hydrocarbures pétroliers

Ce sont des produits pétroliers (pétrole brut, pétrole raffiné, kérosène, essences, fuel, lubrifiants, huiles à moteurs), regroupés sous le nom d'hydrocarbures. Ils comprennent principalement des hydrocarbures aliphatiques dont la caractéristique est la présence de chaînes linéaires ou ramifiées (Baker et al., 1994 B). Les produits pétroliers comprennent aussi parfois en proportion significative des hydrocarbures aliphatiques cycliques (cyclanes), des hydrocarbures aromatiques monocycliques (benzène, toluène, xylène, etc.), des hydrocarbures aromatiques polycycliques (anthracène, fluorène, naphthalène, pyrène, benzo(a)pyrène, etc.).

De manière générale, le comportement d'un produit pétrolier dans l'eau dépend du rapport de sa densité avec celle de l'eau. Les produits pétroliers non persistants sont moins denses que l'eau, ce qui les amène à flotter sur l'eau. Leur dégradation rapide est due au fait de leur exposition aux conditions météorologiques. Les hydrocarbures persistants plus denses, sont submergés par l'eau et le processus de dégradation est plus lent (Owens et al., 1998). Ces auteurs démontrent que les produits pétroliers non persistants comme le fuel, l'essence ou le diesel se dégradent habituellement facilement lorsqu'ils sont exposés à certaines conditions météorologiques tels que l'air et une température élevée. Pour une température comprise entre 0 et 5 °C, on note 5 à 20 % de diesel qui s'évapore en deux jours. Cette même quantité est observée en cinq jours pour des températures comprises entre -20 °C et 0 °C.

Les hydrocarbures persistants s'évaporent plus lentement. Lorsqu'il y a une émulsion qui se produit, le processus devient plus complexe du fait des propriétés physiques qui changent. Le tableau ci-dessous résume les principales composantes des différents produits pétroliers.

Tableau I: Composition de produits pétroliers – Composition of petroleum products.

Produits	Composants majeurs
Gaz	Alcanes normaux et ramifiés contenant 1 à 5 atomes de carbone.
Essence	Hydrocarbures normaux et ramifiés contenant 6 à 10 atomes de carbone. Les cycloalcanes et les alkylbenzènes sont également présents.
Kérosène / Diesel	Principalement les hydrocarbures contenant 11 à 12 atomes de carbone. Les hydrocarbures normaux et ramifiés sont présents. Les alcanes normaux sont en général prédominants. Les cycloalcanes, les aromatiques et les cycloalcanes aromatiques mixtes sont également présents. Contiennent généralement des niveaux faibles à indétectables d'hydrocarbures benzéniques et polyaromatiques. Les carburants pour réacteurs ont une composition similaire.
Gazoles légers	Hydrocarbures contenant 12 à 18 atomes de carbone. Comparés au kérosène, ils ont un faible pourcentage d'alcanes normaux. Les cycloalcanes, les aromatiques et les cycloalcanes aromatiques mixtes sont également présents. Contiennent les oléfines telles que les styrènes. Ces produits incluent le diesel et les huiles de moteurs.
Gazoles lourds et huiles lubrifiantes légères	Hydrocarbures contenant 18 à 25 atomes de carbone.
Lubrifiants	Hydrocarbures contenant 26 à 38 atomes de carbone.
Asphalthes	Composés lourds polycycliques.

Source: Nyer et al., 1989, adapté de Baker et al., 1994 B- Nyer and al., 1989, adapted from Baker and al., 1994 B.

Les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) sont des composés ubiquistes, fréquemment retrouvés dans l'environnement, entre autres issus de la combustion de la matière organique (Gabet, 2004). Les sources naturelles incluent les émissions liées aux feux de forêts, aux éruptions volcaniques, mais aussi aux réactions biogènes dans les plantes et les bactéries, ainsi que les réactions géologiques associées à la production de fuel fossile et minéral. Ces émissions concernent les sources diffuses.

Les sources anthropiques sont majoritaires. Elles sont, suivant les cas, diffuses ou ponctuelles. Elles regroupent aussi bien les processus de combustion de fuel fossile (automobiles, usines de production de coke, etc.) que les processus de transformation tels que la production et l'utilisation de créosote, la raffinerie du pétrole (Gabet, 2004).

Leur distribution dans les écosystèmes est déterminée par leurs propriétés physicochimiques qui diffèrent d'une molécule à l'autre et qui sont fonction de leur masse moléculaire et de leur

structure. Les principales caractéristiques sont: une faible solubilité à l'eau (Hébrard-Labit et al., 2004), une forte hydrophobicité, une volatilité faible, sauf pour le naphthalène; une persistance dans les sols, une forte toxicité pour l'homme et l'environnement (Costes et al., 1997).

Les propriétés toxicologiques sont très différentes selon les HAP : trois HAP dont la toxicité est élevée (Fig. 2) sont classés par le *Centre international de recherche contre le cancer* comme cancérigènes probables pour l'homme: il s'agit du benzo(a)pyrène, du benzo(a)anthracène, et du dibenzo(a,h)anthracène. Trois autres sont classés comme cancérigènes possibles pour l'homme (benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, indéno(c,d)pyrène). Le risque de cancer lié aux HAP est l'un des plus anciennement connus, depuis la description des cancers de la peau et du scrotum des ramoneurs dont l'exposition aux HAP se faisait par contact et par respiration de la suie des cheminées (Costes et al., 1997).

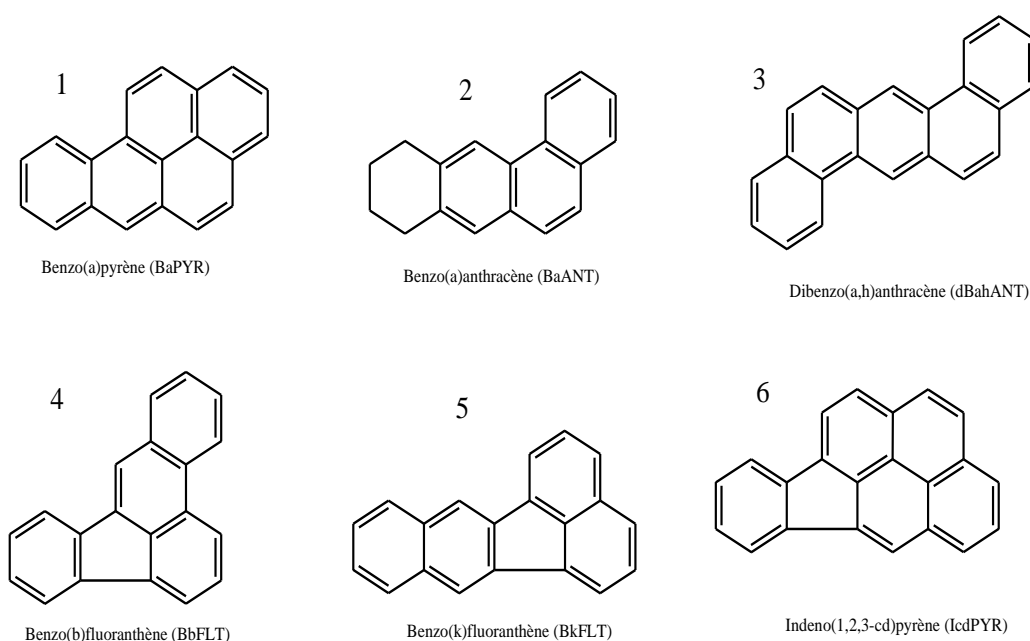


Figure 2: HAP cancérigènes (1, 2 et 3) et potentiellement cancérigènes (4, 5 et 6) pour l'homme – Carcinogenic PAHs (1,2 and 3) and potentially carcinogenic (4,5 and 6) for humans.

I.2.2 Techniques de traitement des sols pollués par les hydrocarbures

En fonction de la persistance du polluant, très souvent due à une cinétique d'évolution très lente des mécanismes de dispersion ou de dégradation (Hermine, 2009), certaines techniques sont plus appropriées que d'autres. On distingue des procédés physicochimiques et biologiques.

Pour le traitement des sites pollués, il existe quatre grandes familles de traitement: les traitements *in situ*, où le sol est laissé sur place, le polluant étant soit extrait et traité en surface, soit dégradé dans le sol ou encore fixé dans le sol ; les traitements hors site, où on procède à l'excavation et à l'évacuation des terres ou des eaux polluées vers un centre de traitement adapté (incinérateur, centre d'enfouissement technique, centre de traitement des terres polluées etc.) ; les traitements sur site

où la terre ou les eaux polluées sont extraites et traitées sur le site même ; et le confinement où la terre ou les eaux sont laissées sur le site, les travaux consistant à empêcher la migration des polluants et limiter le risque (Bernheim, 2009).

Les traitements hors site, sont inapplicables aux mangroves. La bioremédiation est le procédé le mieux adapté pour le traitement des mangroves *in situ* ou sur site.

La bioremédiation est l'utilisation d'organismes vivants dont les procédés microbiens pour dégrader les polluants organiques (Baker et al., 1994 A). Les microorganismes sont depuis très longtemps utilisés dans le processus de transformation et de traitement des déchets (Edeline, 1993). Par exemple, l'épuration des eaux usées municipales est basée sur l'exploitation des microorganismes à travers les systèmes contrôlés comme les stations d'épuration. Tous ces systèmes d'épuration des eaux usées (boues activées, biomasse fixée ou lit bactérien, etc.) dépendent de l'activité métabolique des microorganismes (Edeline, 1993). La biorémédiation peut se résumer comme un procédé qui encourage les processus naturels de biodégradation visant à réduire ou éliminer les polluants (Prince, 1992). Le tableau ci-dessous présente les différentes techniques pouvant être utilisées dans le traitement des sédiments de mangroves à partir des microorganismes.

Tableau II: Technologies de traitement par bioremédiation – Bioremediation treatment technologies.

Différentes techniques	Principales caractéristiques
Bioaugmentation	Addition de cultures microbiennes dans un milieu contaminé, fréquemment utilisée dans les bioréacteurs et les systèmes <i>ex situ</i> .
Biostimulation	Technique permettant de stimuler les populations microbiennes indigènes dans les sols et/ou dans les eaux souterraines. Peut se faire <i>in situ</i> ou <i>ex situ</i> .
Bioventing	Technique employée pour accélérer la biodégradation du polluant en apportant, grâce à une aération contrôlée, l'oxygène aux microorganismes en place.
Compostage	Processus de traitement aérobique et thermophile dans lequel les matériaux contaminés sont mélangés à un agent de <i>bulking</i> ; Peut être fait en utilisant des tas statiques, des tas aérés ou des réacteurs en continu.
<i>Landfarming</i>	Système de traitement par épandage en faible épaisseur (de l'ordre de quelques dizaines de centimètres) des sols pollués par les hydrocarbures sur une surface préparée à l'avance, le terrain pouvant être ensuite cultivé.

Source: Baker et al., 1994 A – Baker and al., 1994 A.

La phytoremédiation est une technique *in situ* de bioremédiation des sites contaminés. Son principe est de mettre à profit les propriétés des plantes et les microorganismes associés pour dépolluer des milieux (sols, eaux, etc.) contaminés par divers polluants (organiques et inorganiques). Elle utilise les capacités des plantes à extraire, transformer ou accumuler les éléments toxiques. Elle est particulièrement adaptée au traitement de larges superficies contaminées par des niveaux faibles de polluant (Ballerini, 2009). Des exemples d'expériences de phytoremédiation par la pollution diffuse ont été réalisées avec succès dans l'industrie d'assainissement (de-Bashan et al., 2011). L'inconvénient

majeur de la phytoremédiation, est qu'elle nécessite un engagement à long terme et de la patience. En effet, le procédé est dépendant de la croissance végétale, de la tolérance de la plante aux polluants et de sa capacité de bioaccumulation; tous ces processus sont lents. Deux mécanismes d'action des plantes peuvent être appliqués aux mangroves polluées par les hydrocarbures : la phytotransformation et la rhizodégradation. Ces mécanismes vont dépendre de la quantité et de la qualité d'hydrocarbures présents dans les sédiments (ITOPF, 2013). La phytotransformation réduit la toxicité du polluant ou la rend non toxique; elle transforme les molécules organiques complexes en composés plus simples ; elle absorbe et dégrade le polluant (Ballerini, 2009 ; de-Bashan et al., 2011). La rhizodégradation quant à elle, augmente l'activité microbienne du sol et permet la dégradation du polluant par les bactéries de la rhizosphère (de-Bashan et al., 2011).

Les plantes seules ont l'inconvénient d'être inefficaces et n'éliminent que de petites quantités de polluant. Pour obtenir une dégradation plus efficace de composés organiques, les plantes dépendent de l'association avec leurs micro-organismes spécifiques en plus des facteurs tels que la disponibilité d'accepteurs d'électrons, le pH du milieu, la température, la salinité, la disponibilité des nutriments (azote et phosphore) et, la nature du polluant, sa concentration dans le milieu et son accessibilité (Tam et al., 2002 ; Chen et al., 2008 ; Ballerini, 2009 ; de-Bashan et al., 2012).

I.2.3 Cas particulier de la rhizosphère des mangroves

Par définition, la rhizosphère est l'ensemble des microrégions du sol en contact avec les racines des plantes supérieures. De par sa teneur plus élevée en composés organiques qui sont à la fois des complexes enzymatiques et une source de carbone et d'énergie, elle favorise la croissance et l'activité des microorganismes. L'atmosphère au niveau de la rhizosphère est généralement plus pauvre en O₂ et plus riche en CO₂ que celle du sol éloigné de cette région (Lynch et al., 1990).

Bien que les écosystèmes de mangroves dépendent de bactéries pour recycler les nutriments, les bactéries à leur tour semblent bénéficier de leur association avec les arbres des mangroves. Elles colonisent la surface racinaire des palétuviers et induisent la production d'exsudats racinaires qui peuvent stimuler leur métabolisme (Lynch et al., 1990). En plus de la modification de certaines conditions physico-chimiques du sol (pH, salinité, etc.), les palétuviers peuvent également fournir aux bactéries de l'oxygène dont le transport est assuré par les racines aériennes. Toutes ces modifications influencent la prolifération de la population bactérienne dans la rhizosphère (Holguin et al., 2001 ; Lu et al., 2011 ; Moreira et al., 2011).

Un certain nombre de souches microbiennes (bactéries et champignons) aptes à dégrader les hydrocarbures ont été isolées au niveau des sédiments des mangroves, aussi bien dans la rhizosphère que dans la zone non rhizosphérique. Plusieurs expériences de bioremédiation des sédiments pollués par les produits pétroliers réalisées dans des laboratoires en bioréacteurs (Liu et al., 2011) ou dans des microcosmes (Ke et al., 2005 ; Guo et al., 2005) ; Tam et al., 2008) ont montré qu'une élimination des hydrocarbures est possible à travers des techniques de bioaugmentation, biostimulation et atténuation

naturelle. Cependant, au niveau de la rhizosphère des mangroves, d'autres composantes viennent renforcer le métabolisme bactérien à l'égard des polluants. La densité du système racinaire y est notamment très intense, ce qui entraîne une activité bactérienne accrue (Lu et al., 2011). Outre la présence des exsudats racinaires, une abondante litière végétale pourrait améliorer la dégradation du polluant en fournissant plus de substrat aux bactéries. Enfin la rhizosphère pourrait jouer un rôle de stabilisateur du polluant à travers des réactions de polymérisation tel que l'humification (Lee et al., 2008). Le gradient descendant de dégradation pour des polluants organiques dans les mangroves suit l'ordre suivant:

Proximité de la rhizosphère > Compartiment des racines > Zone éloignée de la rhizosphère

I.3 Mécanisme de dégradation des hydrocarbures par les bactéries

I.3.1 Voies de dégradation des alcanes et des HAP

- **Dégradation des alcanes**

De nombreuses bactéries ayant la capacité de dégrader les alcanes ont été décrites dans la littérature (Müller, 1992; Baker et al., 1994 B ; Molina-Barahona et al., 2004; Liu et al., 2008; Zhang et al., 2011; etc.). Cette dégradation commence par l'oxydation du groupe méthyle terminal. L'alcool formé est ensuite déshydrogéné via l'aldéhyde en l'acide carboxylique correspondant. Celui-ci est dégradé via la β -oxydation (comme chez les acides gras). De manière générale, les alcanes à chaîne courte sont plus vite dégradés que ceux à longue chaîne et les alcanes à chaîne ramifiée sont moins dégradables que les linéaires.

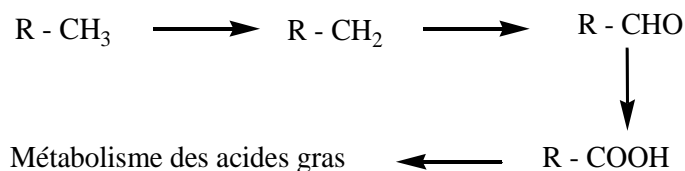


Figure 3: Voie de dégradation des alcanes par les bactéries (Müller, 1992) – Pathway for the bacterial degradation of alkanes (Müller, 1992).

Les HAP sont généralement biodégradables dans les sols (Lemière et al., 2008). Les molécules les plus légères peuvent être rapidement dégradées si le milieu est suffisamment aérobie (Hébrard-Labit et al., 2004).

- **Dégradation des HAP**

- **Dégradation du fluorène**

L'étude de la dégradation des HAP dans les mangroves propose plusieurs voies de dégradation de ces polluants par les bactéries. Ainsi, sur la base de l'identification des métabolites, deux voies possibles de dégradation du fluorène par un consortium bactérien sont proposées. Ces voies se

caractérisent par une réaction ou plusieurs réactions (représentées par les flèches en trait plein). On note au cours de la dégradation du fluorène, la formation de nouveaux métabolites tels que le 1-hydroxyfluorène et le 3-hydroxyfluorène. La formation de l'acide phtalique en passant par le 9-hydroxyfluorène et le 9-fluorène à travers une ou plusieurs réactions marque la fin du processus de dégradation du fluorène (Fig. 4).

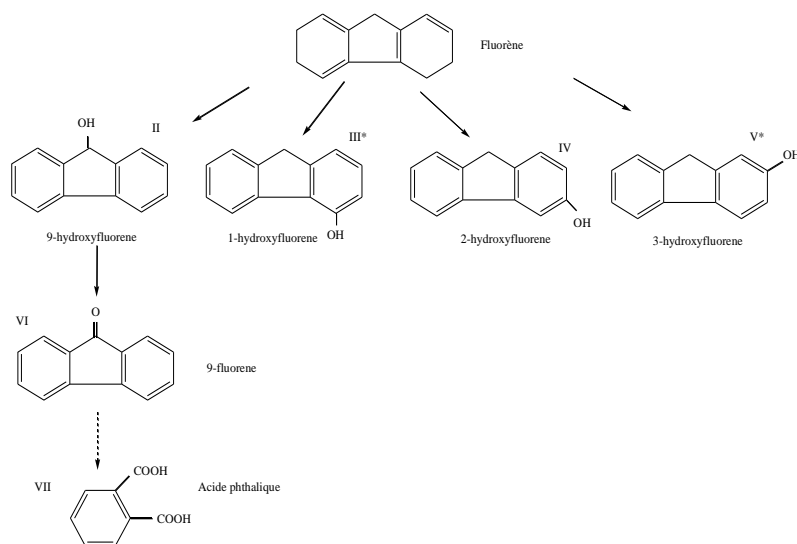


Figure 4: Voies proposées de dégradation du fluorène dans les sédiments de mangrove enrichis par un consortium bactérien. Les flèches en trait plein indiquent une réaction unique et la flèche en trait interrompu indique qu'il y a deux ou plusieurs étapes. Les composés avec astérisque désignent qu'il s'agit de nouveaux métabolites (Luan et al., 2006) – Proposed fluorene degradation pathways by the mangrove enriched bacterial consortium. Solid arrow indicates a single reaction while broken arrow represents two or more transformation steps. The compound with the asterisk symbol denotes it is a novel metabolite (Luan et al., 2006).

- Dégradation du phénanthrène

La dégradation du phénanthrène aboutit à l'acide phtalique en passant par une ou plusieurs réactions. Il apparaît également de nouveaux métabolites comme l'acide benzoïque, le 2-benzoyl méthyle ester et le trihydroxyphénanthrène (Fig. 5). Le phénanthrène peut être transformé par un consortium en mono-hydroxyle phénanthrène par la mono-oxygénase. La présence de trois groupes hydroxyles pourrait être due à des réactions enzymatiques par des systèmes combinés mono- et dioxygénase.

- Dégradation du pyrène

La dégradation du pyrène par un consortium bactérien composé de *Rhodococcus sp.*, *Acinetobacter sp.* et *Pseudomonas sp.*, fait apparaître de nouveaux métabolites comme le lactone et le 4-hydroxyphénanthrène. Cette dégradation se passe en une ou plusieurs réactions (Fig.6).

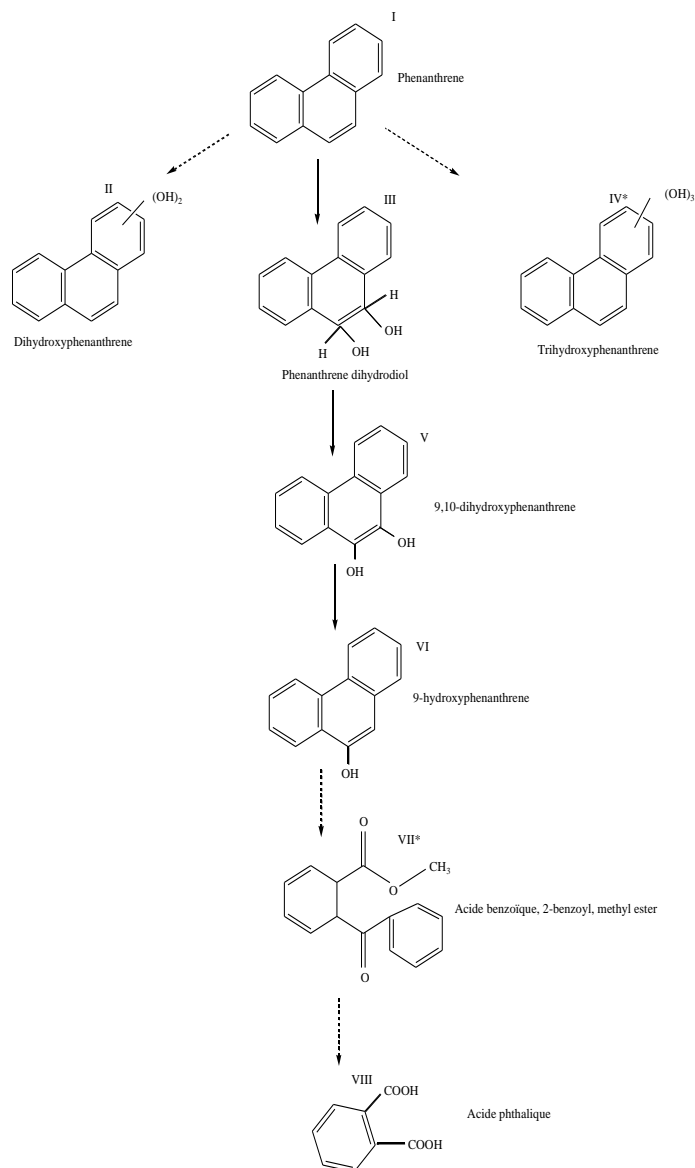


Figure 5: Voies proposées de dégradation du phénanthrène dans les sédiments de mangrove. Les flèches en trait plein indiquent une réaction unique et les flèches en trait interrompu indiquent qu'il y a deux ou plusieurs étapes. Les composés avec astérisque désignent qu'il s'agit de nouveaux métabolites - Proposed phenanthrene degradation pathways by the mangrove enriched bacterial consortium. Solid arrow indicates a single reaction while broken arrow represents two or more transformation steps. The compound with the asterisk symbol denotes it is a novel metabolite.

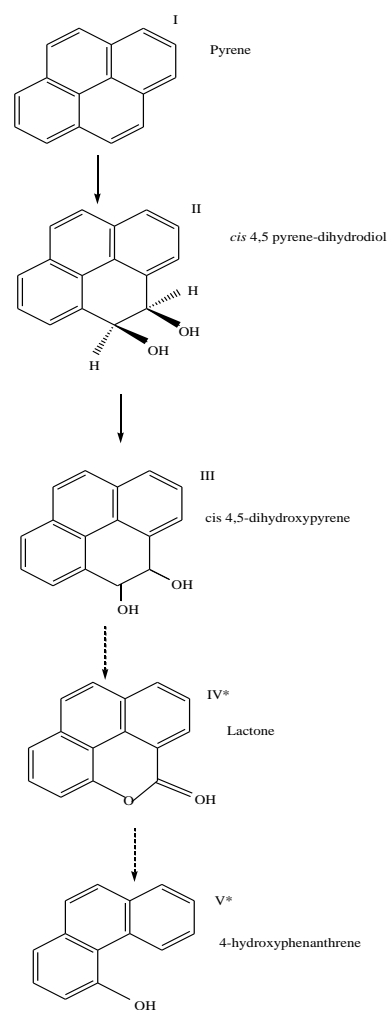


Figure 6: Voies proposées de dégradation du pyrène dans les sédiments de mangrove enrichis par un consortium bactérien. (Les flèches en trait plein indiquent une réaction unique et les flèches en trait interrompu indiquent qu'il y a deux ou plusieurs étapes. Les composés avec astérisque désignent qu'il s'agit de nouveaux métabolites). Proposed pyrene degradation pathways by the mangrove enriched bacterial consortium. Solid arrow indicates a single reaction while broken arrow represents two or more transformation steps. The compound with the asterisk symbol denotes it is a novel metabolite.

I.3.2 Revue de différentes études de gestion de la pollution des mangroves

Plusieurs études ont été menées à travers le monde visant à réduire ou à éliminer les hydrocarbures contenus dans les sols de mangroves. Les procédés de traitements biologiques sont les plus répandus du fait de la qualité du polluant à éliminer et des conditions particulières propres à ces zones. Dans le cas des mangroves précisément, l'intérêt de la biodégradation réside dans le fait qu'elle ne nécessite ni excavation, ni transport des terres, ce qui rend leur mise en œuvre bien moins coûteuse,

si l'on compare aux techniques les plus répandues que sont les traitements thermiques et physico-chimiques. Ainsi des résultats satisfaisants ont été obtenus dans plusieurs sites concernant l'élimination d'une large gamme d'hydrocarbures (Bidoia et al., 2010). Cependant, de nombreux composés ramifiés avec vingt ou plusieurs atomes de carbone ne sont pas facilement métabolisés (Bidoia et al., 2010).

Les sédiments de mangroves renferment une microflore abondante et diversifiée. L'étude sur la diversité de la microflore nous permet de comprendre les voies et moyens pour la protection et la conservation des mangroves. Cette microflore est composée en majorité de bactéries et de champignons. Selon Holguin et al. (2001), les bactéries et les champignons représentent 91% de la biomasse microbienne totale des mangroves tropicales, alors que les algues et les protozoaires ne représentent que 7% et 2% respectivement.

La dégradation des hydrocarbures par les bactéries a été largement étudiée et de nombreuses souches microbiennes aptes à dégrader ces composés ont été isolées. On peut citer *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Achromonas*, ainsi que des genres abondants dans les sols tels que *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (Pelmont, 2005).

Plusieurs expériences avec différentes souches bactériennes ont été menées sur des sols de mangroves contaminés par les hydrocarbures et les résultats obtenus au cours des différents traitements sont l'expression de l'adaptation des microorganismes aux différentes doses du polluant (Haritash et al., 2009). Les expériences sur la biodégradation des hydrocarbures dans les mangroves sont généralement effectuées dans des microcosmes *in vitro*. Les expériences *in situ* sont moins nombreuses (Brito et al., 2009).

Brito et al. (2006) ont isolé et identifié un certain nombre de bactéries dégradant les HAP dans les mangroves. L'expérience réalisée a montré que les genres *Marinobacter* et *Pseudomonas* étaient capables de dégrader le fluoranthène et le pyrène, le genre *Alcanivorax* était capable de dégrader l'octane, le genre *Microbulbifer* le fluoranthène et le naphthalène, et le genre *Sphingomonas* le pristane.

Tam et al. (2002) ont réalisé une expérience de dégradation du phénanthrène en laboratoire à partir d'un consortium bactérien isolé dans les sédiments des mangroves pollués par les hydrocarbures. Ce consortium a été utilisé comme inoculum dans les fioles contenant des sédiments de mangroves enrichis en phénanthrène (concentration 200 mg.L⁻¹) comme seule source de carbone. Six jours après ce traitement, 78% de phénanthrène a été dégradé.

En 2008, Tam et al. ont réalisé une expérience en serre dans un microcosme à partir d'échantillons de sédiments de mangrove. Le niveau de pollution de départ des échantillons était de 170 ng.g⁻¹ de matière sèche (somme totale des 16 HAP prioritaires de l'US EPA). Après 154 jours de culture, 90% du fluorène, 80% du phénanthrène, 70% du fluoranthène, 68% du pyrène et 32% du benzo(a)pyrène ont été dégradés par atténuation naturelle. Ces résultats démontrent que dans un environnement contrôlé, il est possible de dégrader de façon quasi complète les HAP dans les sédiments des mangroves. Il faut cependant noter que les résultats obtenus dans les microcosmes *in vitro* doivent être confirmés *in situ* en milieu naturel.

Pour la dégradation de trois HAP (fluorène, phénanthrène et pyrène) contenus dans les sédiments de mangroves, Yu et al. (2005) ont utilisé un consortium bactérien enrichi, contenant trois espèces bactériennes *Rhodococcus sp.*, *Acinetobacter sp.* et *Pseudomonas sp.* Les concentrations de départ des HAP (somme des 16 HAP prioritaires de l'US EPA) dans les sédiments variaient entre 1162 et 3322 ng.g⁻¹ de matière sèche. Quatre semaines après le traitement, plus de 99% du fluorène et du phénanthrène et seulement 30% du pyrène ont été dégradés par atténuation naturelle. Plus de 97 % des trois HAP ont été dégradés par biostimulation avec ajout d'un amendement nutritif. Les pourcentages de dégradation par bioaugmentation étaient similaires à ceux de l'atténuation naturelle.

Ramsay et al. (2000) ont mené une étude de bioremédiation sur une mangrove à *Rhizophora* en Australie. Cette étude a été réalisée sur 6 parcelles de terrain de 40 m² dont trois parcelles mazoutées et trois autres parcelles non mazoutées considérées comme témoins. La méthode utilisée consistait à aérer activement les sédiments et ajouter un engrais afin de favoriser la biodégradation des hydrocarbures par les microorganismes indigènes. Les sédiments de mangrove renfermaient 10⁴ à 10⁵ cellules/g de sédiment. Le traitement réalisé sur les parcelles mazoutées a augmenté significativement le nombre de cellules de 10⁵ à 10⁸ cellules/g de sédiment avec une augmentation des bactéries dégradant les aromatiques de 10⁴ à 10⁶ cellules/g de sédiment.

Moreira et al. (2011) ont réalisé une expérience qui met en évidence deux modèles de biodégradation : la phytoremédiation assistée avec des espèces de *Rhizophora mangle* et la bioremédiation seule afin de comparer le modèle le plus efficace dans la dégradation des hydrocarbures présents dans les sédiments des mangroves. Après 90 jours, les résultats obtenus présentent un taux d'abattement du polluant de 87% pour la phytoremédiation assistée et 70% pour la bioremédiation. Le dénombrement de la microflore totale a permis de constater une augmentation du nombre de bactéries passé de 2 x 10⁵ CFU/g à 2 x 10⁷ CFU/g au-delà de 30 jours où il y avait la présence des palétuviers. Au niveau de la bioremédiation, on a noté une légère augmentation de la microflore totale (de 2 x 10⁵ CFU/g à 1,8 x 10⁶ CFU/g). Ce qui démontre que la présence des plantes et les exsudats racinaires qui sont sécrétés au niveau de la rhizosphère offrent à la microflore des conditions favorables pour sa croissance (Espinosa et al., 2005) et stimulent la dégradation du polluant (Joner et al., 2005).

La phytoremédiation assistée dans les sédiments de mangroves contaminés pourrait être un moyen efficace d'élimination ou de dégradation des hydrocarbures pétroliers. Ke et al. (2003) ont mis en évidence dans des microcosmes la dégradation du pyrène dans les sédiments de surface et de fond contaminés. La performance de deux espèces de mangroves *Kandelia candel* (L.) Druce et *Bruguiera gymnorrhiza* dans la dégradation du pyrène a également été étudiée. Pendant une période expérimentale de six mois, la croissance des plantes a été mesurée. Les résultats ont montré que cette croissance aussi bien dans les sédiments de surface que de fond est semblable. Par contre, elle est comparable à celles des plantes cultivées dans les microcosmes témoins où les sédiments ne contiennent pas le polluant. La concentration du pyrène dans les sédiments contaminés est passée de

$3\mu\text{g.g}^{-1}$ initialement à moins de $0,4\mu\text{g.g}^{-1}$. Le taux d'élimination du pyrène dans les sédiments de surface et de fond se situe autour de 96,4% et 93 % respectivement avec l'espèce *K. candel*. Ce taux est légèrement inférieur dans les microcosmes contenant *B. gymnorrhiza*. Par contre, le taux d'abattement du pyrène dans les microcosmes ne contenant pas les plantes a été de 89% comparable aux microcosmes contenant *B. gymnorrhiza* (86 %) et légèrement inférieur aux microcosmes contenant l'espèce *K. candel* (93%).

L'activité bactérienne est plus importante au niveau de la rhizosphère dans le modèle de la phytoremédiation assistée. Moreira et al. (2011) ont démontré dans les sédiments pollués des mangroves, que la microflore passe de 2×10^5 CFU/g à 2×10^7 au niveau de la rhizosphère. Les auteurs montrent aussi que la croissance des plantes exposées au polluant est plus importante (46,3 cm de longueur) que celles cultivées dans les sédiments témoins (34,4 cm de longueur), ce qui suggère que les plantes et les bactéries en association, développeraient contre le polluant des mécanismes pour leur survie.

La rhizosphère joue un rôle efficace dans la dégradation des HAP dans les sols contaminés des mangroves. Lu et al. (2011) ont mené une expérience en serre pour évaluer le taux de dégradation du phénanthrène (10 mg.kg^{-1}) et du pyrène (10 mg.kg^{-1}) dans la rhizosphère de *Kandelia candel*. Le système a été mis en place en utilisant des rhizoboxes laminaires divisés en huit compartiments séparés à différentes distances de la surface des racines. Après 60 jours de croissance des plantes, on a observé les taux d'abattement de 47,7% et 37,6% respectivement pour le phénanthrène et pour le pyrène. L'intense activité microbienne qui se déroule au niveau de la rhizosphère a considérablement amélioré le taux de dégradation des contaminants. Il a été observé une plus grande dégradation à 3 mm de la zone des racines où 56,8% de phénanthrène et 47,7% de pyrène étaient dégradés.

I.4 Facteurs accélérant la biodégradation dans les mangroves

De manière générale, l'action des microorganismes sur les hydrocarbures et autres produits pétroliers est limitée par deux facteurs essentiels : la faible solubilité dans l'eau et les effets toxiques des hydrocarbures sur les cellules vivantes. Ainsi les bactéries exposées au stress des produits pétroliers présentent des altérations dans leur structure membranaire, dues au caractère lipophile des hydrocarbures (Pelmont, 2005).

Dans le cas particulier des mangroves, la salinité du milieu apparaît comme l'élément le plus important qui influence le processus de biodégradation. En effet, dans les zones estuariennes, la salinité varie périodiquement suite aux balancements des marées, les apports d'eau douce des rivières et les rejets vers la terre. Ceci pourrait avoir pour conséquence la diminution du potentiel de biodégradation des bactéries ayant colonisé les sédiments des mangroves. Selon Espagne et al., cités par Tam et al. (2002), la biodégradation dans un milieu estuarien est réduite par une augmentation de la salinité qui influe de façon négative sur la croissance bactérienne et la diversité des espèces. Tam et al. (2002), dans une étude sur la biodégradation du phénanthrène, ont démontré qu'une salinité élevée

(35 ‰) inhibe la croissance bactérienne et diminue fortement la biodégradation de ce polluant. Chen et al. (2008) ont conclu également, dans une étude réalisée sur la cinétique de biodégradation des HAP sur les sédiments des mangroves, que la salinité a plus d'effets négatifs sur la biodégradation que la température ou même l'addition d'une solution nutritive. Une corrélation a été déterminée entre la salinité et le taux de minéralisation du phénanthrène et du naphthalène, démontrant que le taux de métabolisme des hydrocarbures dans les sédiments des estuaires diminue lorsque la salinité augmente (de 3,3 à 28,4‰) (Chen et al., 2008).

En plus de la salinité, d'autres facteurs jouent également un rôle catalyseur sur la biodégradation des hydrocarbures en milieu marin. On peut citer notamment les facteurs géographiques, la concentration des matières en suspension. Kuznetsov et al. (2011) ont démontré la dépendance de la biodégradation aux facteurs géographiques du milieu tels que les conditions thermiques, la vitesse d'écoulement des eaux, la profondeur et le type de sédiments. Dans une étude comparative de la dynamique de transformation de la pollution par les hydrocarbures dans des conditions géographiques différentes en milieu aquatique, les auteurs ont mis en évidence que le processus de dégradation naturelle du polluant n'est pas le même. La plus forte dégradation naturelle est observée au niveau des côtes rocheuses, des plages de sable et de graviers exposées à l'air libre, au rayonnement solaire, à la tempête et à l'action des vagues. Cette forte activité est également observée au niveau des secteurs avoisinants caractérisés par des sédiments grossiers, les flux rapides des eaux et une bonne saturation en oxygène. Au contraire, les zones marécageuses des côtes et les cours d'eau caractérisés par des vitesses lentes de circulation des eaux, l'accumulation de sédiments vaseux, une teneur en matières organiques élevée et un déficit en oxygène présentent les plus faibles taux de dégradation naturelle de la pollution par les hydrocarbures.

La matière organique est également considérée comme un des facteurs les plus importants qui influent sur la biodégradation des HAP, et les faibles concentrations en matières inorganiques dans le sol réduisent le nombre de bactéries capables de dégrader les HAP. En effet deux ratios différents carbone/azote/phosphore sont recommandés pour la dégradation des HAP. Il s'agit du ratio C/N/P en masse molaire de l'ordre 100/1,3/0,05. L'autre ratio C/N/P en masse molaire est basé sur des valeurs moyennes de la composition microbienne élémentaire et sur les extraits bruts cellulaires en générale qui est de l'ordre de 100/10/1 (Chen et al., 2008).

A côté de ces facteurs, la maîtrise d'autres paramètres tels l'humidité du sol, le pH, la température est nécessaire (Talaat Balba et al., 1991; Baker, 1994 ; Kuznetsov et al., 2013). La biodégradation va dépendre d'un approvisionnement adéquat en eau dans le sol. L'eau est nécessaire non seulement pour répondre aux exigences physiologiques des microorganismes, mais aussi pour le transport des nutriments et des sous-produits métaboliques et l'apport de l'oxygène dans le sol (Kuznetsov et al., 2011). La biodégradation est généralement plus rapide lorsqu'elle se déroule à des valeurs de pH neutre (Baker, 1994). Certaines études ont d'ailleurs démontré que la minéralisation de certains polluants est plus lente dans les eaux souterraines et dans certains lacs où le pH est plus acide

(pH 4,87). La température peut influencer soit directement soit indirectement la biodégradation. C'est un facteur important dans la croissance et l'activité des microorganismes. Elle favorise l'augmentation du niveau des réactions métaboliques. Selon une étude menée par Song et al. (1990) en appliquant différentes températures (17 °C, 27 °C et 37 °C), le taux d'abattement des hydrocarbures est maximum à 27 °C pour tous les polluants testés. S'il est bien établi que la température est un facteur important dans la croissance et l'activité des microorganismes dans le processus de biodégradation des polluants organiques, certaines études ont démontré une inhibition presque complète de la biodégradation à 5 °C (Baker, 1994).

I.5 Conclusion

Les écosystèmes des mangroves sont d'une importance capitale dans le monde. La spécificité de leur milieu et la richesse de leur diversité biologique (faune et flore) font l'objet d'une protection par les organismes internationaux en charge de la sauvegarde des zones humides. La lutte contre toutes les formes de risques qui pourraient entraîner le dépérissement des mangroves est continue. La pollution des mangroves par les hydrocarbures impacte négativement la chaîne alimentaire jusqu'à l'homme. C'est ainsi que plusieurs études et recherches sont mises en œuvre pour éliminer les hydrocarbures dans les mangroves. L'accent est mis sur des procédés biologiques moins coûteux et compatibles avec l'environnement pour assainir ces milieux. Les bactéries sont au centre de ces recherches. Les expériences de dégradation sont fonction du type d'hydrocarbure, de sa concentration et de sa localisation dans le milieu. Ces expériences, *in vitro* pour la majorité, sont basées sur les capacités dégradatives d'une souche spécifique de bactérie ou d'un consortium soit sur les sédiments, soit au niveau de la zone racinaire, soit encore dans leur association avec les palétuviers. Il serait intéressant d'une part de caractériser les microorganismes indigènes exposés au stress des hydrocarbures dans les mangroves pour affiner les procédés biologiques *in vitro* mis en œuvre, et d'autre part de mettre en place des essais en site réel pour évaluer l'adaptation et la capacité des microorganismes, utilisés dans les expériences en milieu contrôlé, à dégrader les hydrocarbures dans les mangroves.

Bibliographie

- Aijiki K., 2000. Socio-economic study on the utilisation of mangrove forests in Southeast Asia. *In: Asia-Pacific cooperation on research for conservation of mangroves; Proceedings of an International Workshop, 26-30 March 2000*, Okinawa, Japan, UNU, Tokyo, 130-138.
- Baker K.H., 1994. Bioremediation of surface and subsurface soils. *In: Baker K.H. & Herson D.S., eds. Bioremediation*. New York (USA): McGraw-Hill, Inc., 203-259.
- Baker K.H. & Herson D.S., 1994a. Introduction and overview of bioremediation. *In: Baker K.H. & Herson D.S., eds. Bioremediation*. New York (USA): McGraw-Hill, Inc., 1-7.
- Baker K.H. & Herson D.S., 1994b. Microbiology and Biodegradation, *In: Baker K.H. & Herson D.S., eds. Bioremediation*. New York (USA): McGraw-Hill, Inc., 9-60.
- Ballerini D., 2009. Traitements biologiques des sols. *Techniques de l'ingénieur*, G2-620, 6.
- Bernheim Y., 2009. Typologie des techniques de réhabilitation des sites pollués. *Technique de l'ingénieur*, G2-600, 6.
- Bidoia E.D., Montagnoli R.N. & Lopes P.R.M., 2010. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. *In: Méndez Vila A., ed., Appl. Microbiol. and Microb. Biotechnol.* FORMATEX 1277-1288.
- Brito E.M.S., Duran R., Guyoneaud R., Goni-Urriza M., Garcia de Oteyza T., Crapez M.A.C., Aleluia I. & Wasserman J.C.A., 2009. A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil). *Mar. Poll. Bull.*, 58, 418-423.
- Brito E.M.S., Guyoneaud R., Goñi-Urriza M., Ranchou-Peyruse A., Verbaere A., Crapez M.A.C., Wasserman J.C.A. & Duran R., 2006. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Res. in Microbiol.*, 157, 752-762.
- Chen J., Wong M.H., Wong Y.S. & Tam N. F.Y., 2008. Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment. *Mar. Poll. Bull.*, 57, 695-702.
- Costes J.M. & Druelle V., 1997. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement: la réhabilitation des anciens sites industriels. *Revue de l'Institut français du pétrole*, 52(4), 425-440.
- de-Bashan L.E., Hernandez J.P. & Bashan Y., 2012. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. *Appl Soil Ecol.*, 61, 171-189.
- de-Bashan L.E., Schmid M., Hartmann A. & Bashan Y., 2011. Cell-cell interaction in the eukaryote-prokaryote model using the microalgae *Chlorella vulgaris* and the bacterium *Azospirillum brasilense* immobilized in polymer beads. *J Phycology* 47:1350-1359.
- Defew L.H., Mair J.M., Guzman H.M., 2005. An assessment of metal contamination in mangrove sediments and leaves from Punta Mala Bay, Pacific Panama. *Mar Pollut Bull.*, 50 : 547-552.

- Dupuy B., Maître H.-F. & Amsallem I., 1999. Techniques de gestion des écosystèmes forestiers tropicaux: état de l'art. *FAO Paper for the World Bank Forest Policy Implementation Review and Strategy* Forestry Policy and Planning Division, Rome.
- Edèline F., 1993. L'épuration biologique des eaux. Théorie et technologie des réacteurs. *CEBEDOC*, 299.
- Espinosa E., Martinez M.E., Torres E.F. & Rojas M.G., 2005. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere*, 59, 405–413.
- FAO, 2007. The world's mangroves 1980-2005. A thematic study prepared in the framework on the Global Forest Resources Assessment 2005 - *FAO Forestry Paper*, 153, 89.
- Gabet S., 2004. Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat: Université de Limoges (France), 186.
- Guiral D., Albaret J.J., Baran E., Bertrand F., Debenay J.P., Diouf P. S., Guillou J.J., Loeui P.L., Montoroi J.P. & Sow M., 1999. Les écosystèmes à mangrove. In: Cormier Salem M.C., ed., *Rivières du Sud, Sociétés et Mangroves Ouest-Africaines*. Paris : IRD éditions, 1, 63-117.
- Guo C.L., Zhou H.W., Wong Y.S., Tam N.F.Y., 2005. Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. *Mar. Pollut. Bull.*, 51, 1054-1061.
- Haritash A.K. & Kaushik C.P., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a review. *J. of Hazard. Mater.*, 169, 1–15.
- Hébrard-Labit C. & Meffray L., 2004. Comparaison de méthodes d'analyse des éléments traces métalliques (ETM) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sur les sols et les végétaux. *Centre d'études sur les réseaux, les transports, l'urbanisme et les constructions publiques*, 121.
- Hermine J.P., 2009. Sites pollués : contamination des sols et des nappes phréatiques. *Techniques de l'Ingénieur*. G2-500, 3.
- Holguin G., Vazquez P. & Bashan Y., 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biol. Fertil. Soils*, 33, 265–278
- IPIECA, 1993. Biological impacts of oil pollution: Mangroves. *Proceedings of the IPIECA, International Petroleum Industry Environmental Conservation Association (IPIECA' 90)*, London.
- ITOPF, 2013. Effet de la pollution par les hydrocarbures sur l'environnement. *Guide d'informations techniques 13. The International tanker Owners pollution Federation Limited (ITOPF)*, London.
- Joner E.J., Corgie S., Amellal N. & Leyval C., 2005. Nutritional constraints to PAH degradation in a rhizosphere model. *Soil Biol. Biochem.*, 34, 859–864.
- Kathiresan K. & Bingham B.L., 2001. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Adv. Mar. Biol.*, 40, 81-251.
- Ke L., Wang W.Q., Wong T.W.Y., Wong Y.S. & Tam N.F.Y., 2003. Removal of pyrene from contaminated sediments by mangrove microcosms. *Chemosphere*, 51, 25-34.

