

Tolérance aux métaux, aux hydrocarbures et aux antibiotiques de deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* neutrophiles isolées du gasoil

Augustin Aimé LEBONGUY¹, Joseph GOMA-TCHIMBAKALA^{1,2*} et Simon KELEKE³

¹ Institut National de Recherche en Sciences Exactes et Naturelles, Laboratoire de Microbiologie Appliquée et de Biologie Moléculaire, BP 2400 Brazzaville, Congo

² Université Marien Ngouabi, Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et de Foresterie, BP 69 Brazzaville, Congo

³ Institut National de Recherche en Sciences Exactes et Naturelles, URR Microbiologie, BP 1286 Pointe-Noire, Congo

* Correspondance, courriel : goma.tchimbakala@gmail.com

Résumé

L'objectif de cette étude est d'évaluer la multi-résistance aux hydrocarbures, aux métaux et aux antibiotiques des souches de *Pseudomonas aeruginosa* G2 et G3 isolées du gasoil. L'effet du pH et de la concentration en NaCl sur la croissance des deux souches en milieu liquide a été préalablement étudié. Les résultats montrent que les deux souches sont neutrophiles. La souche *P. aeruginosa* G2 tolère jusqu'à 40 g/L de NaCl tandis que la souche G3 tolère moins de 20 g/L. L'étude de la tolérance aux hydrocarbures par les méthodes de diffusion sur gélose et de spot montre que les deux souches tolèrent 100% de gasoil et d'huile SAE 90. Cependant, l'essence, le toluène et le xylène inhibent la croissance de *P. aeruginosa* G3 tandis que seul le xylène inhibe la croissance de *P. aeruginosa* G2. Les deux souches de *P. aeruginosa* G2 et G3 résistent, respectivement aux CuCl₂, SnCl₂, NiCl₂, CoCl₂, ZnSO₄ et SnCl₂, ZnSO₄, FeSO₄. Enfin, l'antibiogramme montre que les deux souches sont résistantes à l'ampicilline et la spiramycine mais sensibles au chloramphénicol à 0,5 %. Seule la souche *P. aeruginosa* G2 résiste à la kanamycine. Ainsi, cette étude montre que les deux souches de *P. aeruginosa* sont multi-résistantes aux hydrocarbures, aux métaux et aux antibiotiques. Ces caractéristiques sont très importantes dans leur utilisation potentielle dans la bioremédiation des sites co-contaminés par ces polluants.

Mots-clés : *Pseudomonas aeruginosa*, tolérance, multirésistance, polluants.

Abstract

Metals, hydrocarbons, and antibiotics tolerance of two neutrophilic *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from diesel oil

The objective of this study is to evaluate the multi-resistance to hydrocarbons, metals and antibiotics of *Pseudomonas aeruginosa* G2 and G3 strains isolated from diesel oil. pH and NaCl concentration effect on growth of both strains in liquid medium was previously studied. Results show that both strains are neutrophils. *P. aeruginosa* G2 strain tolerates up to 40 g / L NaCl while G3 strain tolerates less than 20 g / L. Hydrocarbon tolerance study by spot and agar diffusion methods shows that both strains tolerate 100 % diesel and SAE 90 oil. However, gasoline, toluene and xylene inhibit the growth of *P. aeruginosa* G3 while only xylene inhibits the growth of *P. aeruginosa* G2. Both *P. aeruginosa* G2 and G3 strains are resistant to CuCl₂, SnCl₂, NiCl₂, CoCl₂, ZnSO₄ and SnCl₂, ZnSO₄, FeSO₄, respectively. Finally, antibiotic resistance study shows

that both strains are resistant to ampicillin and spiramycin but sensitive to chloramphenicol at 0.5 ‰. Only *P. aeruginosa* G2 strain is resistant to kanamycin. Thus, this study shows that both strains of *P. aeruginosa* are multi-resistant to hydrocarbons, metals and antibiotics. These characteristics are very important in their potential use in bioremediation of co-contaminated sites by these pollutants.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, tolerance, multi-resistance, pollutants.