- Kuznetsov A.N., Fedorov Y., Fattal P., Zagranitchny K.A., 2013. Peculiarities of fuel oil natural transformation in the strait of Kerch polluted in November 2007 in consequence of tanker accident. *Marine and Ocean ecosystems, 13th International Multidisciplinary Scientific Geo-Conference "Modern Management of Mine Producing, Geology and Environmental Protection"* – SGEM (Bulgaria), 839-846.
- Kuznetsov A.N., Fedorov Yu.A., Fattal P., 2011. Regularities of oil spilled oil transformation in watercourses and coastal zone (results of long-term observations). *International Multidisciplinary Scientific GeoConference SGEM (Surveying Geology & Ecology Management)*, 579-586.
- Lee S.H., Lee W.S., Lee C.H. & Kim J.G., 2008. Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. *J. Hazard. Mater.*, 153, 892–898.
- Lemière B., Seguin J.J., Le Guern C., Guyonnet D., Baranger P. & Saada A., 2008. Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. *Document du BRGM 300 – Nouvelle édition*, 155.
- Liu C.W., Liu H.S., 2011. *Rhodococcus erythropolis* strain NTU-1 efficiently degrades and traps diesel and crude oil in batch and fed-batch bioreactors. *Process Biochem.*, 46, 202-209.
- Liu P.-W.G., Whang L.-M., Yang M.-C. & Cheng S.-S., 2008. Biodegradation of diesel-contaminated soil: A soil column study. *J. of the Chin. Inst. of Chem. Eng.*, 39, 419-428.
- Lu H., Zhang Y., Liu B., Liu J., Ye J. & Yan C., 2011. Rhizodegradation gradients of phenanthrene and pyrene in sediment of mangrove (*Kandelia candel* (L.) Druce). *J. of Hazard. Mater.*, 196, 263–269.
- Luan T.G., Yu K.S.H., Zhong Y., Zhou H.W., Lan C.Y. & Tam N. F.Y., 2006. Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Chemosphere*, 65, 2289-2296.
- Lynch J.M. & Whipps J.M., 1990. Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil*, 129, 1–10.
- MacFarlane G.R., Pulkownik A., Burchett M.D., 2003. Accumulation and distribution of heavy metals in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh: biological indication potential. *Environ Pollut* 123 : 139–151.
- Marius C., 1977. Propositions pour une classification française des sols de mangroves tropicales. *Cah. ORSTOM sér. Pédol.*, 15(1), 89-102.
- Molina-Barahona L., Rodriguez-Vasquez R., Hernandez-Velasco M., Vega-Jarquín C., Zapata-Pérez O., Mendoza-Cantu A. & Albores A., 2004. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Appl. Soil Ecol.*, 27, 165-175.
- Moreira I.T.A., Oliveira O.M.C., Triguís J.A., Dos Santos A.M.P., Queiroz A. F. S., Martins C. M. S., Silva C.S. & Jesus R.S., 2011. Phytoremediation using *Rizophora mangle* L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's). *Microchem. J.*, 29, 376-382.
- Müller R., 1992. Bacterial degradation of xenobiotics. In: Fry J.C., Gadd G.M., Herbert R.A., Jones C.W., & Watson-Craik I.A., eds. *Microb. Control of pollut.*, Cambridge : University Press, 48, 35-57.

- OIBT, Conseil international des bois tropicaux, 2002. Gestion durable et conservatoire des écosystèmes forestiers de la mangrove, Plan d'action OIBT sur la mangrove. 32^{ème} session, Bali, Indonésie, 13 – 18 mai.
- Owens E.H., Solsberg L.B., West M.R., McGrath M., 1998. Field guide for oil spill response in arctic waters. *Emergency Prevention, Preparedness and Response (EPPR)*, Environment Canada, Yellowknife, NT Canada, 348.
- Pelmont J., 2005. Biodégradations et métabolismes, les bactéries pour les technologies de l'environnement. *Collection Grenoble Sciences* 798.
- Prince R.C., 1992. Bioremediation of oil spills, with particular reference to spill from the Exxon Valdez. In: Fry J.C., Gadd G.M., Herbert R.A., Jones C.W. & Watson-Craik I.A., eds. *Microb. Control of pollut.* Cambridge : University Press, 48: 19-34.
- Ramsar, 2002. Résolution VIII.32. Conservation, gestion intégrée et utilisation durable des écosystèmes de mangroves et de leurs ressources. 8^{ème} session de la Conférence des Parties, Ramsar, Valence, novembre 2002.
- Ramos e Silva C.A., da Silva A.P., de Oliveira S.R., 2006. Concentration, stock and transport rate of heavy metals in a tropical red mangrove, Natal, Brazil. *Mar. Chem.*, 99: 2 –11.
- Ramsay M.A., Swannell R.P.J., Shipton W.A., Duke N.C. & Hill R.T., 2000. Effect of Bioremediation on the Microbial Community in Oiled Mangrove Sediments. *Mar. Pollut. Bull.*, 41(12), 413-419.
- Ray A.K., Tripathy S.C., Patra S., Sarma V.V., 2006. Assessment of Godavari estuarine mangrove ecosystem through trace metal studies. *Environ. Inter.*, 32 : 219 – 223.
- Saenger P., 1998. Mangrove vegetation: An evolutionary perspective. *Mar. and Freshw. Res.*, 49(4), 277-286.
- Saenger P., 2003. Mangrove Ecology, Silviculture and Conservation. *Dordrecht, NL, Kluwer Academic Publishers.*
- Sathirathai S. & Barbier E.B., 2005. Valuing mangrove conservation in Southern Thailand. *Contemporary Economic Policy* 19 (2), 109-122.
- Song H.G., Wang X. & Bartha R., 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 652–656.
- Talaat Balba M. & Bewley R.J.F., 1991. Organic contaminants and microorganisms. In: Jones K.C., ed., *Organic contaminants in the environment: environmental pathways and effects.* Environmental Management series. University Press, Cambridge, 237-274.
- Tam N.F.Y., Guo C.L., Yau W.Y. & Wong Y.S., 2002. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong-Kong. *Mar. Pollut. Bull.*, 42, 316–324.
- Tam N.F.Y., Yao M.W.Y., 2002. Concentrations of PCBs in coastal mangrove sediments of Hong Kong. *Mar. Pollut. Bull.*, 44 : 642–651.

- Tam N.F.Y. & Wong Y.S., 2008. Effectiveness of bacterial inoculum and mangrove plants on remediation of sediment contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar. Pollut. Bull.*, 57, 716-726.
- Tanaka N., Sasaki Y., Mowjood M., Jinadasa K. & Homchuen S., 2007. Coastal vegetation structures and their functions in tsunami protection: experience of the recent Indian Ocean tsunami. *Landsc. and Ecol. Eng.*, 3 (1), 33-45.
- Valiela I., Bowen J.L. & York J.K., 2001. Mangrove Forests: One of the World's Threatened Major Tropical Environments. *BioScience*, 51(10), 807-815.
- Yu K.S.H., Wong A.H.Y., Yau K.W.Y., Wong Y.S. & Tam N.F.Y., 2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar. pollut. Bull.*, 51, 1071-1077.
- Yu S.H., Ke L., Wong Y.S., Tam N.F.Y., 2005. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environ. Inter.*, 31, 149-154.
- Zhang Z., Hou Z., Yang C., Ma C., Tao F., Xu P., 2011. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresour. technol.*, 102, 4111-4116.

CHAPITRE II : LES MICROORGANISMES DANS LE MAINTIEN DE L'ÉQUILIBRE ET LA RÉHABILITATION DES ÉCOSYSTÈMES DE MANGROVE POLLUÉS PAR LES HYDROCARBURES. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE – MICROORGANISMS IN MAINTAINING BALANCE AND REHABILITATION OF POLLUTED MANGROVE ECOSYSTEM BY OIL. A REVIEW.

Firmin Semboung Lang¹, Jacqueline Destain¹, Philippe Druart², Marc Ongena¹, Philippe Thonart¹ (2016). Microorganisms in maintaining balance and rehabilitation of polluted mangrove ecosystem by oil. A review. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **10**(5): 2268-2284.

(1) Université de Liège - Gembloux Agro Bio-Tech. Centre Wallon de Biologie Industrielle. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique). E-mail : langsemb@yahoo.fr

(2) Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W). Chaussée de Namur, 24. B-5030 Gembloux (Belgique).

Résumé : Les mangroves constituent un écosystème particulier. Leur développement est fortement lié à leur fonctionnement. La microflore y joue un rôle de premier plan. Grâce à son activité de dégradation de la matière organique, elle pourvoit, aux organismes supérieurs, les éléments nutritifs d'importance tels que l'azote et le phosphore indispensables à leurs cycles biologiques. Il existe une relation entre la composition globale des microorganismes et la demande en éléments nutritifs. Une simulation artificielle de la dégradation des hydrocarbures par les bactéries demande une addition d'azote et de phosphore. La biodégradation qui est un phénomène naturel de dégradation des molécules organiques par les microorganismes (bactéries et champignons, etc.), dont la croissance s'effectue par l'oxydation du carbone utilisé comme source d'énergie est une réaction qui met en jeu l'azote et le phosphore qui participent à la synthèse protéique. Lorsque l'oxydant est représenté par l'oxygène, on parle de condition d'aérobiose. Dans le cas d'anaérobiose, l'oxygène est remplacé par les nitrates, phosphates, sulfates ou le méthane.

Mots clés : mangroves, microflore, pollution, biodégradation, réhabilitation.

Abstract : Mangroves are a particular ecosystem. Their development is strongly linked to their operation. The microflora plays a prominent role. Through its degradation of organic matter of activity, it provides higher organisms, nutrients matter such as nitrogen and phosphorus essential for their biological cycles. There is a relationship between the overall composition of the microorganisms and the nutrient demand. An artificial simulation of hydrocarbon degradation by bacteria requires the addition of nitrogen and phosphorus. Biodegradation is a natural phenomenon of degradation of organic molecules by microorganisms (bacteria and fungi, etc.), the growth is carried out by oxidation of the carbon used as an energy source is a reaction that involves the nitrogen and phosphorus involved in protein synthesis. When the oxidant is represented by oxygen, it is called aerobic condition. In the case of anaerobiosis, oxygen is replaced by nitrates, phosphates, sulphates or methane.

Keywords: Mangroves, microflora, pollution, biodegradation, rehabilitation.

II.1 Introduction

Les mangroves sont considérées comme un écosystème interface entre milieu terrestre et milieu océanique. Ce sont des écosystèmes forestiers qui se développent dans des zones intertidales (zones de balancement des marées) des régions tropicales. Elles couvrent une superficie d'environ 150 000 km² sur notre planète, c'est-à-dire 75% des côtes tropicales du monde, ce qui correspond à moins de 1% de la superficie de l'ensemble des forêts tropicales (Spalding et al., 1997; FAO, 2007). Les espèces ligneuses qui composent cet écosystème sont les palétuviers. Ce sont des espèces arborescentes caractérisées par une morphologie et une physiologie particulières qui leur permettent de survivre et de se développer dans un milieu anaérobique (racines aériennes, pneumatophores), salé (halotolérance) et instable. Ces forêts jouent un rôle tampon primordial de préservation et de protection du littoral. Elles participent non seulement au filtrage des pollutions et à la qualité des eaux littorales (Schaffelke et al., 2005), mais elles constituent également une barrière physique qui atténue l'effet érosif (et parfois meurtrier) des houles de tempêtes, d'ouragans voire de tsunamis (Tanaka et al., 2007). La forte productivité liée à la dynamique accélérée de l'écosystème de mangrove (présence de nombreuses espèces avec une capacité de régénération rapide) alimente la chaîne trophique côtière et constitue un refuge-habitat pour de nombreuses espèces animales (oiseaux, crabes, crevettes, etc.). Selon Nagelkerken et al., (2008), la totalité de la litière utilisée et/ou exportée sur l'ensemble du domaine côtier par l'action des marées via un réseau dense de chenaux, permet le bon fonctionnement de l'écosystème et le renouvellement des ressources halieutiques. Selon la FAO (2007), 75% des espèces tropicales commercialisées ont passé une partie de leur vie dans les mangroves. Par ailleurs, l'exploitation du bois dans les mangroves fournit des matières premières pour la construction et l'industrie du papier, du charbon de bois, du tanin et des substances médicinales (Walters et al., 2008). Malgré le rôle que jouent les forêts de mangrove dans le maintien des équilibres écologiques, on note entre 1980 et 2000, un dépérissement d'environ 35% de la superficie mondiale des mangroves (Valiela et al., 2001). Ce dépérissement a pour origine l'augmentation d'activités industrielles (aquaculture, barrages hydro-électriques, industries portuaire et pétrolière) et de l'urbanisation, elles-mêmes liées à une augmentation importante des populations vivant sur le littoral (FAO, 2007). Les pressions sur les ressources côtières ne sont pas que locales. Par exemple, la forte demande mondiale de crevettes pousse les gouvernements et les industriels à poursuivre l'installation de fermes aquacoles extensives en opposition avec une gestion à long terme du milieu côtier (Sathirathai et Barbier, 2005). Mais depuis une dizaine d'années, il y a un regain d'intérêt pour la protection voire la restauration des mangroves. Pour ce faire, il est important de comprendre le fonctionnement biologique et de l'évolution de cet écosystème. Les processus de minéralisation de la matière organique bien que particulièrement complexes, doivent être analysés. Car ils font intervenir des mécanismes différents selon qu'ils se situent dans la partie aérobie du système ou dans la partie réductrice, une foule de microorganismes, protozoaires, champignons, bactéries, etc. (Snedaker, 1978).

II.2 Transformation de la matière organique par les microorganismes

Dans les écosystèmes de mangrove, les microorganismes sont les principaux responsables de la dégradation des feuilles et du bois des palétuviers (Alongi et al., 1989). Cette dégradation commence immédiatement après leur colonisation par les bactéries et les champignons résident dans les sédiments et peut durer entre 2 et 6 mois ou plus pour ce qui concerne la dégradation du bois (Steinke et al., 1990). La communauté bactérienne hétérotrophe dans les mangroves se compose de microorganismes avec une activité cellulolytique, pectinolytique, amylolytique, et protéolytique (Holguin et al., 2001). Les champignons qui dégradent les mangroves ont une activité pectinase, protéase et d'amylase et possèdent la capacité à dégrader les composés lignocellulosiques (Holguin et al., 2001). Ainsi, la dégradation du matériel végétal dans les écosystèmes de mangroves produit des détritiques qui peuvent être définis comme de la matière organique en phase de décomposition. Les détritiques sont riches en énergie et contiennent une grande population microbienne active (Bano et al., 1997). En plus des bactéries et des champignons, d'autres organismes peuvent également coloniser le matériel végétal et contribuer à la formation des détritiques (D'Croz et al., 1989). Selon Blum et al., (1988), la biomasse microbienne totale ne dépasse jamais 1,2% de la masse détritique totale, et dans la plupart des cas est sensiblement moins de 1%. Il est donc peu probable que les organismes détritivores (qui se nourrissent de particules détritiques) ne puissent compter uniquement que sur les microorganismes en tant que source d'énergie. Odum et Heald (1975) ont déterminé que la teneur initiale en protéines des feuilles de mangroves nouvellement tombées est de 6%. Six mois plus tard, cette teneur en protéines des feuilles passe à 20%, probablement par suite de la transformation des matières grasses, des glucides et des protéines végétales contenus dans les feuilles par les populations microbiennes. De même, la teneur en azote totale synthétisée au cours de la décomposition des feuilles et du bois des mangroves augmente avec le temps. Ainsi, au cours de la décomposition des feuilles de la litière de *Avicennia marina*, la concentration d'azote augmente de 0,7% à 1,2% (par poids sec) après 105 jours principalement par exportation de carbone sous forme de CO₂. L'augmentation de 41% à 64% de l'azote de la litière peut aussi être causée par la fixation biologique de l'azote (Holguin et al., 2001). La teneur en azote dans les troncs tombés de *Rhizophora* spp. augmente de 500% au cours des deux premiers mois de décomposition (Robertson et Daniel, 1989). Dans les feuilles de palétuviers rouges décomposés ayant montré une perte de 50% en poids sec après 27 jours d'immersion, les concentrations d'azote augmentent de 0,3% à 2,9% (en poids sec) dans les 93 jours, et les concentrations en phosphore augmentent de 0,04% à 0,13% (en poids sec) pendant la même période (D'Croz et al., 1989). Les produits finaux de la décomposition des feuilles sont une biomasse microbienne riche en énergie, de l'azote, des protéines, et des substances humiques (Holguin et al., 2001).

II.3 Transformation des nutriments par les microorganismes dans un écosystème de mangrove

Bien que les écosystèmes de mangroves soient riches en matières organiques en général, ils sont déficients en nutriments, en particulier en azote et phosphore (Holguin et al., 1992; Vazquez et al., 2000). En dépit de cela, les mangroves sont très productives. Ce paradoxe peut s'expliquer par le fait qu'il existe dans les mangroves, un système de recyclage de nutriments très efficace dans lequel les éléments nutritifs essentiels rares sont conservés et de nouveaux éléments nutritifs sont régénérés à partir de la décomposition de feuilles. L'azote total est synthétisé au cours de la décomposition des feuilles et du bois des mangroves et augmente avec le temps. Ainsi, au cours de la décomposition des feuilles de la litière de *Avicennia marina*, la concentration d'azote augmente de 0,7% à 1,2% (par poids sec) après 105 jours principalement par exportation de carbone sous forme de CO₂. L'augmentation de 41% à 64% de l'azote de la litière peut aussi être causée par la fixation biologique de l'azote (Holguin et al., 2001). La teneur en azote dans les troncs tombés de *Rhizophora* spp., augmente de 500% au cours des deux premiers mois de décomposition (Robertson et Daniel, 1989). Dans les feuilles de palétuviers rouges décomposés ayant montré une perte de 50% en poids sec après 27 jours d'immersion, les concentrations d'azote augmentent de 0,3% à 2,9% (en poids sec) dans les 93 jours, et les concentrations en phosphore augmentent de 0,04% à 0,13% (en poids sec) pendant la même période (D'Croz et al., 1989). Les produits finaux de la décomposition des feuilles sont une biomasse microbienne riche en énergie, de l'azote, des protéines, et des substances humiques (Holguin et al., 2001). L'activité microbienne est responsable pour les grandes transformations de nutriments dans un écosystème de mangrove (Holguin et al., 1999). Dans les mangroves tropicales, bactéries et champignons constituent 91% de la biomasse microbienne totale, alors que les algues et protozoaires représentent seulement 7% et 2% (Holguin et al., 2001). Les bactéries sont responsables de la majorité du flux de carbone dans les sédiments de mangroves tropicales. Elles traitent la plupart des flux d'énergie et de nutriments, et agissent comme un puits de carbone. Par exemple, dans les écosystèmes de mangroves semi-arides, les bactéries sont attachées aux particules des sédiments et transforment la plupart des nutriments de l'écosystème (Bano et al., 1997). En consommant du carbone organique dissous présent dans les eaux interstitielles, les populations bactériennes dans les sédiments de mangrove empêchent l'exportation de cette forme de carbone vers les écosystèmes adjacents (Alongi et al., 1989). La concentration du carbone organique dissous dans les eaux interstitielles est supérieure à celle qui se trouve dans les eaux des sédiments, cependant, il n'y a pas de flux net de carbone entre les deux couches d'eau. Les taux et les flux des différents types de composés azotés dans un écosystème de mangroves dépendent des caractéristiques du milieu. Dans certaines mangroves, la perte d'azote par dénitrification est négligeable du fait que l'azote est consommé avant qu'il puisse être libéré dans l'atmosphère sous forme de N₂ (Holguin et al., 2001). Il peut y avoir une forte concurrence entre les bactéries et les plantes pour l'azote disponible dans l'écosystème. Les nitrates présents dans les sédiments et provenant de la dégradation des composés azotés organiques sont probablement

convertis en ions ammoniums par des bactéries et sont ensuite assimilés par les plantes et les bactéries. Ce processus conserve l'azote à l'intérieur de l'écosystème (Holguin et al., 2001). D'autres processus existent et pourraient conserver l'azote dans le milieu comme la réduction des nitrates en ammonium et la possible oxydation anaérobie de l'ammonium (Holguin et al., 2001).

Dans d'autres mangroves, le taux et le flux provenant de la transformation de l'azote inorganique par les processus de nitrification, de dénitrification, et de fixation de N_2 est minime, par conséquent il existerait un couplage entre les processus de minéralisation et d'assimilation (Kristensen et al., 1991). Dans les écosystèmes tropicaux, aquatiques ou terrestres, le recyclage des nutriments par les communautés microbiennes est habituellement un processus efficace (Alongi, 1994). Les déversements d'hydrocarbures, les eaux usées domestiques, les effluents industriels entraînent des perturbations dans l'équilibre du système aérobie-anaérobie pour établir un système anaérobie complet moins efficace et lent dans le recyclage des nutriments, entraînant l'accumulation et la libération de sulfures toxiques. Ainsi, on peut affirmer que la restauration des écosystèmes tropicaux, y compris les écosystèmes de mangroves, dépend de la préservation des communautés microbiennes benthiques et de leur environnement géochimique (Alongi, 1994).

II.4 Rôle des microorganismes dans l'équilibre et la survie de la production des écosystèmes de mangroves

Les microorganismes jouent plusieurs rôles très importants pour maintenir l'équilibre et assurer la survie des écosystèmes de mangroves. Il existe dans les mangroves, des bactéries responsables de la fixation de l'azote atmosphérique, de la solubilisation des phosphates, des bactéries sulfato-réductrices, des bactéries photosynthétiques anoxygéniques et des bactéries méthanogènes.

II.4.1 La fixation de l'azote dans les écosystèmes des mangroves

L'une des fonctions écologiques des microorganismes est la fixation de l'azote utile dans les cycles biologiques. Selon Masepohl et Klipp (1996), les écosystèmes terrestres et marins peuvent être colonisés par les microorganismes fixateurs d'azote ou diazotrophes. Cette fixation est catalysée généralement par la présence d'une source d'énergie. Dans les écosystèmes de mangroves, les teneurs élevées d'azote observées proviennent généralement de la décomposition des feuilles mortes (Mann et Steinke, 1992), des pneumatophores au niveau des racines aériennes, de la rhizosphère (Holguin et al., 1992), des écorces des palétuviers, du tapis de cyanobactéries recouvrant la surface des sédiments, et des sédiments eux-mêmes (Holguin et al., 2001). Les teneurs en N_2 diminuent lorsque qu'il y a insuffisance de sources d'énergie. Cette énergie est probablement apportée par la décomposition des feuilles et des racines, par la microflore non diazotrophe qui colonise les feuilles mortes des palétuviers (Holguin et al., 2001). La concentration de l'azote soluble dans l'eau de la mangrove peut également influencer le taux de fixation de l'azote atmosphérique par les bactéries diazotrophes. Les faibles taux de N_2 observés dans les sédiments et la rhizosphère de la mangrove *Avicennia marina* ont

été attribués à la forte concentration de N_2 soluble (jusqu'à 25 mg/L) dans l'eau de mangrove et à l'absence de sources de carbone appropriées (Mann et Steinke, 1992). Ces constatations suggèrent que les bactéries associées aux mangroves qui reçoivent une entrée d'azote par le drainage des eaux usées fixent peu d'azote. Les bactéries fixatrices d'azote identifiées appartiennent aux genres *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Clostridium*, et *Klebsiella*. Elles ont été isolées des sédiments, de la rhizosphère, et des racines dans diverses espèces de mangrove. La surface des pneumatophores (racines aériennes) du palétuvier noir est complètement colonisée principalement par des microorganismes, fixateurs de N_2 , des cyanobactéries non-fixatrices de N_2 , des diatomées, des microalgues vertes, des bactéries et des champignons (Holguin et al., 2001).

II.4.2 La solubilisation du phosphate par les bactéries

Le phosphore (P) est l'élément essentiel du métabolisme énergétique de toutes les formes de vie. Principal composant de l'ADN, de l'ARN, de l'ATP et des phospholipides (composant majeur des membranes cellulaires), le P est indispensable pour les cellules vivantes. Le phosphore est fortement impliqué dans la division cellulaire, la transmission de l'information génétique, le transfert et le stockage d'énergie et aussi dans le système photosynthétique. Toutes ces propriétés font de cet élément l'un des trois macronutriments (avec l'azote (N) et le potassium (K)) nécessaires pour la croissance et le développement des plantes. La disponibilité du phosphore influe fortement sur le processus par lequel les organismes photosynthétiques fixent le carbone inorganique au niveau de la biomasse cellulaire. La flore microbienne du sol a un rôle essentiel dans le cycle du P, car elle établit un lien entre le réservoir de P dans l'environnement vivant et non vivant. Certains microorganismes facilitent, en effet, l'altération, la minéralisation et la solubilisation des différentes formes de P, rendant l'orthophosphate à la disposition des communautés microbiennes et végétales.

En effet, en plus d'agir comme des réservoirs de P dans l'environnement, les microorganismes contribuent à la transformation du P dans les autres réservoirs, comme dans le sol ou dans les environnements aquatiques environnants. Habituellement les phosphates précipitent en raison de l'abondance de cations dans l'eau interstitielle des sédiments de mangrove rendant le phosphore largement inaccessible aux plantes. La solubilisation du phosphate par la flore microbienne joue un rôle important dans la conversion du P insoluble en P soluble. En effet, il a été démontré que certaines bactéries du sol sont impliquées dans la solubilisation des phosphates insolubles. Ces bactéries bénéficient directement du P biodisponible nécessaire pour leur croissance. De même, d'autres organismes sont en mesure de profiter du P solubilisé, tels que les champignons et les plantes supérieures. Notons que les bactéries qui solubilisent les phosphates produisent des acides organiques et relâchent des protons, qui à travers leurs groupements carboxyliques, chélatent les cations fixés aux phosphates insolubles ce qui permet de les convertir en formes solubles (mono et dibasiques) (Holguin et al., 2001). Ainsi les bactéries en tant que fournisseurs potentiels des formes solubles du phosphore, sont d'une très grande importance pour les plantes de mangrove. Les conditions généralement

anoxiques des sédiments sous la zone aérobie auraient tendance à favoriser la dissolution de phosphate non soluble à travers la production de sulfure. Toutefois, selon le degré d'aération de la rhizosphère par translocation d'oxygène des racines, les bactéries sont susceptibles de solubiliser les phosphates au niveau des racines où les sédiments ne sont pas toujours complètement anoxiques.

II.4.3 Les bactéries sulfato-réductrices

Les sédiments de mangrove sont principalement anaérobies avec une mince couche sous-jacente de sédiments aérobie. La dégradation de matières organiques dans la zone aérobie se produit principalement par le biais de la respiration aérobie tandis que dans la zone anaérobie la décomposition de la couche se fait principalement par réduction du sulfate (Sherman et al., 1998). La réduction du sulfate représente près de 100% de l'émission totale du CO₂ des sédiments (Kristensen et al., 1991). Le taux de réduction des sulfates dépend de la disponibilité de la matière organique et des processus physiques qui affectent le mélange et le mouillage des sédiments superficiels. Dans les sédiments de mangroves, la disponibilité du fer et du phosphore peut dépendre de l'activité des bactéries sulfato-réductrices. Dans des conditions aérobie, le phosphate dissous réagit avec l'oxyhydroxyde de fer pour donner un complexe FeOOH-PO₄ insoluble. Lorsque le sulfate est réduit par les bactéries sulfato-réductrices, les composés soufrés solubles tels que H₂S et HS sont produits. Ces composés soufrés solubles réagissent avec le fer, ce qui réduit le Fe(III) en Fe(II) pour donner la pyrite (FeS₂). La pyrite est le principal produit de la réduction du sulfate dans les marais salants (Sherman et al., 1998). La réduction de Fe(III) en Fe(II) libère le phosphate soluble. Il semble que les bactéries sulfato-réductrices, principaux agents de décomposition de la matière organique dans les sédiments anaérobies, jouent un rôle majeur dans la minéralisation du soufre organique et dans la production de fer et de phosphore solubles utilisés par les organismes dans les écosystèmes de mangroves. Les bactéries sulfato-réductrices peuvent également contribuer au bien-être de l'écosystème en fixant l'azote.

II.4.4 Les bactéries photosynthétiques anoxygéniques

Les bactéries pourpres sulfureuses (aussi appelée bactéries phototrophes sulfo-oxydantes) sont des bactéries primitives. Elles font partie de la famille des bactéries photosynthétiques avec les bactéries vertes sulfureuses et les cyanobactéries. Les bactéries photosynthétiques anoxygéniques ne produisent pas d'oxygène comme un produit de la photosynthèse et utilisent le sulfure d'hydrogène (ou autre soufre inorganique réduit) à la place de l'eau en tant que donneur d'électron dans la réaction: $\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{S} \rightarrow \text{CH}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O} + 2\text{S}$. Les écosystèmes de mangrove sont riches en soufre. Les sols sont principalement anaérobies et offrent des conditions favorables à la prolifération de ces bactéries. Plusieurs souches bactériennes appartenant à la famille des Chromatiaceae (bactéries pourpres sulfureuses) et Rhodospirillaceae (bactéries pourpres non sulfureuses) ont été isolées de certains sédiments de mangrove (Vethanayagam et Krishnamurthy, 1995). Les bactéries appartenant aux

genres *Chloronema*, *Chromatium*, *Beggiatoa*, *Thiopedia*, et *Leucothiobacteria* ont également été identifiées dans les sédiments des mangroves. Certaines bactéries photosynthétiques sont anoxygéniques et également diazotrophes. Les bactéries du genre *Rhodospirillaceae* et les cyanobactéries non-hétérocystées sont probablement responsables des deux tiers de la fixation de N₂ associés aux feuilles en décomposition de *Rizophora mangle* (Holguin et al. 2001). Les bactéries photosynthétiques anoxygéniques qui sont les organismes photosynthétiques prédominantes dans les milieux anaérobies, peuvent contribuer à la productivité de la mangrove. Dans les estuaires, une grande partie du carbone fixé par la photosynthèse est probablement déposée dans les sédiments et minéralisée par voie anaérobie par des bactéries. L'énergie dérivée de ces processus soutient la croissance bactérienne, qui à son tour donne des produits qui peuvent fournir de l'énergie aux invertébrés et aux poissons via les chaînes alimentaires détritiques.

II.4.5 Les bactéries méthanogènes

La présence des bactéries méthanogènes dans la communauté bactérienne des écosystèmes de mangroves est très importante. Leur nombre est fonction des conditions du milieu tels que la température, le pH, le potentiel redox, la salinité de l'eau et les sédiments (Mohanraju et Natarajan, 1992). Leur population fluctue au cours de l'année entre $3,6 \times 10^2$ à $1,1 \times 10^5$ CFU par gramme de matières fraîches. La présence de bactéries sulfato-réductrices limite la prolifération de ces bactéries (Ramamurthy et al., 1990). Une souche de la bactérie méthanogène, *Methanocoides methylutens* (Mohanraju et al., 1997), et quatre souches de bactéries méthanogènes thermotolérants non identifiés (Marty, 1985) ont été isolées à partir des sédiments d'une forêt de mangrove. Selon Giani et al., (1996), les sols des mangroves possèdent un potentiel d'émission du méthane assez élevé quand il y a de l'activité anthropogénique.

II.4.6 Les champignons

Plus d'une centaine d'espèces de champignons ont été identifiés dans différentes communautés de mangroves. Ils sont capables de synthétiser toutes les enzymes nécessaires pour dégrader la lignine et la cellulose (Bremer, 1995). Les champignons commencent la décomposition de la matière végétale et permettent ainsi la colonisation par des bactéries secondaires et les levures qui la décomposent en matière organique (Holguin et al., 2001). Ainsi, l'intérêt des champignons en bioremédiation de polluants très hydrophobes comme les HAP réside en grande partie dans leurs enzymes lignolytiques extracellulaires. Ces dernières peuvent en effet diffuser jusqu'aux micropolluants non dissous et initier l'étape d'oxydation, les rendant par la suite hydrosolubles et accessibles aux bactéries dégradantes. Par ailleurs, les enzymes lignolytiques ne sont pas spécifiques, du fait de la diversité des noyaux aromatiques polymérisés constituant la lignine, et peuvent oxyder une grande diversité de composés organiques (Gianfreda et Rao, 2004). La biodégradation des HAP dans les sols, en particulier celle des

HAP «lourds», résulterait en réalité de clivages séquentiels des cycles aromatiques, initiés par les champignons et pris en charge ensuite par les cultures mixtes bactériennes (Boonchan et al., 2000).

II.5 Impacts de la pollution pétrolière sur un écosystème de mangrove

Les déversements d'hydrocarbures peuvent avoir des répercussions sérieuses sur les écosystèmes de mangroves, tant par engluement physique que par toxicité. La sévérité de l'impact dépend généralement de la quantité et du type d'hydrocarbure déversé, des conditions ambiantes, ainsi que de la sensibilité aux hydrocarbures des organismes touchés et de leurs habitats (Duke et al., 2000). La pollution des mangroves peut entraîner la destruction des palétuviers et mettre ainsi en difficulté la survie de la faune associée (crabes, huîtres et autres invertébrés). Cette pollution conduit à la destruction de leurs habitats ainsi que d'importantes frayères et nourricières pour les poissons et les crevettes (Holguin et al., 2001). En outre, du fait de la présence des hydrocarbures dans les mangroves, il devient difficile à la structure des racines des palétuviers de jouer leurs rôles de piégeage et de stabilisateur des sédiments, de réduire l'érosion des littoraux et de minimiser le dépôt de sédiments terrestres sur les herbiers et récifs coralliens voisins. Les palétuviers poussent généralement sur des sédiments anaérobies vaseux, denses et dépendent de l'apport d'oxygène par les petits pores de leurs racines aériennes, appelés lenticelles. Selon le rapport ITOPF (2013), le recouvrement des systèmes racinaires aériens par des hydrocarbures peut bloquer l'arrivée d'oxygène et causer la mort des palétuviers. Cependant, dans les sédiments aérés ouverts, qui permettent un échange d'eau relativement libre, les systèmes de racines tirent l'oxygène de l'eau de mer et tolèrent donc davantage l'engluement par les hydrocarbures. Dans ce second mécanisme, les composants toxiques des hydrocarbures, notamment des produits raffinés légers, perturbent les systèmes de maintien de la salinité des végétaux, affectant ainsi leur tolérance à l'eau salée. La mortalité des palétuviers due à l'engluement par des hydrocarbures lourds paraît moins probable que la mortalité due à la couverture par des produits plus légers qui peuvent induire une perte localisée de la couverture arborée. Les organismes qui vivent dans l'écosystème des mangroves peuvent subir à la fois les effets directs des hydrocarbures et, à plus long terme, la perte de leur habitat (Leahy et Colwell, 1990).

Selon Holguin et al. (2001), les bactéries et les champignons représentent 91% de la biomasse microbienne totale des mangroves tropicales, alors que les algues et les protozoaires ne représentent que 7% et 2%, respectivement. Cette microflore subit parfois de façon irréversible les effets néfastes de la pollution. Les hydrocarbures présents dans le milieu sont cytotoxiques. Ils affectent négativement les fonctions microbiennes par destruction de leur membrane cytoplasmique entraînant une réduction de la biomasse microbienne, l'activité enzymatique du sol et la réduction des populations de micro algues (Megharaj, et al., 2000). Les hydrocarbures sont également mutagènes pour les microorganismes dans les mangroves. (Horn, et al., 2004). Si le rétablissement naturel de l'écosystème complexe des mangroves peut demander beaucoup de temps, diverses mesures de réhabilitation offrent un réel potentiel d'accélération. La biostimulation et la bioaugmentation sont des

traitements par voie biologique par lesquels les pouvoirs d'assimilation des hydrocarbures des microorganismes sont utilisés pour épurer les écosystèmes des mangroves.

II.6 Influence des éléments nutritifs sur la biodégradation des hydrocarbures

La dégradation optimale des hydrocarbures passe par la surveillance de certains facteurs du milieu dont le pH, la température, l'aération et la présence des nutriments. Le pH semble ne pas jouer un rôle particulièrement important du fait que les microorganismes adaptés à la dégradation des hydrocarbures, seront différents suivant que le milieu est acide (levures, champignons), neutre ou basique (bactéries) ; de même, la biodégradation est possible aussi bien en milieu aérobie qu'en milieu anaérobie. La température dans les écosystèmes de mangroves oscille entre 25°C et 35°C, ce qui est idéal pour la croissance bactérienne. Par contre, l'absence des nutriments (azote et phosphore organiques) ralentit et bloque le processus de dégradation des hydrocarbures par les microorganismes.

Le rejet des hydrocarbures dans les environnements qui contiennent des éléments nutritifs inorganiques en faibles concentrations, conduit généralement à des rapports carbone/azote et carbone/phosphore très élevés, défavorables pour la croissance microbienne (Leahy et Colwell, 1990). Ces éléments sont présents sous forme de composés hétérocycliques (exemple des dérivés de la pyridine et du pyrrole pour l'azote) ou organométalliques complexes. Selon Bertrand et Mille (1989), ces deux formes ne sont pas utilisables par les microorganismes. Dans ce cas, l'azote et le phosphore constituent des facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures dans les sédiments. S'il convient de dire que les hydrocarbures constituent une source importante de carbone bien que ne contenant ni azote, ni phosphore disponibles pour les microorganismes, il faut reconnaître que leur présence dans les sédiments des mangroves, peut engendrer à moyen terme une réduction significative de la quantité de nutriments disponibles pour les plantes dans les sols (Xu et al., 1997). En effet, selon Kaye et Hart (1997), lorsque les microorganismes dégradent les hydrocarbures, ils puisent en même temps les nutriments disponibles dans le milieu, entraînant des déficiences et accentuant les phénomènes de compétition préexistants. De plus, la contamination en hydrocarbures peut être toxique pour certaines populations bactériennes et fongiques impliquées dans les cycles biogéochimiques, amplifiant les carences des plantes en nutriments (Muratova et al., 2003). En général, un ratio C/N/P de 120/10/1 [mg] est considéré comme optimal pour la croissance des bactéries en présence de contaminants (Wilson et Jones, 1993). De manière plus spécifique à la bioremédiation des sols, la plupart des études font état d'un ratio C/N/P optimal de 120/14/3 [mg] soit 100/10/1 [mole] (Bouchez et al., 1995).

II.7 Les nutriments dans les écosystèmes de mangroves

Pour comprendre le flux des nutriments dans les écosystèmes de mangroves, deux modèles de base peuvent être approchés : celui de Bano et al. (1997) et celui de Holguin et al. (2001). Le modèle de Bano (Figure 1) démontre que les bactéries sont les seules pourvoyeuses des nutriments (azote et phosphore organiques) aux protozoaires et métazoaires jusqu'aux organismes de niveau trophique

supérieur. Selon ce modèle, l'énergie nécessaire aux réactions chimiques devant aboutir à la transformation de l'azote et du phosphore inorganiques sous leurs formes organiques est libérée par les détritiques produits par la mangrove. En effet les détritiques fournissent de l'énergie aux bactéries à travers la matière organique particulaire ou dissoute. Ainsi les bactéries à leur tour ont la possibilité de fixer et de rendre soluble l'azote et le phosphore inorganiques. Ces bactéries sont ensuite consommées par les protozoaires et métazoaires. Les deux nutriments (azote et phosphore) vont se retrouver au niveau trophique supérieur à travers le mécanisme fonctionnel de la chaîne alimentaire. Ainsi ce modèle très simplifié stipule que le dépérissement des forêts de mangroves pourrait avoir un impact majeur sur la structure, le fonctionnement et la productivité de cet écosystème.

Par contre le modèle de Holguin et al. (Figure 2), s'appuie sur le rôle que jouent plusieurs groupes bactériens (cycle de l'azote, la solubilisation du phosphate, la sulfato-réduction, la photosynthèse aérobie et bactéries méthanogènes) et les champignons dans la survie et le développement de l'écosystème des mangroves en considérant en fin de compte la flore et la faune comme consommateurs des produits d'origine bactérienne. La bactérie étant bien sûr à la base de la chaîne alimentaire des animaux marins. Selon ce modèle, la structure microbienne et la fonction de l'écosystème de mangroves sont étroitement liées pour le bien-être des écosystèmes de mangroves. En effet, les organismes de niveau trophique supérieur seront gravement touchés si la structure et la fonction de ces microorganismes sont perturbées ou détruites.

Les deux modèles complémentaires développées par ces auteurs nous emmènent à conclure que la destruction des forêts de mangroves (modèle de Bano) et la rupture partielle de l'activité microbienne (modèle de Holguin) auront un impact négatif majeur sur la productivité de la mangrove. Les hydrocarbures présents dans les eaux et les sédiments des mangroves sont des polluants qui de par leurs effets négatifs sur les palétuviers et les communautés microbiennes peuvent impacter négativement la productivité des mangroves.

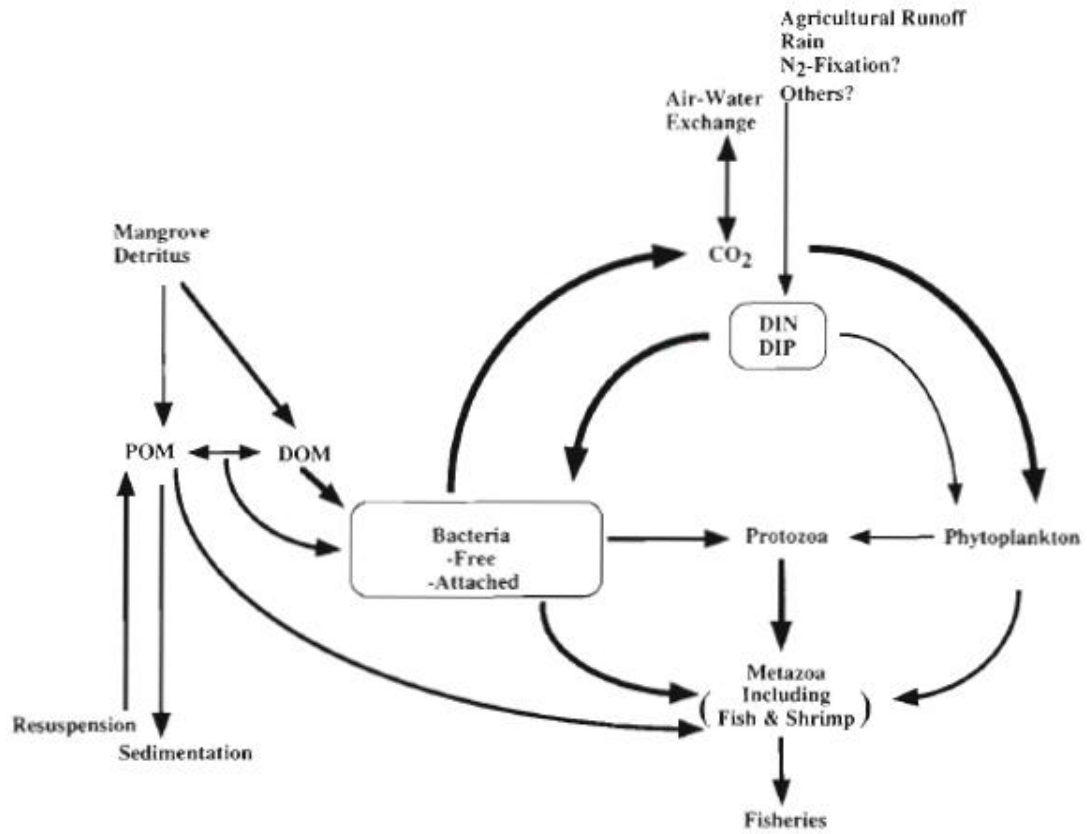


Figure 1: Modèle conceptuel des principaux flux de carbone induits par des bactéries hétérotrophes dans un écosystème de mangroves. POM, DOM: particulate and dissolved organic matter; DIN, DIP: Dissolved Inorganic Nitrogen and Phosphorus (Bano et al., 1997).

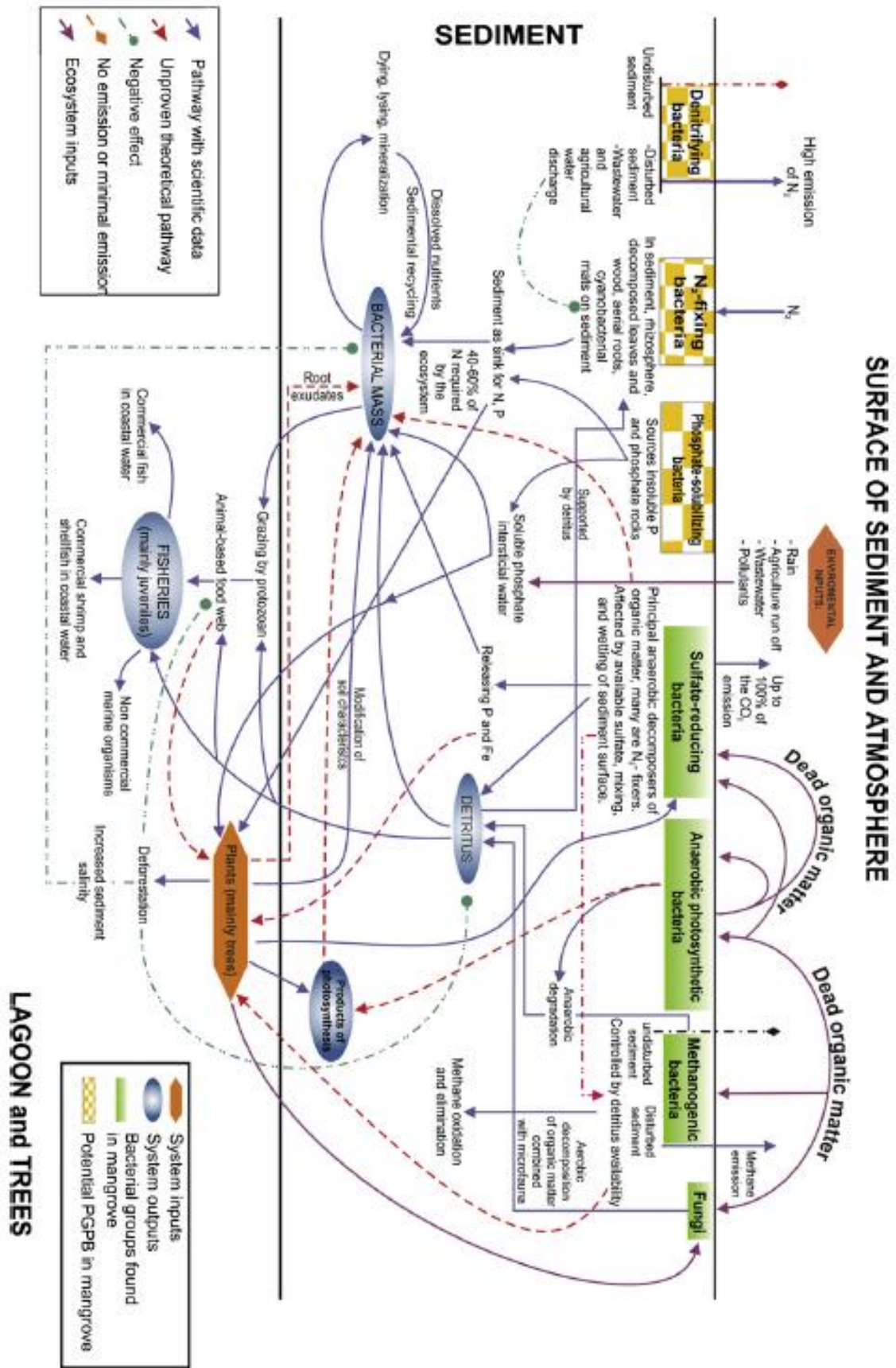


Figure 2: Modèle conceptuel des interactions microbiennes dans un écosystème de mangrove (Holguin et al., 2001)

II.8 Apport des nutriments dans le processus de biodégradation des hydrocarbures

Dans la littérature, les recherches sur l'apport des nutriments tels que l'azote et le phosphore dans les processus de dégradation des hydrocarbures par voie microbienne ont suscité plusieurs débats. Plusieurs chercheurs (Atlas et Bartha, 1972 ; Bartha et Atlas, 1973 ; Floodgate, 1973 ; Floodgate, 1979 ; Gunkel, 1967 ; LePetit et Barthelemy, 1968 ; LePetit et N'Guyen, 1976) ont indiqué que les concentrations d'azote et de phosphore disponibles dans les eaux de mer sont très restrictives à la biodégradation des hydrocarbures. D'autres par contre (Kinney et al., 1969), affirment que l'azote et le phosphore sont des facteurs qui accélèrent le processus de biodégradation des hydrocarbures dans les eaux de mer. La différence de résultats est paradoxale et semble être basée sur les études visant à évaluer la biodégradation des hydrocarbures solubles dans un microcosme. En effet, lors de ces études, malgré la disponibilité du carbone apporté par les hydrocarbures pour la croissance microbienne, on a constaté que les microorganismes ont besoin de l'azote et du phosphore pour incorporer ce carbone.