1. Introduction

De nouvelles niches écologiques sont apparues suite aux rejets dans l'environnement de déchets industriels toxiques constitués souvent de mélange de métaux et de composés organiques [1]. Ces polluants constituent un sérieux problème environnemental. Selon la liste nationale prioritaire de l'agence américaine de protection de l'environnement (EPA), 40 % des sites contenant de déchets dangereux sont co-contaminés par les polluants organiques et les métaux lourds. La remédiation de ces sites pose un problème complexe en raison de la nature mélangée des contaminants [2]. Dans les sols agricoles et industriels, par exemple, les niveaux sensiblement élevés de contaminants organiques et de métaux lourds rendent difficile leur restauration [3, 4]. Ceci à cause de l'effet synergique de la co-contamination à l'origine de la cytotoxicité [1, 5]. En effet, les métaux lourds peuvent inhiber la biodégradation des composés organiques par interaction avec les enzymes directement impliquées dans la biodégradation ou intervenant dans le métabolisme général [5]. En dépit de ce constat, il existe des méthodes physico-chimiques et biologiques pour traiter ces contaminants. Les approches physiques et chimiques sont capables d'éliminer un large spectre de contaminants. Malheureusement, elles sont consommatrices d'énorme quantité d'énergie et nécessitent l'utilisation de composés minéraux qui sont aussi polluants [6]. En outre, les traitements physico-chimiques tels que l'incinération transfèrent les polluants d'un compartiment environnemental à un autre sans les dégrader [6]. D'où l'intérêt porté aux méthodes biologiques ou bioremédiation qui offre une possibilité de détruire le contaminant ou de le rendre moins toxique en utilisant l'activité biologique [5, 6]. Les technologies utilisées peuvent aboutir à une minéralisation complète du contaminant organique.

Elles sont plus rentables, moins toxiques, compatibles avec l'environnement et peuvent être applicable sur de vastes zones [5, 6]. La République du Congo, comme la plupart des pays producteurs du pétrole, est confrontée au problème de pollution de l'environnement par les hydrocarbures. En effet, de nappes de pétrole et/ou de bitume échouent périodiquement sur la côte atlantique à Pointe-Noire, ville pétrolière du pays. Dans cette ville, plusieurs sites pollués par les hydrocarbures sont observés dans les zones où se développe l'industrie pétrolière. La dépollution de ces sites par bioremédiation nécessite la sélection des microorganismes hydrocarbonoclastes autochtones ou allochtones répondant aux conditions tropicales. En outre, il existe dans l'environnement des microorganismes capables d'utiliser les hydrocarbures comme seule source de carbone et d'énergie [6 - 8]. Ces microorganismes ont acquis la capacité de vivre dans des milieux ayant des concentrations toxiques d'hydrocarbures, de solvant organiques, de métaux lourds et d'antibiotiques [3, 9, 11]. Par ailleurs, ces microorganismes ont développé une multi-résistance à la présence de ces composés dans leur environnement [3, 6, 11]. Dans nos précédentes études, deux souches de *P. aeruginosa* émulsionnant les produits pétroliers ont été isolées du gazoil. Ces deux souches ont été capables de croître en présence de 2 % du gazoil et d'huile SAE 90 comme seule source de carbone [12]. Le but du programme dans lequel s'insère la présente étude est de constituer une banque de microorganismes présentant des résistances multiples et capables d'utiliser les hydrocarbures comme source de carbone afin de les utiliser dans la bioremédiation des sites pollués. L'objectif est d'évaluer au laboratoire les effets du pH et de la salinité sur la croissance des deux souches de *P. aeruginosa* G2 et G3 ainsi que leur tolérance aux hydrocarbures, aux antibiotiques et aux métaux lourds.

2. Matériel et méthodes

2-1. Matériel

2-1-1. Souches microbiennes

Les deux souches de *P. aeruginosa* G2 et G3 utilisées dans ce travail ont été isolées du gasoil. Elles ont été identifiées phénotypiquement et par séquençage du gène de l'ARNr 16S comme étant étroitement apparentés à *P. aeruginosa* strain GIM 32 et *P. aeruginosa* strain NV2, avec une similarité de 97 % [15].

2-1-2. Milieux et conditions de culture

Dans la présente étude l'effet du pH sur la croissance des souches a été étudié sur un milieu BH (bouillon de Bushnell-Haas, Difco France) supplémenté de 2,5 g de peptone de caséine et 1,2g d'extrait de levure. Les cultures ont été incubés au bain marie (Kottermann Labortechnik, Germany) à 30°C pendant 24 H sous agitation. Par contre l'effet du NaCl sur la croissance des deux souches a été étudié sur bouillon nutritif supplémenté de NaCl à différentes concentrations. Le milieu PCA (Plate Count Agar, Flukachemie Spain) a été utilisé pour les études de la tolérance en milieu solide et la conservation des souches. Les ensemencements ont été faits en surface et les incubations à 37°C pendant 24 à 72 H. Le test de résistance aux antibiotiques a été effectué sur le milieu de Mueller-Hinton (MH). Ce milieu est composé de 2g d'extrait de levure, 17,5 g de peptone de caséine, 1,5 g d'amidon de maïs, 17 g d'agar, 1000 ml d'eau distillée (pH = 7,4). L'ensemencement a été fait à la surface de la gélose et l'incubation à 37°C pendant 24 H. Les hydrocarbures testés dans cette étude sont : le toluène, le xylène fournis gracieusement par la société K-Chimie, le gasoil, l'essence et l'huile SAE 90 achetés dans les commerces de la ville de Pointe-Noire. Ces hydrocarbures conservés dans des flacons en verre sont stérilisés par autoclavage à 121°C pendant 20 min avant expérimentation.

2-2. Méthodes

2-2-1. Effet de la variation du pH sur la croissance des souches

Une colonie de 24H de souche purifiée sur milieu PCA est ensemencée dans 20 mL de bouillon BH contenu dans un erlenmeyer de 100 mL supplémenté de la peptone (0,25g/100mL) et de l'extrait de levure (0,12 g/100 mL). Le mélange est incubé à 37°C pendant 24H dans le bain Marie sous agitation. Ensuite, 0,5 mL de cette culture de 24H est inoculé dans des flacons de 250 mL contenant 50 ml du bouillon précédent dont les pH ont été ajustés à 3, 5, 7,5, 9 et 11 (avec l'acide chlorhydrique à 0,5N et l'hydroxyde de potassium à 1N). Les flacons ainsi ensemencés sont incubés pendant 24H dans les mêmes conditions que précédemment. Et la densité optique de la culture est mesurée à 547 nm en utilisant le spectrophotomètre Genesys 20 (Thermo Scientific).

2-2-2. Effet de la variation la concentration en NaCl sur la croissance les souches

Une culture d'une nuit de la souche purifiée (100 µL) sur milieu PCA est inoculée dans le bouillon nutritif en tube (10 mL) supplémenté de NaCl à différentes concentration (0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 et 65.5 g/L). Les tubes de culture ainsi ensemencés ont été incubés à 37°C pendant 24 H et la densité optique a été mesurée à 547 nm. L'expérience a été réalisée en triple.

2-2-3. Tolérance aux hydrocarbures

2-2-3-1. Méthode de diffusion en gélose

Dans cette méthode, le milieu PCA coulé en boîte de pétri est perforé au centre à l'aide d'un emporte-pièce stérile afin de créer un puits de 1 cm de diamètre et 4 mm de profondeur. Trois boîtes ont été préparées par type d'hydrocarbure et par souche. Dans chaque boîte de pétri un volume de 100 µL de la culture microbienne de 24 heures est étalé sur la surface de la gélose. Les puits sont remplis séparément soit de 200 µL de xylène, de toluène, de gasoil, d'essence soit encore de l'huile SAE 90. Les boîtes de culture ainsiensemencées sont incubées à 37°C pendant 24 heures. L'absence de tolérance à l'hydrocarbure est constatée par l'apparition d'une zone d'inhibition marquée par un halo autour du puits.

2-2-3-2. Méthode de spot

Pour évaluer l'effet direct du contact des hydrocarbures testés sur chaque souche de *Pseudomonas aeruginosa*, 50 µL d'inoculum sont déposés sur le milieu gélosé PCA. Le milieu est incubé pendant 30 minutes à 37°C pour permettre à la culture d'adhérer à la gélose. Ensuite, les boîtes sont transférées à température ambiante, sous hotte à flux laminaire pour être ventilées. Un volume de 4 mL d'hydrocarbure à tester est alors étalé sur la surface du milieu gélosé. Après 8 heures de contact, l'hydrocarbure est aspiré à l'aide d'une micropipette et les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 H [12]. La tolérance est marquée par la croissance des bactéries. Par contre l'absence de croissance de la bactérie traduit une inhibition.