La disponibilité de ces deux éléments nutritifs à l'intérieur du microcosme contenant les hydrocarbures est très importante. Dans les écosystèmes marins, le mélange entre les nutriments et les hydrocarbures se fait par l'intermédiaire des vagues qui provoquent des turbulences au niveau des eaux de mer. Mais dans de nombreux cas, l'apport de l'azote et du phosphore dépend de la diffusion de la nappe de pétrole. Les taux de diffusion peuvent être inadéquats pour fournir suffisamment de l'azote et du phosphore afin d'établir des rapports C/N et C/P optimaux pour la croissance et le métabolisme microbiens. Les chercheurs qui étudient le devenir des grands déversements de pétrole ont ainsi correctement conclu dans de nombreux cas, que les concentrations de N et P sont restrictives à l'égard des taux de biodégradation des hydrocarbures. En effet, l'efficacité de N et de P ne se fait sentir que lorsque leurs concentrations dans le milieu permettent l'établissement d'un rapport C/N ou C/P favorable. Ceci permet d'obtenir de meilleurs taux de dégradation des hydrocarbures.

Floodgate (1979), en tenant compte de la disponibilité des nutriments dans le processus de biodégradation des hydrocarbures dans les écosystèmes marins, a proposé le concept de détermination de la «demande d'azote», analogue au concept de la demande biochimique en oxygène (DBO). Il a ainsi déterminé que dans les écosystèmes marins à basse température (14°C), la demande d'azote nécessaire est de 4 μmol d'azote pour 1mg de pétrole brut. Bridie et Bos (1971) ont déterminé que l'addition de 3,2 mg d'azote d'ammonium et 0,6 mg de phosphate sont les taux maximaux admis pour la dégradation du pétrole brut dans l'eau de mer à une concentration de 70 mg/L de pétrole. Atlas et Bartha (1972) ont démontré que les concentrations de 1 mg d'azote et 0,07 mg de phosphore par litre sont suffisantes pour la dégradation maximale du pétrole brut dans l'eau de mer avec une concentration de 8 g/L de pétrole. Reisfeld et al. (1972), ont déclaré que les concentrations optimales d'azote et de phosphore sont de 11 et 2 mg/L respectivement pour la dégradation de 1 g/L de pétrole brut dans l'eau de mer. Colwell et al. (1978), ont conclu que le pétrole se dégrade lentement dans l'environnement marin, probablement en raison des limitations imposées par des concentrations relativement faibles de l'azote et de phosphore disponibles dans l'eau de mer. Ward et Brock (1976)

ont déclaré que, bien que la température soit le principal facteur limitant durant plusieurs années, les carences en éléments nutritifs en été ont limité la biodégradation du pétrole dans les lacs tempérés. Des taux plus élevés de biodégradation du pétrole pourraient être obtenus par l'addition d'azote et de phosphore. Les taux élevés de dégradation des hydrocarbures étaient relevés seulement pendant un mois de l'année où la température et l'apport de nutriments étaient optimaux. Ils ont conclu que la disponibilité de microorganismes métabolisant les hydrocarbures au sein de la communauté microbienne indigène n'était pas un facteur limitant mais plutôt les facteurs environnementaux que sont la température et la disponibilité des nutriments.

LePetit et N'Guyen (1976) ont constaté que la stimulation artificielle des bactéries dégradant les hydrocarbures nécessite l'addition de phosphore dans l'eau de mer. Ils ont signalé des concentrations optimales de phosphore pour soutenir la dégradation des hydrocarbures comprise entre 2×10^{-4} et 8×10^{-4} M pour l'eau de mer et entre $1,5 \times 10^{-3}$ et 3×10^{-3} M pour les eaux côtières recevant un apport important de l'eau douce. Cependant l'inhibition du développement bactérien a été observée avec des concentrations plus élevées de phosphate. Gibbs (1975) a calculé que 1m^3 d'eau de mer contient une quantité d'azote suffisante pour dégrader 30 g de pétrole par an à des températures d'été et 11 g de pétrole par an à des températures d'hiver. Bergstein et Vestal (1978) ont étudié la biodégradation de pétrole brut dans les étangs de la toundra en Arctique. Ils ont conclu que les fertilisants oléophiles peuvent constituer un outil intéressant pour améliorer la biodégradation du pétrole brut déversé dans des milieux marins oligotrophes. Dans ces milieux, sans addition d'azote et de phosphore, la biodégradation des hydrocarbures est très limitée. Atlas et Bartha (1973) ont décrit que les engrais oléophiles contenant l'azote et le phosphore pourraient relever les concentrations d'azote et de phosphore dans l'eau de mer et de stimuler la biodégradation de pétrole dans l'eau de mer. Les engrais constitués d'urée de paraffines et d'octylphosphate avec des rapports optimaux C/N et C/P de 10:1 et 100:1 respectivement, peuvent booster la dégradation de pétrole dans les eaux de mer. Olivieri et al. (1976) ont démontré qu'une libération lente des engrais contenant du magnésium de paraffine avec le phosphate d'ammonium comme ingrédients actifs favorise la biodégradation du pétrole. Ils ont indiqué que la biodégradation du pétrole brut dans l'eau de mer a été considérablement renforcée par addition des engrais contenant de la paraffine. Après 21 jours, ils ont noté une dégradation de 63% de pétrole avec ajout d'engrais par rapport à 40% en zone de contrôle. Kator et al. (1972) ont suggéré l'utilisation de l'ammonium paraffiné et les sels de phosphate pour améliorer la biodégradation du pétrole dans l'eau de mer. Raymond et al. (1976) ont été capables de stimuler la dégradation microbienne des hydrocarbures dans les eaux souterraines contaminées par des procédures qui comprenait l'addition des nutriments tels que l'azote et le phosphore. Une étude comparative a été menée par Dibble et Bartha (1976) en vue d'examiner l'effet du fer sur la biodégradation du pétrole dans l'eau de mer du Sud de Louisiane et les effets combinés de l'azote, du phosphore, et des suppléments de fer sur la biodégradation du pétrole brut dans l'eau de mer du littoral pollué et relativement propre recueillies le long de la côte du New Jersey. Les résultats ont montré que le taux

de dégradation était négligeable dans les échantillons d'eau de mer du Sud de Louisiane. L'addition de l'azote et du phosphore a permis une dégradation très rapide du pétrole dans les échantillons du New Jersey où on a relevé après trois jours, un taux de dégradation du brut de 73%. La quantité de fer total relevée dans les échantillons de Louisiane était de 5,2 mM et l'ajout du fer dans les échantillons du New Jersey n'a eu aucun effet sur le taux de dégradation constaté. Dans le même temps, avec des échantillons d'eau de mer du Sud de Louisiane moins pollués et moins riches en fer (1,2 mM de fer), le taux de dégradation du pétrole brut relevé après trois jours est de 21%. Ces auteurs ont conclu que la biodégradation du brut dans les eaux de mer de Louisiane serait plus rapide et efficace avec l'ajout de l'azote et du phosphore à condition que les températures soient favorables. Dibble et Bartha (1979) ont examiné l'effet des facteurs environnementaux sur la biodégradation des boues d'hydrocarbures. Ils ont mené une étude en laboratoire visant à évaluer et à optimiser les facteurs environnementaux dans les terres agricoles exposées à la pollution par des boues d'hydrocarbures issues du raffinage du pétrole brut et dont soumises à un processus de biodégradation. Ils ont constaté que la biodégradation des boues d'hydrocarbures était optimale sur des terres ayant une capacité de rétention d'eau de 30 à 90%, un pH de 7,5 à 7,8, un rapport C/N de 60: 1, et un rapport C/P de 800:1. Les températures optimales sont de 20 °C et plus. Les exemples ci-dessus montrent que l'azote et le phosphore sont des facteurs limitants de la biodégradation. Leur disponibilité à des concentrations suffisantes combinée à une température optimale stimule la croissance microbienne et accélère la dégradation des hydrocarbures.

II.9 Conclusion

Les mangroves sont des écosystèmes particuliers de par leur structure et leur fonctionnement. Elles renferment en leur sein une microflore abondante et diversifiée dont le rôle est de synthétiser les éléments nutritifs utiles pour l'ensemble de la chaîne alimentaire spécifique à cet écosystème. La structure fonctionnelle de l'écosystème des mangroves génère une intense activité microbienne que l'on ne retrouve nulle part ailleurs. Cette spécificité se caractérise également par l'extrême sensibilité de cette microflore aux changements du milieu. Les microorganismes jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre des mangroves. La rupture de cet équilibre entraîne un dysfonctionnement dans l'alimentation et le flux des nutriments produits par la microflore, vers les niveaux trophiques supérieurs. Les conséquences de cette rupture pouvant provoquer le dépérissement des palétuviers. La restauration de l'écosystème devra passer par des techniques qui favorisent une approche fonctionnelle intégrée du système. La dégradation des substances pétrolières par voie biologique appelle un certain nombre de techniques dont l'atténuation naturelle, la biostimulation et la bioaugmentation. Ces techniques doivent être mises en œuvre dans une approche intégrée. La biostimulation ne doit être envisagée que si le manque ou l'insuffisance des nutriments dans le milieu constitue un facteur limitant à la biodégradation. De même, la bioaugmentation ne peut être envisagée que si les capacités dégradatives de la microflore endogène sont insuffisantes. Avant d'envisager un traitement par voie biologique, il est nécessaire d'effectuer des analyses spécifiques sur la microflore endogène spécifique

apte à dégrader les hydrocarbures, les facteurs limitants (pH, température, apport en quantité suffisante des nutriments, etc.), l'accessibilité et la toxicité du polluant et la disponibilité des accepteurs finaux d'électrons. De ces analyses préalables dépendent le succès de la biodégradation des hydrocarbures dans les écosystèmes de mangroves.

Références

- Alongi DM. 1994. The role of bacteria in nutrient recycling in tropical mangrove and other coastal benthic ecosystems. *Hydrobiologia*, **285**: 19–32.
- Alongi DM, Boto KG, Tirendi F. 1989. Effect of exported mangrove litter on bacterial productivity and dissolved organic carbon fluxes in adjacent tropical nearshore sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **56**: 133–144.
- Atlas RM, Bartha R. 1973. Stimulated biodegradation of oil slicks using oleophilic fertilizers. *Environ. Sci. Technol.*, **7**: 538-541.
- Atlas RM, Bartha R. 1972. Degradation and mineralization of petroleum in seawater: limitation by nitrogen and phosphorus. *Biotechnol. Bioeng.*, **14**: 309-317.
- Bano N, Nisa MU, Khan N, Saleem M, Harrison PJ, Ahmed SI, Azam F. 1997. Significance of bacteria in the flux of organic matter in tidal creeks of mangrove ecosystem of the Indus River delta, Pakistan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **157**: 1–12.
- Bartha R, Atlas RM. 1973. Biodegradation of oil in seawater: limiting factors and artificial stimulation. In *The microbial degradation of oil pollutants*, Ahearn DG and Meyers SP (eds). Center for Wetland Resources, Louisiana State University, Baton Rouge; 147-152.
- Bergstein PE, Vestal JR. 1978. Crude oil biodegradation in Arctic tundra ponds. *Arctic*, **31**: 158-169.
- Bertrand JC, Mille G. 1989. Devenir de la matière organique exogène. Un modèle : les hydrocarbures. In *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*, Bianchi, M (ed.), Paris : Masson ; 343-385.
- Blum LK, Mills AL, Zieman JC, Zieman RT. 1988. Abundance of bacteria and fungi in seagrass and mangrove detritus. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **42**: 73–78.
- Boonchan S, Britz ML, Stanley GA. 2000. Degradation and Mineralization of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(3): 1007-1019.
- Bouchez M, Blanchet D, Vandecasteele JP. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**(1): 156-164.
- Bremer GB. 1995. Lower marine fungi (*Labyrinthulomycetes*) and the decay of mangrove leaf litter. *Hydrobiologia*, **295**: 89–95.
- Bridie AL, Bos J. 1971. Biological degradation of mineral oil in seawater. *J. Inst. Pet.*, London **57**, 270-277.
- Colwell RRR, Mills AL, Walker JD, Garcia-Tello P, Campos PV. 1978. Microbial ecology studies of the Metula spill in the Straits of Magellan. *J. Fish. Res. Board Can.*, **35**: 573-580.
- D’Croz L, Del Rosario J, Holness R. 1989. Degradation of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) leaves in the Bay of Panama. *Rev. Biol. Trop.*, **37**, 101–104.
- Dibble JT, Bartha R. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**: 729-739.

- Dibble JT, Bartha R. 1976. The effect of iron on the biodegradation of petroleum in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**: 544-550.
- Duke NC, Burns KA, Swannell RPJ, Dalhaus O, Rupp RJ. 2000. Dispersant use and a bioremediation strategy as alternate means of reducing impacts of large oil spills on mangroves: The Gladstone field trials. *Mar. Pollut. Bull.*, **41**: 403-412.
- FAO 2007. The world's mangroves 1980-2005. A thematic study prepared in the framework on the Global Forest Resources Assessment 2005. Roma: *FAO Forestry Paper* **153**: 89.
- Floodgate GD. 1973. A threnody concerning the biodegradation of oil in natural waters. In *The microbial degradation of oil pollutants*, Ahearn DG, Meyers SP (eds). Center for Wetland Resources, Louisiana State University, Baton Rouge. 17-24.
- Floodgate GD. 1979. Nutrient limitation. In *Proceedings of workshop, Microbial Degradation of Pollutants in Marine Environments*, Bourquin AW, Pritchard PH (eds). Environmental Research Laboratory, Gulf Breeze, Fla. 107-118.
- Gianfreda L, Rao MA. 2004. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microbial Technol.* **35**(4): 339-354.
- Giani L, Bashan Y, Holguin G, Strangmann A. 1996. Characteristics and methanogenesis of the Balandra lagoon mangrove soils, Baja California Sur, Mexico. *Geoderma* **72**: 149-160.
- Gibbs CF. 1975. Quantitative studies in marine biodegradation of oil. Nutrient limitation at 14°C. *Proc. R. Soc. London Ser. B.*, **188**: 61-82.
- Gunkel W. 1967. Experimentell-okologische Untersuchungen uber die limitierenden Faktoren des mikrobiellen Olabbaues in marinen Milieu. *Helgol. Wiss. Meeresunters.*, **15**: 210-224.
- Holguin G, Vazquez P, Bashan Y. 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biol. Fertil. Soils*, **33**: 265-278.
- Holguin G, Bashan Y, Mendoza-Salgado RA, Amador E, Toledo G, Vazquez P, Amador A. 1999. La Microbiologia de los manglares. Bosques en la frontera entre el mar y la tierra. *Ciencia Desarrollo*, **144**: 26-35.
- Holguin G, Guzman MA, Bashan Y. 1992. Two new nitrogen-fixing bacteria from the rhizosphere of mangrove trees: their isolation, identification and in vitro interaction with rhizosphere *Staphylococcus* sp. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **101**: 207-216.
- Horn RC, Rocha JA, Vargas VM. 2004. Determination of sediment mutagenicity and cytotoxicity in an area subjected to petrochemical contamination. *Mutagenesis*, **19**(6): 445-451.
- ITOPF. 2013. Effet de la pollution par les hydrocarbures sur l'environnement. *Guide d'informations techniques 13. The International tanker Owners pollution Federation Limited (ITOPF)*, London.
- Kator H, Miget R, Oppenheimer CH. 1972. Utilization of paraffin hydrocarbons in crude oil by mixed cultures of marine bacteria. *Symposium on Environmental Conservation*. Society of Petroleum Engineers, Dallas, Tex. Paper no. SPE 4206.

- Kaye JP, Hart SC. 1997. Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends ecol. Evolut.*, **12**(4): 139-143.
- Kinney PJ, Button DK, Schell DM. 1969. Kinetics of dissipation and biodegradation of crude oil in Alaska's Cook Inlet. In *Proceedings of 1969 Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills*. American Petroleum Institute, Washington, D.C. pp. 333-340
- Kristensen E, Holmer M, Bussarawit N. 1991. Benthic metabolism and sulfate reduction in a south-east Asian mangrove swamp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **73**: 93–103.
- Leahy JG, Colwell RR. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.*, **54**: 305-315.
- LePetit J, N'Guyen MH. 1976. Besoins en phosphore des bactéries métabolisant les hydrocarbures en mer. *Can. J. Microbiol.*, **22**: 1364-1373.
- LePetit J, Barthelemy MH. 1968. Les hydrocarbures en mer le problème de l'épuration des zones littorales par les microorganismes. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, **114**: 149-158.
- Mann FD, Steinke TD. 1992. Biological nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with decomposing *Avicennia marina* leaves in the Beachwood Mangrove Nature Reserve. *S. Afr. J. Bot.*, **58**: 533–536.
- Marty DG. 1985. Description de quatre souches méthanogènes thermo tolérantes isolées de sédiments marins ou intertidaux. *C. R. Acad. Sci. III*, **300**: 545–548.
- Masepohl B, Klipp W. 1996. Organization and regulation of genes encoding the molybdenum nitrogenase and the alternative nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. *Arch. Microbiol.*, **165**: 80–90.
- Megharaj M, Singleton I, McClure NC, Naidu R. 2000. Influence of petroleum hydrocarbon contamination on microalgae and microbial activities in a long-term contaminated soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **38**(4): 439–445.
- Mohanraju R, Natarajan R. 1992. Methanogenic bacteria in mangrove sediments. *Hydrobiologia*, **247**: 187–193.
- Mohanraju R, Rajagopal BS, Daniels L, Natarajan R. 1997. Isolation and characterization of a methanogenic bacterium from mangrove sediments. *J. Mar. Biotechnol.*, **5**: 147–152.
- Muratova A, Bner T, Narula N, Wand H, Turkovskaya O, Kuschik P, Jahn R, Merbach W. 2003. Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Microbiol res.*, **158**(2): 151-161.
- Nagelkerken SJM, Blaber S, Bouillon P, Green M, Haywood LG, Kirton JO, Meynecke J, Pawlik HM, Penrose A, Sasekumar PJ, Somerfield. 2008. The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. *Aquatic Botany*, **89**: 155–185.
- Odum WE, Heald EJ. 1975. Mangrove forests and aquatic productivity. In *Coupling of land and water systems*, Hasler AD (ed) Ecological studies, Springer, Berlin Heidelberg New York; 129-136.
- Olivieri R, Bacchin P, Robertiello A, Oddo N, Degen L, Tonolo A. 1976. Microbial degradation of oil spills enhanced by a slow-release fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**: 629-64.

- Ramamurthy T, Raju RM, Natarajan R. 1990. Distribution and ecology of methanogenic bacteria in mangrove sediments of Pitchavaram, east coast of India. *Indian J. Mar. Sci.*, **19**: 269-273.
- Raymond RL, Jamison VW, Hudson JO. 1976. Beneficial stimulation of bacterial activity in ground waters containing petroleum products. American Institute of Chemical Engineers, New York. 319-327.
- Reisfeld A, Rosenberg E, Gutnick D. 1972. Microbial degradation of oil: factors affecting oil dispersion in seawater by mixed and pure cultures. *Appl. Microbiol.*, **24**: 363-368.
- Robertson AI, Daniel PA. 1989. Decomposition and the annual flux of detritus from fallen timber in tropical mangrove forests. *Limnol. Oceanogr.* **34**: 640-646.
- Sathirathai S, Barbier EB. 2005. Valuing mangrove conservation in Southern Thailand. *Contemp. Econ. Policy.*, **19**(2): 109-122.
- Schaffelke B, Campbell ML, Hewitt CL. 2005. Reproductive phenology of the introduced kelp *undaria pinnatifida* (Phaeophyta Laminariales) in Tasmania, Australia. *Phycologia*, **44**: 84-94.
- Sherman RE, Fahey TJ, Howarth RW. 1998. Soil-plant interactions in a neotropical mangrove forest: iron, phosphorus and sulfur dynamics. *Oecologia*, **115**: 553-563.
- Snedaker SC. 1978. Les mangroves: leur intérêt et leur conservation. *Nature et Ressources Paris*, **14**(3): 7-15.
- Spalding MD, Blasco F, Field CD. 1997. World Mangrove Atlas. In *International Society for Mangrove Ecosystems*, (eds.), Okinawa, Japon. 178 pages.
- Steinke TD, Barnabas AD, Somaru R. 1990. Structural changes and associated microbial activity accompanying decomposition of mangrove leaves in Mgeni Estuary. *S. Afr. J. Bot.*, **56**: 39-48.
- Tanaka N, Sasaki Y, Mowjood M, Jinadasa K, Homchuen S. 2007. Coastal vegetation structures and their functions in tsunami protection: experience of the recent Indian Ocean tsunami. *Landsc. Ecol. Eng.*, **3**(1): 33-45.
- Valiela I, Bowen JL, York JK. 2001. Mangrove forests: one of the world's threatened major tropical environments. *BioSci.*, **51**(10), 807-815.
- Vazquez P, Holguin G, Puente ME, Lopez-Cortes A, Bashan Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biol. Fertil. Soils.*, **30**: 460-468.
- Vethanayagam RR, Krishnamurthy K. 1995. Studies on anoxygenic photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas* sp. from the tropical mangrove environment. *Ind. J. Mar. Sci.*, **24**: 19-23.
- Walters BB, Rönnbäck P, Kovacs J, Crona B, Hussain S, Badola R, Primavera J, Barbier EB, Dahdouh-Guebas F. 2008. Ethnobiology, socio-economics and adaptive management of mangroves: a review. *Aquatic Bot.*, **89**(2): 220-236.
- Ward DM, Brock TD. 1976. Environmental factors influencing the rate of hydrocarbon oxidation in temperate lakes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**: 764-772.
- Wilson SC, Jones KC. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ. Pollut.*, **81**(3): 229-49.

Xu JG, Johnson RL. 1997. Nitrogen dynamics in soils with different hydrocarbon contents planted to barley and field pea. *Can. J. Soil Sci.*, **77**(3): 453-458.

**PARTIE II: OBJECTIFS ET CADRE
CONCEPTUEL DE RECHERCHE**

CHAPITRE III : OBJECTIFS ET CADRE CONCEPTUEL DE RECHERCHE

III.1 Objectifs de recherche

Les forêts de mangrove revêtent une importance capitale du fait de leur position et du rôle qu'elles jouent dans le maintien et l'équilibre des côtes des régions tropicales et subtropicales. La pollution qu'elle soit naturelle ou accidentelle causée par les hydrocarbures et autres produits pétroliers raffinés entraîne le dépérissement de ces forêts. L'élimination de ces polluants entraîne la survie des mangroves. Plusieurs techniques physicochimiques et biologiques sont utilisées pour éliminer les hydrocarbures de ces écosystèmes. Les techniques biologiques in situ de traitement des écosystèmes pollués ou contaminés favorisent la biodégradation des hydrocarbures au moyen des microorganismes endogènes (présents dans le milieu) ou exogènes (étrangers au milieu). Les techniques biologiques paraissent plus adaptées aux mangroves du fait de leur particularité. Au cours de cette recherche l'accent a été mis sur la technique de bioremédiation. Plusieurs études ont démontré la possibilité de dégrader de façon biologique les écosystèmes de mangroves polluées par les hydrocarbures. Cette étude a pour objectifs :

- 1- D'évaluer la capacité des microorganismes endogènes à dégrader les hydrocarbures ;
- 2- De montrer l'efficacité des microorganismes endogènes par rapport aux microorganismes exogènes ;
- 3- De mettre au point une méthode de dépollution des hydrocarbures.

III.2 Stratégie de recherche

Pour atteindre ces objectifs, un cadre conceptuel de recherche a été défini. Ce cadre renferme diverses activités comme le montre la figure ci-dessous :

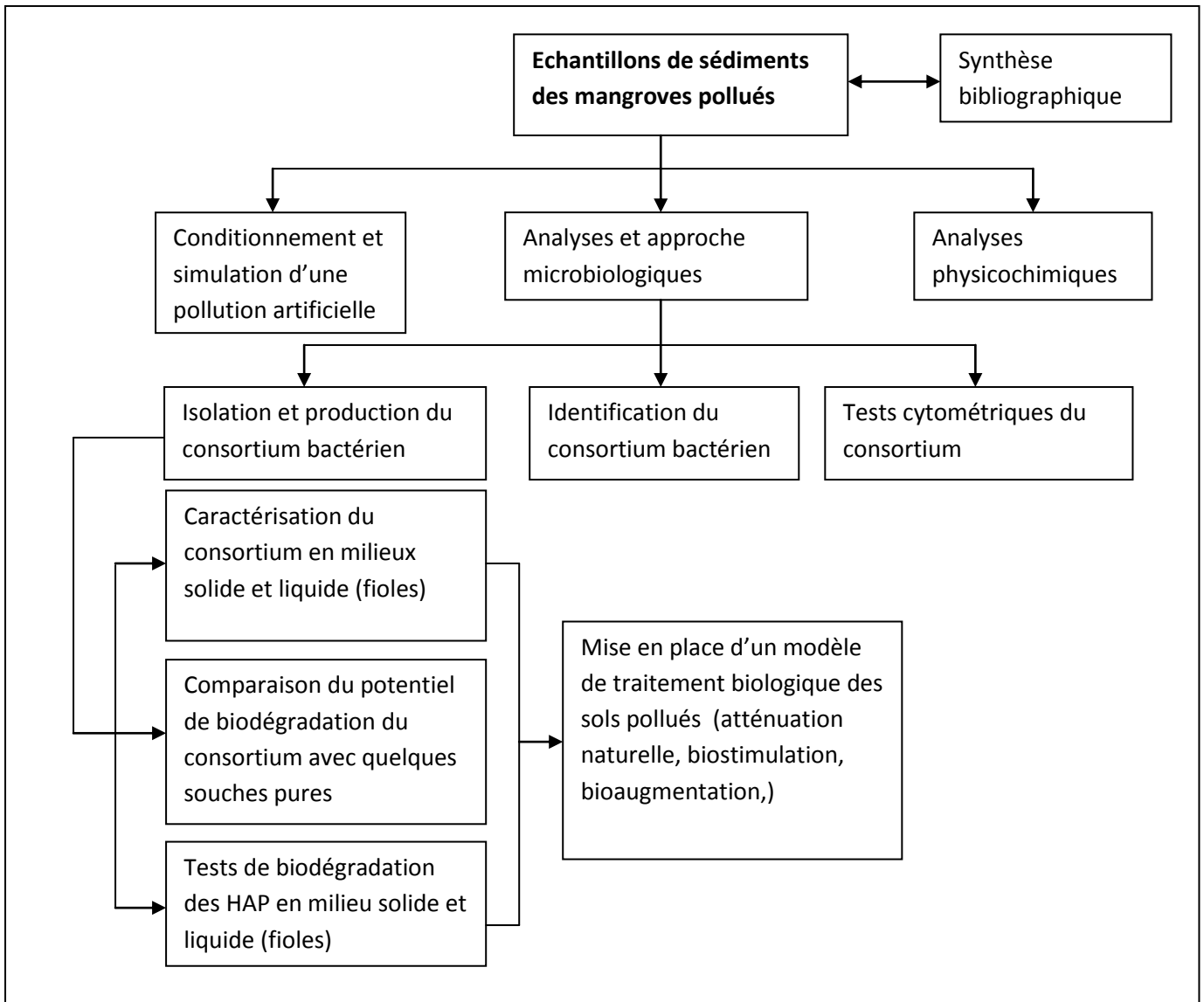


Figure 1: Stratégie de recherche

CHAPITRE IV: CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE POTENTIAL OF A DIESEL-DEGRADING BACTERIAL CONSORTIUM ISOLATED FROM FRESH MANGROVE SEDIMENT

Ce chapitre tient compte des insuffisances relevées au niveau de la bibliographie. Il met en évidence le potentiel de dégradation de la microflore endogène active présente dans les sédiments de mangroves. Sa production dans un bioréacteur sous forme de starter permet non seulement d'augmenter sa concentration dans les sédiments mais aussi d'évaluer son comportement en présence des hydrocarbures. Les différents résultats obtenus au cours de cette expérience permettent d'établir une comparaison sur sa capacité à dégrader les hydrocarbures et d'autres souches pures exogènes comme *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* et *Rhodococcus erythropolis*.

CHAPITRE IV: CHARACTERIZATION AND EVALUATION OF THE POTENTIAL OF A DIESEL-DEGRADING BACTERIAL CONSORTIUM ISOLATED FROM FRESH MANGROVE SEDIMENT

Firmin Semboung Lang¹, Jacqueline Destain¹, Frank Delvigne¹, Philippe Druart², Marc Ongena¹, Philippe Thonart¹ (2016). Characterization and evaluation of the potential of a diesel-degrading bacterial consortium isolated from fresh mangrove sediment. *Water Air and Soil Pollution*, 227:58. DOI 10.1007/s11270-016-2749-7

(1) Université de Liège - Gembloux Agro Bio-Tech. Centre Wallon de Biologie Industrielle. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique). E-mail : langsemb@yahoo.fr

(2) Centre Wallon de Recherches Agronomiques (CRA-W). Chaussée de Namur, 24. B-5030 Gembloux (Belgique).

Abstract:

Hydrocarbons are ubiquitous and persistent organic pollutants in the environment. In wetlands and marine environments, particularly in mangrove ecosystems, their increase and significant accumulation result from human activities such as oil and gas exploration and exploitation operations. Remediation of these ecosystems requires the development of adequate and effective strategies. Natural attenuation, biostimulation, bioaugmentation, are all biological soil treatment techniques that can be adapted to mangroves. Our experiments were performed on samples of fresh mangrove sediments from the Cameroon estuary and mainly from the Wouri River in Cameroon. This study aims to assess the degradation potential of a bacterial consortium isolated from mangrove sediment. The principle of our bioremediation experiments is based on a series of tests designed to evaluate the potential of an active indigenous microflora and three exogenous pure strains, to degrade diesel with/without adding nutrients. The experiments were conducted in laboratory flasks and a greenhouse in microcosms. In one case, as in the other, the endogenous microflora showed that it was able to degrade diesel. Under stress of the pollutant, the endogenous microflora fits well enough in the middle to enable metabolism of the pollutant. However, the *Rhodococcus* strain was more effective over time. The degradation rate was 77 and 90 % in the vials containing the sterile sediments and non-sterile sediments, respectively. The results are comparable with those obtained in the microcosms in a greenhouse where only the endogenous microflora were used. The results of this study show that mangrove sediment contains an active microflora that can metabolize diesel. Indigenous and active microflora show an interesting potential for diesel degradation.

Keywords: Mangrove, oil pollution, microorganisms, bioremediation

IV.1 Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous and persistent organic pollutants in the environment (Tam and Wong 2008; Lu et al., 2011). In wetlands and marine environments, particularly in mangrove ecosystems, their increase and significant accumulation result from human activities such as oil and gas exploration and exploitation operations. Oil spills occur during tanker-loading operations in the oil platforms or in the ballast tanks of ships, most often near the mainland coast during the transportation of crude oil in pipelines, urban discharges in service stations from petroleum products, emissions from combustion and industrial processes (Tam and Wong 2008), etc. Biodegradation of petroleum hydrocarbons is a complex process that depends on the type and on the amount of hydrocarbons. Petroleum hydrocarbons can be divided into four classes: saturates, aromatics, asphaltenes (phenols, fatty acids, ketones, esters, and porphyrins), and resins (pyridines, quinolines, carbazoles, sulfoxides, and amides) (Colwell et al., 1977). Different factors influencing hydrocarbon degradation have been reported by Cooney et al., (1985). One important factor that limits biodegradation of oil pollutants in the environment is their limited availability to microorganisms. Petroleum hydrocarbon compounds bind to soil components, and are consequently removed or degraded with difficulty (Barathi and Vasudevan 2001). Hydrocarbons differ in their susceptibility to microbial attack. The susceptibility of hydrocarbons to microbial degradation can be generally ranked as follows: linear alkanes > branched alkanes > small aromatics > cyclic alkanes (Perry, 1984; Ulrici, 2000). Some compounds, such as the high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), may not be degraded at all (Atlas and Bragg, 2009). Bacteria are the most active agents in petroleum degradation, and they work as primary degraders of spilled oil in the environment (Rahman et al., 2003; Brooijmans et al., 2009). Several bacteria are even known to feed exclusively on hydrocarbons (Yakimov et al., 2007). Floodgate (1984) listed 25 genera of hydrocarbon-degrading bacteria and 25 genera of hydrocarbon-degrading fungi which were isolated from a marine environment. A similar compilation by Bartha and Bossert (1984) included 22 genera of bacteria and 31 genera of fungi. Mangrove ecosystems are plant formations along the coasts of tropical and subtropical regions. They are closely related to industrial activities and are subject to various forms of pollution including oil pollution. Remediation of these ecosystems requires the development of adequate and effective strategies. In addition to the physicochemical treatment of contaminated sites, which is known for its high financial cost, more accessible biological processes also appear adapted to mangrove ecosystems (Singh et al., 2010). Natural attenuation, bioaugmentation, phytoremediation, etc., are all biological soil treatment techniques that can be adapted to mangroves. These techniques use plants and/or microorganisms to degrade hydrocarbons (Tam and Wong 2008). Mangrove sediment contains an abundant and diverse microflora mainly composed of bacteria and fungi. According to Holguin et al. (2001), and fungi account for 91 % of the total microbial biomass in tropical mangroves, while algae and protozoa represent only 7 and 2 %, respectively. Fungal populations have been found in the rhizosphere of mangroves dominated by *Avicennia marina* along

the coast of Karachi (Mehdi et al. 2000). Leahy and Colwell, (1990) have reported biodegradation of petroleum oil by *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, and *Rhodococcus*. The present study, therefore, aims to assess the diesel degradation potential of endogenous microflora and to compare this potential with that of other pure strains known for their ability to degrade diesel. The bacterial consortium isolated of mangrove sediments is an active bacterial starter product bioreactor. Exogenous strains used are *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Rhodococcus erythropolis*. These strains are known for their ability to degrade hydrocarbons. *B. subtilis* is a Gram-positive, catalase-positive bacterium commonly found in soil. It produces a natural surfactant, possesses the ability to biodegrade hydrocarbons, and is a facultative aerobe. Spores can survive extreme heat. *B. subtilis* also produces a biosurfactant, surfactin, in the presence of crude oil. Laboratory experiments have shown that biosurfactant production is not inhibited by the presence of crude oil (Queiroga et al., 2003). Several experiments of bioremediation of soils polluted by hydrocarbons were performed with *B. subtilis* (Moran et al., 2000; Christova et al., 2004; Das and Mukherjee 2007; Wang et al., 2011; Jalilzadeh Yengejeh et al., 2014; Darsa et al., 2014). The strain *P. fluorescens* was used in a number of hydrocarbon biodegradation experiments. Chandrasekhar and Karigar (2010) used this strain for the degradation of anthracene. Kaczorek and Olszanowski (2011) used *P. fluorescens* to evaluate the effects of exogenous biosurfactants on biodegradation of hydrocarbons. The genus *Rhodococcus*—bacteria with a diverse and efficient metabolism—is also able to transform, biodegrade, or utilize as a carbon source several hydrophobic compounds such as hydrocarbons, chlorinated phenols, steroids, lignin, coal, and crude oil. *R. erythropolis* is an ideal candidate for enhancing the bioremediation of contaminated mangrove sites. *Rhodococcus* has been proven to be of immense use also for enantioselective synthesis and the production of amides from nitriles. This capability could be of great commercial and industrial importance. *Rhodococcus* are aerobic, Gram-positive, non-motile, nocardioform actinomycetes, with a life cycle alternating between cocci and small rods, sometimes showing small filamentous projections (Bicca et al., 1999). *R. erythropolis* has the ability to occupy many niches; this species dominates the nitrile-degrading microorganisms from many marine and terrestrial zones (Brandao et al., 2003). Diesel oil is an excellent model for studying hydrocarbon biodegradation, since it is constituted of a variety of these molecules, such as paraffin, olefins, naphtha, and aromatic compounds. The molecular weight of the hydrocarbons in diesel is also variable, with molecules containing 9 to 20 carbon atoms.

IV.2 Materials and Methods

IV.2.1 Soil and Diesel

The experiment was performed on samples of fresh mangrove sediments from the Cameroon estuary, mainly from the Wouri River in Cameroon. The physicochemical characteristics of the soil samples were determined. The diesel used in this study was commercial diesel; it contained 75.2 % of aliphatic hydrocarbons, carbon chains are C11 to C24 and 24.7 % aromatic hydrocarbons.

IV.2.2 Development of the Consortium Bacterial Starter

Our initial bacterial consortium was isolated from fresh mangrove sediment. 250 g of fresh sediment were lyophilized for 72 h. One gram of lyophilized sediment was introduced into a test tube containing 9 mL of sterile peptone water. The test tube containing the mixture was placed in a water bath at 80 °C for 15 min. This process allowed us to obtain a competent microflora resistant to heat shocks. Dilutions were carried out by plating the extracts on a mineral salt medium (MSM) with 10 ppm of diesel as the sole carbon source and solidified with agar in Petri dishes. Each dilution was spread three times. After 3 days of incubation at 30 °C, the number of CFUs (colony forming units) was counted and the mean of each dilution was raised. MSM had the following composition (mg/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1000; K_2HPO_4 , 800; KH_2PO_4 , 200; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100; and trace elements $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1; and $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1; 15 g agar. The medium pH was 7.0 - 7.2. MSM was prepared in deionized water except when salinity effects were examined when artificial seawater at 10 g/L salinity was used to dissolve various salts. To obtain the total microflora, we used rich medium (glucose, 20 g/L; peptone, 10 g/L; yeast extract, 10 g/L; Tween 80, 1 mL/L). For cultures on solid medium (enumeration and recovery of data stored on microbeads strains), this medium was supplemented with 15 g/L of agar.

We used a bioreactor for the production of bacterial biomass. The fermentation process led to the creation of a pre-culture reactor for carrying out the culture itself. Data were collected at each step and the results analyzed. The pre-cultures were carried out with the rich medium with 10 mL/L of diesel added. Bacterial growth was monitored by measuring optical density ($\lambda = 600$ nm) over a 48 h period. The pre-cultures were performed as follows: 1 mL of suspension equivalent to 104 CFUs/mL of bacterial spores was added into a 250 mL flask containing 100 mL of rich medium autoclaved for 20 min at 121 °C and 10 mL/L of diesel. The flask was brought to the oven at 30 °C on a stirring plate. The evolution of biomass in the flask was monitored for 48 h until it reached 107 CFUs/mL. This was pre-culture 1. Pre-culture 1 inoculum was used for pre-culture 2, which was carried out in a 2 L flask containing 500 mL of rich medium and 10 mL/L of sterile diesel, and incubated at 30 °C under stirring for 24 h. A 20-L bioreactor (BIOLAFITTE, N° C38304, France) was used for biomass production. An equivalent volume of 16 L of rich medium supplemented with diesel was introduced into the bioreactor for sterilization. After cooling, the inoculum (pre-culture 2) was added to the mixture. Once the bioreactor was launched, successive counts were conducted for 48 h. At the end of the process, the suspension was recovered and then centrifuged. The biomass obtained was stored at -20 °C for 24 h before lyophilization. Two percent (v/v) glycerol and 10 % (v/v) maltodextrin were added as cryoprotectants to limit the effects of lyophilization on bacteria. Bioreactor conditions were as follows: temperature, 30 °C; pH, 6.5 to 7; aeration, 0.5 vvm; shaking, 130 rpm; and duration, 48 h. Centrifugation (Thermo Scientific ® SORVALL RC12BP™, France) conditions were as follows: temperature, ± 4 °C; shaking, 4700 rpm; and time, 15 min. After 24 h at -20 °C, the biomass was

lyophilized for 72 h to obtain a powder. Shelf temperature was adjusted between -40 and $+50$ °C. The trap reached a temperature below -50 °C at the end of the lyophilization process. A count was made after lyophilization to assess the performance after that step. The bacterial starter was used throughout this study as diesel-degrading biomass.

IV.2.3 Biodegradation Experiments

The characterization of active bacterial consortium isolated in mangrove sediments was performed through two different experiments. The first was conducted in flask. Only the active consortium was tested on artificially contaminated sediments by diesel. The second experiment was done in a greenhouse in microcosms with larger volumes of sediment. For this last experiment, the diesel degradation potential of the endogenous microflora was compared with that of exogenous pure strains known for their ability to degrade hydrocarbons.

IV.2.3.1 In Flasks

For this experimentation, this study aimed to assess the degradation potential of a bacterial consortium isolated from mangrove sediment. The biodegradation assays took place using two techniques with several series, and different treatments in the flasks. Each series was performed in triplicate. The experiment was conducted as follows: the first technique was performed with sterile mangrove sediments and the second used non-sterile mangrove sediments. For the first technique, we achieved the experiment with two series of three flasks. In one series, 100 g of mangrove sediments was introduced. The flasks were sterilized by autoclaving. Then, 1 mL/L of diesel (10,000 ppm) was added. We also inoculated a 107 CFU/g consortium as a starter and 250 mL of artificial seawater. The second series of flasks was treated as above with the only difference being the addition of 30 % nutrient solution. For the second technique, the experiment was carried out in four series of three flasks with non-sterile sediment. In the first series of flasks, 100 g of mangrove sediment was introduced and 250 mL of artificial seawater was added; this was the treatment by natural attenuation. The second series concerned treatment by biostimulation, and involved the above treatment followed by the addition of 30 % nutrient solution. The third series was the same as the first, followed by inoculation with 107 CFU/g bacterial consortium powder; this was the bioaugmentation. The fourth series was treated as the third, with the addition of 30 % nutrient solution; this was the combination of biostimulation and bioaugmentation. A series of three flasks containing 500 g of sterile mangrove sediment and 250 mL of artificial seawater without the addition of microorganisms was the control flask for this experiment. Figure 1 summarizes the experiment set up applied to the study of biodegradation in flasks.

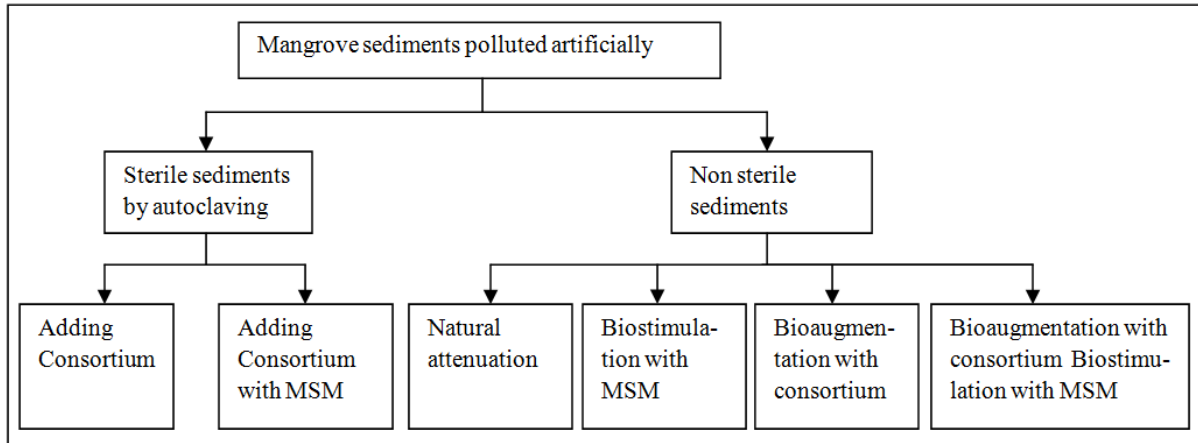


Fig. 1: Biodegradation experiment in flasks.

IV.2.3.2 Biodegradation in Greenhouse

This used three different traditional techniques for the biological treatment of polluted soils. These techniques are: natural attenuation, biostimulation, bioaugmentation and a combination of bioaugmentation and biostimulation.

Regarding natural attenuation, 500 g of mangrove sediments polluted with previously diesel (10,000 ppm) was introduced into a series of three microcosms; then, 750 mL of artificial sea water was introduced into each of three microcosms so that the sediments were fully immersed in water. The artificial seawater had the following composition in one liter of MilliQ water (g/L): NaCl, 10; KCl, 0.74; CaCl₂, 0.99; MgCl₂, 6.09; MgSO₄, 3.94; and pH, 7.8 (pH was adjusted with NaOH to increase or HCl to decrease) and the liter bottle was sterilized by autoclave. The three microcosms corresponded to three repetitions.

Regarding the bioaugmentation, four series were treated as previous microcosms; in the first series, a bacterial consortium isolated from mangrove sediments was added; in the second series, a pure culture of *R. erythropolis* was used, in the third series, a pure culture of *B. subtilis* was added and in the fourth series, *P. fluorescens* was added.

Regarding biostimulation, two concepts were tried: stimulating endogenous microorganisms with a mineral salt medium (MSM) and organic material in the form of compost, or both. In this case, 500 g of polluted mangrove sediment was introduced into three series of three microcosms. In the first series, 30 % MSM was added, while in the other, 30 % of compost was added. In the third series, 30 % MSM and 30 % compost was added to both.

The second concept is the combination of the bioaugmentation and biostimulation. In this case, two series of microcosms were treated as described above under bioaugmentation. Here, 30 % MSM was added in one series and the other contained 30 % compost. MSM had the following composition (mg/L): (NH₄)₂SO₄, 1000; K₂HPO₄, 800; KH₂PO₄, 200; MgSO₄.7H₂O, 200; CaCl₂.2H₂O, 100; and trace elements made up of FeSO₄.7H₂O, 12; MnSO₄.7H₂O, 3; ZnSO₄.7H₂O, 3; CoSO₄.7H₂O, 1; and (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 1. Compost had the following physicochemical composition: 25 % white

peat; 30 % Baltic black peat; 45 % German black peat with 1.5 kg of PG mix NPK fertilizer (14 + 16 + 18+trace elements); pH, 6.

Two additional mixtures were developed to serve as controls; this was formed by the first four series of three microcosms containing 500 g each of sterile mangrove sediment polluted with diesel (10,000 ppm) and 750 mL of artificial seawater. In the first one, a bacterial consortium was added; in the second one, a pure strain of *R. erythropolis* was used; *B. subtilis* was added into the third one; and *P. fluorescens* was used in the fourth one. The second installation was performed by a single series of microcosms containing 500 g of sterile mangrove sediment artificially contaminated with diesel (10,000 ppm); this series did not contain microorganisms. The experiment lasted for 5 weeks. The water and soil samples were taken once a week to measure the total petroleum hydrocarbon (TPH). Figure 2 summarizes the experiment set up applied to the study of biodegradation in the greenhouse.