2-2-4. Tolérance aux métaux lourds

La tolérance aux métaux a été réalisée selon la méthode proposée par [13]. Brièvement, 100 µL d'une culture d'une nuit de la souche purifiée sont étalés sur la surface du milieu PCA en boîte de pétri. Le milieu PCA est perforé au centre à l'aide d'un emporte-pièce stérile afin de créer un puits de 1 cm de diamètre et 4 mm de profondeur. Trois boîtes sont été préparées par type de solution métallique et par souche. Les puits sont remplis à chaque fois par la solution métallique appropriée ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, ZnSO_4 , ou $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) à une concentration de 20 mM. La culture est incubée à 37°C pendant 48 à 72 heures dans une étuve thermostatée (type BE 500; Memmert, Germany). Après incubation les halos autour des puits sont mesurés.

2-2-5. Résistance aux antibiotiques

L'étude de la tolérance aux antibiotiques a été réalisée selon le protocole suivant : une suspension d'opacité égale à 0.5 de McFarland (BioMérieux, France) est réalisée par ajout goutte à goutte, dans 2.5 mL d'eau physiologique (à 0.9 % de NaCl), d'une suspension dense préparée en prélevant, avec un écouvillon, toutes les bactéries d'une culture pure de 24H sur milieu PCA. En suite cette suspension diluée au 1/10 est étalée sur la surface du milieu Mueller-Hinton (MH) coulé en boîtes de pétri (Société Française de Microbiologie, 2013). Enfin, les disques imbibés d'hydrocarbures, consignés dans le tableau 1, sont déposés aseptiquement sur la surface de la gélose et les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 H. Pour le chloramphénicol, une solution à 0.5‰ de chloramphénicol dans de l'eau distillée stérile est préparée puis 50 µL (25µg) est déposé au milieu du milieu MHensemencé comme précédemment. Les boîtes sont laissées ouvertes sous hotte à flux laminaire jusqu'à séchage, puis incubées à 37°C pendant 24 H. Le **Tableau 1** présente les différents groupes d'antibiotiques testés et leur concentration.

Tableau 1 : Présentation des différents groupes d'antibiotiques testés et leur concentration

Famille	Antibiotique utilisé	Code	Quantité
β-lactamine	Ampicilline	Am	10 UI
Aminoside	Kanamycine	K	5 UI
Macrolide	spyramycine	SP	100 UI
Phénicoles	Chloramphénicol	C	25 µg

UI = unité internationale (correspond à 0.0006 g)

2-2-6. Analyse phylogénétique des deux souches de *P. aeruginosa*

L'arbre phylogénétique est construit en utilisant la méthode de maximum de vraisemblance (Maximum likelihood ou ML). Les séquences de l'ARNr 16S des souches de *P. aeruginosa* G3 et G2 sont utilisées pour déterminer leur proximité phylogénétique avec les différentes espèces des différents groupes de *Pseudomonas* sp tel que défini par le Bergey's manual of systematic bacteriology (2nd ed.) dont les séquences sont contenues dans la base des séquences nucléotidiques GenBank. La méthode ML est réalisée en utilisant l'application "advanced" avec option step by step du site <http://www.phylogeny.fr> [14]. Les séquences sont alignées avec le programme MUCLE 3.7. Ensuite, les alignements obtenus sont affinés avec le programme Gblocks 0.91b qui élimine les positions faiblement alignées ainsi que les régions divergentes. La phylogénie est réalisée avec le programme PhyML 3.0 qui utilise la méthode ML. Pour évaluer la robustesse des arbres phylogénétiques un test statistique "Bootstrap" avec 100 réplifications est intégré dans PhyML. Enfin, la construction et l'édition de l'arbre phylogénétique sont réalisées avec le programme treeDyn (V198.3).

3. Résultats

3-1. Effet de la variation du pH sur la croissance des deux souches

Les résultats de la **Figure 1** montrent, après 24H d'incubation, que les deux souches *P. aeruginosa* G2 et *P. aeruginosa* G3 croissent dans un intervalle de pH compris entre 5 et 9 avec un optimum de croissance à pH 7,5. Les densités optiques correspondantes sont de 1,05 et 0,85 respectivement. En deçà de pH 3 et au-delà de pH 9, la croissance bactérienne est presque nulle.

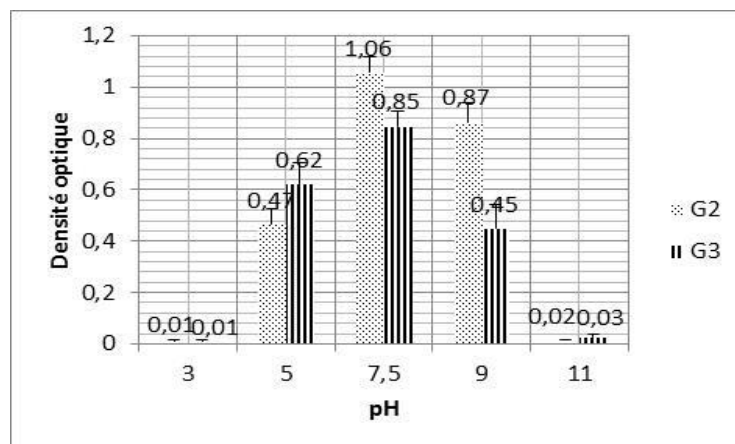


Figure 1 : Croissance de *P. aeruginosa* G2 et G3 en fonction du pH après 24H d'incubation

3-2. Effet de la concentration en chlorure de sodium (NaCl) sur la croissance des deux souches

L'influence de la variation de la concentration en NaCl sur la croissance des souches de *P. aeruginosa* G2 et G3 est montrée sur la **Figure 2**. La souche de *P.aeruginosa* G3 a une bonne croissance, par rapport aux témoins, à 10 et 20 g de NaCl /L, avec un optimum à 10 g/L. Par contre, à partir de 20 g/L de NaCl dans le milieu la croissance décroît et devient nulle à 65,5g/L. La souche *P. aeruginosa* G2 croît mieux dans le milieu de culture sans NaCl que dans ceux supplémentés en NaCl à différentes concentrations. La souche *P. aeruginosa* G2 croît dans une gamme de concentration en NaCl plus large (10 à 40g/L) que celle de *P. aeruginosa* G3.

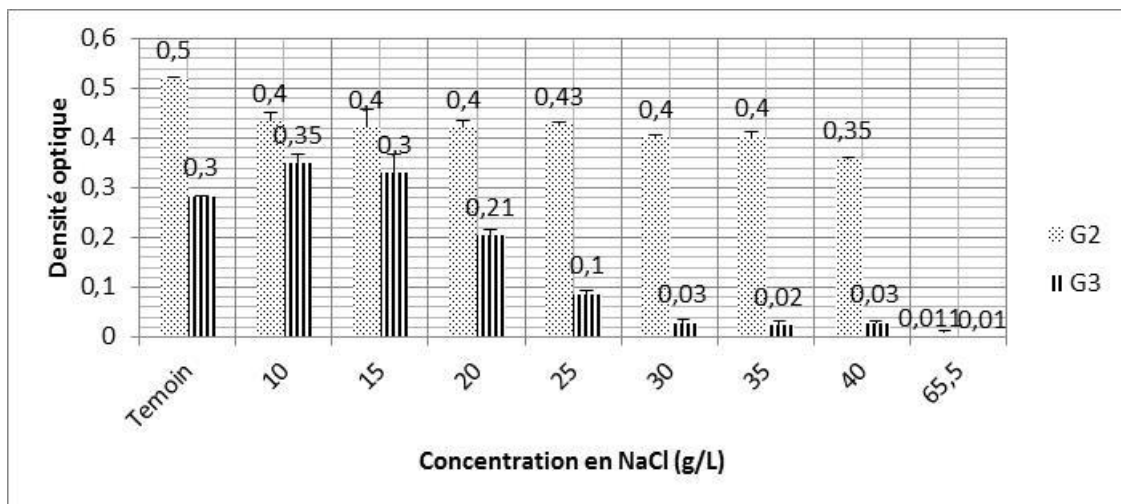


Figure 2 : Effet de la concentration en NaCl sur la croissance des deux souches de *P. aeruginosa* G2 et G3