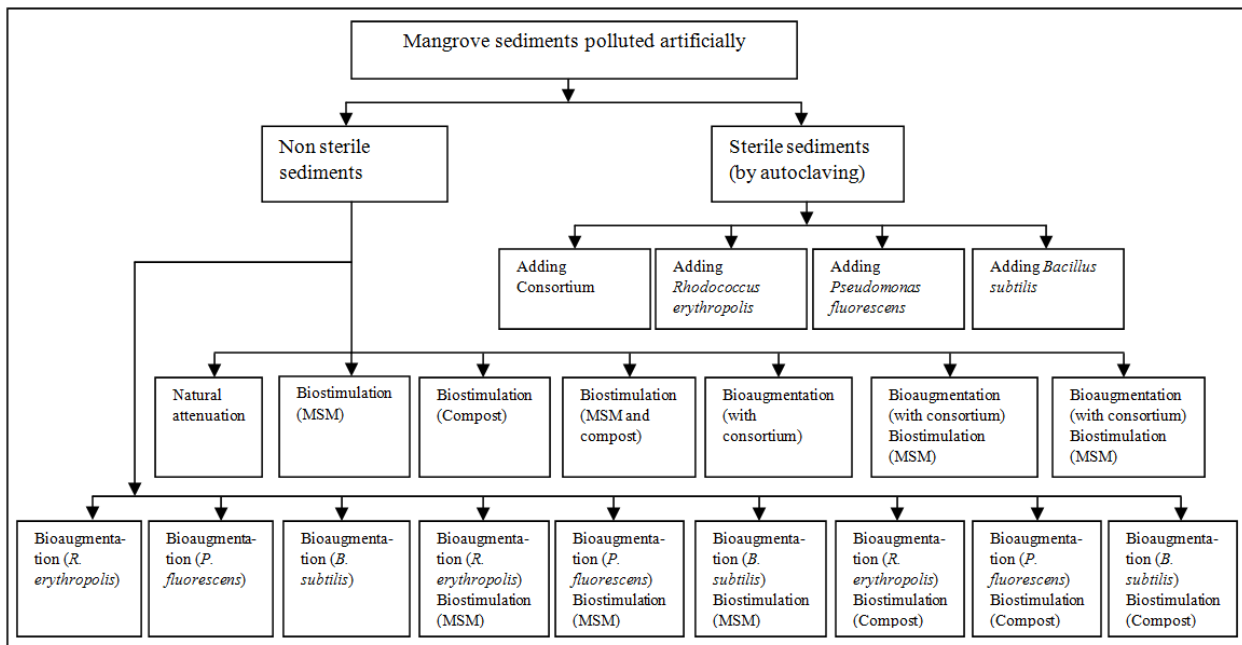


Fig. 2: Biodegradation experiment in greenhouse.

IV.2.4 Cytometric Assays

Accuri CFlow® or CFlow Plus software (CFlow) was used to control the C6 Flow Cytometer® system, acquire data, generate statistics, and analyze results. CFlow software provides the following features: tabbed views for collection, analysis, and statistics. Cytometric analyses were aimed at characterizing the consortium under diesel stress quantitatively and qualitatively. All bacteria in the consortium did not react in the same way to diesel stress; therefore, we studied parameters such as viability and membrane integrity by labeling them with propidium iodide (PI), an intercalating agent. The amount of PI determined for each cell was proportional to the DNA content. PI allowed us to assess the membrane integrity of the cells. We also used cFDA (carboxyfluorescein diacetate), another intercalating agent, to assess bacterial mortality during the experiment. The analysis was

performed every two days throughout the entire experiment. Cytometric analysis first requires the extraction of soil bacteria. Extraction was performed as follows: 10 mL of mangrove sludge was placed in a 50 mL Falcon® tube, and then 10 mL of PBS (×10) containing 0.1 % sodium pyrophosphate plus 0.05 % Tween 20 was added. The tubes were vortexed and placed on a rotary stirrer for 30 min and then centrifuged for 10 min at 500 rpm. After centrifugation, 1 mL of supernatant was transferred into a microtube, and 1 mL of Nycodenz solution, density 1.3 (8 g Nycodenz powder in 10 mL of distilled H₂O), was added. The mixture was centrifuged for 10 min at 10,000 rpm. As a result, three layers became visible in the microtubes: a precipitate at the bottom, ground water in the middle, and a bacterial layer on the top. The bacterial layer was recovered. One milliliter of the bacterial layer was transferred into two microtubes: the first was heated at 90 °C for 30 min in a water bath (heat shock) and the second was placed on ice (reference sample). For each sample, 100 µL of the bacterial layer was introduced into another microtube, and then 900 µL of PBS (0.2 µm filtered) and 10 µL of PI and CFDA were added. The mixture was vortexed, incubated at 37 °C for 15 min and then centrifuged at 10,000 rpm for 2 min. The pellet (desired range 10⁶ CFUs/mL) was recovered, 1000 µL of PBS were added, and the cells were resuspended using a vortex before cytometry analysis. PBS (1× solution) was composed of 800 mL of distilled H₂O; 8 g of NaCl; 0.2 g of KCl; 1.44 g of Na₂HPO₄; and 0.24 g of KH₂PO₄. The pH was adjusted to 7.4 with HCl. The final volume was adjusted to 1 L with additional distilled H₂O, and the preparation was sterilized by autoclaving.

IV.2.5 Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) Analysis and Rate of Diesel Reduction

Hydrocarbons were extracted using a Soxhlet device. For extraction from sediment, 8 g of contaminated soil were taken from each flask and were introduced into an extraction thimble (Whatman). The extraction thimbles were then placed in the Soxhlet device. Each balloon contained 70 mL of acetonitrile saturated with hexane. Extraction time was 6 h. After the extraction step, the balloons containing about 70 mL of acetonitrile mixed with hydrocarbons were recovered. An equivalent volume of hexane solution saturated with acetonitrile was added to each balloon. The mix was stirred for 10 min and yielded two phases: the hexane phase (above) containing hydrocarbons and impurities, the acetonitrile phase (below). 1.5 g of Florisil (15 % MgO, 85 % SiO₂, MACHEREY-NAGEL GmbH and Co.KG, Germany) and 1.5 g of sodium sulfate (Na₂SO₄) were placed in a settling leg made of sintered glass. The two products were designed to retain impurities (Na₂SO₄) and water (Florisil). The acetonitrile phase (below) was recovered first. The hexane phase containing hydrocarbons of interest was next recovered in another balloon. The balloons containing the hexane phase were then dried and heated in an oven at 105 °C for 3 h and then cooled in a desiccator to dry them and protect them from moisture. The solution in each flask was then evaporated using a rotary evaporator heated at 50 °C to a volume of about 2 mL. The final sample volume was measured and an aliquot was introduced into a vial stored at 4 °C before GC injection. The remaining diesel oil was

quantified by weight to determine the amount of diesel oil degraded over time. The percentage of diesel oil degradation was determined using the amount of diesel oil in the same flask at day 0 as 100 %. The dosage of hydrocarbons in soils and water was performed using a gas chromatograph (HP 5890 Series II Gas Chromatograph). Prior external calibration was made with standard diesel (diesel oil additives without DIN H53) and mineral oil (mineral oil additives without DIN H53). Analysis conditions and the characteristics of the column were as follows: pre-column, deactivated fused silica; column Macherey-Nagel Optima 1 (99 % polydimethylsiloxane, 1 % diphenyl); column length, 30 m; internal diameter of column, 250 µm; stationary phase thickness, 0.25 µm; injection volume, 1 µL; injector, on-column; carrier gas, helium at 0.8 bar; hydrogen fueling the detector, 1.15 bar; FID detector at 300 °C; and oven temperature, 40 °C for 5min, temperature rise for 26 min at a rate of 10 °C/min, 300 °C for 30 min. Oil content was measured by determining the total petroleum hydrocarbons (TPH) that represents the hydrocarbon concentration calculated from a calibration line. The integrated surface was inbetween the peaks of decane and tetracontane injected extemporaneously dissolved in hexane to determine their retention times.

IV.2.6 Quality Control and Statistical Analyses

Mean values were compared with the ANOVA test with a p value ≤ 0.05 . The differences in the various rates of diesel reduction were also analyzed by the same test. An analysis of variance (ANOVA) was performed to test the differences between initial and final TPH concentrations between the treated flasks and the control flasks. All statistical analyses were performed using MINITAB 15 statistical software (French version).

IV.3 Results and Discussion

IV.3.1 Sediment Characteristics

The properties of the sediment collected from Wouri mangrove swamps are summarized in Table 1. Wouri sediment contained a lot of sand (90.6 %) and very little clay (6.1 %), silt (3.4 %) or humus (2 %). It had low levels of organic matter comparable to those observed in the literature and could have a particular affinity with respect to hydrocarbons (Zhang et al., 2007). Similarly, the hydrocarbon and heavy metal levels were low compared to those found in the literature. This could make hydrocarbon degradation complex, because not only are there heavy or persistent petroleum products, but they also settle to the bottom of the water, leading to a non negligible fraction of light (or non-persistent hydrocarbons mixes) with fine sand particles in emulsion (Owens et al., 1998). The high concentrations in heavy metals may have a negative effect on activity and microbial density (Ellis et al., 2003). This may result in a reduction of the rate of hydrocarbon degradation by microorganisms, and thereby lead to their accumulation in the soil. Indeed, high concentrations in heavy metals cause a decrease in the microbial biomass, inhibiting some enzymatic activities. A modification of the structure of the microbial community can also be observed (Khan and Scullion 2002). At low

concentrations, heavy metals are not supposed to have an effect on the biodegradation process. Here, the concentrations are too low to cause such negative effects. The rapid degradation of hydrocarbons is favored by a number of weather conditions like wind and high temperatures, which accelerate pollutant evaporation. This is not always possible for the pollutants that settle to the bottom of the water. According to Owens et al. (1998), at temperatures ranging between 0 °C and 5 °C, 5 to 20 % of diesel evaporates in 2 days. The same quantity evaporates in 5 days at temperatures ranging between -20 °C and 0 °C.

Table 1: Physicochemical properties of Wouri mangroves sediments

Clay	6.1%/DM	Traces elements (mg/kg dry matter)		Dry matter (DM)	80,7%
Silt	3.4%/DM	Pb	4 mg/kg	Conductivity ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ at 20°C)	59,2
Sand	90.6%/DM	Cd	0.03 mg/kg	MAH's (mg/kg DM)	< 0.06
Crude humus	2%/DM	Cu	7.7 mg/kg	Halogen solvents (mg/kg DM)	< 0.2
Carbon	1%/DM	Ni	4 mg/kg	PAH's (mg/kg DM)	
pH (KCl)	6.4	Zn	19.8 mg/kg	* Mixing Borneff	< 0.07
Available elements (mg/100g)		Cr	28.2 mg/kg	* Total	< 0.18
Phosphorus	3	As	1.15 mg/kg	Total petroleum hydrocarbon (mg/kg DM)	< 100
Potassium	4	Hg	0.02 mg/kg	C ₉ -C ₄₀ (mg/kg DM)	3.28
Magnesium	23	Co	2.9 mg/kg	PCB's (mg/kg DM)	0.015
Calcium	89	CN ⁻	< 0.01 mg/kg	Pesticides chlorinated (mg/kg DM)	< 0.02
Sodium	12	F ⁻	41.4 mg/kg		

IV.3.2 Counting of Bacteria in Sediment

Different counts from mangrove sediment determined the total microflora and the competent or active (diesel degrading) microflora. The total microflora obtained from the rich medium containing glucose was 10^8 CFU/g. The specific competent flora was obtained by subjecting the total microflora to various stresses. When counts from fresh sediment were carried out on a mineral salt medium (MSM) containing 10 ppm diesel as the sole carbon source, the competent microflora count was 1.5×10^7 CFU/g soil. After sediment lyophilization, and counting on the same medium, we obtained a microflora count of 8×10^6 CFU/g of soil. Finally, in addition to lyophilization, we placed diluted sediment grown in the same medium for 15 min in a water bath at 80 °C and obtained a specific flora of 9×10^5 CFU/mg (Fig. 3).

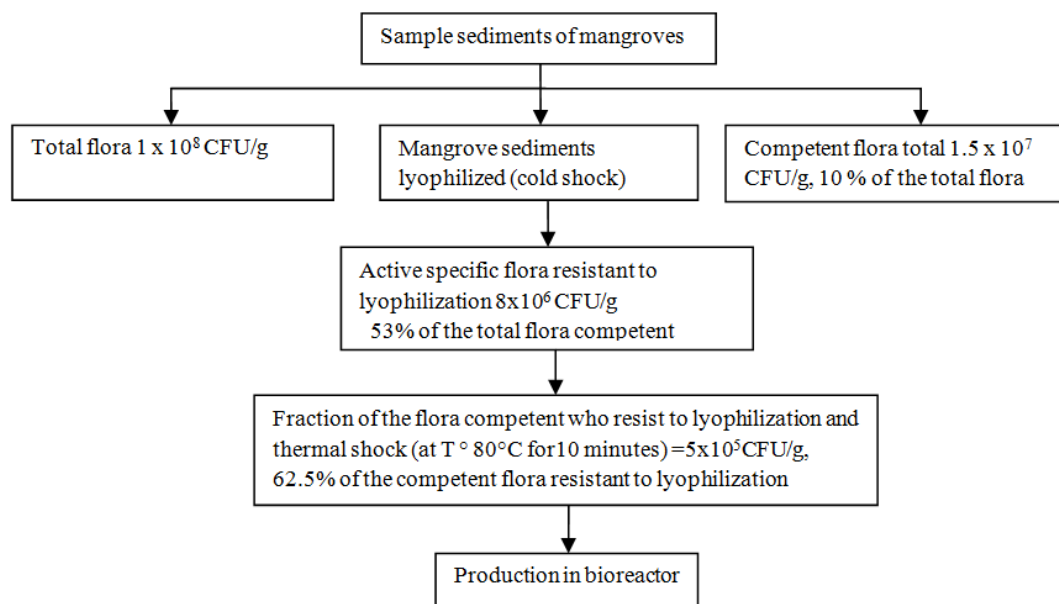


Fig. 3: Total microflora and active microflora in the mangrove sediment

The total microflora and hydrocarbon-degrading microflora fraction may vary among mangroves and depend on weather conditions, the degree of pollution and the sampling place. In a study on the potential for hydrocarbon biodegradation, Tian et al., (2008) counted bacteria from five mangrove sediment samples taken from various locations; they recovered a total of 10^9 cells/g sediment, and between 10^2 and 10^4 hydrocarbon-degrading bacteria/g sediment. Moreira et al., (2011) counted between 10^5 – 10^7 CFU/g in *Rhizophora mangle* rhizosphere and 10^5 to 10^6 CFU/g in the non-rhizospheric area. Bacterial activity plays an important role in biomass formation. In tropical mangroves, bacteria and fungi constitute 91 % of the total microbial biomass, whereas algae and protozoa represent only 7 and 2 %, respectively (Alongi, 1988; Tian et al., 2008). The unique features of mangroves, i.e., their high primary productivity, abundant detritus, rich organic carbon, and anoxic/reduced conditions make them a preferential site for uptake and preservation of anthropogenic PAHs (Bernard et al., 1996; Tian et al., 2008). Ramsay et al., (2000) report that the number of aromatic-degraders in mangrove sediment is very high (10^4 – 10^6 cells/g sediment), and such an indigenous community has a considerable potential for oil component degradation. Moreover, the number of oildegraders could be increased by oil addition. Yu et al., (2005) also reported that a bacterial consortium enriched from mangrove sediment had a good PAH degradation capability, with 100 % degradation of fluorene and phenanthrene after 4 weeks of growth. These results suggest that mangrove sediment might harbor different groups of hydrocarbon-degrading bacteria.

IV.3.3 Consortium Production in Bioreactor

From the competent microflora obtained after a heat shock, we tried to obtain a bacterial starter after the production in bioreactor. The results of the fermentation experiment are shown in Table 2. The results presented in Table 2 show a good development of competent microflora under the

conditions of the bioreactor 1.4×10^{10} CFU/mL. After centrifugation, the culture showed a survival rate of 75.9 %. However, the survival rate after lyophilization is only 20 %. Cold stress consequently damages the consortium, which comes from tropical areas where the annual average temperature is 23–24 °C.

Table 2: Production of consortium in bioreactor

Composants	Periods		Number of CFU/mL or CFU/g		Total CFU	Yield per step
	Start	End	Start	End		
Volume (L)	16L	15,7 L	8×10^7	$1,4 \times 10^{10}$	$2,2 \times 10^{14}$	
Centrifugation		458 g		$3,7 \times 10^{11}$	$1,7 \times 10^{14}$	75,9%
Lyophilization		120 g		3×10^{11}	$4,4 \times 10^{13}$	20,2%

IV.3.4 Biodegradation of Diesel in Mangrove Sediment by Bacterial Consortium in Flasks

The principle of our bioremediation experiment is based on a series of tests designed to assess the potential of an active indigenous microflora to degrade diesel with or without the addition of a nutrient solution. This principle is similar to well-known techniques such as bioaugmentation, biostimulation, and natural attenuation. In this experiment, the mangrove sediment initially had low levels of oil pollution. The addition of diesel increased the TPH to 14,900 ppm. After the treatment described above, the dosage of hydrocarbons by GC once per week for 5 weeks showed time-dependent diesel degradation. Degradation was evidenced by the general shape of the different curves.

In flasks initially containing sterile sediment, TPH decreased from 14,900 ppm to 6900–1500 ppm depending on the treatments. To interpret these results, we first had to distinguish between treatments with sterile sediment and those with non sterile sediment, and then establish the correlation between the two. In the control flasks without bacteria, no diesel degradation was observed. The rate of diesel reduction in the flasks containing sterile sediment with only consortium added was 68.4 ± 0.4 % after 5 weeks of treatment, while for sterile sediment that received the consortium and a nutrient solution (containing inorganic nitrates — see “Biodegradation in Greenhouse”) a reduction rate of 90.2 ± 0.2 % was seen within the same time interval (Fig. 4). Nutrients have the particularity of boosting microbial activity. According to one-way ANOVA, statistical analysis (95 % confidence interval) showed no significant difference between the two treatments. However, regardless of the treatment applied, degradation rates are different from one week to the next. The results show a significant difference between the fifth week and the first 4 weeks. The results of the first 2 weeks were significantly different from the following 2 weeks.

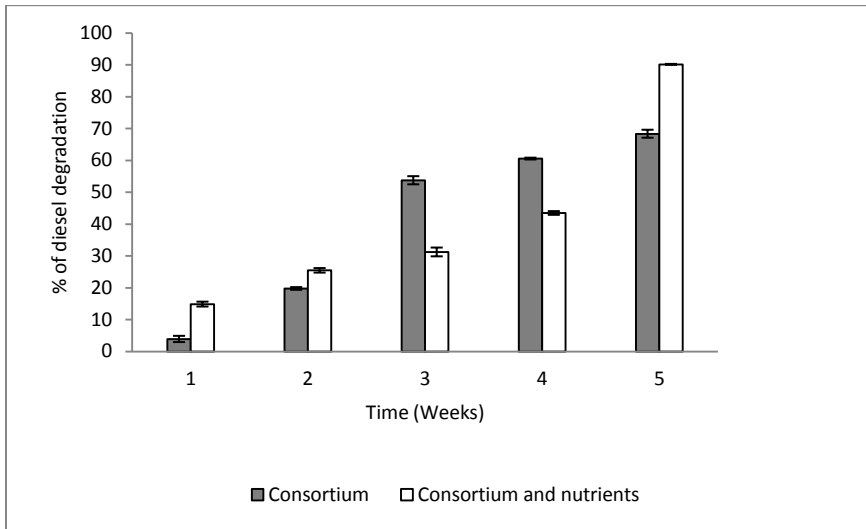


Fig. 4: Percentage of diesel degradation in mangrove sterile sediments using bacterial consortium

With non-sterile sediments, the rate of diesel reduction varied between 54.1 ± 0.6 and 77.2 ± 0.2 %. Microbial activity was more intense (77.2 ± 0.2 %) in the flasks with only consortium added (bioaugmentation); it was lower (54.1 ± 0.6 %) in the consortium-free flasks (natural attenuation). Conversely, we found no difference between the flasks with consortium and nutrient solution added (biostimulation and bioaugmentation) on the one hand and the flasks with only nutrient solution added (biostimulation) on the other. The abatement rate of diesel in these flasks was 67.9 ± 0.4 and 67.3 ± 0.4 %, respectively. The results analyzed according to the time and treatment applied show a significant difference between the diesel reduction rate of week 5 and that of the other weeks. Similarly, the abatement rate for weeks 3 and 4 was significantly different from that of the first 2 weeks. Statistical analysis shows that, based on abatement rate, there was no significant difference between treatment with bioaugmentation and biostimulation. In contrast, there was a significant difference in the reduction rate between biostimulation and bioaugmentation treatments and other treatments (Fig. 5).

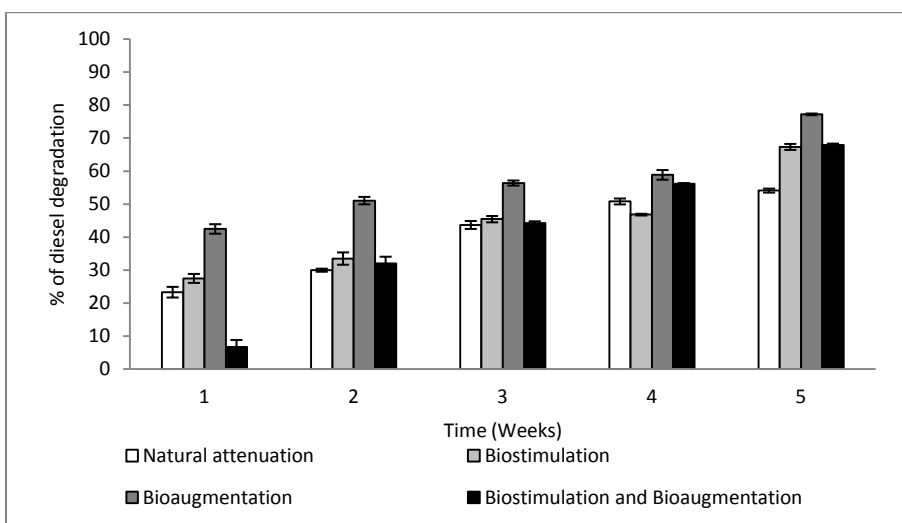


Fig. 5: Percentage of diesel degradation in mangrove non-sterile sediments using bacterial consortium

Our results show that the consortium used has the potential to degrade hydrocarbons. This confirms several previous studies showing that mangroves have indigenous microorganisms capable of metabolizing hydrocarbons (Tam et al., 2002; Yu et al., 2005; Brito et al., 2006; Tam and Wong 2008; Lu et al., 2011; Moreira et al., 2011). In sterile sediment, the consortium used diesel as the sole source of carbon or energy. In the first case, adding nutrient solution in some flasks boosted bacterial activity. Several studies have demonstrated the importance of the presence of nutrients as factors that favorably affect biodegradation (Steffensen and Alexander, 1995), and low levels of inorganic nutrients in the soil could affect or reduce the number of hydrocarbon-degrading bacteria (Chen et al., 2008). Nutrients have been suggested as one of the most important factors that accelerate PAH biodegradation and some inorganic nutrient concentrations in the soil could reduce the number of active bacteria at an inadequate level and slow down the biodegradation process (Steffensen and Alexander, 1995; Chen et al., 2008).

IV.3.5 Percentage of Diesel Degradation and Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) in a Greenhouse

Analysis of the results in terms of total hydrocarbon index shows a biodegradation activity in both microcosms containing sterile sediments compared to those containing non-sterile sediments. Thus, the ability of each microflora to degrade diesel will be appreciated according to the different treatments. This ability will also be assessed according to time in order to identify the treatment to be applied and with which bacteria in mangrove areas.

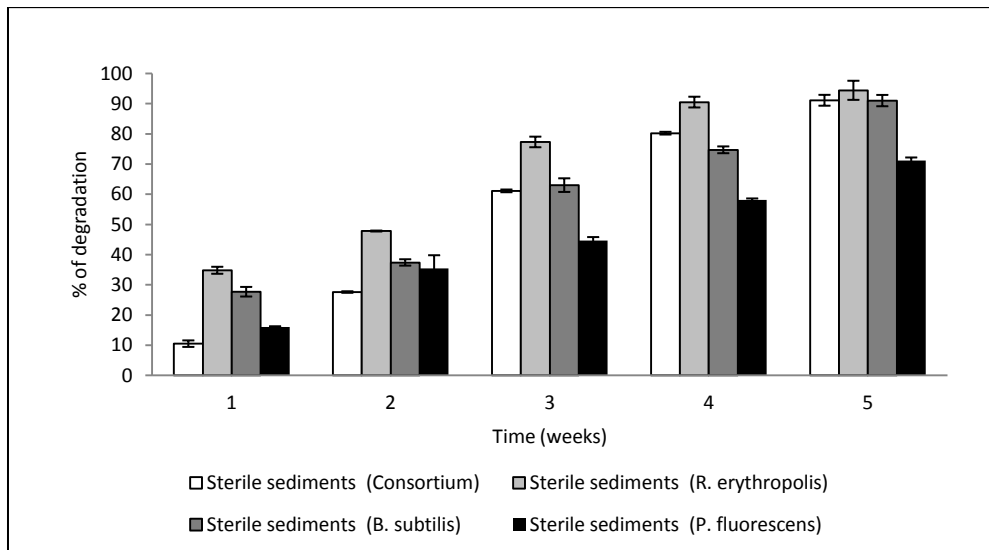


Fig. 6: Percentage of diesel degradation by consortium in a sterile mangroves sediments

Figure 6 shows the results obtained in microcosms containing sediment sterile mangroves. The objective was to assess the capacity of diesel degradation by pure exogenous microorganisms such as *R. erythropolis*, *B. subtilis*, *P. fluorescens* and active bacterial consortium, which is part of the

endogenous bacteria isolated from mangrove sediment. The first observation is that the degradation rate differs depending on the microorganism used. After 5 weeks of treatment, the rate of reduction of diesel was 91.1 ± 1.7 % in the microcosms treated with the bacterial consortium; this was 96.4 ± 3 % in the microcosms treated with *R. erythropolis*, 91.0 ± 1.9 % for *B. subtilis*, and 71.2 ± 0.9 % for *P. fluorescens*. Statistical analysis shows that there is a significant difference between treatments. Similarly, there is a significant difference over time for the same treatment; that is to say, for two consecutive samples, there is a significant difference in the total petroleum hydrocarbon (TPH). In the analysis of these results, the first information we can draw is that the endogenous microflora and exogenous microflora present the capacity to degrade diesel. As the strains used are different from one another, the rate of degradation will also be different from one strain to another. *R. erythropolis*, compared with other inbred strains and endogenous bacterial consortia, has a better degradation rate of diesel.

Figure 7 shows degradation kinetics of diesel content in mangrove sediments from endogenous microflora. This experience highlights natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation as treatments. Bioaugmentation is carried out with the addition of endogenous bacterial consortium, as an isolated asset, for its ability to metabolize diesel. Biostimulation is carried out by adding a mineral salt medium (MSM), compost or both to the microcosms. We also highlighted a combination of bioaugmentation and biostimulation; that is to say, the addition of the microcosms containing diesel, the endogenous bacterial consortium plus MSM, compost or both. After 5 weeks of treatment, the different degradation rates are estimated from the total petroleum hydrocarbon (TPH). Thus, the degradation rate observed for the natural attenuation processing is 29.1 ± 1.2 %. It is 78.6 ± 0.25 % for bioaugmentation, 65.4 ± 0.8 % for biostimulation with the addition of MSM, $71.7.0 \pm 0.4$ % for biostimulation with the addition of compost, and 79.8 ± 1.5 % for biostimulation with the addition of compost plus MSM. The combination of bioaugmentation and biostimulation with the addition of compost has a degradation rate of 86.2 ± 0.1 %, while this is 78.3 ± 1.2 % with the addition of the mineral salt solution. Statistical analysis of these results indicates that there is a significant difference for each treatment over time; that is to say, from one week to another, degradation rates are changed for the same treatment. Statistical analysis by one-way ANOVA with the Tukey comparison method (95 % confidence level) shows that taking reduction rate as a fixed variable compared to the treatment applied to each microcosm did not identify a significant difference between treatments.

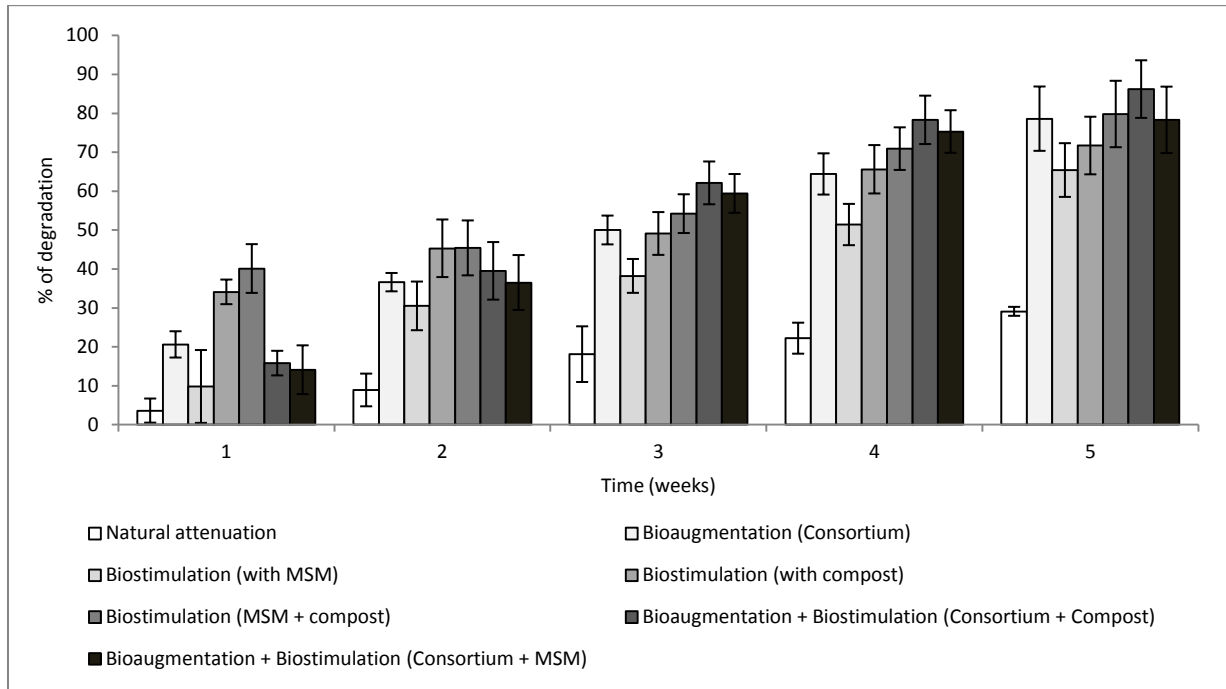


Fig. 7: Percentage of degradation of diesel by consortium using natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation methods

The results in Fig. 8 are used to assess the capacity of endogenous microflora to degrade diesel. Experience shows treatment with a natural attenuation method, which requires the ability of endogenous microorganisms to metabolize diesel, treatment with a biostimulation method where some microcosms will have a mineral salt medium (MSM) added, or compost. This addition can boost the bacterial activity to optimize the biodegradation process. It is clear that after 5 weeks of treatment, the diesel degradation rate by natural attenuation is quite low (about 30 %). It was therefore interesting to evaluate the potential impact of a mineral salt medium or compost or both on the performance of microorganisms. After 5 weeks of treatment, the degradation rate was 65.4 ± 0.8 % when MSM was added, 71.7 ± 0.4 % when compost was added, and 79.8 ± 1.5 % when MSM plus compost were added. MSM and compost are considered to bring nutrients and oxygen into the environment, which accelerates bacterial growth and promotes intense activity in the degradation of diesel. The results show a significant difference in degradation rate between the addition of MSM and the addition of the two components (MSM and compost), as well as a simple difference when comparing results with the addition of compost and adding the two compounds at the same time. Again, the difference was not significant when adding only the MSM and compost.

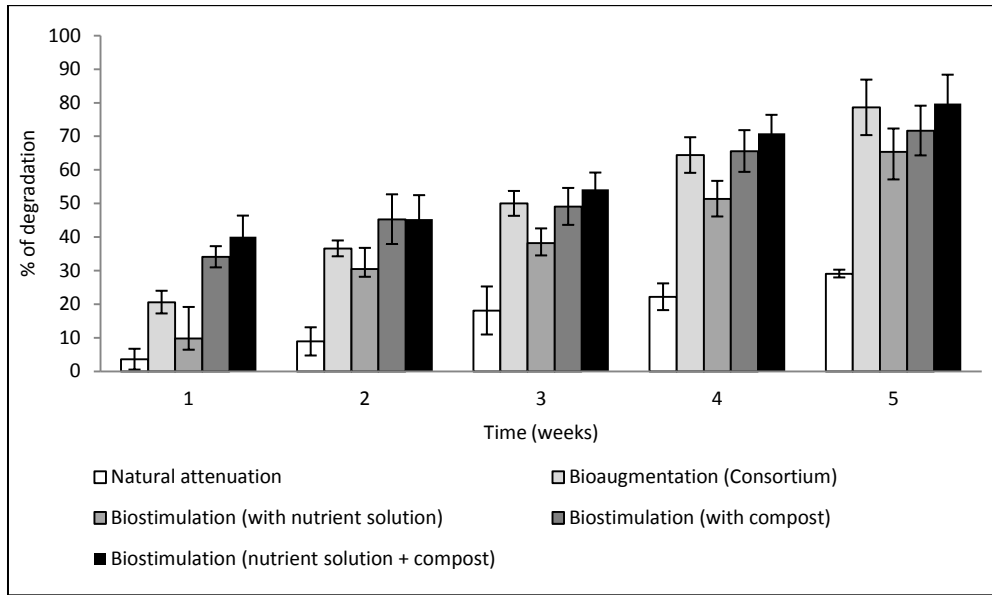


Fig. 8: Percentage of degradation of diesel by endogenous bacterial using natural attenuation and biostimulation methods

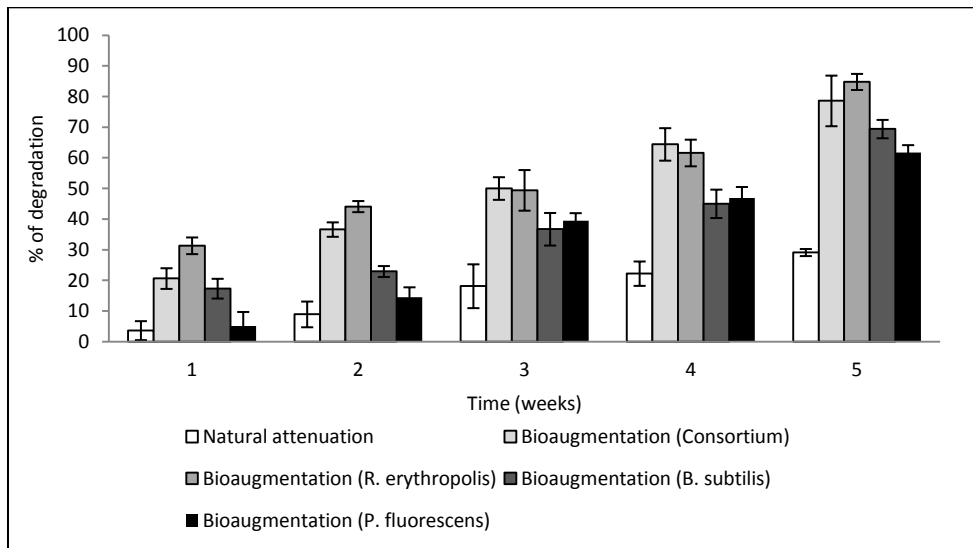
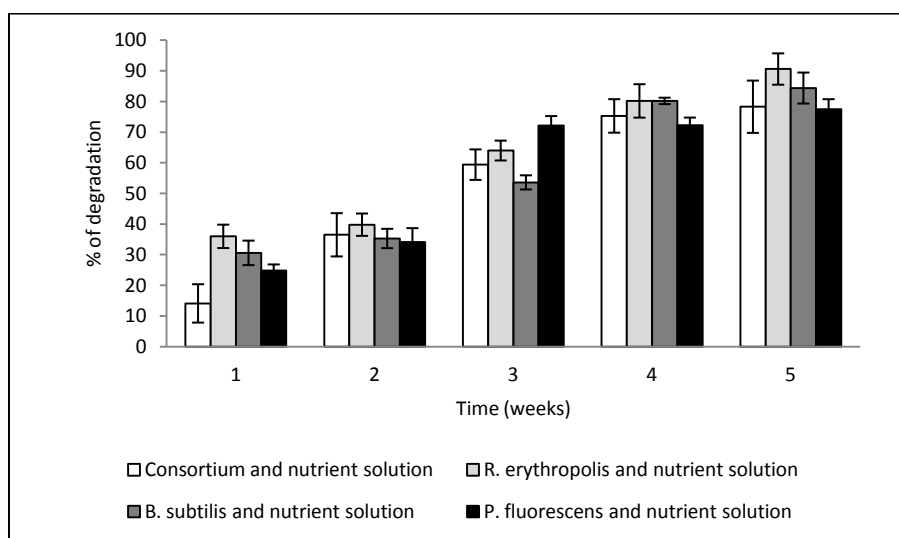


Fig. 9: Percentage of biodegradation of diesel using natural attenuation and bioaugmentation methods

Assessment of the activity of endogenous microflora through the degradation of diesel gave a degradation rate of 29.1 ± 1.2 % after 5 weeks of treatment. This was the treatment by natural attenuation. Contrary to that which was observed in microcosms containing sterile sediments, the degradation was shown to be very slow and there was a low degradation rate at the same time. For this treatment by natural attenuation, we see from the results of the statistical analysis that the degradation rate is significantly different between the first and second week, and between the last 3 weeks. We could say that the endogenous microflora had a period of adjustment to the pollutant which was quite difficult; this adaptation increased over time. The low rate of active microflora in mangrove sediments (10 % of the total microflora) could give the first explanation of the slow degradation of diesel in these microcosms, as it would probably take longer for the proper adaptation of this microflora to pollutants.

The treatment with bioaugmentation was characterized by the addition of active endogenous or exogenous microflora, and presented more satisfactory results compared to natural attenuation. It should be noted that we used three exogenous pure strains, namely *R. erythropolis*, *B. subtilis*, and *P. fluorescens*, and isolated endogenous active consortium sediments of mangroves.

The observation results in microcosms having undergone treatment with bioaugmentation, showing a difference in the diesel degradation rate based on the microorganisms used and the time taken to treat the sediment. In relative values, *R. erythropolis* had a higher degradation rate than *B. subtilis*, *P. fluorescens* and the endogenous consortium. Thus, after 5 weeks of treatment, there was a degradation rate of 84.8 ± 2.6 % in the microcosms treated with *R. erythropolis*, a degradation rate of 78.6 ± 1.2 % in the microcosms treated with the consortium, a 69.4 ± 2.9 % rate of degradation in the microcosms treated with *B. subtilis*, and finally a degradation rate of 61.7 ± 0.4 % in the microcosms treated with *P. fluorescens* (Fig. 9). Statistically, a difference was observed between treatment with *R. erythropolis* and two treatments with the consortium and *B. subtilis*. In contrast, there is a significant difference in treatment with *R. erythropolis* and treatment with *P. fluorescens*. However, the different degradation rates observed for each treatment are significantly different from one week to another; that is to say, over time, there is a significant difference between two samples for the same treatment. Probably in one case as in the other, increasing the active microflora ($+10^7$ CFU/g dry matter) accelerated the diesel degradation. The three pure strains used here are well-known for their ability to degrade hydrocarbons alone or in combination with other bacteria. According to Liu (2011), *R. erythropolis* has oxygenases that make them capable of degrading oil components such as nalkanes, iso-alkanes, cycloalkanes, and aromatics.



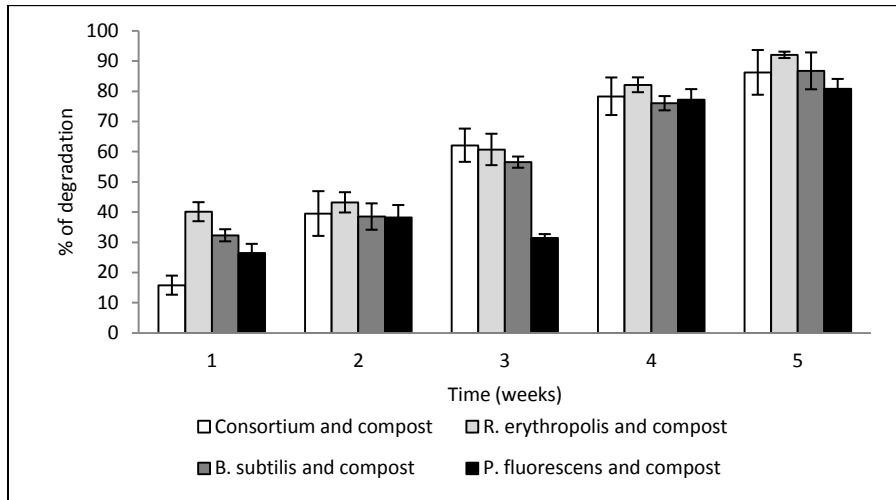


Fig. 10: Percentage of diesel degradation using two methods combined biostimulation and bioaugmentation

In this experiment, we used a technique that combines both bioaugmentation and biostimulation methods. Bioaugmentation was performed by the addition of different bacterial strains such as *P. fluorescens*, *B. subtilis*, *R. erythropolis* and the isolated bacterial consortium mangrove sediments. Biostimulation is achieved by adding to each microcosm series compost or mineral salt medium. From the observation of results, after 5 weeks of treatment, in microcosms containing compost, there was a diesel reduction rate of 80.8 ± 0.2 % in the microcosms treated with *P. fluorescens*, 86.2 ± 0.1 % with the endogenous consortium 86.7 ± 0.07 % with *B. subtilis* and 92.0 ± 0.02 % with *R. erythropolis* (Fig. 10). Statistical analysis of these results reveals that there is no significant difference between treatments. However, there is a significant difference over time during the first three weeks. There is no significant difference in the degradation of diesel in the last two weeks, irrespective of the treatment. The general compost acts as a biostimulant, providing nutrients to the existing microflora; it also improves sediment structure by promoting soil aeration through the various elements. The mineral-salt medium is used in the same proportions in each microcosm; the degradation rate observed here is the exclusive result of bacterial activity. *R. erythropolis* appears to be the most appropriate strain for the degradation of diesel over time. In order 77.5 ± 0.2 % is noted as diesel degradation rates in microcosms containing *P. fluorescens*, 78.3 ± 1.2 % in microcosms containing endogenous consortium, 84.4 ± 0.07 % with *B. subtilis*, and 90.6 ± 0.08 % with *R. erythropolis*. As in the previous case with compost, the statistical analysis of these results reveals that there is no significant difference between treatments. There is a significant difference over time during the first 3 weeks. There is no significant difference in the degradation of diesel in the last 2 weeks, irrespective of the treatment.

Biodegradation is dependent on several factors including the oxygen concentration of the environment, environmental temperature, pH and the presence of nutrients in the medium. Microorganisms require appropriate environmental conditions to successfully reduce, eliminate, or

transform contaminants present in different media (Fulekar, 2010; Ghaly et al., 2013). Under these conditions, successfully degraded molecules are natural organic compounds such as light hydrocarbons such as diesel (Bulman and Newland 1993; Bragg et al., 1994; Wenderoth et al., 2003). Compared to natural attenuation, the analysis of samples by flow cytometry showed cell viability of 63% and 70 %, respectively, for the first and second week of treatment. The results obtained from the bioaugmentation treatment are quite satisfactory and are better than those obtained by biostimulation. It should be noted that the rate of degradation here is a function of the bacterial strain used. *R. erythropolis* strain has better degradation compared to *B. subtilis*, *P. fluorescens*, and the consortium.

Combining bioaugmentation and biostimulation, we obtained even better results. The increase in bacteria (10^7 CFU/g of dry matter) and the improvement of environmental conditions (medium temperature between 27 and 30 °C) promoted better diesel degradation kinetics compared to all other strategies in place. *R. erythropolis* always presented better results than other species. By focusing more on this strain, the literature indicates that the genus *Rhodococcus* is a very diverse group of bacteria that possesses the ability to degrade a large number of organic compounds, including some of the most difficult compounds with regard to recalcitrance and toxicity (Larkin et al., 2005). *Rhodococcus* can catabolize short and long-chain alkanes, aromatic (halogenated and nitro-substituted), heterocyclic, and polycyclic aromatic compounds. According to Liu (2011), these strains possess oxygenases, making them capable to biodegrade the constituents of petroleum such as n-alkanes, isoalkanes, cycloalkanes, and aromatic compounds (Atlas, 1981; Hamamura et al., 2008). For example, *R. erythropolis* was able to use 20,000 ppmv of crude oil as the only energy source (Karpenko et al., 2006) demonstrating the potential of *Rhodococcus* strains to bioremediation. The success of members of the genus *Rhodococcus* in degrading aromatic compounds is based upon the possession of a wide range of dioxygenases (Larkin et al., 2005).

Five weeks after the experiment, the results showed a high concentration in diesel in control sediment in sterile flasks and in the greenhouse. Only a small fraction was eliminated. The results show that 3.5 % and 7.6 % diesel have evaporated sterile control sediment respectively flask and microcosms (Table 3). Sediments are sterilized by autoclave. This sterilization allows taking out the total microflora. This loss of diesel is certainly due to volatilization by evaporation of diesel. The degradation of diesel was effective in sterile sediment when microorganisms were added into the material. Thus, the microorganisms used in our experiment were able to degrade diesel.

Table 3: Masse balance of diesel, amount remained (ppm) and percentages of total hydrocarbons (input) in sterile control sediments after 5 weeks

Hydrocarbon	fate of hydrocarbon	In flasks		In greenhouse	
		Sterile control		Sterile control	
		Amounts (ppm)	% Input	Amounts (ppm)	% Input
Diesel	Input	14900 ± 82.3		21000 ± 2778	
	In sediment	14383 ± 237	96.5	19405 ± 1824	7.6
	Losses	517	3.4	1595 ± 924	92.4

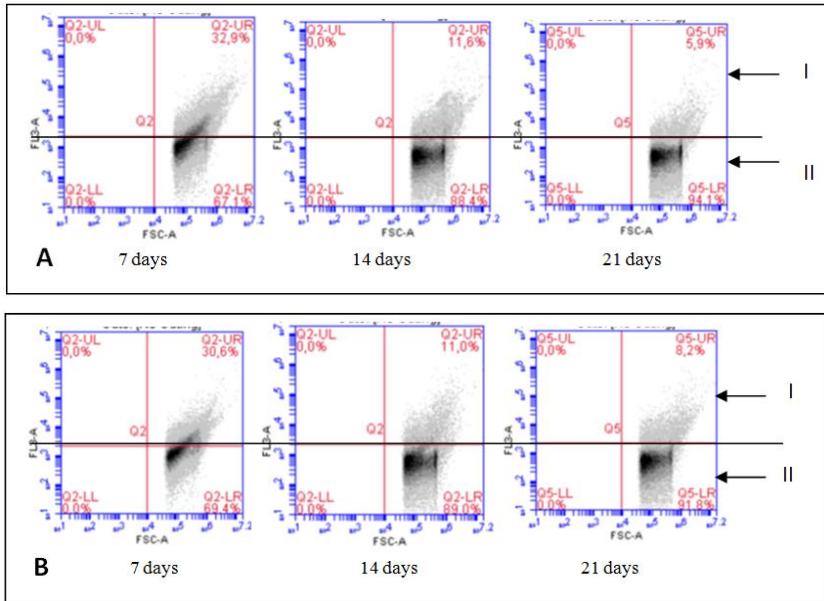
To degrade diesel found in mangrove sediments we have worked with, we controlled two main elements. Both elements can be limiting factors for biodegradation. Temperature was adjusted at 30 °C, and we focused on the contribution of microorganisms and the presence of nutrients. The first part of the experiment consisted in demonstrating the presence of microorganisms able to degrade diesel. Then, we used an isolated mangrove sediment consortium able to degrade hydrocarbons. As it was suggested by Venosa et al., (2002), the presence of microorganisms with the appropriate metabolic abilities is the most important requirement for bioremediation. Several studies of the biodegradation of hydrocarbons in mangrove ecosystems have already used endogenous and/or exogenous consortia or pure strains (Bento et al., 2005; Yu et al., 2005; Chen et al., 2008; Liu and Liu 2011). In all treatments performed (natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation), the presence of microorganisms able to degrade diesel has been reported. The second parameter to be studied is the presence of nutrients. Some nutrients such as nitrogen and phosphorus are essential for growth and metabolic activities of microorganisms.