3-3. Tolérance aux hydrocarbures

Les **Tableaux 2 et 3** montrent le profil de tolérance au xylène, toluène, gasoil, essence et à l'huile à moteur SAE 90, des deux souches de *P. aeruginosa*, respectivement par la méthode de diffusion sur gélose et de spot. La souche *P. aeruginosa* G2 a toléré 100 % de gasoil, d'huile SAE 90, d'essence et de toluène (**Figure 3a**). Par contre avec le xylène il y a formation d'une zone d'inhibition de croissance autour du puits (**Figure 3b**). Avec la méthode de spot, seules quelques colonies sont visibles après 8 heures de contact avec le xylène. La souche *P. aeruginosa* G3 tolère 100 % de gasoil, d'huile SAE mais ne donne aucune croissance visible avec l'essence, le toluène et le xylène quel que soit la méthode utilisée.

Tableau 2 : Profil de tolérance aux 5 hydrocarbures (xylène, toluène, gasoil, essence et huile SAE 90) des deux souches de *Pseudomonas aeruginosa* par la méthode de diffusion en gélose

	Xylène	Toluène	Gasoil	Essence	Huile SAE90
G2	-(1.7)	+	+	+	+
G3	-	-	+	-	+

+ = croissance d'une masse microbienne jusqu'au niveau du puits ou présence de quelques colonies isolées et éparpillées sur toute la surface de la gélose, - = inhibition de croissance ou formation d'une zone d'inhibition de croissance autour du puits, (x) = diamètre en cm de la zone inhibition de croissance

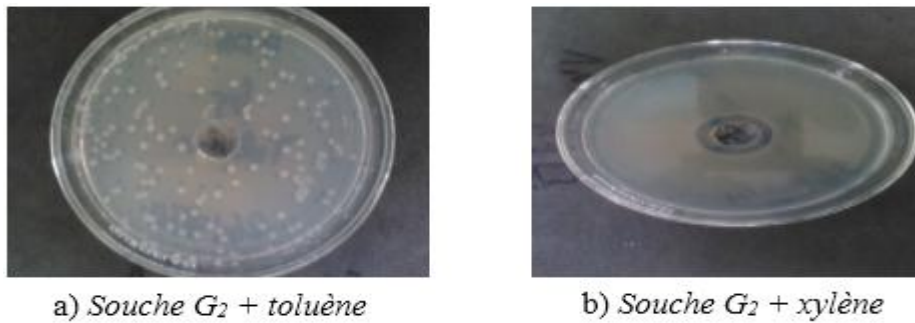


Figure 3 : Tolérance de la souche de *Pseudomonas aeruginosa* G₂ au toluène et xylène

Tableau 3 : Profil de tolérance aux cinq hydrocarbures (xylène, toluène, gasoil, essence et huile SAE 90) des deux souches *P. aeruginosa* par la méthode de spot.

	Xylène	Toluène	Gasoil	Essence	Huile SAE 90
G2	±	+	+	+	+
G3	-	-	+	-	+

où, + = présence de tache indiquant une croissance ; - = absence de tache indiquant une inhibition de croissance ; ± = absence de tache mais présence de quelques colonies.

3-4. Tolérance aux métaux

Le **Tableau 4** montre le profil de résistance aux métaux des deux souches de *P. aeruginosa*. La souche *P. aeruginosa* G2 peut croître en présence de cinq métaux (CuCl₂, SnCl₂, NiCl₂, CoCl₂ et ZnSO₄). Par contre, La souche *Pseudomonas aeruginosa* G3, ne tolère la présence que de trois métaux (SnCl₂, ZnSO₄, FeSO₄). Aucune des deux souches n'a été capable de croître en présence du mercure. La **Figure 4** illustre les résultats obtenus.