In the treatment by biostimulation, we added a mineral solution containing nitrogen and phosphorus. Biostimulation is the addition of limiting nutrients to support microbial growth. According to Adams et al., (2015) bioremediation uses microbial metabolism in the presence of optimal environmental conditions and sufficient nutrients to breakdown contaminants, notably petroleum hydrocarbons. Microorganisms able to degrade petroleum products are known to use directly metabolizable nitrogen and phosphorus compounds as helping agents for biodegradation. The fertilizer supply causes an increase in heterotrophic and hydrocarbon-splitting bacteria and an increase in the phytoplanktonic biomass (LePetit and N'Guyen 1976). The various degradation rates obtained in flasks and the greenhouse in this experiment are comparable in time to those that are found in the literature. Using the compost to make his experiment of biostimulation, Atagana (2008) obtained 100 % of degradation after 570 days of treatment. After 84 days, Abioye et al., (2012) obtained 92 % of degradation of TPH by biostimulation and 55 % by natural attenuation. Also using organic nutrients, Chikere (2012) obtained in two different experiments 95 % and 98 % of degradation after 56 days. Orji et al. (2012) obtained 63 % of degradation by treating sludge mangroves by biostimulation with organic nutrients. As for the degradation of diesel by bioaugmentation, Fan et al. (2013) obtained 83 % TPH removal using an exogenous pure strain and 61 % using indigenous microorganisms. Wu et al.

(2012) obtained more than 60 % after 270 days using *P. fluorescens*. All these different reduction rates are comparable to our results. The main difference is the short time of this study.

IV.3.6 Characterization of the Consortium by Flow Cytometry in Flasks Experiment

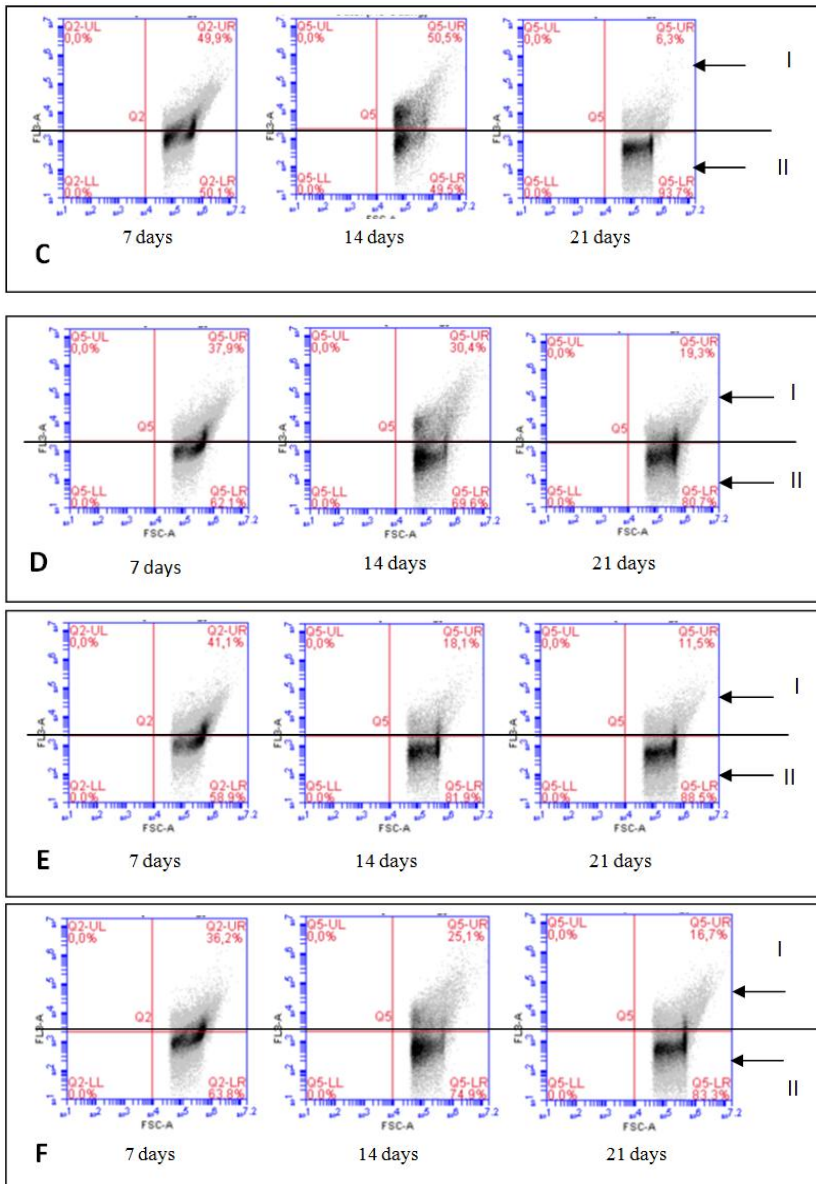
The evolution of the consortium during 21 days in flasks in sterile and non-sterile sediments was observed by the flow cytometry method. Interpretation of the results was performed using the PI coloration of cells, as cells that stain with PI are either dead or have poor membrane integrity. PI penetrates the cell membrane and binds to the DNA. The uncolored cells are alive and show good membrane integrity. The cytograms of the consortium in flasks show two subpopulations: a subpopulation (I) containing the PI-labeled cells and a subpopulation (II) containing intact cells that resist the effects of diesel and are not labeled with PI. The results during the 21 days of experiment are presented in Figs. 11 and 12 for sterile and non-sterile conditions, respectively. The cytograms presented in Fig. 11 are those of the flasks containing sterile sediments. After 7 days of treatment, the subpopulation with poor membrane integrity represented 33 % in the treatment where nutrient solution only was added, compared to 30% in the flasks with consortium and nutrient solution added. These percentages dropped to 11 and 11 %, respectively, after 14 days of treatment to finally reach 6 and 8 %, respectively, after 21 days of treatment. This decrease in subpopulation (I) can be explained by the fact that diesel degraded in the sediment over time. After 21 days, the degradation rate was 46 % in the flasks with only the consortium added and 31 % in the flasks with the consortium and nutrient solution added. This reduced the stress induced by the pollutant in the cells. Moreover, the consortium probably became acclimated to diesel and metabolized it over time (Wild and Jones, 1986; Chaneau et al., 1999; Zhang et al., 2006).



I: Sub-population with poor membrane integrity; II: Sub-viable population or one with good membrane integrity; FL3-A: Red fluorescence; FSC-A: Forward Scatter

Figure 11: Cytofluorimetry plots presenting evolution of microorganisms in mangrove sterile sediment over 21 days (A = Sterile sediments + Consortium; B = Sterile sediments + Consortium + Nutrient solution)

In the other treatments performed with non-sterile sediment, the trend was the same. Analysis of cytofluorimetry plots in both cases shows a progressive adaptation of endogenous microflora to stress caused by the diesel during treatment. This adaptation is based on the degradation of the pollutant in the flasks. This leads us to conclude that the consortium was probably acclimated to diesel and metabolized it over time.



I: Sub-population with poor membrane integrity; II: Sub-viable population or one with good membrane integrity; FL3-A: Red fluorescence; FSC-A: Forward Scatter

Fig. 12: Cytograms presenting evolution of microorganisms in mangrove non-sterile sediments (C = Cytograms of samples treated by natural attenuation; D = Cytograms of samples treated by biostimulation; E = Cytograms of samples treated by bioaugmentation; F: Cytograms of samples treated both by biostimulation and bioaugmentation)

The cytograms in Figs. 11 and 12 show that diesel has a negative effect on membrane integrity or survival of microorganisms with PI staining at the cell membrane. This negative effect is higher in the first week of the experiment. Thereafter, it is found that the percentage of microorganisms undergoing PI staining in their membrane decreases with time. This could be explained by the fact that microorganisms adapt gradually to diesel. The addition of nutrients does not reduce this negative effect of diesel but seems to increase the size and metabolic activity of bacterial strains. The

consortium in sterile flasks becomes colored at least PI microorganisms compared to non-sterile flasks. This is due to the fact that the consortium undergoes less stress and is well-adapted to diesel.

IV.4 Conclusion

The results obtained in this study must take account of the fact that diesel was manually added into the samples. The results of this study show that, in the first step, mangrove sediment contains an active microflora that can metabolize diesel. Indigenous and active microflora presents an interesting potential for diesel degradation. Our consortium adapted well to various conditions and was resistant to pollutant-induced stress. Nutrient supplementation significantly increased the rate of diesel degradation (90 % after 35 days). In general, we found that the consortium adapts well to the pollutant; the degradation of diesel is the consequence of this adaptation. In the second step, different treatments on mangrove sediments artificially polluted by diesel such as natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation showed the ability of endogenous microflora to degrade diesel. However, the degradation rates obtained with the endogenous microflora in relation to the time or duration of the treatment were substantially lower than those obtained when the treatment was carried out with the addition of exogenous bacteria for the same duration. Bioaugmentation with the addition of *Rhodococcus erythropolis* presented good results in this case. These results were even better when the treatment was a combination of bioaugmentation and biostimulation.

References

- Abioye, O. P., Agamuthu, P., & Abdul-Aziz, R. A. (2012).** Biodegradation of used motor oil using organic waste amendment. *Biotechnology Research International*. doi:10.1155/2012/587041Research.
- Adams, G. O., Fufeyin, P. T., Okoro, S. E., Ehinomen, I. (2015).** Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 3(1), 28–39.
- Alongi, D. M. (1988).** Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. *Microbiology Ecology*, 15, 59–79.
- Atagana, H. I. (2008).** Compost bioremediation of hydrocarbon-contaminated soil inoculated with organic manure. *African Journal of Biotechnology*, 7(10), 1516–1525.
- Atlas, R. M., & Bragg, J. (2009).** Bioremediation of marine oil spills: when and when not—the Exxon Valdez experience. *Microbial Biotechnology*, 2(2), 213–221.
- Atlas, R. M. (1981).** Microbial-degradation of petroleum-hydrocarbons—an environmental perspective. *Microbiological Reviews*, 45(1), 180–209.
- Barathi, S., & Vasudevan, N. (2001).** Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environmental International*, 26(5-6), 413–416.
- Bartha, R., & Bossert, I. (1984).** The treatment and disposal of petroleum wastes. In *Petroleum Microbiology* (Ed.), R. M. Atlas (pp. 553–578). Macmillan: New York, USA.
- Bento, F. M., Camargo, F. A. O., Okeke, B. C., Frankenberger, W. T. (2005).** Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*, 96, 1049–1055.
- Bernard, D., Pascaline, H., Jeremie, J. J. (1996).** Distribution and origin of hydrocarbons in sediments from lagoons with fringing mangrove communities. *Marine Pollution Bulletin*, 32, 734–739.
- Bicca, F. C., Fleck, L. C., & Ayub, M. A. Z. (1999).** Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiologia*, 30, 231–236.
- Bragg, J. R., Prince, R. C., Harner, E. J., & Atlas, R. M. (1994).** Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. *Nature*, 368, 413–418.
- Brandao, P. F., Clapp, J. P., & Bull, A. T. (2003).** Diversity of nitrile hydratase and amidase enzyme genes in *Rhodococcus erythropolis* recovered from geographically distinct habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5754–5766.
- Brito, E. M. S., Guyoneaud, R., Goñi-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., Crapez, M. A. C., Wasserman, J. C. A., & Duran, R. (2006).** Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in Microbiology*, 157, 752–762.

- Brooijmans, R. J. W., Pastink, M. I., & Siezen, R. J. (2009).** Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. *Microbial Biotechnology*, 2(6), 587–594.
- Bulman, T. L., & Newland, M. (1993).** In situ bioventing of a diesel fuel spill. *Hydrological Sciences Journal*, 8, 297–308.
- Chandrasekhar, N., & Karigar, C. S. (2010).** Bacterial degradation of anthracene by *Pseudomonas fluorescens* KCP2. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences*, 12(3), 591–597.
- Chaneau, C. H., Morel, J., Dupont, J., Bury, E., & Oudot, J. (1999).** Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Science of the Total Environment*, 227, 237–247.
- Chen, J., Wong, M. H., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2008).** Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment. *Marine Pollution Bulletin*, 57, 695–702.
- Chikere, C. B. (2012).** Culture-independent analysis of bacterial community composition during bioremediation of crude oil polluted soil. *British Microbiology Research Journal*, 2(3), 187–211.
- Christova, N., Tulevaa, B., & Nikolova-Damyanova, B. (2004).** Enhanced hydrocarbon biodegradation by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59c, 205–208.
- Colwell, R. R., Walker, J. D., & Cooney, J. J. (1977).** Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Critical Reviews in Microbiology*, 5(4), 423–445.
- Cooney, J. J., Silver, S. A., & Beck, E. A. (1985).** Factors influencing hydrocarbon degradation in three freshwater lakes. *Microbial Ecology*, 11(2), 127–137.
- Darsa, K. V., Thatheyus, A. J., & Ramya, D. (2014). Biodegradation of petroleum compound using the bacterium *Bacillus subtilis*. *Science International*, 2(1), 20–25.
- Das, K., & Mukherjee, A. K. (2007).** Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource Technology*, 98(7), 1339–1345.
- Ellis, R. J., Morgan, P., Weightman, A. J., & Fry, J. C. (2003).** Cultivation-dependant and independent approaches for determining bacterial diversity in heavy metal contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3223–3230.
- Fan, M. Y., Xie, R. J., & Qin, G. (2013).** Bioremediation of petroleum-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with yeast. *Environmental Technology*, 35, 4.
- Floodgate, G. (1984).** The fate of petroleum in marine ecosystems. In *P. Microbiology* (Ed.), R. M. Atlas (pp. 355–398). Macmillan: New York, USA.
- Fulekar, M. H. (2010).** Global status of environmental pollution and its remediation. In Fulekar M. H. (Eds.), Recent Advances. *Bioremediation Technology*, 1–6.

- Ghaly A. E., Yusran A., Dave D. (2013).** Effects of biostimulation and bioaugmentation on the degradation of pyrene in soil. *Journal Bioremediation Biodegradation*, 5, 1–13.
- Hamamura, N., Fukui, M., Ward, D. M., & Inskeep, W. P. (2008).** Assessing soil microbial populations responding to crude-oil amendment at different temperatures using phylogenetic, functional gene (alkB) and physiological analyses. *Environmental Science and Technology*, 42, 7580–7586.
- Holguin, G., Vazquez, P., & Bashan, Y. (2001).** The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biology and Fertility of Soils*, 33, 265–278.
- Jalilzadeh Yengejeh, R., Sekhavatjou, M. S., Maktabi, P., Arbab Soleimani, N., Khadivi, S., & Pourjafarian, V. (2014).** The biodegradation of crude oil by *Bacillus subtilis* isolated from contaminated soil in hot weather areas. *International Journal of Environmental Research*, 8(2), 509–514.
- Kaczorek, E., & Olszanowski, A. (2011).** Uptake of hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* (P1) and *Pseudomonas putida* (K1) strains in the presence of surfactants: a cell surface modification. *Water, Air, and Soil Pollution*, 214, 451–459.
- Karpenko, E. V., Vil'danova-Martishin, R. I., Shcheglova, N. S., Pirog, T. P., & Voloshina, I. N. (2006).** The prospects of using bacteria of the genus *Rhodococcus* and microbial surfactants for the degradation of oil pollutants. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 42, 156–159.
- Khan, M., & Scullion, J. (2002).** Effects of metal (Cd, Cu, Ni, Pb or Zn) enrichment of sewage-sludge on soil micro-organisms and their activities. *Applied Soil Ecology*, 20, 145–155.
- Larkin, M. J., Kulakov, L. A., & Allen, C. C. R. (2005).** Biodegradation and *Rhodococcus*—masters of catabolic versatility. *Environmental Biotechnology*, 16, 282–290.
- Leahy, J. G., & Colwell, R. R. (1990).** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, 5, 305–315.
- LePetit, J., & N'Guyen, M.-H. (1976).** Besoins en phosphore des bacteries metabolisant les hydrocarbures en mer. *Canadian Journal of Microbiology*, 22, 1364–1373.
- Lu, H., Zhang, Y., Liu, B., Liu, J., Ye, J., & Yan, C. (2011).** Rhizodegradation gradients of phenanthrene and pyrene in sediment of mangrove (*Kandelia candel* (L.) Druce). *Journal of Hazardous Materials*, 196, 263–269.
- Liu, C. W., & Liu, H. S. (2011).** *Rhodococcus erythropolis* strain NTU-1 efficiently degrades and traps diesel and crude oil in batch and fed-batch bioreactors. *Process Biochemistry*, 46, 202–209.
- Mehdi, F. S., Siddiqui, I. A., Ali, N. I., & Afzal, M. (2000).** Rhizosphere mycoflora of black mangrove seedling at Karachi coast. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 3(8), 1352–1353.
- Moran, A. C., Olivera, N., Commendatore, M., Esteves, J. L., & Sineriz, F. (2000).** Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. *Biodegradation*, 11, 65–71.

- Moreira, I. T. A., Oliveira, O.M. C., Triguis, J. A., Dos Santos, A. M. P., Queiroz, A. F. S., Martins, C. M. S., Silva, C. S., & Jesus, R. S. (2011).** Phytoremediation using *Rhizophora mangle* L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's). *Microchemical Journal*, 29, 376–382.
- Orji, F. A., Abiye, A. I., & Dike, E. N. (2012).** Laboratory scale bioremediation of petroleum hydrocarbon—polluted mangrove swamps in the Niger Delta using cow dung. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(4), 219–228.
- Owens, E. H., Solsberg, L. B., West, M. R., & McGrath, M. (1998).** Field guide for oil spill response in arctic waters (Emergency prevention, preparedness and response (EPPR), p. 348). Yellowknife, NT Canada: Environment Canada.
- Perry, J. J. (1984).** Microbial metabolism of cyclic alkanes. In *Petroleum Microbiology* (Ed.), R. M. Atlas (pp. 61–98). New York, USA: Macmillan.
- Queiroga, C. L., Nascimento, L. R., & Serra, G. E. (2003).** Evaluation of paraffin biodegradation and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(4), 321–324.
- Rahman, K. S. M., Rahman, T. J., Kourkoutas, Y., Petsas, I., Marchant, R., & Banat, I. M. (2003).** Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioprocess Technology*, 90(2), 159–168.
- Ramsay, M. A., Swannell, R. P. J., Shipton, W. A., Duke, N. C., Hill, R. T. (2000).** Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 41(12), 413–419.
- Singh, A., Kumar, V., & Shrivastava, J. N. (2010).** Green biotechnology of EM in bioremediation of wastewater. *Geobios*, 37, 231–237.
- Steffensen, W. S., & Alexander, M. (1995).** Role of competition for inorganic nutrients in the biodegradation of mixtures of substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2859–2862.
- Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (2008).** Effectiveness of bacterial inoculum and mangrove plants on remediation of sediment contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, 57, 716–726.
- Tam, N. F. Y., Guo, C. L., Yau, W. Y., & Wong, Y. S. (2002).** Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 316–324.
- Tian, Y., Liu, H. J., Zheng, T. L., Kwon, K. K., Kim, S. J., Yan, C. L. (2008).** PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*, 57, 707–715.
- Ulrici, W. (2000).** Contaminant soil areas, different countries and contaminant monitoring of contaminants. In: H.J. Rehm and G. Reed (Eds.), Environmental Process II. *Soil Decontamination Biotechnology*, 11, 5-42.

- Venosa, A.D., Lee, K., Suidan, M.T., Garcia-Blanco, S., Cobanli, S., Moteleb, M., Haines, J.R., Tremblay, G., & Hazelwood, M. (2002).** Bioremediation and biorestitution of a crude oil contaminated freshwater wetland on the St. Lawrence River. *Bioremediation Journal*, 6(3), 261–281.
- Wang, Q., Zhang, S., Li, Y., & Klassen, W. (2011).** Potential approaches to improving biodegradation of hydrocarbons for bioremediation of crude oil pollution. *Journal of Environmental Protection*, 2, 47–55.
- Wenderoth, D. F., Rosenbrock, P., Abraham, W. R., Pieper, D. H., & Höfle, M. G. (2003).** Bacterial community dynamics during biostimulation and bioaugmentation experiments aiming at chlorobenzene degradation in groundwater. *Microbial Ecology*, 46, 161–176.
- Wild, S. R., & Jones, K. C. (1986).** Biological and abiotic losses of polynuclear hydrocarbons from soils freshly amended with sewage sludge. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12, 5–12.
- Wu, T., Xie, W. J., Yi, L., Li, X. B., Yang, B. H., & Wang, J. (2012).** Surface activity of salt-tolerant *Serratia* spp. And crude oil biodegradation in saline soil. *Plant, Soil and Environment*, 58(9), 412–416.
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., & Golyshin, P. N. (2007).** Obligate oil-degrading marine bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(3), 257–266.
- Yu, S. H., Ke, L., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2005).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environment International*, 31, 149–154.
- Zhang, X., Kimmel, M. R. D., McGilliard, C., & Boicourt, W. (2006).** Spatial variability in plankton biomass and hydrographic variables along an axial transect in Chesapeake Bay. *Journal of Geophysical Research Oceans*, 111(5), 1978–2012.
- Zhang, C. G., Leung, K. K., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2007).** Germination, growth and physiological responses of mangrove plant (*Bruguiera gymnorrhiza*) to lubricating oil pollution. *Environmental and Experimental Botany*, 60, 127–136.

CHAPITRE V: BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN MANGROVE SEDIMENTS UNDER DIFFERENT STRATEGIES: NATURAL ATTENUATION, BIOSTIMULATION AND BIOAUGMENTATION WITH *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* T902.1

Ce chapitre se situe dans la continuité du chapitre précédent. Le souci étant d'aller plus loin dans l'évaluation de la capacité du consortium endogène à dégrader les hydrocarbures. Cette expérience met en évidence les différents traitements tels que l'atténuation naturelle, la bioaugmentation et/ou la biostimulation. La différence réside dans le fait que dans cette expérience, le polluant à dégrader est constitué d'hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ce sont des hydrocarbures contenant un ou plusieurs noyaux aromatiques et dont récalcitrants. Ils sont plus difficiles à dégrader par les microorganismes. L'expérience utilise d'un côté le consortium endogène et de l'autre une souche pure exogène *Rhodococcus erythropolis*. Les résultats ont montré que le consortium tel qu'il a été utilisé peut permettre de dégrader les hydrocarbures contenus dans les sédiments de mangroves sans faire appel aux souches pures ou aux consortia exogènes.

CHAPITRE V: BIODEGRADATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN MANGROVE SEDIMENTS UNDER DIFFERENT STRATEGIES: NATURAL ATTENUATION, BIOSTIMULATION AND BIOAUGMENTATION WITH *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* T902.1

Firmin Semboung Lang¹, Jacqueline Destain¹, Frank Delvigne¹, Philippe Druart², Marc Ongena¹, Philippe Thonart¹ (2016). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments under different strategies: natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation with *Rhodococcus erythropolis* T 902.1. *Water Air and Soil Pollution*, 227: 297. DOI 10.1007/s11270-016-2999-4

(1) Université de Liège – Gembloux Agro Bio-Tech, Centre Wallon de Biologie Industrielle, Passage des Déportés, 2, B-5030 Gembloux, Belgium. E-mail: langsemb@yahoo.fr

(2) Centre Wallon de Recherche Agronomique (CRA-W), Chaussée de Namur, 24, B-5030 Gembloux, Belgium

Abstract:

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are pollutants that occur in mangrove sediments. Their removal by bacteria often depends on such characteristics as the number of benzene rings they possess and their solubility. Their removal also depends on environmental factors, such as pH, temperature, oxygen and the ability of the endogenous or exogenous microflora to metabolize hydrocarbons. With the aim of biologically treating mangrove sediments polluted by hydrocarbons, a biodegradation experiment was conducted using mangrove sediments artificially contaminated by a mixture of four PAHs. The study used *Rhodococcus erythropolis* as the exogenous bacterial strain in order to assess the biodegradation of the PAH mixture by natural attenuation, biostimulation, bioaugmentation and a combination of biostimulation and bioaugmentation. The results showed that the last three treatments were more efficient than natural attenuation. The biostimulation/bioaugmentation combination proved to be the most effective PAH degradation treatment.

Keywords: Mangrove, Biodegradation, Hydrocarbons.

V.1 Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute an important class of organic compounds with two or more fused aromatic rings that persist in soils and sediments (Cerniglia 1993; Marini et al. 2013). This class of toxic environmental pollutants has accumulated into the environment mainly because of anthropogenic activities. PAHs are generated by natural combustion processes as well as human activities. Anthropogenic inputs from atmospheric deposition, industrial stack emission, oil spills, ship traffic, urban runoff, and the illegal discharge of industrial effluents have led to a significant accumulation of PAHs in the marine biotope (Luan et al. 2006). Mangrove ecosystems, which are important inter-tidal estuarine wetlands along coastlines in tropical and subtropical regions, are exposed to human activities and are subject to PAH contamination from tidal water, river water, and land-based sources (Yu et al. 2005). Ho Chung swamp covers a mangrove area of 2.37 ha and has been polluted by vehicle exhausting deposition, and discharge of industrial, livestock, and household waste and wastewater. The PPAHs concentrations (sum of 16 USEPA priority PAHs) of surface sediments varied from 1162 to 3322 mg kg⁻¹ freeze-dry weight with mean and standard deviation values (based on three replicates) of 2202 ± 959 mg kg⁻¹ freeze-dry weight. The silt and clay percentage, organic matter content, and pH in this mangrove sediment were 36 ± 12, 4.59 ± 0.58 dry weight, and 7.24 ± 0.24 %, respectively (Yu et al. 2005). PAHs present in soil can have a toxic effect on many plants, microorganisms and invertebrates (Tian et al. 2008).

According to Juhasz (2000), since 1970, the research on the biological degradation of PAHs has demonstrated that bacteria, fungi, and algae have catabolic abilities that could be used for the remediation of PAH-contaminated soil and water. Mangrove sediments contain a diverse group of indigenous bacterial species capable of degrading PAH efficiently (Tam et al. 2002; Ke et al. 2003). Bioremediation has been shown to be effective in remediating soils contaminated with low molecular weight PAHs (Mueller et al. 1991; Kastner and Mahro 1996; Banerjee et al. 1995), but high molecular weight PAHs are generally recalcitrant to microbial attack (Park et al. 1990; Erickson et al. 1993; Cerniglia 1992).

Microbial degradation is believed to be one of the major processes involved in cleaning up PAH-contaminated sediments (Hughes et al., 1997). Ramsay et al. (2000) reported that a large number and a wide diversity of PAH-degrading microorganisms were found in mangrove sediments. Ke et al. (2003) showed that over 90 % of pyrene was removed from contaminated mangrove microcosms in 6 months. In order to enhance biodegradation efficiency, three remedial strategies were proposed by Iwamoto and Nasu (2001): natural attenuation, bioaugmentation, and biostimulation.

Natural attenuation uses indigenous microorganisms to degrade contaminants and has the advantage of being natural, involving no external modification of the environment (Mills et al. 2003). Therefore, it also avoids causing any damage in ecologically sensitive mangrove habitats (Dowty et al. 2001). However, intrinsic bioremediation often takes a long time to complete because of the

limited population size of the indigenous degrading microorganisms (Forsyth et al. 1995). Biostimulation, based on supplying additional nutrients or substrates to stimulate the degradation of native microorganisms, can also be used to activate biodegradation (Riser-Roberts 1998), especially in environments such as mangrove sediments where nutrients are often found in low concentrations (Burns et al. 1999). The microbial activity to degrade oil contamination can be stimulated by addition of soluble inorganic fertilizer to mangrove sediments. However, the effectiveness of these strategies depends on the sediments and the contaminants considered (Balba et al. 1998). Bioaugmentation, based on inoculating microorganisms with the required degradation capability, might be a way of enhancing the biodegradability of toxic contaminants. Bioaugmentation with competent degrading strains of bacteria can stimulate the rate and the extent of biodegradation in appropriate environments (Vogel 1996).

The current study therefore aims to (1) assess the potential degradation ability of *Rhodococcus erythropolis* T902.1, an exogenous bacterial strain, in the presence of a mixture of four PAHs, (2) assess the ability of *R. erythropolis* in pure culture and in association with the endogenous microflora, and (3) evaluate and compare different PAH degradation strategies.

V.2 Materials and Methods

V.2.1 Mangrove Sediments and PAH Analysis of Sediments

Mangrove sediments were collected from the mangrove ecosystem of the Wouri estuary in Cameroon. This ecosystem receives effluent from industrial activities upstream. The hydrocarbon index for PAH Borneff is less than 0.18 mg/kg dry matter.

V.2.2 Microorganisms

We used the indigenous microflora of the mangrove sediments for treatment by natural attenuation and biostimulation. *Rhodococcus erythropolis* T902.1 was added to the indigenous microflora for treatment by bioaugmentation. The *Rhodococcus* genus is a very diverse group of bacteria with the ability to degrade a large number of organic compounds, including some of the most problematic compounds in terms of recalcitrance and toxicity. *Rhodococcus* bacteria appear to have adopted a strategy of hyper-recombination associated with a large genome (Larkin et al. 2005). *Rhodococcus* sp. appears to be a good candidate for use in bioaugmentation, since this genus is ubiquitous (Bell et al. 1998) and can degrade a broad range of aliphatic, branched, cyclic, (polycyclic) aromatic, sulfur-containing, and chlorinated hydrocarbons (Martinkova et al. 2009; Larkin et al. 2010a, 2010b). *Rhodococcus* sp. can also withstand environmental stresses, such as low temperature, a low water content, high pH values, a high salinity, lacks of nutrients, and the presence of toxic solvents or pollutants (Whyte et al. 1999; de Carvalho 2010, 2012; de Carvalho et al. 2014). *Rhodococci* synthesize mycolic acids and trehalolipids to modify their membrane hydrophobicity in order to protect themselves from these adverse environments and to solubilize and

assimilate hydrophobic substrates that are poorly bioavailable in soil (Lang and Philp 1998; Kuyukina et al. 2005; Kuyukina and Ivshina 2010). *Rhodococcus erythropolis* T902.1, despite a limitation in oxygen transfer, enhanced a greater hydrocarbons degradation compared to the biostimulation treatment. *R. erythropolis* T902.1 is the desiccation-tolerant strain. This strain is suitable for large production in bioreactors and conservation in a powdered form before its use in real conditions (Weekers et al. 1999; Masy et al. (2016).

V.2.3 Polycyclic Aromatics Hydrocarbons

Polycyclic aromatic hydrocarbons are nonpolar, hydrophobic compounds that do not ionize. As a result, they are only slightly soluble in water. In this study, we used four PAHs: anthracene (Ant), phenanthrene (Phe), pyrene (Pyr), and fluoranthene (Flt), purchased from UCB in Belgium (purity > 97 %). Anthracene contains three benzene rings, its molecular weight is 178.24, and the octanol-water partition coefficient (logKow) is 4.54. Phenanthrene has three benzene rings as well, its molecular weight is 178.24 and the logKow is 4.57. Pyrene has four benzene rings, its molecular weight is 202.26 and its logKow is 5.18. Finally, fluoranthene also contains four benzene rings, its molecular weight is 178.24 and its logKow is 4.18.

V.2.4 Biodegradation Studies

Mangrove sediments, up to a depth of 10 cm, were collected from the mangrove area of the Wouri estuary, which covers the Mungo Wouri and Dibamba mangroves in Cameroon at low tide. The sediments were artificially contaminated using the method described by Puri et al. (1997), Ke et al. (2003), and Tam et al., (2008), with some slight modifications. In each flask, 10,000 mg kg⁻¹ of dry matter of each PAH used (anthracene, phenanthrene, pyrene, and fluoranthene) were dissolved in 25 ml of acetone and mixed with 100 g of mangrove sediment. The flasks were left open for 2 days in order to allow the acetone to evaporate and the sediment to adsorb the PAHs. The PAH concentration in each flask was about 10,000 mg kg⁻¹ of dry matter. A volume of 100 mL of artificial seawater with a salinity of 10 ‰ (parts per thousands) was added into each flask.

Two series of three flasks, each containing 100 g of artificially contaminated mangrove sediment, were sterilized by autoclaving at 121 °C for 30 min. We added in one series 100 mL of medium containing 70 % of seawater, 30 % of mineral salt medium (MSM) and *R. erythropolis* T902.1. In other series, we added 100 mL of medium containing 100 % of seawater and *R. erythropolis* T902.1. Another series of three flasks, also sterilized by autoclaving, only contained PAHs and 100 mL of seawater. This series was used as the control to determine any abiotic loss of PAHs. For the natural attenuation treatment, we used three flasks containing sterile noncontaminated sediment and artificial seawater. For the biostimulation treatment, another set of three flasks were treated as above, with 30 % of MSM added. For the bioaugmentation treatment, we used flasks with nonsterile contaminated sediment, artificial seawater, and *R. erythropolis* as the pure

bacterial strain. For the treatments combining biostimulation and bioaugmentation, we added *R. erythropolis* and 30 % MSM to three flasks containing nonsterile contaminated sediment. For the bioaugmentation sediment slurry, the *R. erythropolis* starter was inoculated in order to give an initial inoculum concentration of 10^{-7} cell ml^{-1} at the beginning of each degradation experiment (after the adsorption of the spiked PAHs into the sediment). The MSM was composed of (in mg L^{-1}): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,000; K_2HPO_4 , 800; KH_2PO_4 , 200; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200; and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100. The trace elements were composed of: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1; and $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1. The salinity of the MSM was adjusted to 10 ‰, similar to the artificial seawater. The PAHs were extracted from the sediments every 7 days and over a period of 5 weeks. The extraction procedure was based on an analysis of PAHs by high-performance liquid chromatography (HPLC) Agilent 1100 series, as proposed by Wannoussa et al. (2015), with slight modifications. Thus, 1 g of humid sediment sample was put into 18-ml glass tubes, and an equivalent weight of anhydrous sulfate and 10 mL of hexane were added. The mixture was homogenized by vortexing and placed in an ultrasonic bath for 1 h. The tubes were then placed into a horizontal shaker protected from light for 16 h, and the organic phase was transferred to 15-mL Falcon tubes. After centrifugation and transfer into a new tube, the residue was extracted a second time with 10 mL of hexane and put into a glass balloon. The hexane was evaporated using a rotavapor (BUCHI ROTAVAPOR R-200) heated to 55 °C, and the dry extract was taken up in 10 mL of methanol. Then, 1 mL of this solution was put into an HPLC vial and closed with a septum cap and a crimper. The samples were next sent to HPLC analysis. The HPLC analyses were performed using Agilent 1100 Series equipment and a C18 column (LiChroCART® 250–4.6 HPLC-cartridge Purospher® STAR RP-18 endcapped 5 μm , Merck, D) maintained at 30 °C.

V.2.5 Enumeration of Total Aerobic Heterotrophs and PAH-Degrading Bacteria

The enumeration of the total microflora and active microflora was done by using the successive dilution method, with the dilution spread on Petri dishes. In this way, 1 g of mangrove sediment sample was recovered from each flask every 7 days. The sample was placed in a test tube containing 9 ml of peptone water. For the active microflora, the spreading was done on a solid MSM containing 10 mg/kg of dry matter of diesel as the sole carbon source. Each dilution was spread three times. After 3 days of incubation at 30 °C, the number of colony forming units (CFUs) was counted and the mean of each dilution was determined. The MSM was composed of (in mg L^{-1}): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,000; K_2HPO_4 , 800; KH_2PO_4 , 200; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100; and trace elements made up of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 12; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3; $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1; and 15 g agar. The pH was adjusted to 7.0–7.2. The MSM was prepared in artificial seawater at 10 ppt (parts per thousands). In order to assess the total microflora, we used rich medium (M 863): glucose, 20 g/L; peptone, 10 g/L; yeast extract, 10 g/L; and Tween 80, 1 mL/L. For cultures on solid medium, this medium was supplemented with 15 g/L of agar.

V.2.6 Statistical Analysis

The mean values were compared using an analysis of variance (ANOVA) test, with a p value ≤ 0.05 . The differences in the various rates of diesel reduction were also analyzed using the same test. An ANOVA was used to calculate the differences between the initial and final total petroleum hydrocarbon (TPH) concentrations in the treated flasks and the control flasks. All statistical analyses were performed using MINITAB 15® statistical software (French version).

V.3 Results

The current study aims to assess the potential degradation ability of *Rhodococcus erythropolis*T902.1, an exogenous bacterial strain, in the presence of a mixture of four PAHs, to assess the ability of *R. erythropolis* in pure culture and in association with the endogenous microflora and to evaluate and compare different PAH degradation strategies. The results are presented in two parts. The first part focuses on the experiment conducted in sterile conditions and the second part on the experiment conducted in nonsterile conditions.

V.3.1 Experiments with Sterilized Mangrove Sediments and Exogenous Rhodococcus

V.3.1.1 Evolution of pH over 5 Weeks of Biodegradation

The different pH curves showed that the pH remained almost constant (between 7 and 7.5) in the control flasks. In the flasks containing sterile sediments, the pH fell to between 5.5 and 6 after 5 weeks, irrespective of the treatment (Fig. 1). This decrease was probably due to the release of ions and protons formed during PAH degradation.

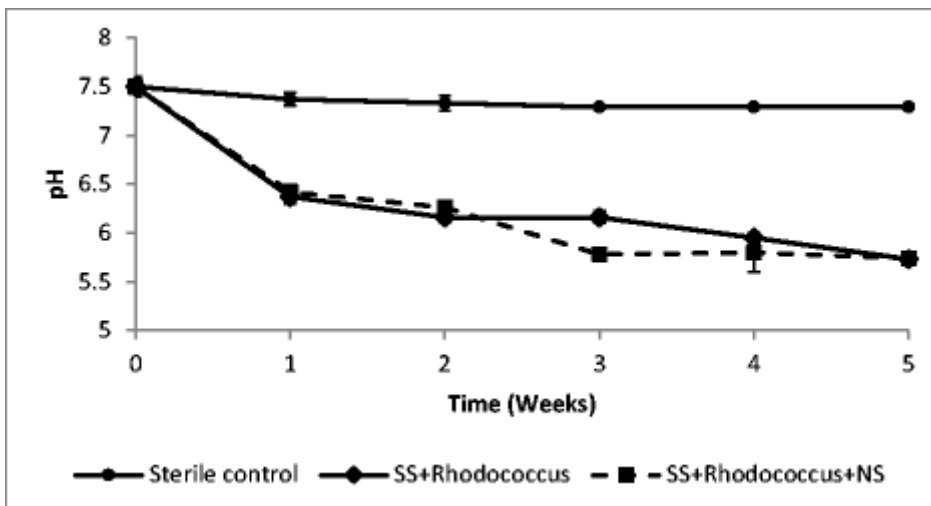


Fig. 1: Evolution of pH in mangrove sterile sediments after 5 weeks under two strategies

V.3.1.2 Evolution of Microflora in the Flasks

During the experiment, we evaluated the evolution of the total microflora and active microflora in the flasks for each treatment in the sterile sediments. The growth of *R. erythropolis* was better in flasks where the nutrient solution had been added in the first week. The biomass in these flasks, however, decreased with time and was lower than the one in the flasks to which no nutrient solution had been added. The steady drop in pH over the 5 weeks of treatment might explain the slower bacterial growth in various flasks. The 5.5–6 pH range reached during the last 2 weeks of treatment was not optimal for bacterial growth (Fig. 2). The decrease in microbial growth and the degradation of PAHs in the flasks could be attributed to the decrease in pH.

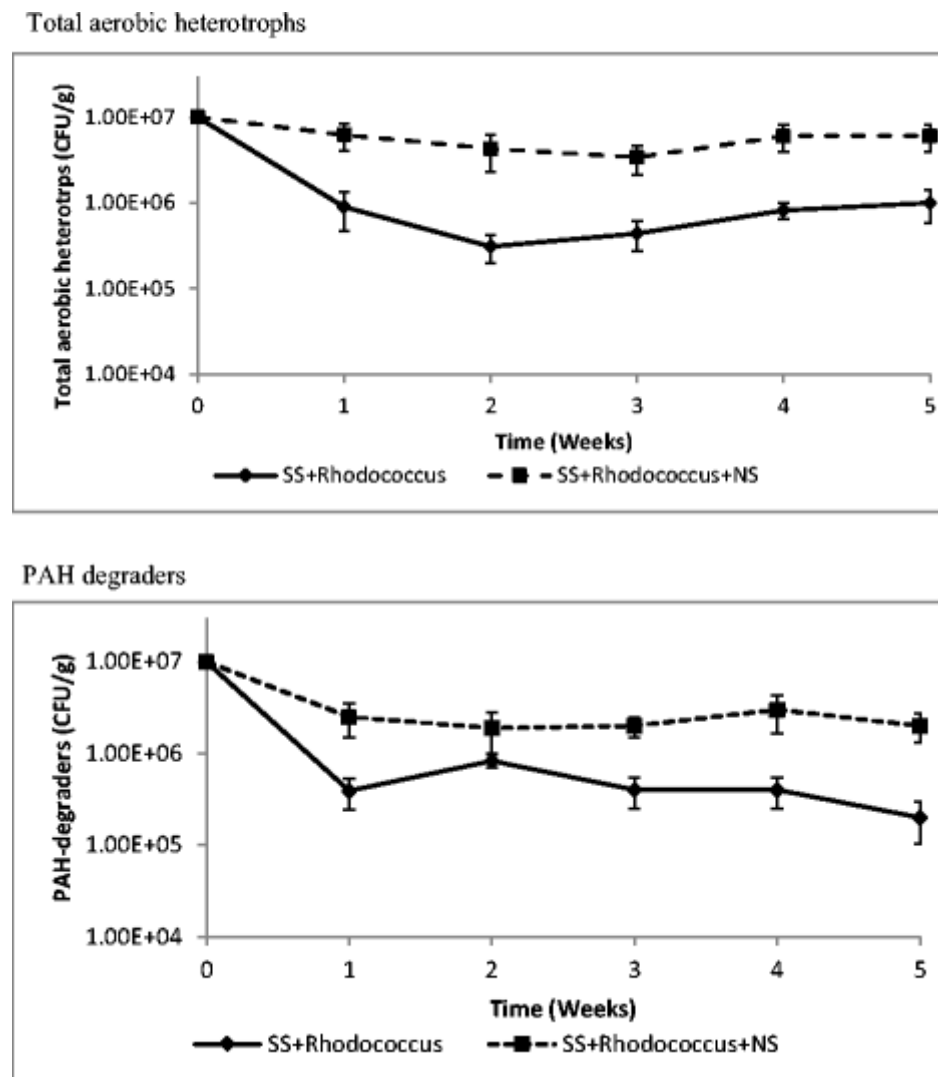


Fig. 2: Evolution of microorganisms in mangrove sterile sediments after 5 weeks according to two strategies (presence or absence of nutrients)

Statistical analyses showed significant differences in the number of microorganisms, depending on the treatments. In flasks with sterile sediments, there was a significant difference between treatments with or without the addition of nutrients. In the treatments involving an addition

of nutrients, the concentration in total microorganisms after 5 weeks of treatment moved from 10^7 CFU/g of dry matter to 6×10^6 CFU/g of dry matter. On the other hand, the concentration in degrading bacteria moved from 10^7 CFU/g of dry matter to 2×10^6 CFU/g of dry matter. In treatments without the addition of nutrients, the bacterial concentrations were 1×10^6 CFU/g of dry matter and 2×10^5 CFU/g of dry matter for total microflora and degrading microflora, respectively. This difference in the concentration in microorganisms could be the effect of nitrogen (N) and phosphorus (P) in the nutrient solution. Both nutrients play a key role in the survival and metabolism of the microorganisms and promote their adaptation to the pollutant.

V.3.2 Degradation of Mixed PAHs Under Two Strategies in Sterile Sediments

After 5 weeks of experiment, the results for the control flasks, without bacteria or nutrients, showed a PAH decrease of 1.3, 2.8, 0.8, and 0.4 % for phenanthrene, anthracene, fluoranthene, and pyrene, respectively. These levels of degradation were evaporative losses without any microbiological implications. In the presence of bacteria (Fig. 3), the results show, after 5 weeks of treatment, 100 % of degradation of phenanthrene, anthracene, and fluoranthene in both flasks containing *R. erythropolis* and *R. erythropolis* with nutrients. Over the same period, pyrene degradation was incomplete. There was a degradation rate of 75.4 ± 10.5 % in the flasks with only *R. erythropolis* and 82.2 ± 1.7 % in the flasks with bacteria and the nutrient solution. The statistical results obtained with a controlled factor ANOVA (simultaneous confidence intervals Tukey = 95 %) showed that there had been a significant difference between the first 3 weeks in the degradation of all PAHs, irrespective of treatment. Anthracene, phenanthrene, and fluoranthene were more degraded than pyrene. This molecule requires more time to be degraded completely (Fig. 3).

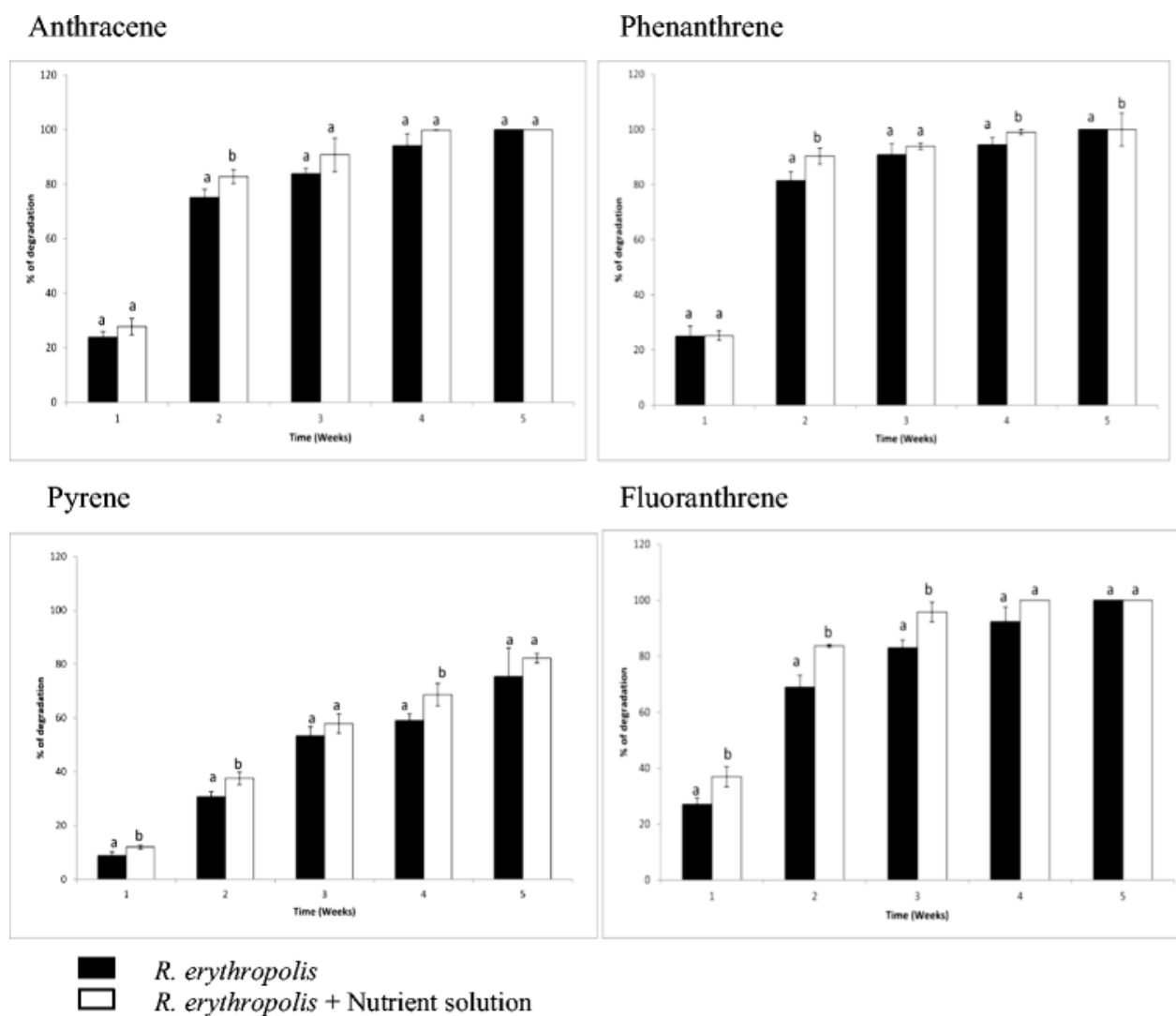


Fig. 3: Biodegradation percentage of anthracene (Ant), phenanthrene (Phe), pyrene (Pyr), and fluoranthene (Flt) in mangrove sterile sediments during 5 weeks

V.3.3 Experiments with mangrove sediments with or without exogenous *Rhodococcus*

V.3.3.1 Evolution of pH over 5 weeks of biodegradation

The pH decreased irrespective of the treatment. It was more acidic after 5 weeks of treatment, decreasing between 5 and 6 (Fig. 4). This pH drop was certainly due to acid metabolites derived from the degradation of various PAHs in the environment. The pH could also decrease due to biodegradation of other molecules such as organic matter that are involved in the sediments from this kind of complex environment.