Tableau 4 : Profil de résistance des souches de *P. aeruginosa* G2 et G3 aux métaux lourds après 48 à 72 heures d'incubation sur milieu gélose PCA

	CuCl ₂	SnCl ₂	HgCl ₂	NiCl ₂	CoCl ₂	AlCl ₃	ZnSO ₄	FeSO ₄
G2	+	+	-	+	+	-	+	-
G3	-	+	-	-	-	-	+	+

où, + = croissance jusqu'au niveau du puits ou présence des colonies dans la zone d'inhibition. ; - = inhibition de croissance autour du puits inoculé ou absence totale de croissance.

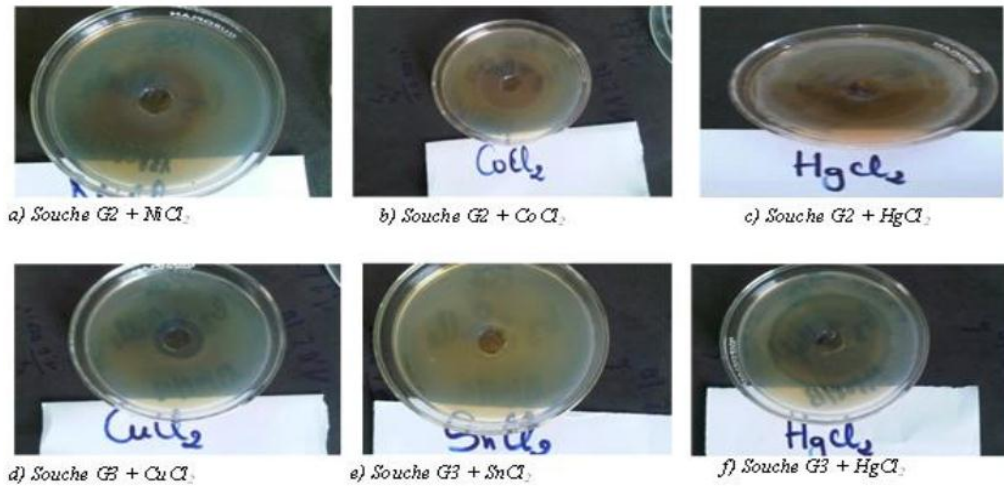


Figure 4 : Tolérance aux métaux des souches de *P. aeruginosa* G₂, (a) en présence du NiCl₂, (b) en présence du CoCl₂, (c) en présence du HgCl₂ et *P. aeruginosa* G₃ (d) en présence du CuCl₂, (e) en présence du SnCl₂, (f) en présence du HgCl₂

3-5. Résistance aux antibiotiques

Le profil de résistance aux antibiotiques des deux souches de *P. aeruginosa* est consigné dans le **Tableau 5**. La souche *P. aeruginosa* G₂ montre une résistance à trois antibiotiques (Ampicilline, Spiramycine, Kanamycine) (**Figure 5a**) tandis que la souche *P. aeruginosa* G₃ est résistante seulement à l'Ampicilline et la Spiramycine (**Figure 5a**). Cependant, les deux souches sont incapables de croître en présence du chloramphénicol à 0,5 ‰, concentration généralement utilisée pour inhiber la croissance des bactéries gram - et + au cours de l'isolement des champignons.

Tableau 5 : Profil de résistance aux antibiotiques des deux souches de *P. aeruginosa* G₂ et G₃

	Ampicilline (Am)	Kanamycine (K)	Spiramycine (Spy)	Chloramphénicol (C)
G ₂	+	+	+	-
G ₃	+	-(1,5)	+	-

- = Inhibition de croissance, + = croissance ; (x) = diamètre en cm de la zone inhibition de croissance



Figure 5 : Antibiogramme des deux souches de *P. aeruginosa* G₂ (a) et G₃ (b)

3-6. Analyse phylogénétique

La **Figure 6** montre la position des souches *P. aeruginosa* G₂ et G₃ dans le genre *Pseudomonas*. L'arbre a été construit avec 63 séquences de différentes espèces du genre *Pseudomonas*. La position des deux souches

est différente. En effet, la séquence de la souche *P. aeruginosa* G3 s'éloigne considérablement du clade des *P. aeruginosa*. Elle forme un cluster avec les espèces de *P. chlororaphis* et *P. saponiphila*. Cependant ce cluster a été obtenu avec une valeur très faible de bootstap soit 8 %. Par contre, la souche *P. aeruginosa* G2 forme un cluster avec les deux espèces de *P. aeruginosa* sélectionnées en l'occurrence *P. aeruginosa* strain GIM 32 et *Pseudomonas aeruginosa* strain NV2 avec un bootstap de 100 %. Ainsi, sa position dans l'arbre phylogénétique confirme son appartenance au groupe de *P. aeruginosa*.