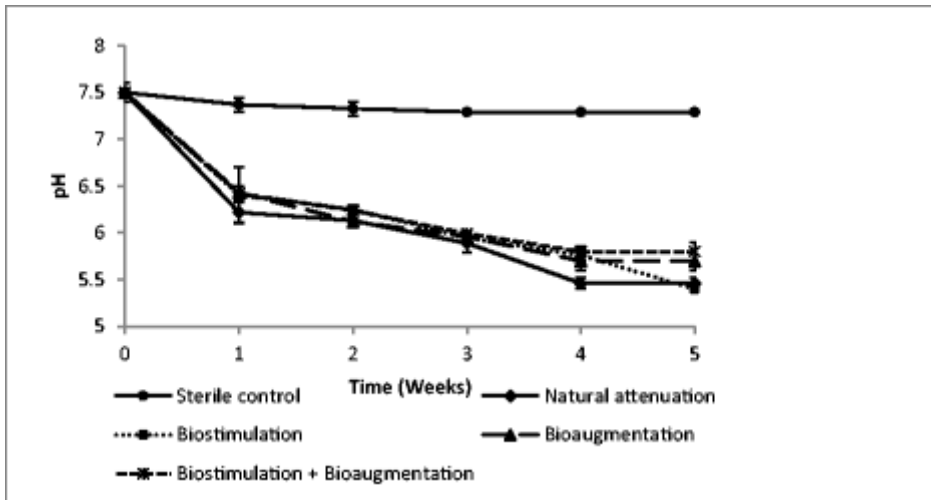


Fig. 4: Evolution of pH in mangrove nonsterile sediments under different strategies

V.3.3.2 Evolution of Microflora in the Flasks

During the experiment, we evaluated the evolution of the total microflora and active microflora in the flasks for each treatment in nonsterile sediments. The evolution of the total microflora was comparable with that of the active microflora; for all the treatments, there was a decrease in concentrations over the 5-week period. In the flasks corresponding to the bioaugmentation treatment and the combined bioaugmentation/biostimulation treatment, the microflora was higher than in the natural attenuation and biostimulation experiments. In the third week, the biomass in the sediment in the biostimulation treatment was comparable with that in biostimulation/bioaugmentation treatment. This biomass was higher than that in the bioaugmentation and natural attenuation treatments. The statistical analysis showed no significant difference as for the concentrations in microorganisms according to the treatments. This was observed for both total and degrading microflora. With regard to the total microflora, there was a significant difference between the natural attenuation treatment and all the other treatments. The statistical analysis also showed a significant difference between the bioaugmentation/biostimulation treatment and the biostimulation and bioaugmentation treatments. The difference in the total microflora concentration between the biostimulation and bioaugmentation treatments was not significant. The observation of the fact that the total microflora concentration depended on the treatment in nonsterile sediments was also true for degrading microflora. Nutrients played an important role in the growth of microorganisms (Fig. 5).

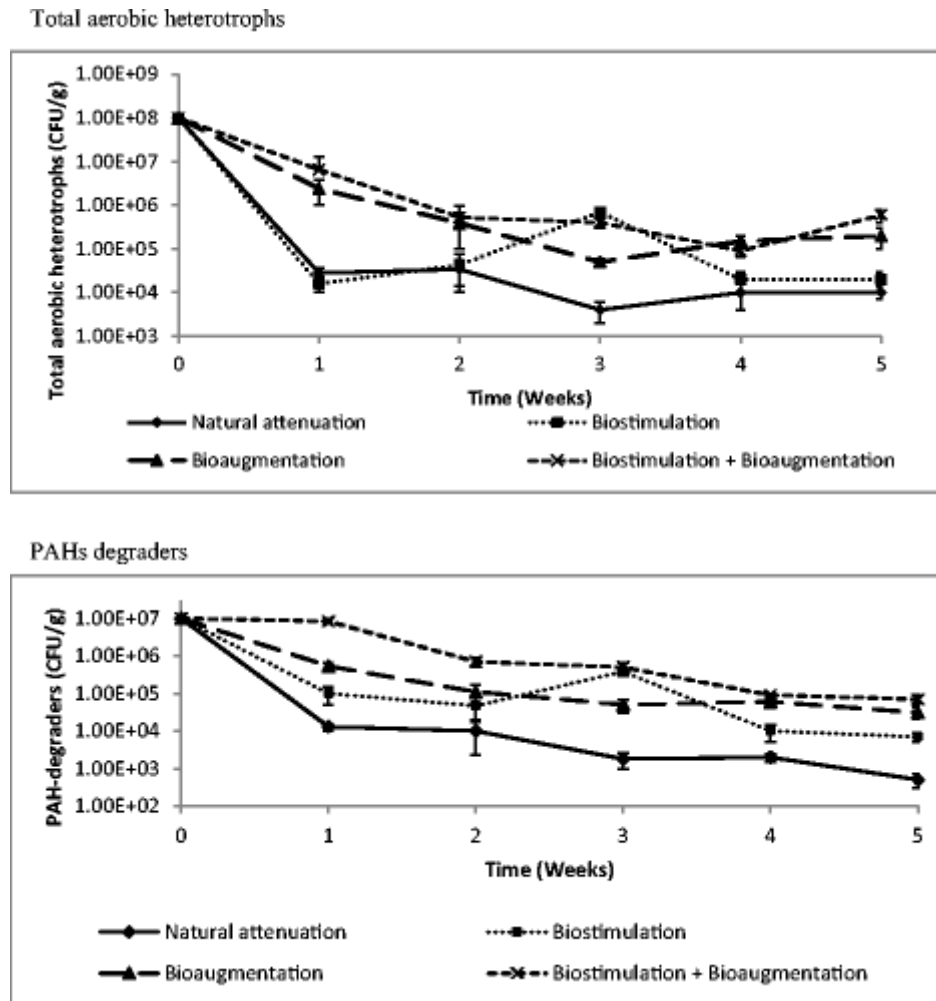


Fig. 5: Evolution of microorganisms in mangrove nonsterile sediments over 5 weeks under different strategies

V.3.3.3 Degradation of Mixed PAHs Under Different Strategies in Nonsterile Sediments

After 5 weeks of experimentation, the results showed bacterial activity in the metabolism of different PAHs present in the medium. This activity depended on the treatment and the type of pollutant considered (Fig. 6). For anthracene, the results from the combined biostimulation/bioaugmentation treatment differed significantly from those obtained for the other treatments over the first 4 weeks. The biostimulation and bioaugmentation treatments were comparable.

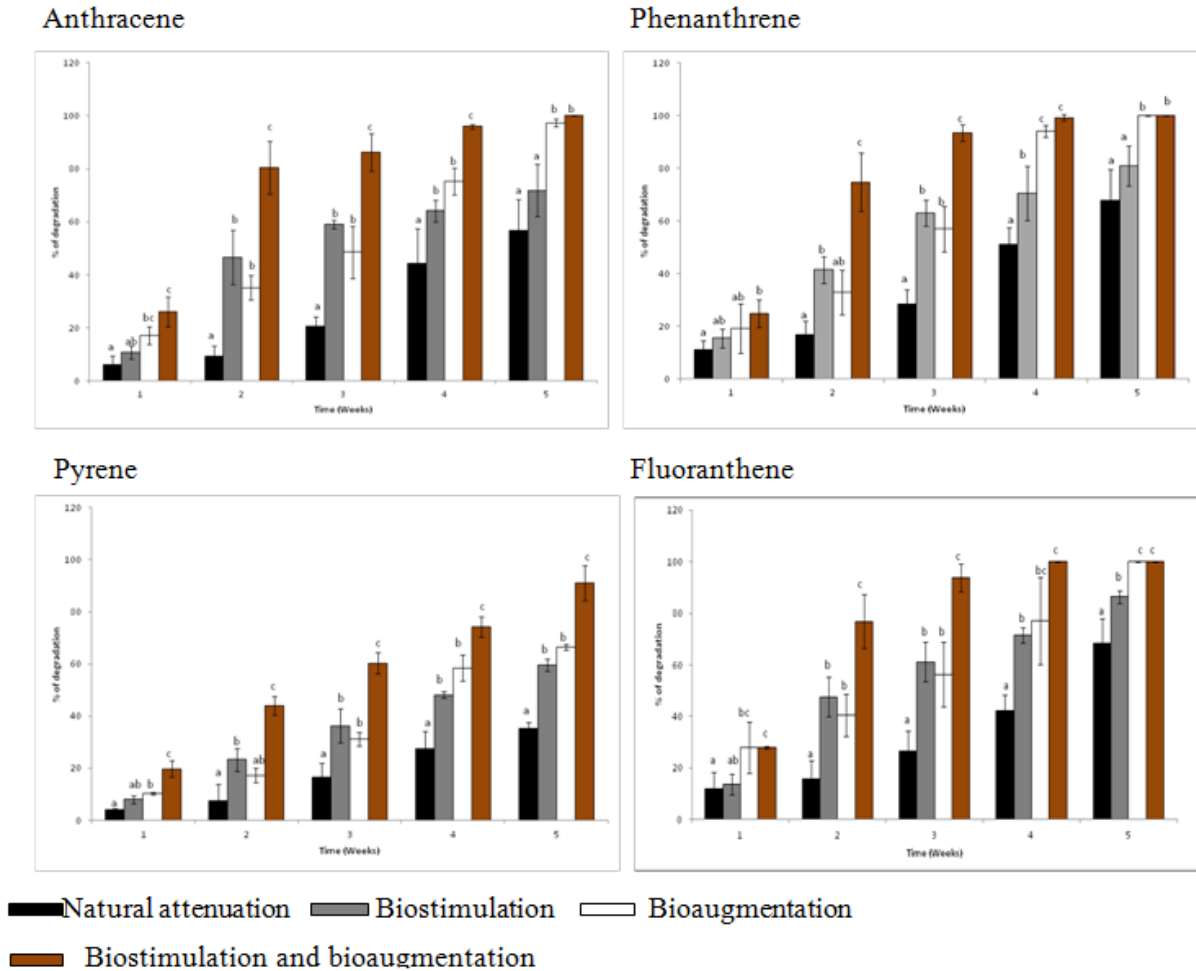


Fig. 6: Biodegradation rate of anthracene (Ant), phenanthrene (Phe), pyrene (Pyr), and fluoranthene (Flt) in mangrove nonsterile sediments during 5 weeks degradation according to different strategies

For phenanthrene, after 5 weeks of experimentation, the results showed a degradation rate of $67.8 \pm 11.7\%$ with the natural attenuation treatment, $81.1 \pm 7.5\%$ with the biostimulation treatment, and 100% with the bioaugmentation and biostimulation/bioaugmentation treatments. The statistical analysis showed a significant difference between the natural attenuation treatment and the biostimulation/bioaugmentation treatment in the first week. There was also a significant difference between the biostimulation and the bioaugmentation/biostimulation treatments from the second week. There was no significant difference, however, between the biostimulation and bioaugmentation treatments during the first 3 weeks, but the difference was significant in the last 2 weeks. The statistical analysis showed a significant difference between the first and second weeks, irrespective of the treatment. The degradation rate was significantly different between the fifth week and the first 3 weeks. For pyrene, after 5 weeks of treatment, the natural attenuation degradation rate was $35.2 \pm 2.4\%$, but $59.5 \pm 2.4\%$ for the biostimulation treatment, $66.3 \pm 1.2\%$ for the bioaugmentation treatment, and $91.1 \pm 6.7\%$ for the biostimulation/bioaugmentation treatment. The degradation rates for the biostimulation/bioaugmentation treatment differed significantly from other treatments over the 5-week period of the experiment. The results obtained for the biostimulation and bioaugmentation

treatments were comparable; they differed significantly from the natural attenuation treatment in the last 3 weeks. For fluoranthene, the degradation rates for the biostimulation/bioaugmentation treatment differed significantly from those obtained for the natural attenuation and biostimulation treatments. In general, irrespective of the treatment, the degradation rates of the four PAHs in the fifth week differed significantly from those obtained in the first 3 weeks. Similarly, the results for the fourth week differed significantly from those of the first 2 weeks (see Table 1).

Table 1: Mass balance of PAHs amount remained (ppm) and percentages in each fraction to total PAHs added (input) in nonsterile sediments after 5 weeks of degradation

PAHs	Fate of PAHs	Sterile control		Natural attenuation		Biostimulation		Bioaugmentation		Biostimulation and Bioaugmentation	
		Amounts (ppm)	% Input	Amounts (ppm)	% Input	Amounts (ppm)	% Input	Amounts (ppm)	% Input	Amounts (ppm)	% Input
Phenanthrene	Input	10985.1 ± 355.9		10985.1 ± 355.9		10985.1 ± 355.9		10985.1 ± 355.9		10985.1 ± 355.9	
	In sediment phase	10839.8 ± 282.5	98.4	3532.9 ± 1291	32.2	2075.8 ± 831.4	18.9	0.5 ± 0.4	0.1	0.75 ± 0.9	0.1
	Losses	145.3 ± 82.6	1.6	7452 ± 935.3	67.8	9909 ± 486.2	81.1	10984.6 ± 355.5	99.9	10984.3 ± 355.1	99.9
Anthracene	Input	11382.3 ± 481.8		11382.3 ± 481.8		11382.3 ± 481.8		11382.3 ± 481.8		11382.3 ± 481.8	
	In sediment phase	11062.5 ± 500	97.2	4932.8 ± 1359.4	43.4	3195.6 ± 1123.9	28.1	300.3 ± 162.8	2.7	0.86 ± 0.13	0.1
	Losses	319.8 ± 18.1	2.8	6449.5 ± 985.3	56.6	8186.7 ± 1347.4	71.9	11082 ± 637.1	97.3	11381.4 ± 481.7	99.9
Pyrene	Input	9977.9 ± 197.1		9977.9 ± 197.1		9977.9 ± 197.1		9977.9 ± 197.1		9977.9 ± 197.1	
	In sediment phase	9935.8 ± 215	99.6	6460.6 ± 241.2	64.8	4038.9 ± 240.5	40.5	3354.6 ± 115.3	33.7	889.9 ± 670.4	40.5
	Losses	42.1 ± 17.9	0.4	3517.3 ± 370.7	35.2	5939 ± 52.6	59.5	6623.3 ± 183.1	66.3	9088 ± 494.1	59.5
Fluoranthene	Input	11676.6 ± 525.9		11676.6 ± 525.9		11676.6 ± 525.9		11676.6 ± 525.9		11676.6 ± 525.9	
	In sediment phase	11578.6 ± 500	99.2	3695.1 ± 1134.4	31.7	1598.1 ± 286.6	15.7	0.89 ± 0.08	0.1	0.4 ± 0.06	0.1
	Losses	97.9 ± 25.9	0.8	7981.5 ± 860.1	68.3	10078.5 ± 800.4	86.3	11675.7 ± 525.9	99.9	11676.2 ± 526	99.9

V.4 Discussion

PAHs are organic compounds with two or more benzene rings. They are degraded biologically by various microorganisms, such as bacteria and fungi, usually under aerobic conditions. Most microorganisms reported to mineralize PAHs under aerobic conditions use similar metabolic pathways. The microbial degradation of PAHs in aquatic and terrestrial ecosystems is strongly influenced by a variety of abiotic and biotic factors, including temperature, pH, soil type, aeration, nutrients, depth, diffusion, microbial adaptations, bioavailability, previous chemical exposure, water availability, sediment toxicity, PAH physicochemical properties, PAH concentration, and seasonal factors (Cerniglia 1992).

In order to degrade anthracene, phenanthrene, pyrene, and fluoranthene, this experiment adapted certain parameters—type and nature of pollutants—adding *R. erythropolis* as an exogenous pure strain for the bioaugmentation treatment, maintaining the temperature at 30 °C, monitoring the pH evolution and the evolution of total microflora and degrading microflora, and the contribution of nutrients to the bio-stimulation strategy. Several studies have shown that mangrove sediments contain a specific microflora capable of degrading hydrocarbons. Brito et al. (2006) isolated and identified a number of PAH-degrading bacteria in the mangroves. The experiment showed that *Marinobacter* and *Pseudomonas* species were able to degrade fluoranthene and pyrene, *Alcanivorax* species degraded octane, *Microbulbifer* species degraded fluoranthene and naphthalene, and *Sphingomonas* species degraded pristane. Tam et al. (2002) conducted a phenanthrene degradation experiment using a bacterial consortium isolated in mangrove sediments polluted with hydrocarbons. This consortium was used as an inoculum in flasks containing mangrove sediments added with phenanthrene (concentration 200 mg l⁻¹) as the sole carbon source. Six days after this treatment, 78 % of the phenanthrene was degraded. Later, Tam et al. (2008) conducted a greenhouse experiment in microcosm using samples of mangrove sediments. The level of pollution of the samples was 170 ng g⁻¹ of dry matter (total of 16 priority PAHs according to the US Environmental Protection Agency). After 154 days of culture, 90 % fluorene, 80 % phenanthrene, 70 % fluoranthene, 68 % pyrene, and 32 % benzo(a)pyrene were degraded by natural attenuation. Several experiments with different bacterial strains were conducted on mangrove soils contaminated by hydrocarbons, and the results obtained during the various treatments illustrated the adaptation of microorganisms to different doses of pollutant (Haritash et al. 2009). For the degradation of three PAHs (fluorene, phenanthrene, and pyrene) found in mangrove sediments, Yu et al. (2005) used an enriched bacterial consortium containing three bacterial species (*Rhodococcus* sp., *Acinetobacter* sp., and *Pseudomonas* sp.). The starting PAH concentrations (total of 16 priority PAHs from the US EPA) in sediments varied from 1.162 to 3.322 ng g⁻¹ of dry matter. Four weeks after treatment, more than 99 % of the fluorene and phenanthrene and only 30 % of the pyrene had been degraded by natural attenuation. Over 97 % of the three PAHs were degraded by biostimulation activated by a nutrient solution. The bioaugmentation treatment percentages were similar to those of natural

attenuation. These results show that, without taking the time factor into account, some endogenous and exogenous microorganisms (pure strains or consortium) are able to degrade hydrocarbons in mangrove sediments. In our study, the temperature was set at 30 °C. Temperature can directly or indirectly affect biodegradation. This is an important factor in the growth and activity of microorganisms. It causes an increase in the level of metabolic reactions. According to a study by Song et al. (1990), by applying different temperatures (17, 27, and 37 °C), the rate of hydrocarbon reduction was the best at 27 °C for all the pollutants tested. Although it is well established that temperature is an important factor in the growth and activity of microorganisms in the hydrocarbon biodegradation process, some studies have shown an almost complete inhibition of biodegradation at 5 °C (Baker 1994). Our experiment was conducted in optimal temperature conditions to improve growth and the bacterial metabolism (30 °C). Mangroves are ecosystems that are usually found in tropical zones. Temperature in these ecosystems (25–30 °C) should not be a limiting factor in the degradation of hydrocarbons in sediments. Monitoring the pH evolution enabled us to point out the good conditions to achieve an effective biodegradation. At the beginning of the experiment, the pH value was 7.5 and, after 5 weeks, it was 5.46. Baker (1994) noted that biodegradation is usually faster when it occurs under neutral pH conditions. Some studies have shown that the digestion of some pollutants is slower in groundwater and certain lakes where the pH is more acidic (pH 4.87). The drop in pH was probably due to acidic metabolites (such as phenanthrene dihydrodiol, dihydroxy phenanthrene, phthalic acid, dihydroxy pyrene, lactone, etc.), derived from PAH degradation. In polluted mangrove ecosystems, the rapid degradation of hydrocarbons depends on environmental conditions. In addition to temperature, optimum pH, and the presence of PAH degraders, nutrients are also required. Nutrients accelerate bacterial growth, which directly affects hydrocarbon degradation. Moreira et al. (2011) conducted an experiment that used two biodegradation models (assisted phytoremediation with *Rhizophora mangle* and only bioremediation) to identify the most efficient process for hydrocarbon degradation in mangrove sediments. After 90 days, the results showed a pollutant abatement rate of 87 % for assisted phytoremediation and 70 % for bioremediation. The enumeration of the total microflora showed an increase in the number of bacteria from 2×10^5 to 2×10^7 CFU g⁻¹ beyond 30 days where there was mangrove. For bioremediation, there was a slight increase in total microflora (2×10^5 to 1.8×10^6 CFU g⁻¹) showing that, in the presence of plants, root exudates are secreted into the rhizosphere microflora, providing favorable conditions for growth (Espinosa et al. 2005) and stimulating pollutant degradation (Joner et al. 2005). The hydrocarbon contamination, especially PAHs, may firstly result in a significant reduction in the amount of nutrients available to plants in soil. In fact, hydrocarbons are a major source of carbon but do not contain nitrogen or phosphorus. When microorganisms degrade PAHs, they consume the nutrients available in the environment, causing deficiencies and increasing the existing competition phenomena. Nutrient addition (generally nitrogen and phosphorus) can enhance biodegradation of oil under nutrient-limited conditions. Similarly, the addition of nutrients (nitrogen and phosphorus) in

polluted soils can stimulate the bacterial growth and therefore increase the rate of hydrocarbon degradation. Nutrients and root exudates stimulate bacterial growth in mangrove ecosystems. Lu et al. (2011) conducted a greenhouse experiment to assess the rate of degradation of phenanthrene (10 mg kg^{-1}) and pyrene (10 mg kg^{-1}) in the rhizosphere of *Kandelia candel*. The system was implemented using laminar rhizoboxes divided into eight compartments, separated at different distances from the root surface. After 60 days of plant growth, they observed abatement rates of 47.7 and 37.6 % for phenanthrene and pyrene, respectively. The intense microbial activity in the rhizosphere significantly improved the rate of degradation of the contaminants. In our experiment, we used N and P as nutrients. Kinney et al. (1969) asserted that N and P accelerate the biodegradation process of hydrocarbons in seawater. Despite the availability of C from the hydrocarbons for microbial growth, microorganisms need N and P to metabolize carbon compounds. The availability of these two nutrients is a key parameter of biodegradation. N and P must be available to ensure appropriate C/N and C/P ratios, sufficient for optimal microbial growth and metabolism, which increases the rate of hydrocarbon degradation.

Two different C/N/P ratios are recommended for PAH degradation. The first C/N/P molar mass ratio is 100/1.3/0.05. The other one is based on average values of the elementary microbial composition (100/10/1) (Chen et al. 2008). Our study showed that nutrients are essential in the biostimulation treatment. The aim was to stimulate the growth and metabolism of endogenous microorganisms capable of degrading various PAHs. N and P are found in MSM.

Our results clearly showed that in sterile flasks, the nutrient input is not important. *Rhodococcus erythropolis* degrades anthracene, phenanthrene, and fluoranthene rapidly and completely. In contrast, the pyrene degradation was incomplete after 5 weeks. There was no significant difference between the two types of treatment in sterile flasks after 5 weeks. *Rhodococcus* sp. is a bacterial strain known for its capability to degrade hydrocarbons (Eun-Hee et al. 2011). Eun-Hee et al. (2011) used a combination of *Rhodococcus* sp. EH831 and a surfactant for the bioremediation of diesel-contaminated soils and compared this treatment with bioaugmentation using *Rhodococcus* species only. They reported that the addition of surfactant had no significant effect on the remediation performance. Many bacterial strains belonging to different genera isolated from soils contaminated with PAHs have different degradation abilities. The analytical results for nonsterile sediments have shown that nutrients play an important role in the biodegradation process. Other factors, such as the availability of inorganic nutrients, the presence of co-substrates, the redox potential environment, the substrate concentration, temperature, water activity, and the adaptive response of microorganisms, affect the biodegradation rates of PAHs in the soils (Zhang et al. 2006). Soil characteristics greatly influence the efficiency of microbial PAH degradation as well. The concentration of the available substrate is one of the most important parameters influencing PAH biodegradation (Cai et al. 2002). Although the rate of biodegradation has been reported to be positively and directly related to substrate concentration, at higher

concentrations, an adaptation period precedes active degradation (Jia et al. 2005; Johnsen et al. 2005). The availability of nutrients, such as N and P, has also been reported to affect PAH persistence. Microbial activity usually functions optimally at a C/N/P ratio of 100/5/1 (Zhou and Hua 2004). Therefore, for a complete bioremediation of soil containing elevated levels of PAHs, additional inputs of inorganic nutrients have to be provided to the soil microorganisms. A too high N-concentration, however, inhibits some microorganisms (Yan et al. 2004).

In nonsterile sediments, the microflora is more effective with the addition of nutrients. The results of the bioaugmentation and bioaugmentation/biostimulation treatments were comparable with those of sterile sediments. It is known that the PAH biodegradation is related to various factors, including the number of aromatic rings and the type of fused ring structure (Walker and Colwell 1975; Herbs and Schwall 1978; Wild et al. 1991). We found that anthracene and phenanthrene (containing three benzene rings) were rapidly degraded. In literature, several experiments have shown that many three-ring PAHs are quickly decomposed and can be used as the primary substrate by organisms that degrade PAHs (Herbs and Schwall 1978; Gardner et al. 1979; Sims and Overcash 1983; Uthe 1991). The degradation of pyrene and fluoranthene (PAHs with four aromatic rings) occurs primarily by co-metabolism (Neff 1979). The differences in degradation are mainly due to the solubility of these PAHs. Some bacterial strains are able to use only the most soluble PAHs in water (Trzesicka-Mlynarz and Ward 1995). For this reason, much research focuses on the production of biosurfactants by degrading bacteria in order to increase the availability of PAHs (Arino et al. 1996; Burd and Ward 1996; Deziel et al. 1996). The bacterial strains belonging to different genera isolated from soils contaminated with PAHs differ in their ability to degrade these compounds. The most common bacteria in bioremediation, however, belong to the *Pseudomonas* and *Rhodococcus* genera. (Ramsay et al. 2000) showed that mangrove sediments contain a highly active microflora capable of degrading PAHs. For artificially polluted environments, the microorganisms need some time to adapt and to acclimate to pollutants in order to degrade them.

In our study, we worked with slightly polluted mangrove sediments. We felt that a large artificial pollution of these sediments would adversely affect the microbial growth, resulting in a low PAH degradation. This led us to use *R. erythropolis* as the primary bacterium for bioaugmentation. Several bacteria, such as *Rhodococcus* spp., *Bacillus* spp., and *Pseudomonas* spp., were isolated from various hydrocarbon-contaminated soils. These bacteria used anthracene, phenanthrene, pyrene, and fluoranthene as sole C and energy sources (Kelley et al. 1993; Samanta et al. 2002). Fan and Krishnamurthy (1995) and Tian et al. (2008) reported that the reason for the high degradation capacity of these microorganisms was that they possess key enzymes, such as PAH dioxygenase and catechol oxygenase. These microorganisms degrade PAHs via metabolism or co-metabolism. Co-metabolism is especially relevant for the degradation of PAH mixtures.

V.5. Conclusion

This study was carried out to assess the response capacity of active microflora under stress conditions with a mixture of four PAHs. This approach enabled us to measure the degradation capacity of *R. erythropolis* in association with an endogenous microflora. We evaluated the potential of degradation of a mixture of four PAHs (anthracene, phenanthrene, pyrene, and fluoranthene) under different bio-treatments: natural attenuation, biostimulation, bioaugmentation, and a combination of biostimulation and bioaugmentation, with a bacterial consortium and *R. erythropolis* in aerobic conditions. The degradation results obtained in sterile sediments showed that *R. erythropolis* was able to degrade anthracene, phenanthrene, and fluoranthene completely after 5 weeks of treatment. The addition of a nutrient solution improved the degradation. Over the same period, the degradation of pyrene (four benzene rings) was not completed. The natural attenuation treatment proved to be less effective than the biostimulation or biostimulation/bioaugmentation treatments. The addition of nutrients had a positive effect on the microflora. The addition of *R. erythropolis* accelerated the degradation. The *Rhodococcus* strain is recognised for its ability to metabolize hydrocarbons. Its association with the endogenous microflora does not seem to be a problem. The degradation rates obtained were clearly determined by this association. The study also showed that the endogenous microflora, which has a low rate of degradation, needs time to adapt to the pollutant.

References

1. Arino, S., Marchal, R., & Vandecasteele, J. P. (1996). Involvement of a rhamnolipid-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa* in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterial community. *Journal of Applied Microbiology*, *84*, 769–776.
2. Baker, K. H. (1994). Bioremediation of surface and subsurface soils. In K. H. Baker & D. S. Herson (Eds.), *Bioremediation* (pp. 203–259). New York, USA: McGraw-Hill Inc.
3. Balba, M. T., Al-Awadhi, N., & Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal Microbiology Methods*, *32*, 155–164.
4. Banerjee, D. K., Fedorak, P. M., Hashimoto, A., Masliyah, J. H., Pickard, M. A., & Gray, M. R. (1995). Monitoring the biological treatment of anthracene-contaminated soil in a rotating-drum bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *43*, 521–528.
5. Bell, K. S., Philp, J. C., Aw, D. W. J., & Christofi, N. (1998). The genus *Rhodococcus*. *Journal Applied Microbiology*, *85*, 195–210.
6. Brito, E. M. S., Guyoneaud, R., Goñi-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., Crapez, M. A., Wasserman, J. C., & Duran, R. (2006). Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in Microbiology*, *157*(8), 752–762.
7. Burd, G., & Ward, O. P. (1996). Involvement of a surface-active high molecular weight factor in degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas marginalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, *42*, 791–797.
8. Burns, K. A., Codi, S., Swannell, R. J. P., & Duke, N. C. (1999). Assessing the petroleum hydrocarbon potential of endogenous tropical marine wetland microorganisms: flask experiments. *Mangroves and Salt Marshes*, *3*, 67–83.
9. Cai, Q. Y., Mo, C. H., Wu, Q. T., Wang, B. G., & Zhu, X. Z. (2002). Effect of municipal sludges and chemical fertilizers on the content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in paddy soil grown *Ipomoea aquatica* Fossk. *Acta Pedologica Sinica (in Chinese)*, *39*(6), 887–891.
10. Cerniglia, C. E. (1993). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion Biotechnology*, *4*, 331–338.
11. Cerniglia, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, *3*, 351–368.
12. Chen, J., Wong, M. H., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2008). Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment. *Marine Pollution Bulletin*, *57*, 695–702.
13. de Carvalho, C. C. C. R. (2010). Adaptation of *Rhodococcus* to organic solvents. In H. M. Alvarez (Ed.), *Biology of Rhodococcus* (pp. 109–131). Berlin Heidelberg: Springer.
14. de Carvalho, C. C. C. R. (2012). Adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells for growth and bioremediation under extreme conditions. *Resources Microbiology*, *163*, 125–136.

15. de Carvalho, C. C. C. R., Marques, M. P. C., Hachicho, N., & Heipieper, H. J. (2014). Rapid adaptation of *Rhodococcus erythropolis* cells to salt stress by synthesizing polyunsaturated fatty acids. *Applied Microbiology Biotechnology*, 98, 5599–5606.
16. Deziel, E., Paquette, G., & Villemur, R. (1996). Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 1908–1912.
17. Dowty, R. A., Shaffer, G. P., Hester, M. W., Childers, G. W., Campo, F. M., & Greene, M. C. (2001). Phytoremediation of small-scale oil spills in fresh marsh environments: a mesocosm simulation. *Marine Environmental Research*, 52, 195–211.
18. Erickson, D. C., Loehr, R. C., & Neuhauser, E. F. (1993). PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soil. *Water Research*, 27, 911–919.
19. Espinosa, E., Martinez, M. E., Torres, E. F., & Rojas, M. G. (2005). Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere*, 59, 405–413.
20. Eun-Hee, L., Kang, L. K., & Cho, K.-S. (2011). Bioremediation of diesel-contaminated soils by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation employing *Rhodococcus sp.* EH831. *Korean Journal of Microbiology Biotechnology*, 39(1), 86–92.
21. Fan, C. Y., & Krishnamurthy, M. (1995). Enzymes for enhancing bioremediation of petroleum-contaminated soils: a brief review. *Air Waste Management Association*, 45, 453–460.
22. Forsyth, J. V., Tsao, Y. M., & Bleam, R. D. (1995). Bioremediation: when is augmentation needed. In R. E. Hinchee, J. Fredrickson, & B. C. Alleman (Eds.), *Bioaugmentation for Site Remediation* (pp. 1–14). Columbus: Battelle Press.
23. Gardner, W. S., Lee, R. F., Tenore, K. R., & Smith, L. W. (1979). Degradation of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal sediments: importance of microbes and polychaete worms. *Water, Air, and Soil Pollution*, 11, 339–347.
24. Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, 169, 1–15.
25. Herbs, S. E., & Schwall, L. R. (1978). Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum-contaminated sediments. *Applied Environmental Microbiology*, 35, 306–316.
26. Hughes, J. B., Beckles, D. M., Chandra, S. D., & Ward, C. H. (1997). Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18, 152–160.
27. Iwamoto, T., & Nasu, M. (2001). Review: current bioremediation practice and perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92, 1–8.
28. Jia, L. Q., Qu, Z. Q., & Quyang, Z. Y. (2005). Ecological behavior of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) in soil-plant systems. *Pedosphere*, 15(2), 216–224.

29. Johnsen, A. R., Wick, L. Y., & Harms, H. (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133, 71–84.
30. Joner, E. J., Corgie, S., Amellal, N., & Leyval, C. (2005). Nutritional constraints to PAH degradation in a rhizosphere model. *Soil Biology Biochemistry*, 34, 859–864.
31. Juhasz, A. L., & Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo [a] pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 45, 57–88.
32. Kastner, M., & Mahro, B. (1996). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 668–675.
33. Ke, L., Wang, W. Q., Wong, T. W. Y., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2003). Removal of pyrene from contaminated sediments by mangrove microcosms. *Chemosphere*, 51, 25–34.
34. Kelley, I., Freeman, J. P., Evans, F. E., & Cerniglia, C. E. (1993). Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. Strain PYR-1. *Applied Environmental Microbiology*, 59, 800–806.
35. Kinney, P. J., Button, D. K., & Schell, D. M. (1969). Kinetics of dissipation and biodegradation of crude oil in Alaska's Cook Inlet. In *Proceedings of 1969 Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills* (pp. 333–340). Washington, D.C: American Petroleum Institute.
36. Kuyukina, M. S., & Ivshina, I. B. (2010). *Rhodococcus* biosurfactants: biosynthesis, properties, and potential applications. In H. M. Alvarez (Ed.), *Biology of Rhodococcus* (pp. 291–313). Berlin Heidelberg: Springer.
37. Kuyukina, M. S., Ivshina, I. B., Makarov, S. O., Litvinenko, L. V., Cunningham, C. J., & Philp, J. C. (2005). Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environmental International*, 31, 155–161.
38. Lang, S., & Philp, J. C. (1998). Surface-active lipids in *rhodococci*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 74, 59–70.
39. Larkin, M. J., Kulakov, L. A., & Allen, C. C. R. (2010a). *Rhodococcus*. In K. N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1839–1852). Heidelberg: Springer-Verlag.
40. Larkin, M. J., Kulakov, L. A., & Allen, C. C. R. (2010b). *Rhodococcus*: genetics and functional genomics. In K. N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (pp. 1345–1353). Heidelberg: Springer-Verlag.
41. Larkin, M. J., Kulakov, L. A., & Allen, C. C. R. (2005). Biodegradation and *Rhodococcus* – masters of catabolic versatility. *Environmental Biotechnology*, 16, 282–290.
42. Lu, H., Zhang, Y., Liu, B., Liu, J., Ye, J., & Yan, C. (2011). Rhizodegradation gradients of phenanthrene and pyrene in sediment of mangrove (*Kandelia candel* (L.) Druce). *Journal of Hazardous Material*, 196, 263–269.

43. Luan, T. G., Yu, K. S. H., Zhong, Y., Zhou, H. W., Lan, C. Y., & Tam, N. F. Y. (2006). Study of metabolites from the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Chemosphere*, *65*, 2289–2296.
44. Marini, M., & Frapiccini, E. (2013). Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments in the deeper area of the Northern Adriatic Sea (Mediterranean Sea). *Chemosphere*, *90*, 1839–1846.
45. Martinkova, L., Uhnakova, B., Patek, M., Nesvera, J., & Kren, V. (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. *Environmental International*, *35*, 162–177.
46. Masy, T., Demaneche, S., Tromme, O., Thonart, P., Jacques, P., Hiligsmann, S., & Vogel, T. M. (2016). Hydrocarbon biostimulation and bioaugmentation in organic carbon and clay-rich soils. *Soil Biology & Biochemistry*, *99*, 66–74.
47. Mills, M. A., Bonner, J. S., McDonald, T. J., Page, C. A., & Autenrieth, R. L. (2003). Intrinsic bioremediation of a petroleum-impacted wetland. *Marine Pollution Bulletin*, *46*, 887–899. [CrossRef](#)
48. Mueller, J. G., Lantz, S. E., Blattmann, B. O., & Chapman, P. J. (1991). Bench-scale evaluation of alternative biological treatment process for the remediation of pentachlorophenol and creosote contaminated materials: solid phase bioremediation. *Environmental Science and Technology*, *25*, 1045–1055.
49. Moreira, I. T. A., Oliveira, O. M. C., Triguís, J. A., Dos Santos, A. M. P., Queiroz, A. F. S., Martins, C. M. S., Silva, C. S., & Jesus, R. S. (2011). Phytoremediation using *Rhizophora mangle* L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's). *Microchemistry Journal*, *29*, 376–382.
50. Neff, J. M. (1979). *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fate and biological effects*. Essex, England: Applied Science Publishers, Ltd.
51. Park, K. S., Sims, R. C., & Dupont, R. (1990). Transformations of PAHs in soil systems. *Journal Environmental Engineering*, *116*, 632–640.
52. Puri, R. K., Ye, Q. P., Kapila, S., Lower, W. R., & Puri, V. (1997). Plant uptake and metabolism of polychlorinated biphenyls PCBs. In W. Wang, J. W. Gorsuch, & J. S. Hughes (Eds.), *Plants for Environmental Studies* (pp. 482–513). New York: CRC Press LLC.
53. Ramsay, M. A., Swannell, R. P. J., Shipton, W. A., Duke, N. C., & Hill, R. T. (2000). Effect of bioremediation community in oiled mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, *41*, 413–419.
54. Riser-Roberts, E. (1998). *Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes* (pp. 5–313). Boca Raton: Lewis Publishers.
55. Samanta, S. K., Singh, O. V., & Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnology*, *20*, 243–248.
56. Sims, R. C., & Overcash, M. R. (1983). Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Residue Review*, *1*, 2–68.
57. Song, H. G., Wang, X., & Bartha, R. (1990). Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Applied Environmental Microbiology*, *56*, 652–656.

58. Tam, N. F. Y., Guo, C. L., Yau, W., & Wong, Y. S. (2002). Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, 45, 316–324.
59. Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (2008). Effectiveness of bacterial inoculum and mangrove plants on remediation of sediment contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, 57, 716–726.
60. Tian, Y., Liu, H. J., Zheng, T. L., Kwon, K. K., Kim, S. J., & Yan, C. L. (2008). PAHs contamination and bacterial communities in mangrove surface sediments of the Jiulong River Estuary. *China Marine Pollution Bulletin*, 57, 707–715.
61. Trzesicka-Mlynarz, D., & Ward, O. P. (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its components pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 470–476.
62. Uthe, J. F. (1991). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment. *Canadian Chemistry News*, 43(7), 25–27.
63. Vogel, T. M. (1996). Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current. Opinion and Biotechnology*, 7, 311–316.
64. Walker, J. D., & Colwell, R. R. (1975). Degradation of hydrocarbons and mixed hydrocarbon substrate by microorganisms from Chesapeake Bay. *Progress Water Technology*, 7, 83–91.
65. Wannoussa, W., Masy, T., Lambert, S. D., Heinrichs, B., Tasseroul, L., Al-Ahmad, A., Weekers, F., Thonart, P., & Hiligsmann, S. (2015). Effect of iron nanoparticles synthesized by a sol–gel process on *Rhodococcus erythropolis* T902.1 for biphenyl degradation. *Journal of Water Resource and Protection*, 7, 264–277.
66. Weekers, F., Jacques, P., Springael, D., Mergeay, M., Diels, L., & Thonart, P. (1999). Improving the catabolic functions of desiccation-tolerant soil bacteria. In B. H. Davison & M. Finkelstein (Eds.), *Twentieth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (pp. 251–266). Gatlinburg, Tennessee: Humana Press.
67. Whyte, L. G., Slagman, S. J., Pietrantonio, F., Bourbonniere, L., Koval, S. F., Lawrence, J. R., Inniss, W. E., & Greer, C. W. (1999). Physiological adaptations involved in alkane assimilation at a low temperature by *Rhodococcus* sp. strain Q15. *Applied Environmental Microbiology*, 65, 2961–2968.
68. Wild, S. R., Berrow, M. L., & Jones, K. C. (1991). The persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge-amended agricultural soils. *Environmental Pollution*, 72, 141–57.
69. Yan, J., Cheng, S. P., Zhang, X. X., Shi, L., & Zhu, J. (2004). Effect of four metals on the degradation of purified terephthalic acid wastewater by *Phanaerochaete chrysosporium* and strain Fhhh. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 72, 387–393.

70. Yu, K. S. H., Wong, A. H. Y., Yau, K. W. Y., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2005). Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, *51*, 1071–1077.
71. Zhang, X. X., Cheng, S. P., Zhu, C. J., & Sun, S. L. (2006). Microbial PAH-degradation in soil: degradation pathways and contributing factors. *Pedosphere*, *16*(5), 555–565.
72. Zhou, Q. X., & Hua, T. (2004). Bioremediation: a review of applications and problems to be resolved. *Progress Natural Science*, *14*(11), 937–944.

CHAPITRE VI : THE EFFECT OF NUTRIENTS ON THE DEGRADATION OF HYDROCARBONS IN MANGROVE ECOSYSTEMS

Dans les chapitres précédents, il ressort que le traitement qui combine la bioaugmentation et la biostimulation sont de loin meilleurs que les résultats des autres traitements et indépendamment des microorganismes utilisés. Nous avons constaté l'augmentation de la concentration des bactéries dans le milieu et la stimulation de leur croissance par un certain nombre de nutriment rendaient plus efficace le processus de biodégradation. Dans le souci donc d'exploiter les différents résultats obtenus au cours des précédents chapitres, nous avons mis en évidence ce traitement combinant la bioaugmentation et la biostimulation. Après avoir travaillé sur l'augmentation de la concentration en microorganismes, nous avons cherché à trouver quels types de nutriments et dans quelle concentration il faudrait ajouter au milieu pollué pour rendre le processus de biodégradation plus efficace.

CHAPITRE VI: THE EFFECT OF NUTRIENTS ON THE DEGRADATION OF HYDROCARBONS IN MANGROVE ECOSYSTEMS BY MICROORGANISMS

Semboung Lang, F.,^{1*} Tarayre, C.,¹ Destain, J.,¹ Delvigne, F.,¹ Druart, P.,² Ongena M.,¹ Thonart P.,¹ (2016). The effect of nutrients on the degradation of hydrocarbons in mangrove ecosystems. *International Journal for Environmental Research* 10(4): 583-592.

(1) Université de Liège - Gembloux Agro Bio-Tech. Centre Wallon de Biologie Industrielle. Passage des Déportés, 2. B-5030 Gembloux (Belgique).

(2) Centre Wallon de Recherche Agronomique (CRA-W). Chaussée de Namur, 24. B-5030 Gembloux (Belgique).

*Corresponding author E-mail: langsemb@yahoo.fr

Abstract:

Mangrove ecosystems are areas prone to various types of pollution, especially hydrocarbons. These hydrocarbons mostly stem from human activities such as spills coming from offshore oil operations, runoff from surrounding urban areas or atmospheric deposition. This pollution causes the decline of mangroves, which results in an imbalance in the functioning of this particular ecosystem with damages to the microbiota. Biodegradation allows to restore these ecosystems. This biodegradation can only be effective in specific environmental conditions. The presence of nutrients, which stimulate bacterial growth and promote biodegradation, is a key parameter to be considered. During this experiment, we achieved biodegradation tests to assess the effect of nitrogen and phosphorus on the process. The results showed that the biodegradation rates were strongly bound to the presence of nutrients. The degradation rates depended on the medium. The treatment that reached the best rate of degradation of diesel after 10 days was the one using 20% of a nutrient solution (MSM) containing nitrogen and phosphorus. This treatment led to a maximal degradation of $84.7\% \pm 4.7\%$ obtained in the flasks containing 20% of a nutrient solution (MSM) containing nitrogen and phosphorus.

Key words: Biodegradation, microorganisms, nutrients.

VI.1 Introduction

Hydrocarbons are currently the main source of energy obtained by combustion. This also makes them the World's main source of pollution (spills, waste products, etc.). Hydrocarbons can affect the environment and many ecosystems such as mangroves ecosystems. More specifically, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are hydrophobic and readily adsorb onto particulate matter. As a consequence, coastal and marine sediments become the ultimate sinks, leading to a strong accumulation of hydrocarbons (Hughes et al., 1997). Mangrove biotopes, which are estuarine wetlands along coastlines of tropical and subtropical regions, are closely tied to human activities and are subject to contamination. Soil disruptions caused by pollution decreases biodiversity and promotes the growth of specific microbial species (Lindstrom et al., 1999; Kozdroj and Van Elsas 2001). A combination of biological, chemical and physical processes can contribute to the degradation of hydrocarbon contaminants, but soil microbial activity is a key parameter for these processes (Alexander, 1999; Gogoi et al., 2003; Greenwood et al., 2009). Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soils has been recognized as an efficient, economic, versatile, and environmentally adapted treatment (Margesin and Schinner, 2001; Pao-Wen et al., 2008). Indigenous microorganisms, including bacteria and fungi, are able to degrade PAHs in soils, leading to the in situ rehabilitation of the soils (Margesin et al., 2000). Three types of bioremediation are predominant today; natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation (Iwamoto and Nasu, 2001). Natural attenuation utilizes intrinsic degradation capability of the autochthonous microorganisms to degrade contaminants and is a natural degradation process (Mills et al., 2003). This strategy is advantageous as it avoids damaging the ecologically sensitive mangrove habitats (Dowty et al., 2001). Biostimulation requires some adaptations of the site (contaminated soil or water) in order to provide bacterial communities with a favourable environment, leading to an effective degradation of hydrocarbons. This includes the addition of nitrogen, phosphorus, and trace minerals with a suitable pH value, improving the proliferation of indigenous microorganisms, hence speeding up the bioremediation process (Venosa et al., 1996; Salanitro et al., 1997). Bioaugmentation is the introduction of microorganisms with specific catabolic abilities into the contaminated environment in order to supplement the indigenous population and to speed up or enable the degradation of pollutants (Perelo, 2010). Traditional techniques for isolating and culturing microorganisms depend on the presence of soluble carbon sources. Recent studies have demonstrated the existence of aerobic heterotrophic bacteria, in pure cultures and consortia, capable of degrading the majority of hydrocarbon products, such as diesel and polycyclic aromatic hydrocarbons (Baker et al., 1994). Some of these bacterial cultures could be isolated from marine environments (Dean-Ross et al., 2001; Moody et al., 2001). They are able to survive in polluted environments and metabolize hydrocarbons as the sole carbon source. This study aims to control the influence of nutrients (more specifically nitrogen and phosphorus) on the rate of biodegradation of oil in mangrove biotopes and to determine the impact of such a treatment on the bacterial microbiota. This study aims to highlight the relationship between the microbiota and

nutrients such as nitrogen and phosphorus in terms of hydrocarbon degradation applied to sediments of mangroves. The use of nutrients has been highlighted in previous studies (Semboung Lang et al., 2016). This study has shown that the oil degradation rate is highly dependent on environmental conditions and, in particular, the presence of nitrogen and phosphorus. The bioaugmentation with the addition of exogenous bacteria able to biodegrade hydrocarbons and adapted to the marine environment has been effective in the presence of nutrients. This experiment was performed in flasks in laboratory. Key parameters, such as temperature, oxygenation of the medium and pH, were controlled during the whole study.

VI.2 Materials and methods

VI.2.1 Sea water, mineral salt medium (MSM) and diesel

The experiment was performed with artificial sea water (in MilliQ water (g/l): NaCl, 10; KCl, 0.74; CaCl₂, 0.99; MgCl₂, 6.09; MgSO₄, 3.94; pH: 7.8 (pH was adjusted with NaOH or HCl)). The bottle was sterilized by autoclave. Mineral salt medium (MSM) had the following composition (mg/l): (NH₄)₂SO₄, 1000; K₂HPO₄, 800; KH₂PO₄, 200; MgSO₄.7H₂O, 200; CaCl₂.2H₂O, 100; trace elements (FeSO₄.7H₂O, 12; MnSO₄.7H₂O, 3; ZnSO₄.7H₂O, 3; CoSO₄.7H₂O, 1; (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 1); 15 g agar. The pH was 7.0-7.2. MSM was prepared in deionized water except when salinity effects were examined. The diesel used in this study was commercial diesel; it contained 75.2% of aliphatic hydrocarbons, carbon chains were C₁₁ to C₂₄ and 24.7% aromatic hydrocarbons.

VI.2.2 Consortium bacterial starter

The bacterial consortium used in this study was developed by Semboung Lang et al., (2016). According to these authors, the active bacterial starter is obtained through a specific selection from the total microflora present in the sediments of mangroves. This consortium is made up of bacteria capable of degrading diesel. The bacterial concentration of the starter was 3 x 10¹¹ CFU/g of powder. This starter was used to inoculate flasks containing diesel.

VI.2.3 Biodegradation experiments

The aim of this experiment was to find out the necessity of nutrients in hydrocarbon degradation. A series of tests in flasks was undertaken. The flasks contained the artificial sea water and nutrients in different concentrations. The experiment was carried out by series of three flasks (3 repetitions). In a series of three flasks of 250 mL, we introduced 160 ml of liquid containing 90% of artificial seawater and 10% of nutrient solution (MSM). In a second series, the flasks contained 80% of artificial seawater and 20% MSM. In the third series, the flasks contain 70% of artificial seawater and 30% MSM. In the fourth series, the flasks contain 60% of artificial seawater and 40% MSM. In the fifth series, the flasks contain 50% of artificial seawater and 50% MSM. In the sixth series, flasks contain 100% artificial seawater. The last series was the control series. In each of the flasks we added

10,000 ppm diesel. Except for the control flasks, we introduced into each of the flasks of the six series a bacterial consortium capable of degrading hydrocarbons. This consortium was isolated from mangrove sediment. The flasks were then incubated in an oven at 30 ° C for two weeks.

VI.2.4 Ammonium and phosphate assays

The determination of NH_4^+ and PO_4^{3-} aimed to follow the evolution of nitrogen and phosphorus in the medium. The determination of ammonium and phosphate were achieved with the 1-05 Nanocolor Test kit and the Test 1-78 Nanocolor, respectively (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany).

VI.2.5 Cytometric assays

Accuri CFlow® or CFlow Plus software (CFlow) was used to control the C6 Flow Cytometer® system, acquire data, generate statistics and analyze results. Cytometric analyses allow to characterize the consortium under diesel stress. The viability and the membrane integrity were measured with propidium iodide (PI). Flow cytometry was also used to count the microorganisms. The analysis was performed every day throughout the entire experiment. The sample preparation was carried out as follows: one ml of each sample was transferred into two microtubes: the first was heated at 90°C for 30 minutes in a water bath (heat shock) and the second was placed on ice (reference sample). For each sample, 500 µL of the solution were introduced into another microtube, and then 500 µL of PBS were added (0.2-µm filtered). The mixture was vortexed and centrifuged at 10,000 rpm for 2 min. The pellet (desired range 10^6 CFUs/mL) was recovered, 1,000 µL of PBS and 10 µL of PI were added, and the cells were re-suspended using a vortex. The mixture was incubated at 37°C for 15 minutes and then centrifuged at 10,000 rpm for 2 min. The pellet was recovered, 1,000 µL of PBS were added and the cells were re-suspended using a vortex before cytometry analysis.

VI.2.6 Total petroleum hydrocarbon (TPH) analysis and rate of diesel degradation

The analysis of the hydrocarbons required a purification step before gas chromatography analysis. During the purification, 100 ml of sample were used. The pH of each sample was adjusted to 2 using HCl. Then we added 4.45% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and, after an agitation step of 30 minutes, the contents was introduced into a separatory funnel. An equivalent volume of hexane solution saturated with acetonitrile was added to each sample. The mix was stirred for 10 minutes and yielded two phases: the hexane phase above containing hydrocarbons and impurities and the acetonitrile phase below. 1.5 g of Florisil (15% MgO, 85% SiO_2 , MACHEREY-NAGEL GmbH and Co.KG, Germany) and 1.5 g of Na_2SO_4 were placed in a settling leg made of fritted glass. The acetonitrile phase (below) was recovered first. The hexane phase containing hydrocarbons was next recovered in another flask. The flasks containing the hexane phase were then dried and heated in an oven at 105 °C for 3 hours and then cooled in a desiccator. The solution in each flask was then evaporated using a rotary

evaporator heated at 50°C to a volume of about 2 ml. The final sample volume was measured and an aliquot was introduced into a vial stored at 4°C before GC injection. The remaining diesel oil was quantified by weight. The percentage of diesel oil degradation was determined on the basis of the original concentration. The dosage of hydrocarbons in soils and water was performed using a gas chromatograph (HP 5890 Series II Gas Chromatograph). An external calibration was made with standard diesel (Diesel Oil Additives Without DIN H53) and mineral oil (Mineral Oil Additives Without DIN H53). Analysis conditions and the characteristics of the column were as follows: Pre-column: deactivated fused silica; Column Macherey Nagel Optima 1 (99% polydimethylsiloxane, 1% diphenyl); Column length: 30 m; Internal diameter of column: 250 microns; Stationary phase thickness: 0.25 microns; Injection volume: 1 µl; Injector: on-column; Carrier gas: helium at 0.8 bar; Hydrogen fueling the detector: 1.15 bar; FID detector at 300°C; Oven temperature: 40°C for 5 minutes, temperature rise for 26 minutes at a rate of 10°C/min, 300°C for 30 minutes. Oil content was measured by the hydrocarbon index, considering all the peaks between decane and tetracontane.

VI.2.7 Metabolic characterization by Biolog ECO microplates®

The metabolism of C and N was analysed with Biolog ECO microplates® and the data were processed with the MINITAB® software. The bacterial suspensions obtained right after the inoculation of the bacterial consortium into the flasks were considered the initial consortium with different nutrient concentrations. These suspensions were diluted in sterile physiological water (NaCl 9 g/l) and inoculated into the microplates at the right dilution. Other samples were taken from the flasks after 10 days of culture and were considered the final consortium, once again at different nutrient concentrations. The microplates were incubated at 30°C in darkness. The results were analysed following the procedure described by Tarayre et al. (2015) through principal component analysis and calculation of similarity rates.

VI.2.8 Quality Control and Statistical Analyses

Mean values were compared with the ANOVA test with a p-value ≤ 0.05 . The differences in the various rates of diesel reduction were also analyzed by the same test. An analysis of variance (ANOVA) was performed to test the differences between initial and final TPH concentrations between the treated flasks and the control flasks. All statistical analyses were performed with the MINITAB 15 statistical software.

VI.3 Results and Discussion

VI.3.1 Evolution du pH

The experiment was carried out with a starting pH of 7-7.5. The evolution of pH is comparable in the different flasks. The pH decreased during the first two days of the experiment. It rose gradually after the second day to reach a stable value in the fourth day. In the flasks containing no nutrients, pH

was from between 4.2 and 4.6 after the second day to the tenth day of the experiment. The pH was more acidic in flasks not containing nutrients. On the other hand, all the flasks added with nutrients showed a similar change in pH. Monitoring the evolution of pH is useful to assess the degradation of diesel. Determining the pH during this experiment showed that nutrients play an important role in the evolution of pH. In the flasks containing nutrients, the pH was between 6 and 7, supporting cell growth. Most microorganisms grow at pH 5.0 to 9.0 with optimal values close to neutrality. Fungi are often more tolerant to acidic conditions (pH <5) as bacteria (pH 6 to 8). The pH also affects the microorganisms and microbial enzymes, but also the dissociation and solubility of many molecules that act directly on micro-organisms. The pH determines the CO₂ solubility and the availability of nutrients such as ammonium and phosphates. The solubility of phosphorus is thus maximized at pH 6.5 (Sims et al., 1990).

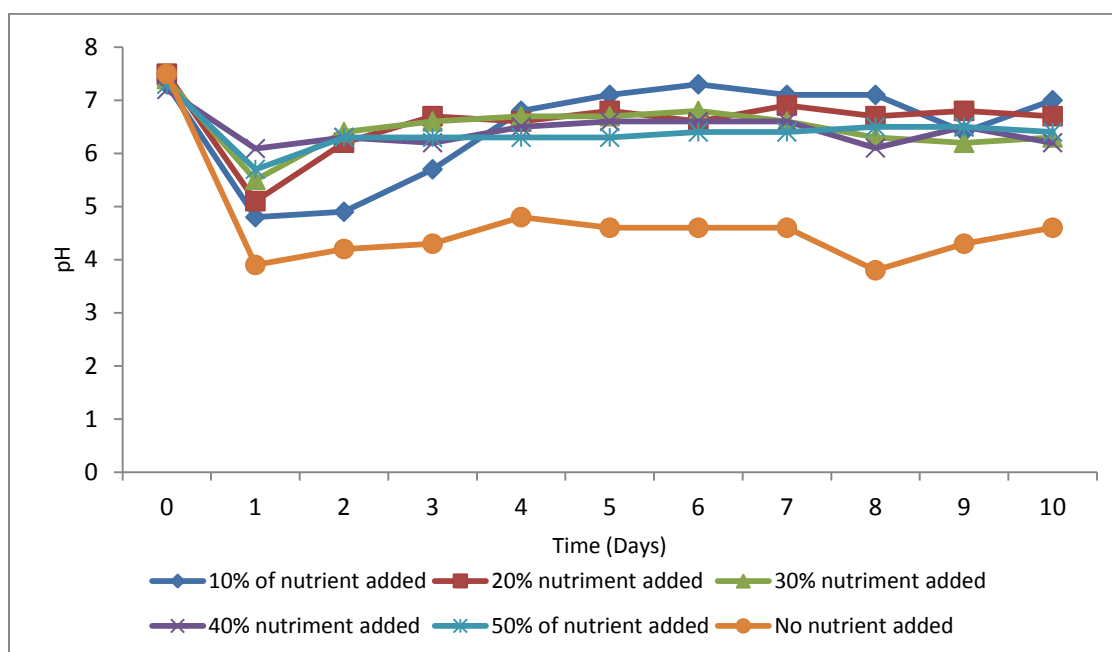


Figure 1 : Evolution of pH during the degradation of hydrocarbons

VI.3.2 Evolution of consortia in the flasks

The figure below (**Fig. 2**) shows the development of biomass in the flasks over a period of 10 days. The bacterial growth seems to be comparable whatever the treatment is. The statistical analysis of the results indicates that there is no significant difference between different flasks whatever the treatment. However, the bacterial concentration was higher in the flasks containing the nutrients. Nutrients added into some flasks in various proportions have an accelerating effect of bacterial growth. The bacterial consortium benefited from the oxygen brought by the agitation and carbon brought in diesel. In literature, it has been reported that a large fraction of the soil microbial population uses oxygen as the terminal electron acceptor in its metabolism. However, experiments show that the presence of nutrients is also important for bacterial growth. According to Sims et al., 1990, the growth of microorganisms may also depend on other factors such as salinity, the presence of nutrients

(nitrogen and phosphorus), temperature and even the interaction between microorganisms. Salinity in the medium has an osmotic effect on microorganisms which also have biological requirements in sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl) and magnesium chloride (MgCl₂). The nitrogen contained in the flasks is important for the biosynthesis of proteins. Phosphorus is needed for ATP production and synthesis of the phospholipid membrane. However, high concentrations can inhibit microbial growth. This can explain the fact that the cell concentration is higher in the flasks receiving a small proportion of nutrients (10, 20 and 30% of the volume of liquid in the flask) compared with the concentration of cells in flasks with more nutrients (40 and 50% by volume). The addition of nitrogen and phosphorus improves cell growth and therefore the decomposition of organic pollutants. For example, according to Atlas 1977, the rate of oil biodegradation in seawater is limited both by the nitrogen and phosphorus content; this barrier can be removed by the addition of nitrogen and phosphorus oleophilic fertiliser. As a part of our experiment, we used a bacterial consortium to degrade diesel. In the flasks it is possible that interactions occur between different microorganisms constituting the consortium. Various types of interactions exist between microbial populations such as mutualism and commensalism.

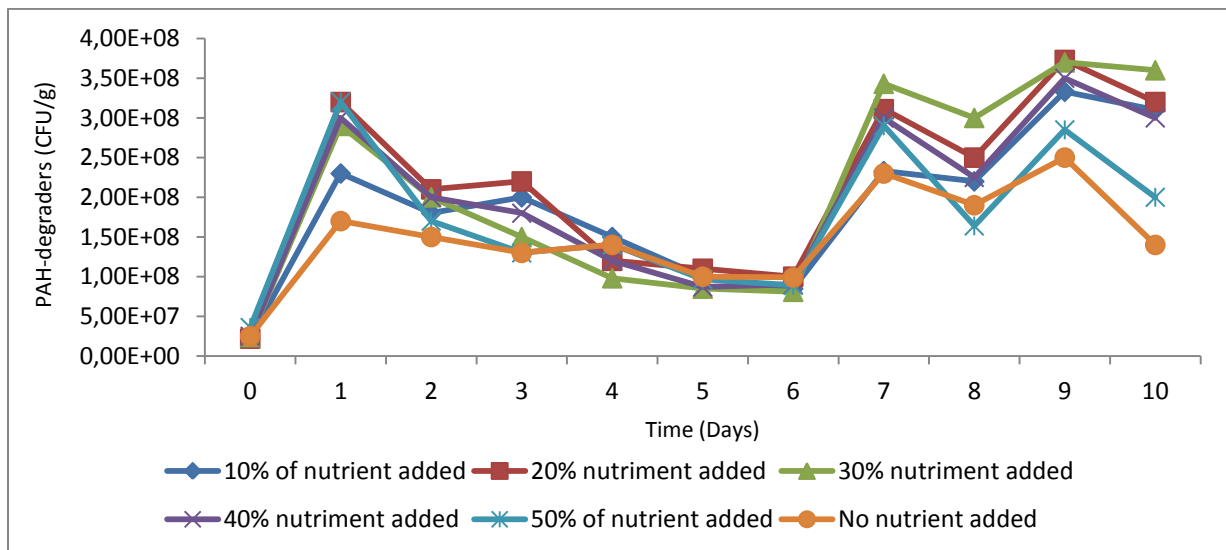


Figure 2 : Evolution of cells counted by flow cytometry during the biodegradation of hydrocarbons

VI.3.3 Assessment of consortium evolution by flow cytometry

The objective consortium monitoring by flow cytometry was to assess the effect of stress caused by diesel, with or without nutrients. Diesel is a pollutant that induces a stress on the microbiota in the medium. This stress can cause death of some or all bacteria composing the consortium, or may cause damages to the membrane integrity of the cells. Propidium iodide (PI) is used as a staining agent which binds to the DNA. Only cells that are dead or the membrane integrity of which is damaged get stained with PI. The cells in good condition do not stain with PI because their membrane does not let the dye in. In the flow cytometry analysis, two kinds of subpopulations can be highlighted: a

subpopulation stained with PI and another which is not. This analysis can also help us to understand the diesel degradation processes. There could be a correlation between the diesel degradation rate and the rate of living cells present in the flasks that are not coloured with PI. Figure 3 shows the different percentages of cells that are not stained by PI. The observation of the different curves shows that the concentration of cells that do not interact with PI is higher in the flasks that were added with nutrients. In flasks with nutrients, the rate of living cells decreases progressively from the first day until the sixth day of treatment with the lowest concentration level observed (54.8% in the flasks that received 30% MSM medium). This rate increases again until the tenth day for the same flasks, with a concentration ratio of 87%. This clearly shows that, at the beginning of the experiment, the diesel induces a significant stress to the consortium. This stress causes the death of many cells, making them inactive. The presence of nutrients promotes cell growth and allows the cells to withstand the presence of pollutant. The results of flow cytometry confirmed that hydrocarbons have adverse effects on cells. Hydrocarbons are cytotoxic and cause cell death (figure 4). The cytograms obtained here showed that the nutrients inhibit the cytotoxic effect of diesel and limit its impact on cell death.

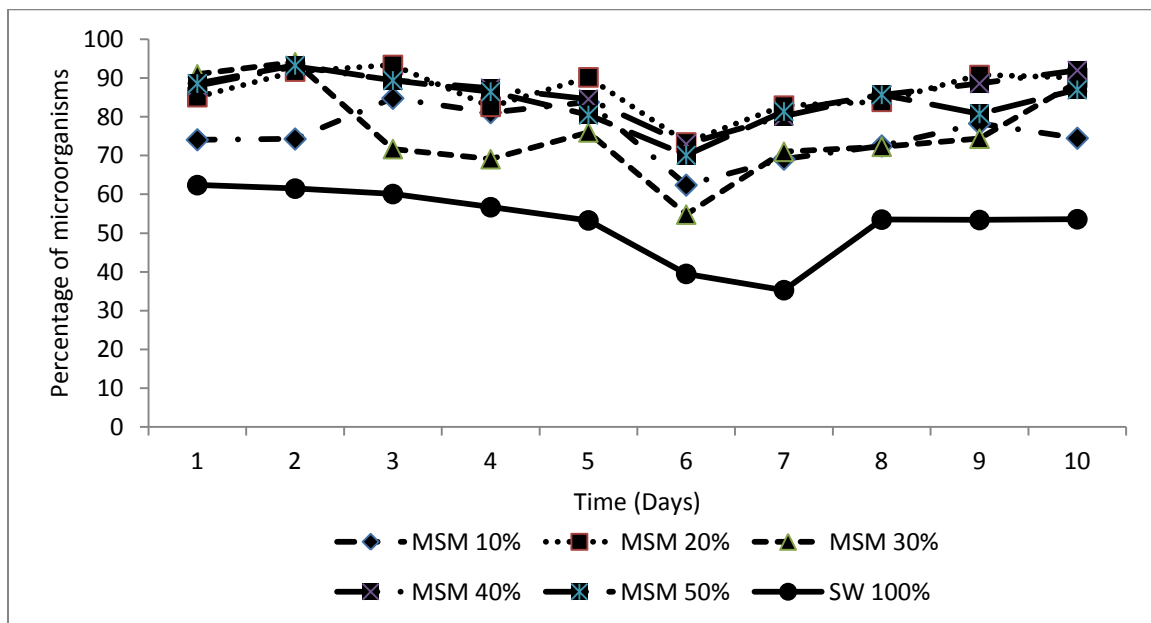
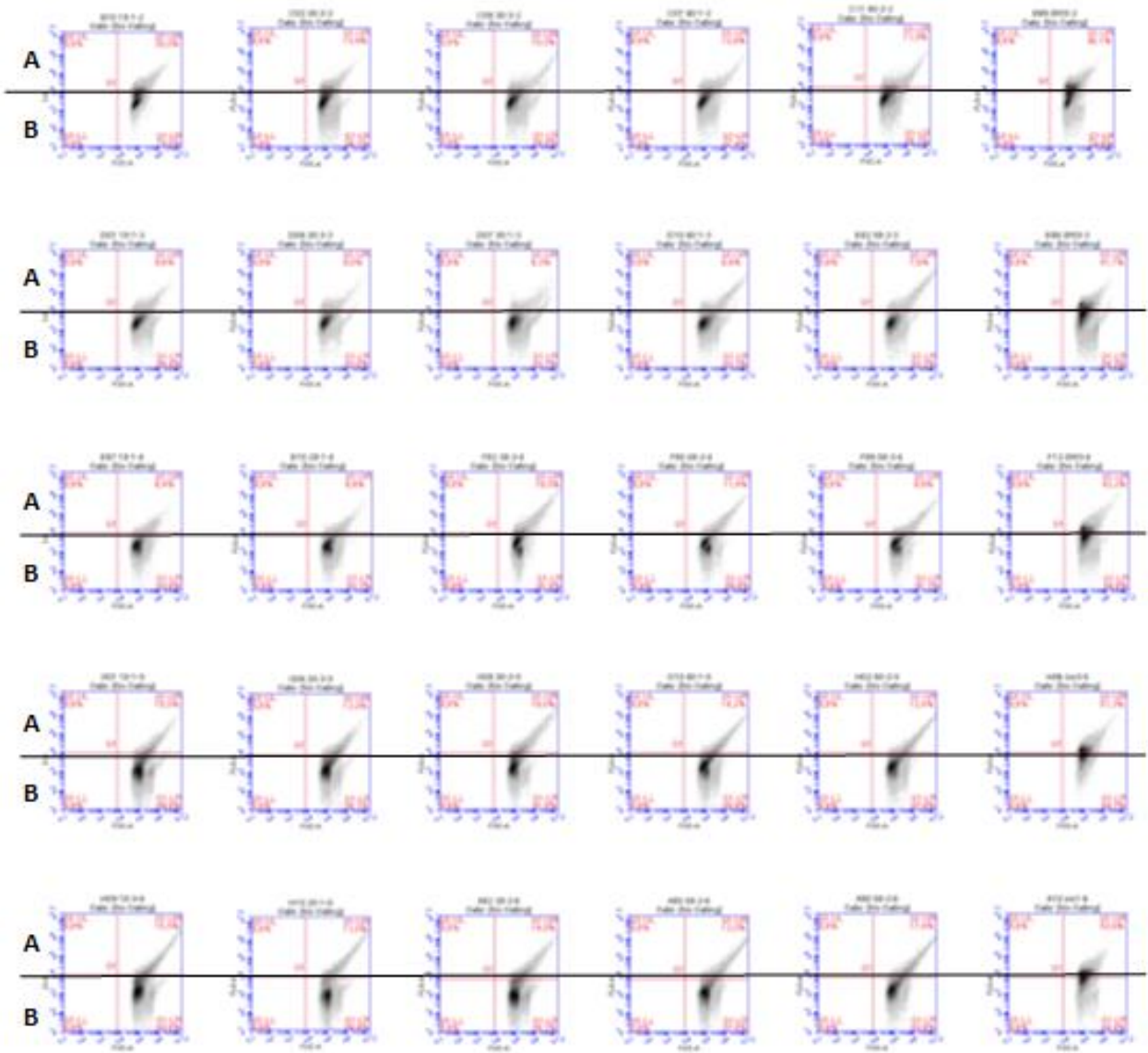


Figure 3 : Percentage of microorganisms that are not stained by PI



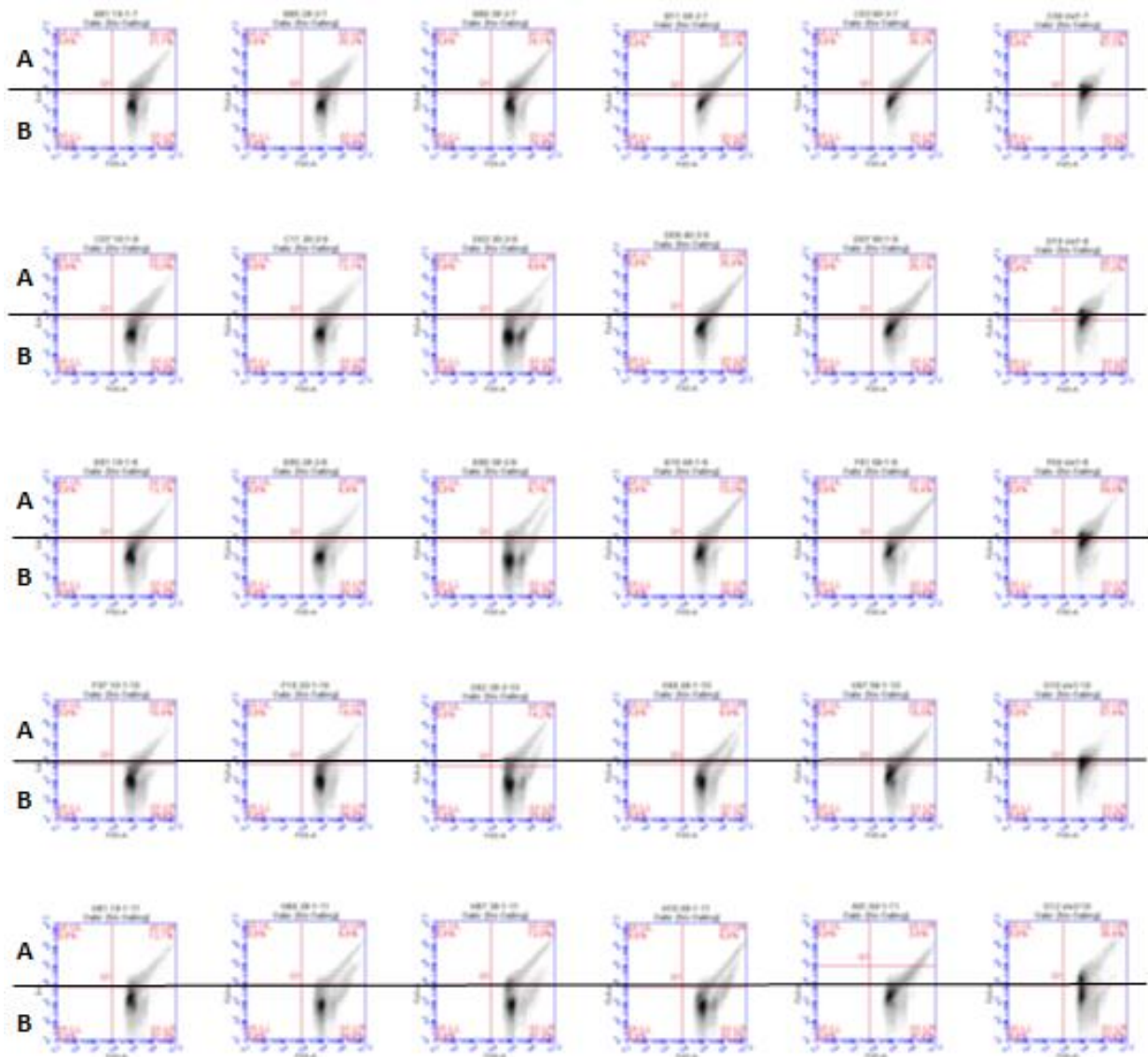


Figure 4 : Cytograms with the consortium's behavior into the flasks

A: Sub-population with poor membrane integrity; B: Sub-viable population or one with good membrane integrity.

VI.3.4 Biodegradation of diesel in mangrove sediment by bacterial consortium in flasks

Several strategies can be used to degrade the hydrocarbons contained in mangrove ecosystems biologically. These strategies include natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Natural attenuation uses indigenous microorganisms to degrade contaminants and has the advantage of being natural, adding no external elements into the environment (Mills et al., 2003). Biostimulation, based on supplying additional nutrients or substrates to stimulate the degradation of native microorganisms, can also be used to promote biodegradation (Riser-Roberts, 1998). Bioaugmentation, based on inoculating microorganisms with the required degradation capability, might be a way of enhancing the biodegradability of toxic contaminants. As a part of our experiment, we used an endogenous bacterial

consortium selected and developed as a starter, capable of degrading hydrocarbons and in particular diesel, and a nutrient solution as described in the methodology. The results at the end of the experiment showed that after 10 days of diesel degradation, the rates were different. These degradation rates differ depending on the medium. Figure 5 shows that, after 10 days, the treatment with the best rate of degradation of diesel was $84.7\% \pm 4.7$ and obtained in the flasks that were added with 20% of a nutrient solution (MSM) containing nitrogen and phosphorus. The flasks fed with 30% MSM solution had a degradation rate of $76.5\% \pm 6.0$. Statistical analyzes indicate that there is no significant difference in the diesel degradation rate in both sets of flasks. However, the other degradation rates were significantly different ($64.7\% \pm 4.0$ for the series of flasks that received 40% of middle MSM, $58.1\% \pm 6.3$ for the series receiving 10% medium MSM, $53.3\% \pm 10.5$ for the series of flasks that received 50% MSM medium and finally $22.8\% \pm 6.3$ for the series of flasks having no received an addition of MSM environment).

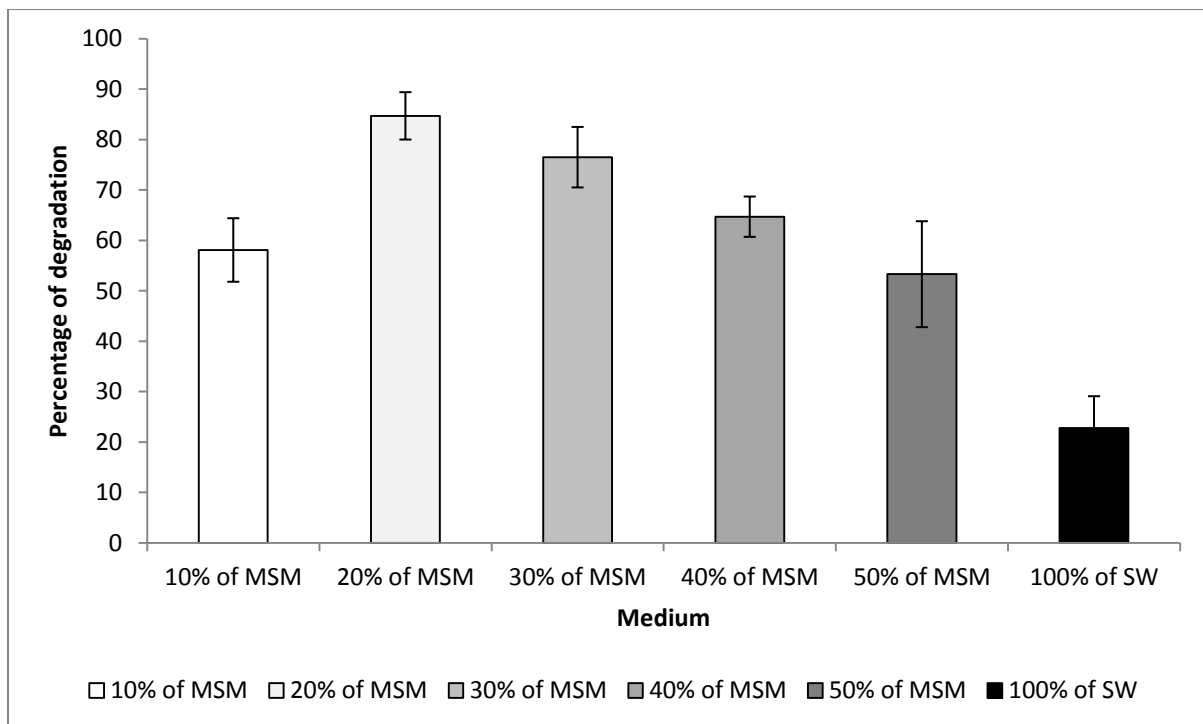


Figure 5 : Biodegradation of diesel obtained after 10 days

These results showed that the nutrients, particularly nitrogen and phosphorus, are very important elements for the success of the biodegradation of diesel. The addition of nitrogen and phosphorus in limited proportions significantly improved the biodegradation of diesel. In mangrove ecosystems, the presence of hydrocarbons results in a significant reduction in the amount of nutrients available in the mangroves. (Sims et al., 1986). Nutrients are also required for microbial growth and cell growth. Appropriate amounts of nutrients for microbial growth are usually present in low amounts, but the nutrients may be added in a usable form by a modification of the organic substrate.

This substrate is also used as an electron donor to stimulate bioremediation. Indeed, hydrocarbons are a major source of carbon but contain no nitrogen or phosphorus. When microorganisms degrade PAHs, they consume the nutrients available in the environment, causing deficiencies and increasing the existing competition phenomena (Kaye et Hart, 1997). In addition, the hydrocarbon contamination may be toxic to certain bacterial and fungal organisms involved in biogeochemical cycles, amplifying the deficiencies of nutrients in plants (Muratova et al., 2003). In general, a C/N/P ratio of 120/10/1 [mg] is considered optimal for the growth of bacteria in the presence of contaminants (Wilson and Jones, 1993). More specifically to the bioremediation of soils, most studies show an optimal C/N/P ratio of 120/14/3 [massic ratio] and 100/10/1 [molar ratio] (Bouchez et al., 1995; Cookson, 1995). However, these ratios must be adapted because of the complexity of some ecosystems such as mangroves. Similarly, it is important to take into account the specific ecosystem conditions: salinity, temperature and sometimes oxygen deficiency, presence of specific microorganisms to degrade hydrocarbons, etc. These conditions must be considered to adjust the quantities of nutrients needed to promote biodegradation. Nutrients such as nitrogen and phosphorus can be limiting factors affecting the biodegradation process. When an oil spill occurs in an ecosystem in marine or fresh water, carbon increases significantly and the availability of nitrogen and phosphorus is usually the limiting factor for the degradation of hydrocarbons. Mangrove ecosystems and wetlands freshwater areas are generally considered nutrient deficient because of strong demands of nutrients by (Ryan et al., 1987) plants. Therefore, nutrient additions are needed to enhance the biodegradation of petroleum products (Sims, 1986; Coover et al., 1987). On the other hand, excessive concentrations of nutrients can also inhibit the biodegradation activity (Sims, 1986). Several authors have reported the negative effects of high levels of NPK on the biodegradation of hydrocarbons (Park et al., 1988), particularly aromatic (Lynch et al., 1989).

VI.3.5 Metabolic assessment of the bacterial consortium

The metabolic properties of the bacterial consortium were assessed with Biolog ECO microplates®. The data were analysed in two ways: principal component analysis (PCA) and calculation of similarity rates. **Figure 6** shows the values of the first two principal components calculated on the basis of the consumption of C and N substrates.

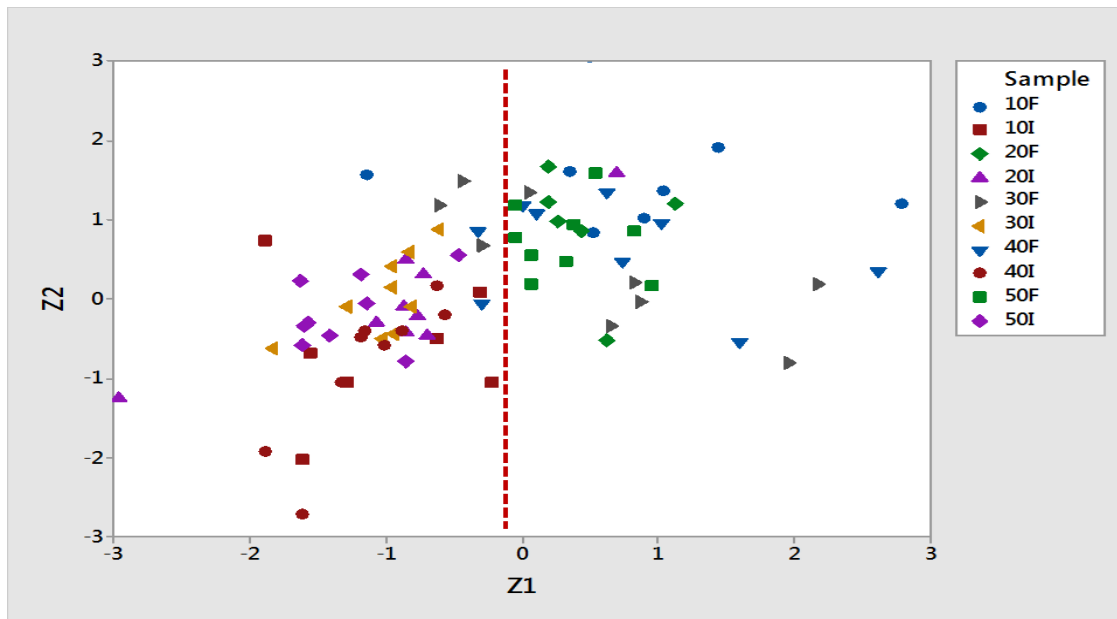


Figure 6 : First (Z1) and second (Z2) principal components calculated on the basis of the metabolism of C and N sources by the bacterial consortium – 10, 20, 30, 40 and 50I correspond to the initial consortium with 10, 20, 30, 40 and 50% of MSM solution; 10, 20, 30, 40 and 50F correspond to the final consortium with 10, 20, 30, 40 and 50% of MSM solution

The values of the first and second principal components suggest a clear separation between the initial and final consortia. This can be explained by a common evolution of bacteria during the biodegradation process. This is linked to a difference in the value of the first principal component (Z1). Indeed, a value superior to -0.15 corresponds to the final consortia (except for 3 samples 30F), while a value inferior to -0.15 is rather linked to the initial consortia. However, such a difference cannot be highlighted with the 2nd principal component. At this level, it is not possible to identify subgroups characterized by different nutrient concentrations. However, the calculation of similarity rates, based on statistical inference, allows to go deeper in these differences. **Table 1**, shows a heat map of the similarity rates calculated for each couple of samples.

Table I : Heat map of similarity rates calculated on the basis of the metabolism of C and N sources by the bacterial consortium – 10, 20, 30, 40 and 50I correspond to the initial consortium with 10, 20, 30, 40 and 50% of MSM solution; 10, 20, 30, 40 and 50F correspond to the final consortium with 10, 20, 30, 40 and 50% of MSM solution

	10I	20I	30I	40I	50I	10F	20F	30F	40F	50F
10I	100.0	96.8	96.8	90.3	87.1	83.9	71.0	90.3	90.3	87.1
20I	96.8	100.0	100.0	100.0	93.5	93.5	83.9	90.3	93.5	93.5
30I	96.8	100.0	100.0	100.0	96.8	93.5	83.9	93.5	96.8	96.8
40I	90.3	100.0	100.0	100.0	96.8	93.5	83.9	90.3	96.8	90.3
50I	87.1	93.5	96.8	96.8	100.0	93.5	90.3	96.8	100.0	100.0
10F	83.9	93.5	93.5	93.5	93.5	100.0	77.4	87.1	96.8	93.5
20F	71.0	83.9	83.9	83.9	90.3	77.4	100.0	74.2	83.9	83.9
30F	90.3	90.3	93.5	90.3	96.8	87.1	74.2	100.0	96.8	100.0
40F	90.3	93.5	96.8	96.8	100.0	96.8	83.9	96.8	100.0	100.0
50F	87.1	93.5	96.8	90.3	100.0	93.5	83.9	100.0	100.0	100.0

These similarity rates show a close profile in the data obtained from the original consortium at different MSM concentrations. The differences observed here are due to the culture medium, more concentrated in nutrients in the samples 30, 40 and 50I. The strongest difference can be observed between the samples 10I and 50I, characterized by the lowest and the highest nutrient concentration, respectively. It must be noted that the consortium inoculated into the microplates is exactly the same in samples 10, 20, 30, 40 and 50I, which means that the significant differences observed here are only due to the composition of the culture medium. As for the final consortium, there is a strong similarity between the samples 30, 40 and 50F. The two other final consortia show many more significant differences in the metabolism of C and N. It seems that the samples 10 and 20F have their own metabolic profiles, and consequently their specific bacterial consortium with a similarity rate of only 77.4%. Some C and N substrates were involved in many significant differences between the samples, while other substrates were degraded by all consortia in the same way. The substrates linked to the most significant differences (more than 6 significant differences out of 45 comparisons) between the pairs of samples were pyruvic acid methyl ester, α -cyclodextrin, 2- and 4-hydroxybenzoic acid, α -ketobutyric acid, L-asparagine, L-phenylalanine, L-threonine and glycyl-L-glutamic acid. It is interesting to note that 4 of these substrates contain nitrogen.

VI.4 Conclusion

The biodegradation of mangrove sediments polluted by diesel involves a set of factors which must be monitored to be effective. Previous works have shown similar results using endogenous or exogenous microorganisms. The success of the biodegradation of mangrove sediments polluted by oil depends on the ability of bacteria to degrade hydrocarbons, the control of temperature and pH of the medium, and the presence of nutrients such as nitrogen and phosphorus. These two elements play a key role in

bacterial growth. The results confirm the importance of the presence of nutrients in the biodegradation process. However, the concentration in key elements (nitrogen and phosphorus) to be added must take into account that the polluted sediments already contain these elements. A high concentration in these nutrients seems to affect the biodegradation process. However, an optimal addition of nitrogen and phosphorus stimulates bacterial growth and promotes good hydrocarbon degradation.

References

- Alexander, M. (Ed.) (1999). *Biodegradation and Bioremediation*. (San Diego, CA: Academic Press).
- Baker, K.H. and Herson, D.S. (1994). *Microbiology and Biodegradation*. (In K.H. Baker, & D.S. Herson (Eds.), *Bioremediation* (pp.9-60). New York (USA): McGraw-Hill, Inc.)
- Bouchez, M., Blanchet, D. and Vandecasteele, J.P. (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Applied of Microbiology and Biotechnology*, **43**(1), 156-164.
- Cookson, J.T. (Ed.) (1995). *Bioremediation engineering : design and application*. (New York: McGraw-Hill).
- Coover, M.P. and Sims, R.C. (1987). The effect of temperature on polycyclic aromatic hydrocarbon persistence in an unacclimated agricultural soil. *Hazardous Waste & Hazardous Materials*, **4**, 69-82.
- Dean-Ross, D., Moody, J.D., Freeman, J.P., Doerge, D.R. and Cerniglia, C.E., (2001). Metabolism of anthracene by *Rhodococcus* species. *EMS Microbiology Letters*, **204**(1), 205-211.
- Dowty, R.A., Shaffer, G.P., Hester, M.W., Childers, G.W., Campo, F.M. and Greene, M.C. (2001). Phytoremediation of small-scale oil spills in fresh marsh environments: a mesocosm simulation. *Marine Environmental Research*, **52**, 195–211.
- Gogoi, B.K., Dutta, N.N., Goswami, P. and Krishna, T.R.M. (2003). A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. *Advances in Environmental Research*, **7**, 767–782.
- Greenwood, P.F., Wibrow, S., George, S. J. and Tibbett, M. (2009). Hydrocarbon biodegradation and soil microbial community response to repeated oil exposure. *Organic Geochemistry*, **40**(3), 293-300.
- Hughes, J. B., Beckles, D. M., Chandra, S.D. and Ward, C.H. (1997). Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **18**, 152–160.
- Iwamoto, T. and Nasu M. (2001). Review: current bioremediation practice and perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **92**, 1–8.
- Kaczorek, E. and Olszanowski, A. (2011). Uptake of Hydrocarbon by *Pseudomonas fluorescens* (P1) and *Pseudomonas putida* (K1) Strains in the Presence of Surfactants: A Cell Surface Modification. *Water, Air & Soil Pollution*, **214**, 451–459.
- Kaye, J.P. and Hart, S.C. (1997). Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends ecology Evolution*, **12**(4), 139-143.
- Kozdroj, J. and Van Elsas, J.D. (2001). Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *Journal of Microbiology Methods*, **43**, 197–212.
- Lindstrom, J.E., Barry, R.P. and Braddock, J.F. (1999). Long-term effects on microbial communities after a subarctic oil spill. *Soil Biology Biochemistry*, **31**, 1677–1689.

- Lynch, J. and Genes, B.R. (1989). Land treatment of hydrocarbon contaminated soils. (In P.T. Kostecki, & E.J. Calabrese (Eds.), *Petroleum Contaminated Soils, Vol I: Remediation Techniques, Environmental Fate, and Risk Assessment*. (pp. 163-174). Chelsea, MI: Lewis Publishers).
- Margesin, R., and Schinner, F. (2001). Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Applied Environmental Microbiology*, **67**, 3127.
- Margesin, R., Zimmerbauer, A. and Schinner F. (2000). Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, **40**, 339–346.
- Mills, M.A., Bonner, J.S., McDonald, T.J., Page, C.A. and Autenrieth, R.L. (2003). Intrinsic bioremediation of a petroleum-impacted wetland. *Marine Pollution Bulletin*, **46**, 887–899.
- Moody, J.D., Freeman, J.P., Doerge, D.R. and Cerniglia, C.E. (2001). Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Applied Environmental Microbiology*, **67**, 1476.
- Muratova, A., Bner, T., Narula, N., Wand, H., Turkovskaya, O., Kusch, P., Jahn, R. and Merbach W. (2003). Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Microbiology Resource*, **158**(2), 151-161.
- Pao-Wen G.L., Liang-Ming W., Ming-Chieh Y., Sheng-Shung C., (2008). Biodegradation of diesel-contaminated soil: A soil column study. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, **39**, 419-428.
- Park, K.S., Sims, R.C., Doucette, W.J. and Matthews, J.E. (1988). Biological transformation and detoxification of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in soil systems. *Journal of Water Pollution Control Federation*, **60**, 1822-1825.
- Perelo, L.W. (2010). Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of Hazardous Materials*, **177**, 81-89.
- Riser-Roberts, E. (1998). *Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes*. (Boca Raton: Lewis Publishers).
- Ryan, J., Loehr, R. and Sims, R. (1987). *The Land Treatability of Appendix VIII Constituents Present in Petroleum Refinery Wastes: Laboratory and Modelling Studies*. American Petroleum Institute, Land Treatment Committee, 1220 L. Street, Washington, D.C.
- Salanitro, J.P., Dorn, P.B., Huesemann, M.H., Moore, K.O., Rhodes, I.A., Jackson, L.M.R., Vipond, T.E., Western, M.M. and Wisniewski, H.L. (1997). Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental Science Technology*, **31**, 1769-1776.
- Semboung Lang, F., Destain, J., Delvigne, F., Druart, P., Ongena, M. and Thonart P. (2016a). Characterization and evaluation of the potential of a diesel-degrading bacterial consortium isolated from fresh mangrove sediment. *Water Air Soil Pollution*, **227**, 58. DOI 10.1007/s11270-016-2749-7.
- Semboung Lang, F., Destain, J., Delvigne, F., Druart, P., Ongena, M. and Thonart P. (2016b). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments under different strategies:

- natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation with *Rhodococcus erythropolis* t 902.1. *Water Air Soil Pollution*, **227**, 297. DOI 10.1007/s11270-016-2999-4.
- Sims, J.L., Sims, R.C. and Matthews, J.E. (1990). Approach to bioremediation of contaminated soil. *Hazardous Waste & Hazardous Materials*, **7**(2), 117 -149.
- Sims, R.C. (1986). Loading rates and frequencies for land treatment systems. (In R.C. Loehr & J.F. Malina, Jr. (Eds.), *Land Treatment: A Hazardous Waste Management Alternative*. Water Resources Symposium No. 13, Center for Research in Water Resources, The University of Texas at Austin, (pp. 151-170). Austin, TX).
- Sims, R.C., J.L. Sims, and R.R. Dupont. (1986). Human health effects assays. *Journal Water Pollution Control Federation* **58**, 703-717.
- Sims, R.C. (1986). Soil Treatability Study Results-Coal Gasification Process Water Pond Residuals. Utah Water Research Laboratory, Utah State University, Logan, UT.
- Tarayre, C., Bauwens, J., Mattéotti, C., Brasseur, C., Millet, C., Massart, S., Destain, J., Vandebol, M., De Pauw, E., Haubruge, E., Francis, F., Thonart, P., Portetelle, D. and Delvigne, F. (2015). Multiple analyses of microbial communities applied to the gut of the wood-feeding termite *Reticulitermes flavipes* fed on artificial diets. *Symbiosis*, DOI 10.1007/s13199-015-0328-0.
- Venosa, A.D., Suidan, M.T., Wrenn, B.A., Strohmeier, K.L., Haines, J.R., Eberhart, B.L., King, D.W. and Holder, E. (1996). Bioremediation of experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. *Environmental Science and Technology*, **30**, 1764-1775.
- Wilson, S.C. and Jones, K.C. (1993). Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environmental Pollution*, **81**(3), 229-49.

PARTIE IV: DISCUSSION GENERALE

CHAPITRE VII : DISCUSSION GENERALE

VII.1 La biodégradation et la bioremédiation

La biodégradation des hydrocarbures et des produits raffinés de pétrole tel que le diesel, les huiles de moteur, etc., présents dans les sédiments et les eaux, est spécialement catalysée par les microorganismes et principalement les bactéries et les champignons. A l'origine, les hydrocarbures et les produits raffinés du pétrole sont naturellement biodégradables. A la suite d'une pollution par les produits pétroliers, le processus d'élimination naturelle du polluant commence par l'évaporation. La dégradation microbienne prend ensuite place pour éliminer de façon partielle ou totale les composés dissous et non dissous. La dégradation de certaines molécules récalcitrantes peut prendre des siècles. La biodégradation des produits pétroliers est principalement un processus aérobie bien que la dégradation anaérobie soit également possible sous certaines conditions de fermentation et de dénitrification par exemple.

La bioremédiation est un processus qui encourage les procédés naturels de biodégradation des produits pétroliers présents dans les écosystèmes. Ces procédés naturels peuvent être l'atténuation naturelle, la biostimulation ou la bioaugmentation. Cependant, l'objectif de l'élimination des hydrocarbures est avant toute chose la protection de l'environnement. De plus, la présence des hydrocarbures dans les sols entraîne en amont la destruction de certaines espèces de microorganismes hétérotrophes (Holguin et al., 2001). Les mangroves génèrent des détritiques qui sont la base d'un vaste réseau alimentaire qui soutient de nombreux organismes d'importance écologique et commerciale. Elles fournissent un abri indispensable pour de nombreux organismes marins. Le développement des mangroves dépend en grande partie des activités des diverses communautés microbiennes, fauniques et floristiques qui transforment et recyclent les nutriments dans l'écosystème.

L'objectif de cette thèse était de mettre au point une méthode de dépollution par voie biologique des sédiments de mangroves polluées par les hydrocarbures. Il s'agissait plus précisément d'évaluer les capacités intrinsèques de dégradation de la microflore spécifique endogène, de comparer le potentiel de dégradation de cette microflore avec d'autres souches pures connues pour leur capacité à dégrader les hydrocarbures et enfin d'évaluer les différentes techniques de biodégradation adaptées pour l'élimination des hydrocarbures dans les sédiments de mangroves.

VII.2 La microflore spécifique isolée sous forme de consortium bactérien

Les sédiments des mangroves disposent d'une microflore abondante constituée essentiellement de bactéries et de champignons (Holguin et al., 2001). Plusieurs études ont démontré l'existence d'une microflore spécifique capable de dégrader les hydrocarbures et les produits raffinés de pétrole dans les sédiments de mangroves (Trzesicka-Mlynarz et al., 1995 ; Aitken et al., 1998 ; Röling et al., 2002 ; Brito et al., 2006). Celle-ci d'après le tableau ci-dessous est de faible concentration par rapport à la microflore totale. Dans cette thèse, nous avons isolé une microflore spécifique dans nos échantillons

de mangroves. Celle-ci a été cultivée en fermenteur et a été utilisée dans les différents tests de biodégradation par la technique de bioaugmentation : la concentration de la microflore spécifique ayant pu être augmentée à 10^7 CFU/g de matière sèche.

VII.3 La microflore spécifique dans le processus de biodégradation des hydrocarbures

VII.3.1 La microflore spécifique dans le traitement par atténuation naturelle

La biodégradation par atténuation naturelle consiste à utiliser les capacités de dégradation de la microflore spécifique autochtone ou endogène sans augmentation de sa concentration, ni ajout d'une autre souche pure ou d'un consortium bactérien exogène, ni ajout d'un quelconque stimulant. La mise en œuvre de cette technique dans le cadre de cette thèse, n'a pas donné de résultats satisfaisants. Le taux de dégradation obtenu après 5 semaines de traitement était seulement d'environ 30%. Ce faible taux peut être dû à la concentration de la microflore spécifique qui est très faible. Cette concentration est en moyenne de l'ordre de 10^4 CFU.g⁻¹ par rapport à 10^9 CFU.g⁻¹ pour la microflore totale soit une cellule spécifique pour 100 milles. Ainsi lorsqu'il y a une pollution de grande ampleur, cette concentration peut s'avérer trop faible pour dégrader en très peu de temps le polluant. Les résultats de plusieurs études ont montré que la biodégradation des hydrocarbures pouvait se faire par atténuation naturelle. Yu et al. (2005), ont démontré que les taux de dégradation du fluorène et du phénanthrène étaient de 100 % par atténuation naturelle après quatre semaines de traitement. Cela n'est possible que si la microflore spécifique s'est très bien adaptée au polluant et donc il s'agit d'une pollution ancienne. Les analyses par cytométrie en flux de nos échantillons ont révélé que les hydrocarbures exerçaient un stress négatif sur la microflore spécifique. Ce stress entraînait la mort d'une bonne partie de la microflore spécifique notamment au début du traitement.

Tableau I : Concentration des bactéries spécifiques présentes dans certains sédiments de mangroves

Sédiments de mangroves	Microflore totale (CFU.g ⁻¹ de matière sèche)	Microflore spécifique (CFU.g ⁻¹ de matière sèche)	Références
M1	6.3×10^9	6.7×10^3	Yun et al., 2008
M2	9.2×10^9	7.3×10^2	
M3	5.2×10^9	3.3×10^3	
M4	9.1×10^9	5.7×10^4	
M5	5.4×10^9	2.6×10^2	
M6	2×10^7	ND	Moreira et al., 2011
M7	1×10^8	ND	Ramsay et al., 2000
M8	2.2×10^5	3×10^3	Ezekoye et al., 2015
M9	1×10^8	5×10^5	Semboung Lang et al., 2016a

VII.3.2 La microflore spécifique dans le traitement par biostimulation

La biostimulation consiste à l'ajout d'une solution nutritive minérale, du compost, ou de l'oxygène pour favoriser la biodégradation. Les éléments ajoutés permettent de stimuler la croissance bactérienne. Dans de bonnes conditions environnementales (pH, T°C, teneur en eau des sols), et en absence de limitations concernant les éléments nutritifs minéraux et les accepteurs d'électrons tels que l'oxygène ou autres, la plupart d'hydrocarbures présents dans les écosystèmes de mangroves peuvent être partiellement ou totalement métabolisés par les microorganismes autochtones présents (Chang et al., 2002 ; Demaneche et al., 2004). La présence de ces microorganismes dans les écosystèmes de mangroves et le rôle qu'ils jouent permet à la fois une dégradation anaérobie (Chang et al., 2002) et une dégradation aérobie (Demaneche et al., 2004 ; Haritash & Kaushik, 2009). Le déséquilibre d'un écosystème de mangroves suite à la présence des hydrocarbures, peut entraîner une réduction du nombre ou une diminution de l'activité des bactéries fixatrices d'azote ou sulfato-réductrices. Or l'absence de l'azote et du phosphore ou tout au moins en quantité insuffisante dans les sédiments pollués conduit généralement à des rapports carbone/azote et carbone/phosphore très élevés, défavorables pour la croissance microbienne (Leahy et Colwell, 1990) et peuvent ralentir le processus de biodégradation. Dans ce cas, l'azote et le phosphore pour se limiter seulement à ces deux éléments, constituent des facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures dans les sédiments de mangroves.

Dans cette thèse la biostimulation a été mise en œuvre par l'ajout de la solution nutritive minérale. Cette solution contient de l'azote et du phosphore, deux éléments nécessaires pour la croissance bactérienne. L'ajout de cette solution permet de diminuer les rapports carbone/azote et carbone/phosphore. Des expériences de biodégradation ont été réalisées avec ajout à petite dose d'une solution nutritive. Cette solution est composée en majorité d'ammonium, de phosphate et de sulfate. On y retrouve également les éléments traces tels que le fer, l'oxygène, le zinc, le manganèse, etc. Après analyse des résultats, il a été vérifié que les quantités d'azote (42 mg.L^{-1} d'azote ou 55 mg.L^{-1} de NH_4), de phosphore (38 mg.L^{-1} de phosphore ou 115 mg.L^{-1} de phosphate) sont nécessaires pour dégrader 10 g/L d'hydrocarbures.

Tableau II : Quantités de nutriments nécessaires pour assurer une bonne dégradation des hydrocarbures

Eléments	Quantités (mg.L ⁻¹)	Hydrocarbures	Références
Azote	42	10 g.L ⁻¹	Semboung Lang et al., (2016)
Ammonium	55		
Phosphore	38		
Phosphate	115		
Azote	64	10 g.L ⁻¹	Puri et al. (1997), Ke et al. (2003), Tam et al., (2008)
Ammonium	82		
Phosphore	56		
Phosphate	173		
NH ₄	457	10 g.L ⁻¹	Bridie et Bos (1971)
PO ₄	86		
Azote	110	10 g.L ⁻¹	Reisfeld et al., (1972)
Phosphore	20		

S'il convient de dire que les hydrocarbures constituent une source importante de carbone bien que ne contenant ni azote, ni phosphore disponibles pour les microorganismes, il faut donc reconnaître que leur présence dans les sédiments des mangroves, peut engendrer à moyen terme une réduction significative de la quantité de nutriments disponibles pour les plantes dans les sols (Xu et al., 1997). En effet, selon Kaye et Hart (1997), lorsque les microorganismes dégradent les hydrocarbures, ils puisent en même temps les nutriments disponibles dans le milieu, entraînant des déficiences et accentuant les phénomènes de compétition préexistants. Colwell et al., (1978) ont conclu que le pétrole se dégrade lentement dans l'environnement marin, probablement en raison des limitations imposées par des concentrations relativement faibles de l'azote et de phosphore disponibles dans l'eau de mer.

L'ajout des nutriments stimule la croissance bactérienne. Les différents dénombrements effectués ont montré que la concentration cellulaire était toujours plus élevée dans les fioles où il y a eu ajout des nutriments que dans les fioles où il n'y en avait pas. L'augmentation de la biomasse cellulaire dans les sédiments permet d'accélérer et de relever le taux de dégradation des hydrocarbures. Les hydrocarbures ont des effets négatifs sur les microorganismes. La solution nutritive est composée de plusieurs autres éléments indispensables au processus de biodégradation. Ces éléments qui sont l'oxygène, le manganèse, le fer (III), les ions sulfates, etc., et leurs potentiels redox correspondants, constituent différents types de classes d'accepteurs d'électrons qui peuvent être impliqués dans le processus de biodégradation. Ces éléments apportent de l'énergie aux microorganismes utile pour leur croissance et leur multiplication. Selon Omokhagbor Adams et al., 2015, la dégradation par voie biologique des hydrocarbures nécessite la présence conjuguée des microorganismes et des accepteurs d'électrons tels que NH₄⁺, NO₃⁻, SO₄²⁻, PO₄³⁻, O₂, Fe³⁺, SO₄²⁻ et produit à la fin du processus du CO₂ et H₂O, N₂, P, Fe(II), H₂S, etc., (Sim et al., 1990). Ces différents ions (NH₄⁺, PO₄³⁻, SO₄²⁻ et Fe³⁺, etc.), sont des catalyseurs des réactions de biosynthèse des molécules pour la biomasse cellulaire (Das et al.,

2011). Les résultats que nous avons obtenus montrent que l'ajout de la solution nutritive a eu un effet positif sur la croissance bactérienne et accélère la dégradation des hydrocarbures.

VII.3.3 La microflore spécifique dans le traitement par bioaugmentation

Cette technique nous a permis d'augmenter la concentration de la microflore spécifique avec soit notre consortium bactérien endogène, soit avec différentes souches pures exogènes. La concentration de la microflore est augmentée jusqu'à 10^7 CFU/g de matière sèche. Les différents taux de dégradation obtenus nous permettent de déduire que cette concentration est optimale pour une dégradation rapide des hydrocarbures. Selon Pontes et al., (2013), l'ajout de microorganismes autochtones capables de dégrader les hydrocarbures favorise une meilleure biodégradation. De plus, l'utilisation de microorganismes autochtones évite les problèmes écologiques et éthiques associés à l'addition de microorganismes exogènes ou de microorganismes génétiquement modifiés. Par ailleurs, Wrabel et Peckol (2000) affirment que ce sont les microorganismes autochtones qui ont le meilleur taux de réussite. La décision d'augmenter la concentration de la microflore spécifique a été motivée par le faible rendement obtenu lors du traitement par atténuation naturelle et par biostimulation. L'objectif était d'améliorer le processus de dégradation. Les résultats obtenus démontrent que l'efficacité de la bioremédiation dépend fortement de la concentration de la microflore spécifique dans les sédiments. L'augmentation de la concentration cellulaire d'un facteur 1000, par ajout du consortium a relevé significativement le taux de dégradation. L'ajout des souches pures exogènes telles que *R. erythropolis*, *B. subtilis* ou par *P. fluorescens*, a permis de comparer le potentiel de dégradation du consortium bactérien. Les résultats obtenus sont comparables avec ceux des souches exogènes pures (tableau II). Ce qui permet de dire qu'il n'est pas nécessaire d'apporter des souches exogènes pures pour dégrader les sédiments de mangroves.

VII.3.4 La microflore spécifique dans le traitement combinant bioaugmentation et biostimulation

Les résultats obtenus lors des traitements par bioaugmentation et la biostimulation peuvent encore être améliorés. Ces deux techniques peuvent avoir des limites, mais utilisées ensemble leurs bénéfices sont amplifiés, entraînant ainsi une dégradation plus rapide des hydrocarbures sans effets négatifs sur le milieu (Pontes et al., 2013). Le but de cette combinaison est de tirer tous les effets positifs des deux types de traitement et de relever le taux de dégradation des hydrocarbures.

Tableau III : Comparaison des résultats (exprimés en pourcentages de diesel dégradé) des différents traitements de bioremédiation impliquant le consortium endogène et d'autres souches pures exogènes

Traitements	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4	Semaine 5
Sédiments stériles (Consortium)	10.5±1.0	27.6±0.2	61.1±0.4	80.2±0.4	91.1±1.8
Sédiments stériles (<i>R. erythropolis</i>)	34.8±1.1	47.8±0.1	77.3±1.7	90.5±1.7	94.4±3.1
Sédiments stériles (<i>B. subtilis</i>)	27.7±1.5	37.4±1.0	63.0±2.2	74.7±1.1	91.0±1.8
Sédiments stériles (<i>P. fluorescens</i>)	16±0.2	35.4±4.3	44.7±1.1	58.1±0.4	71.2±0.9
Atténuation naturelle	3.6±3.1	8.9±4.2	18.1±7.1	22.2±3.9	29.1±1.1
Bioaugmentation (Consortium)	20.6±3.3	36.6±2.3	50.0±3.7	64.4±5.3	78.6±8.2
Biostimulation (with MSM)	9.8±9.3	30.5±6.2	38.2±4.3	51.4±5.3	65.4±6.9
Biostimulation (with compost)	34.1±3.1	45.3±7.4	49.1±5.5	65.6±6.2	71.7±7.4
Biostimulation (MSM + compost)	40.1±6.2	45.4±7.0	54.2±4.9	70.9±5.4	79.8±8.5
Bioaugmentation + Biostimulation (Consortium + Compost)	15.8±3.1	39.5±7.4	62.1±5.5	78.3±6.2	86.2±7.4
Bioaugmentation + Biostimulation (<i>R. erythropolis</i> + Compost)	40.1±3.1	43.2±3.3	60.7±5.2	82.1±2.4	92.0±1.0
Bioaugmentation + Biostimulation (<i>B. subtilis</i> + Compost)	32.3±2.0	38.5±4.3	56.5±1.8	76.0±2.3	86.7±6.1
Bioaugmentation + Biostimulation (<i>P. fluorescens</i> + Compost)	26.5±2.9	31.4±4.1	38.2±1.3	77.2±3.4	80.8±3.2
Bioaugmentation (Consortium)	20.6±3.3	36.6±2.3	50.0±3.7	64.4±5.3	78.6±8.2
Bioaugmentation (<i>R. erythropolis</i>)	31.3±2.7	44.1±1.8	49.4±6.6	61.6±4.3	84.8±2.6
Bioaugmentation (<i>B. subtilis</i>)	17.3±3.2	22.9±1.7	36.7±5.3	45.0±4.6	69.4±3.0
Bioaugmentation (<i>P. fluorescens</i>)	5.1±4.5	14.5±3.2	39.5±2.4	46.9±3.6	61.7±2.4
Bioaugmentation + Biostimulation (Consortium + MSM)	14.1±6.2	36.5±7.0	59.4±4.9	75.3±5.4	78.3±8.5
Bioaugmentation + Biostimulation (<i>R. erythropolis</i> + MSM)	36±3.8	39.8±3.6	64.0±3.2	80.2±5.4	90.6±5.1
Bioaugmentation + Biostimulation (<i>B. subtilis</i> + MSM)	30.6±4.0	35.3±3.1	53.6±2.3	80.2±1.0	84.4±5.0
Bioaugmentation + Biostimulation (<i>P. fluorescens</i> + MSM)	24.8±2.0	34.1±4.5	72.1±3.1	72.3±2.4	77.5±3.2

VII.4 Les effets des hydrocarbures sur la microflore spécifique : Analyse par cytométrie en flux

Les analyses par cytométrie en flux permettent de nouveaux développements dans le domaine de la biodégradation des hydrocarbures. Grâce à l'iodure de propidium (PI) utilisé comme marqueur, nous avons pu observer l'effet néfaste des hydrocarbures sur les microorganismes. A travers ces analyses, nous pouvons expliquer pourquoi la concentration cellulaire diminue suite à une pollution du milieu par les hydrocarbures. Nous pouvons également juger nécessaire d'augmenter la concentration cellulaire. Holguin et al., 2001, ont démontré qu'à la suite d'un déversement d'hydrocarbures entraînant une pollution des mangroves, il y a disparition de la microflore non spécifique (bactéries, champignons, algues et autres protozoaires). Cette microflore subit parfois de façon irréversible les effets toxiques et néfastes des produits pétroliers. Les analyses cytométriques nous ont permis de constater également qu'au début de chaque traitement une partie non négligeable de la microflore

spécifique meurt du fait du polluant. Les hydrocarbures présents dans le milieu sont cytotoxiques. Ils affectent négativement les fonctions microbiennes par destruction de leur membrane cytoplasmique entraînant une réduction de la biomasse microbienne (Semboung Lang et al., 2016a), de l'activité enzymatique du milieu et la réduction des populations de micro algues (Meghara, et al., 2000). Les hydrocarbures sont également mutagènes pour les microorganismes dans les mangroves (Horn, et al., 2004). Les cytogrammes obtenus à l'issue de nos analyses confirment l'aspect toxique et néfaste des hydrocarbures sur la biomasse cellulaire. Les cytogrammes présentent deux sous-populations différentes. Une sous-population qui se colore au PI et l'autre qui ne se colore pas. La sous-population qui se colore au PI présente une membrane cytoplasmique en très mauvaise état. Le PI ne traverse que la membrane cytoplasmique dont l'intégrité n'est pas bonne pour se fixer au niveau de l'ADN de la cellule. Cette sous-population est constituée des cellules mortes. L'autre sous-population ne se colore pas au PI. Elle renferme les cellules vivantes qui présentent une bonne intégrité membranaire. Ces cellules vivantes sont celles qui participent à la dégradation des hydrocarbures présents dans le milieu. Lorsque celle-ci est de faible concentration, la dégradation des hydrocarbures est plus lente. On peut ainsi suivre la concentration bactérienne dans les différents milieux au cours du traitement. Ces cytogrammes expliquent également les résultats obtenus au niveau des différents dénombrements effectués au cours de nos expériences. La présence des hydrocarbures induit un stress sur la biomasse cellulaire et crée un déséquilibre qui peut s'avérer néfaste pour l'ensemble de l'écosystème. De ce fait, un déséquilibre de l'écosystème de mangrove peut avoir un impact négatif sur le processus de biodégradation.

VII.5 Mise au point d'une technique de réhabilitation d'un écosystème de mangroves

VII.5.1 Connaissances du milieu

La réhabilitation d'un écosystème de mangroves a pour objectifs de restaurer la biodiversité et de la conserver et, de fournir un moyen de subsistance durable pour les populations riveraines (Field, 1997). La nécessité de réhabiliter un écosystème de mangrove intervient donc généralement lorsque la zone considérée a été altérée ou dégradée suite à une pollution par les hydrocarbures de façon naturelle ou anthropique. Cependant, avant de penser à la réhabilitation d'un écosystème de mangroves, il est important de comprendre sa structure et sa dynamique, son fonctionnement au niveau de ses différentes composantes que sont les sédiments, la flore et la faune et ainsi que dans son ensemble en tant qu'une seule entité fonctionnelle (Holguin et al., 2001). Pour réhabiliter, il est nécessaire d'effectuer un certain nombre d'analyses physicochimiques sur les sédiments, les eaux et déterminer le type d'hydrocarbures présents dans le milieu. Une fois ces analyses faites, les activités ou combinaisons d'activités de réhabilitation découleront directement afin d'atteindre les objectifs fixés. Dans les écosystèmes de mangrove cohabitent à l'état naturel une grande diversité de microorganismes capables de métaboliser les hydrocarbures en éléments moins complexes. La présence des

hydrocarbures dans un écosystème de mangrove favorise la prolifération des bactéries et autres champignons qui les dégradent à condition que les conditions du milieu soient propices.

La figure 2 ci-dessous qui présente le rôle spécifique de la communauté microbienne dans un écosystème de mangroves montre que la microflore est constituée principalement des bactéries et des champignons. Les microorganismes jouent plusieurs rôles très importants pour maintenir l'équilibre et assurer la survie des écosystèmes de mangroves. Il existe dans les mangroves, des bactéries responsables de la fixation de l'azote atmosphérique, de la solubilisation des phosphates, des bactéries sulfato-réductrices, des bactéries photosynthétiques anoxygéniques et des bactéries méthanogènes. Les expériences réalisées (voir chapitres 3, 4 et 5) montrent que certaines bactéries présentes dans les sédiments des mangroves sont capables de dégrader les hydrocarbures. Ces capacités de dégradation découlent de la présence naturelle et ubiquiste des hydrocarbures dans l'environnement (Wilcke, 2007). Il a été démontré que le processus majeur de minéralisation des hydrocarbures dans les sédiments des mangroves est la dégradation bactérienne en aérobie. Sous certaines conditions notamment aérobies, le consortium isolé des sédiments des mangroves est capable de croître en utilisant uniquement les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. Certaines études antérieures ont également démontré que sous certaines conditions, une dégradation anaérobie peut aussi se produire, notamment en présence des ions nitrates, ferreux ou sulfates qui assurent le rôle de réducteur dans la biodégradation anaérobie des HAP comme le naphthalène, le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène et le pyrène (Chang et al., 2002).

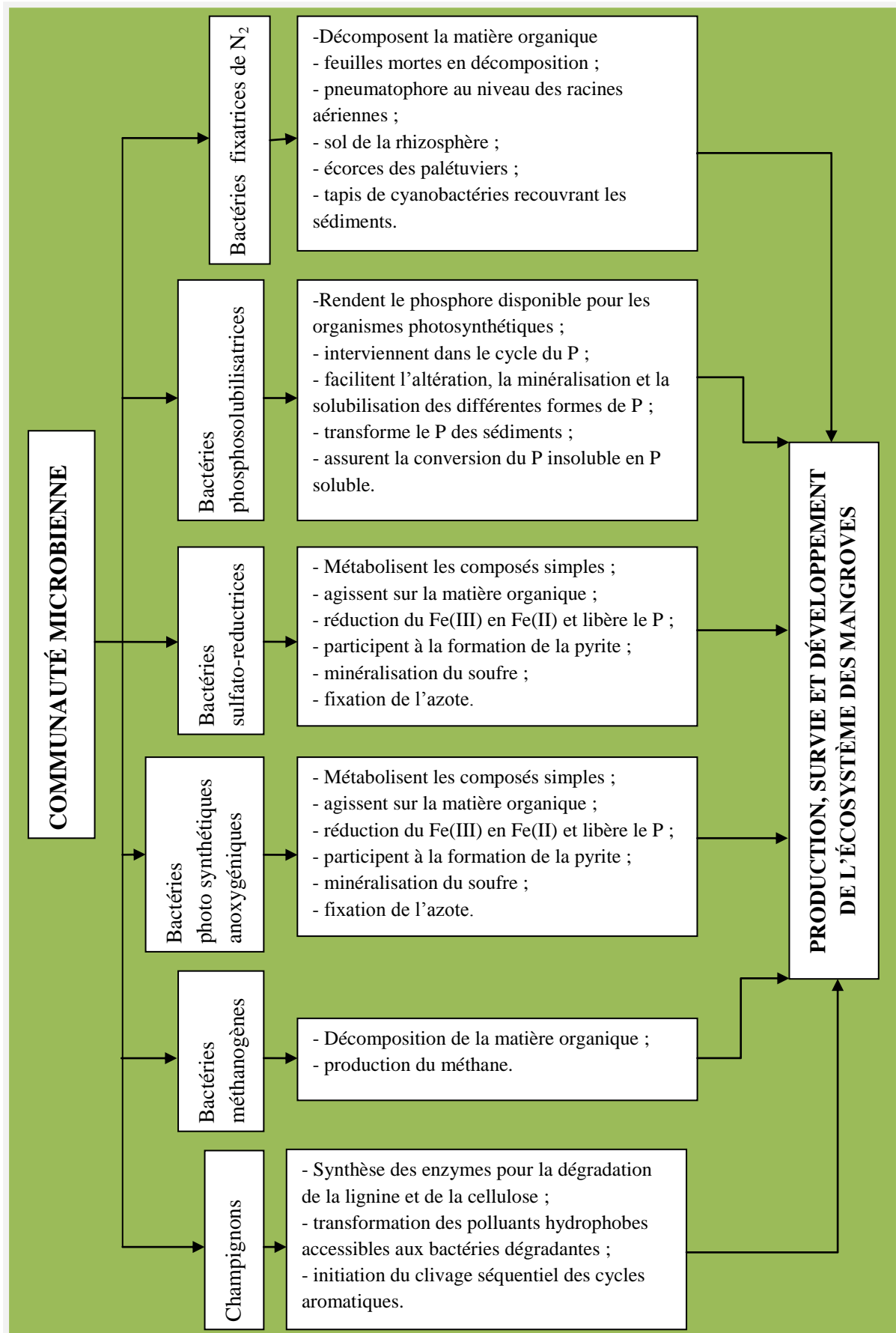


Figure 1 : Rôle spécifique de la microflore bactérienne dans le développement des mangroves

VII.5.2 Cas pratique de dégradation des sédiments pollués dans un écosystème de mangrove

Les résultats présentés dans le cadre de ce travail de recherche mettent en évidence différents aspects de la biodégradation des hydrocarbures dans les sédiments de mangroves. Ils mettent en relation, différentes techniques de traitement de sols pollués sous l'action des microorganismes. La dégradation est possible en utilisant la technique de biotertre qui consiste à disposer les sédiments en tas ou andain avant d'appliquer un traitement. Ce type de disposition des sédiments est parfaitement adapté aux zones de mangroves et admet deux techniques de traitement que sont la bioaugmentation et la biostimulation. Comme nous l'avons démontré au cours de cette thèse, ces deux approches sont complémentaires. La bioaugmentation va consister en un ensemencement du consortium bactérien endogène isolé des sédiments de mangroves. La biostimulation quand à elle va permettre d'injecter dans les sédiments contaminés les nutriments nécessaires à une forte croissance bactérienne. Cette combinaison permet en effet d'utiliser les capacités dégradatives du consortium bactérien en le stimulant pour faciliter la biodégradation. Dans le cadre de notre thèse, cette stimulation est faite à travers l'ajout d'une solution nutritive contenant de l'azote (N) et du phosphore (P). Le tableau III ci-dessus présente les différentes proportions de nutriments à injecter pour assurer une bonne dégradation. Cependant en ce qui concerne le consortium, une concentration de 10^7 CFU.g⁻¹ de matières sèches est nécessaire pour démarrer le processus de biodégradation. La figure ci-dessous montre le procédé de bioremédiation des sédiments de mangroves pollués.

VII.5.3 Intérêt de cette méthode

La bioremédiation est toujours apparue comme un processus de biodégradation à moindres coûts par rapport aux méthodes conventionnelles. Dans le cadre de la dépollution des mangroves, elle peut être applicable sur le site (bioremédiation *in situ*) ou à proximité immédiate (quand des installations *ex situ* sont nécessaires), ce qui réduit les coûts de transport et de manutention. Dans l'exemple proposé (figure 3), l'utilisation du consortium bactérien endogène au lieu des souches exogènes pures ou mixtes permet également de limiter les coûts. Les coûts relatifs à l'achat des souches exogènes par exemple. Les nutriments d'origine minérale sont proposés dans cet exemple. Cependant en tenant compte des moyens et de la zone où la dépollution a lieu, les éléments minéraux peuvent être remplacés par le compost. Ceci permet également de limiter les coûts. Le biotope est moins perturbé. L'élimination du polluant va être permanente puisque la concentration de la microflore spécifique est assez élevée. Ceci permet à l'écosystème de mangrove d'être apte à relancer un processus d'autoépuration en cas de nouvelle pollution du même genre. L'association des deux techniques de bioaugmentation (avec un bioréacteur pour la production de la microflore spécifique) et de biostimulation (avec un compresseur pour l'injection de la solution nutritive ou un composteur pour la fabrication du compost) que nous vous proposons est un atout de cette méthode.

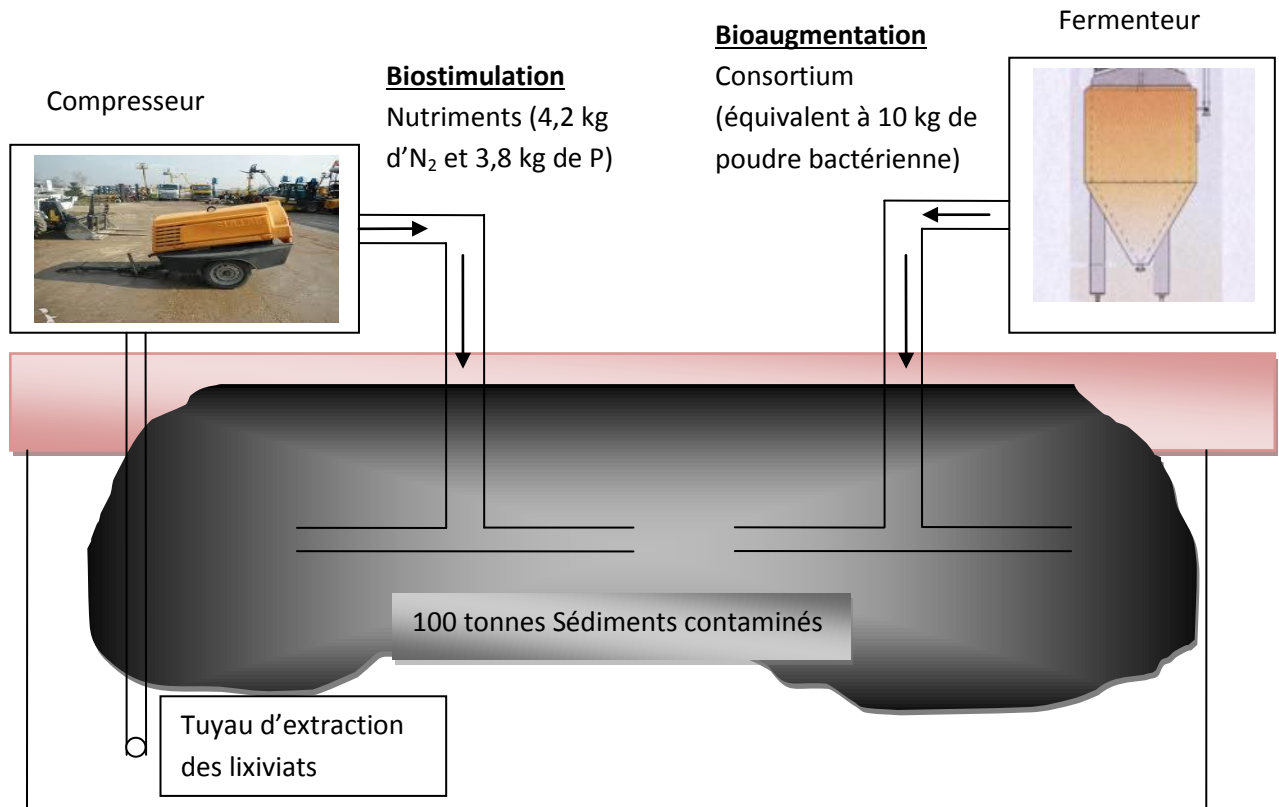


Figure 2 : Application d'un procédé de bioremédiation *in situ* dans un écosystème de mangroves polluées par les hydrocarbures

VII.5.4 Application pratique

Les sédiments à traiter renferme une concentration microbienne de 10^8 CFU.g⁻¹ de matière sèche. Cette concentration représente la microflore totale. La concentration de la microflore spécifique est de 0,1 % de la concentration de la microflore totale. Il a été démontré que cette concentration est insuffisante pour permettre une bonne dégradation des hydrocarbures. Selon Girard et al. (2005), le pourcentage de concentration acceptable de la microflore spécifique pour dégrader les hydrocarbures se situe entre 5 et 10 % par rapport à la microflore totale. Dans les différentes expériences réalisées, nous avons augmenté la concentration bactérienne de 10^5 à 10^7 CFU.g⁻¹ de matière sèche. Cette concentration représente 10 % de la concentration de la microflore totale. L'exemple proposé combine bioaugmentation et biostimulation. Dans nos expériences, l'ajout de l'azote et du phosphore stimule la croissance bactérienne et favorise un bon processus de dégradation des hydrocarbures par le consortium. 42 et 38 mg.L⁻¹ d'azote et de phosphore respectivement sont nécessaires pour stimuler la croissance bactérienne dans les sédiments pollués à 10 g.L⁻¹ d'hydrocarbures.

Dans la pratique, lorsque nous avons à dégrader par exemple 100 tonnes de terres polluées par 10 g.L⁻¹ d'hydrocarbures, les quantités suivantes de microorganismes et de nutriments sont nécessaires pour favoriser une bonne élimination du polluant.

- Nous avons notre consortium sous forme de poudre bactérienne dont la concentration est d'environ 10^{11} CFU.g⁻¹ de matière sèche. Pour 100 tonnes (100.000 kg) de terres il faut 10 kg de notre poudre bactérienne ;
- Azote : 42 mg.L⁻¹ (ou mg.kg⁻¹ de terre) donc 4,2 kg d'azote ;
- Phosphore : 38 mg.L⁻¹ (ou mg.kg⁻¹ de terre) donc 3,8 kg de phosphore.

L'ajout de ces éléments favorise un traitement efficace des sédiments pollués et limite les coûts de traitement par rapport aux méthodes physicochimiques.

References

- Aitken, M.D., Stringfellow, W.T., Nagel, R.D., Kazunga, C., Chen, S.H., (1998).** Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can. J. Microbiol.*, **44** : 743–752.
- Bridie, A.L., and Bos, J., (1971).** Biological degradation of mineral oil in seawater. *J. Inst. Pet. London* **57**: 270-277.
- Brito, E.M.S., Guyoneaud, R., Goñi-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., Crapez, M.A.C., Wasserman, J.C.A., Duran, R. (2006).** Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Res. Microbiol.*, **157**: 752–762.
- Brooijmans, R.J.W., Pastink, M.I., Siezen, R.J., (2009).** Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill cleanup crew. *Microbial Biotechnol.*, **2**(6), 587-594.
- Chang, B.V., Shiung, L.C., Yuan, S.Y., (2002).** Anaerobic biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon in soil. *Chemosphere*, **48**(7), 717-724.
- Colwell, R.R.K., Mills, A.L., Walker, J.D., Garcia-Tello, P., Campos, P.V.. (1978).** Microbial ecology studies of the Metula spill in the Straits of Magellan. *J. Fish. Res. Board Can.* **35**, 573-580.
- Das, N., and Chandran, P., (2011).** Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnol. Res Intern*, doi:10.4061/2011/941810
- Demaneche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M., Willison, J.C., Jouanneau, Y., (2004).** Identification and Functional Analysis of Two Aromatic-Ring-Hydroxylating Dioxygenases from a *Sphingomonas* Strain That Degrades Various Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**(11), 6714-6725.
- Ezekoye, C.C., Amakoromo, E.R., Ibiene1, A.A., (2015).** Bioremediation of Hydrocarbon Polluted Mangrove Swamp Soil from the Niger Delta using Organic and Inorganic Nutrients. *British Biotechnol. J.*, **6**(2), 62-78.
- Field C.D., (1997).** The restoration of mangrove ecosystems. *Intercoast Network*, Special Edition **1**, 11-12.
- Girard M.C., Walter J.C.R., Berthelin J., Morel J.L., (2005).** Sols et Environnement. *Sciences Sup* Edition Dunod 735pages.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P., (2009).** Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.*, **169**(1-3), 1-15.
- Holguin, G., Vazquez, P., Bashan, Y., (2001).** The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biol. Fertil. Soils*, **33**, 265–278.
- Horn, R.C., Rocha, J.A., Vargas, V.M., (2004).** Determination of sediment mutagenicity and cytotoxicity in an area subjected to petrochemical contamination. *Mutagenesis* **19**(6), 445–451.
- Kaye, J.P., Hart, S.C., (1997).** Competition for nitrogen between plants and soil microorganisms. *Trends ecol. Evolut.*, **12**(4), 139-143.

- Leahy, J.G., and Colwell, R.R., (1990).** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* **54**, 305-315.
- Megharaj, M., Singleton, I., Mc Clure, N.C., Naidu, R., (2000).** Influence of petroleum hydrocarbon contamination on microalgae and microbial activities in a long-term contaminated soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **38**(4), 439-445.
- Moreira, I.T.A., Oliveira, O.M.C., Triguís, J.A., Dos Santos, A.M.P., Queiroz, A.F.S., Martins, C.M.S., Silva, C.S. & Jesus, R.S. (2011).** Phytoremediation using *Rhizophora mangle* L. in mangrove sediments contaminated by persistent total petroleum hydrocarbons (TPH's). *Microchem. J.*, **29**, 376–382.
- Omokhagbor Adams, G., Tawari Fufeyin, P., Eruke Okoro, S., Ehinomen, I., (2015).** Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environ. Bioremediation & Biodegradation*, **3**(1), 28-39.
- Pontes, J., Mucha, A.P., Santos, H., Reis, I., Bordalo, A., Basto, M.C., Bernabeu, A., Almeida, C.M.R., (2013).** Potential of bioremediation for buried oil removal in beaches after an oil spill. *Mar. Pollut. Bull.*, **76**, 258-265.
- Ramsay, M.A., Swannell, R.P.J., Shipton, W.A., Duke, N.C., Hill, R.T., (2000).** Effect of bioremediation on the microbial community in oiled mangrove sediments. *Mar. Pollut. Bull.*, **41**(12), 413-419.
- Reisfeld, A., Rosenberg, E. and Gutnick, D., (1972).** Microbial degradation of oil: factors affecting oil dispersion in seawater by mixed and pure cultures. *Appl. Microbiol.*, **24**, 363-368.
- Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.P.J., Head, I.M., (2002).** Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68** : 5537–5548.
- Semboung Lang, F., Destain, J., Delvigne, F., Druart, P., Ongena, M., Thonart, P., (2016a).** Characterization and evaluation of the potential of a diesel-degrading bacterial consortium isolated from fresh mangrove sediment. *Water Air Soil Pollut*, 227:58. DOI 10.1007/s11270-016-2749-7.
- Semboung Lang, F., Destain, J., Delvigne, F., Druart, P., Ongena, M., Thonart, P., (2016b).** Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments under different strategies: natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation with *Rhodococcus erythropolis* T. 902.1. *Water Air Soil Pollut*, 227: 297. DOI 10.1007/s11270-016-2999-4.
- Semboung Lang, F., Tarayre, C., Destain, J., Delvigne, F., Druart, P., Ongena, M., Thonart, P., (2016c).** The effect of nutrients on the degradation of hydrocarbons in mangrove ecosystems by microorganisms. *Int. J. Environ. Res.*, **10**(4) : 583-592.
- Trzesicka-Mlynarz, D., Ward, O., (1995).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Can. J. Microbiol.*, **41**: 470–476.

- Wilcke W., (2007).** Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. *Geoderma*, **141**(3-4), 157-166.
- Wilson, S.C., Jones, K.C., (1993).** Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ. Pollut.*, **81**(3), 229-49.
- Wrabel, M.L., Peckol, P., (2000).** Effects of bioremediation on toxicity and chemical composition of no2 fuel oil: growth responses of the brown alga *Fucus vesiculosus*. *Marine Pollution Bulletin*, **40**(2), 135-139.
- Xu, J.G., Johnson, R.L., (1997).** Nitrogen dynamics in soils with different hydrocarbon contents planted to barley and field pea. *Can. J. Soil Sci.*, **77**(3), 453-458.
- Yu, S. H., Ke, L., Wong, Y. S., Tam, N. F. Y. (2005).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environ Int.*, **31**: 149–154.
- Yun, T., Yuan-rong, L., Tian-ling, Z., Li-zhe, C., Xiao-xing, C., Chong-ling, Y., (2008).** Contamination and potential biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in mangrove sediments of Xiamen, China. *Mar. pollut. Bull.*, **56**, 1184-1191.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

• CONCLUSION GENERALE

Les mangroves sont des écosystèmes particuliers renfermant une microflore particulière adaptée aux caractéristiques de leur habitat. L'efficacité de la biodégradation des hydrocarbures présents dans les sédiments des mangroves passe par une analyse physicochimique et microbiologique préalable des sédiments et de la microflore endogène. Cette analyse permet la compréhension d'un certain nombre de paramètres pouvant aider à la décision du choix de la technique à appliquer et des éléments indispensables à apporter. L'analyse du contaminant doit également être faite pour déterminer le type d'hydrocarbures et le degré de toxicité.

La bioremédiation est une méthode de dépollution par voie biologique qui se veut économique par rapport aux méthodes physicochimiques. Dans plusieurs études ayant trait à la bioremédiation des mangroves, les chercheurs ont le plus souvent utilisé les souches exogènes pures ou mixtes ou des souches génétiquement modifiées. Ceci permet d'éliminer de façon efficace les hydrocarbures dans les sédiments, mais entraîne des problèmes relatifs à l'éthique et à l'écologie des écosystèmes à dépolluer. Les souches exogènes sont étrangères au milieu et leur présence pourrait entraîner des changements au niveau du fonctionnement des mangroves.

Cette recherche nous a permis de mettre en évidence le potentiel de dégradation de la microflore spécifique et d'optimiser son activité au cours du processus de dégradation. Cette optimisation nous a amené à mettre au point deux techniques :

1- La production de la microflore spécifique endogène sous forme de consortium. Ce consortium nous permet d'ajuster la concentration de la microflore spécifique permettant de dégrader efficacement les hydrocarbures. Le développement d'une microflore spécifique sous forme de starter permet d'isoler un consortium qui s'adapte facilement au polluant. Ce starter dont la concentration est connue est intéressant car il est constitué de bactéries aptes à dégrader les hydrocarbures. Il permet d'inoculer dans le milieu pollué la concentration voulue (10^7 CFU.mg⁻¹ de matière sèche dans chacune de nos expériences).

2- L'importance des nutriments dans l'activité des bactéries. Les quantités d'azote et de phosphore nécessaires dans le processus de dégradation sont connues. Les nutriments répondent aux besoins essentiels efficaces pour la biodégradation à savoir fournir de l'énergie pour la croissance cellulaire, fournir des matériaux pour la synthèse des constituants cellulaires et enfin être utilisables comme accepteurs des électrons libérés au cours de la production d'énergie.

La combinaison de ces deux techniques nous a permis d'obtenir des taux de dégradation satisfaisants et comparables à ceux souvent obtenus lorsqu'on utilise des souches exogènes.

- **PERSPECTIVES**

Au terme de ces travaux, quelques pistes en guise de perspectives peuvent être énoncées à savoir :

- Les résultats de nos travaux en laboratoire montrent que la bioremédiation des écosystèmes de mangroves est possible à travers la combinaison des techniques de bioaugmentation et de biostimulation de bactéries actives autochtones. Cependant, il serait intéressant d'effectuer quelques essais sur milieu naturel pour confirmer ces résultats.

- Nous avons mené l'essentiel de nos expériences avec une solution nutritive dont les différents éléments sont des composés chimiques. La bioremédiation étant un procédé à coûts réduits, il serait intéressant de retrouver les nutriments comme l'azote et le phosphore dans les produits naturels. On pourrait travailler avec du compost produit soit à partir des copeaux de bois et de boues d'épuration, soit à partir de drêche de brasserie, de fiente de volaille ou de bouse de vache en tenant compte de leur concentration en azote et en phosphore.

- Lors de nos expériences, nous avons remarqué qu'une certaine microflore bien qu'active subissait les effets toxiques du polluant. Les analyses par cytométrie en flux ont montré à chaque fois deux sous-populations : une sous-population présentant une bonne intégrité membranaire et une autre présentant une détérioration de sa membrane plasmique qui se colore alors à l'iodure de propidium (PI). Il serait intéressant de pousser plus loin le processus de sélection de la microflore active en récupérant seulement la sous-population qui ne subit pas de stress du polluant. Avec cette sous-population, la biodégradation serait probablement meilleure.