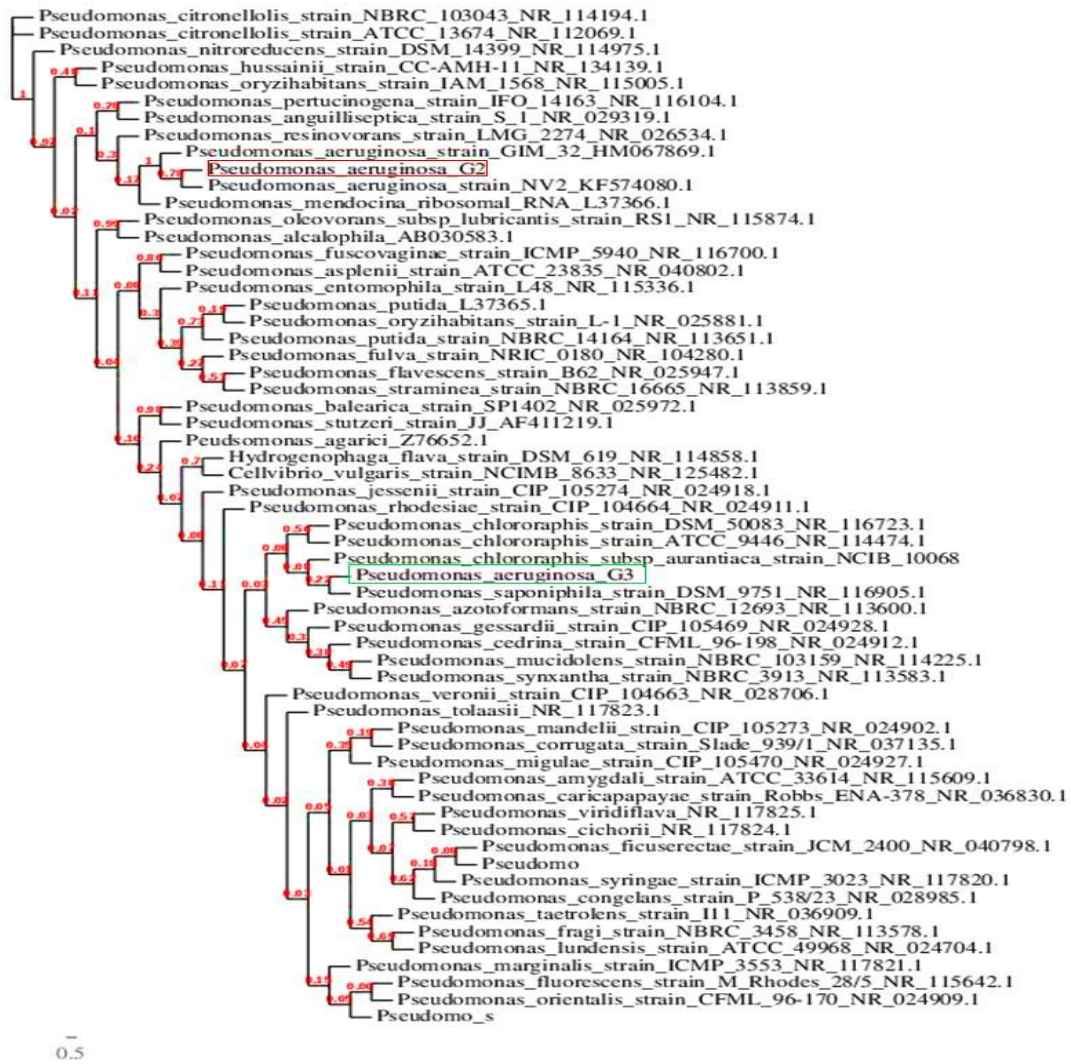


Figure 6 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences de l'ARNr 16S montrant la position des souches de *Pseudomonas aeruginosa* G2 et G3 par rapport aux différentes espèces des groupes de *Pseudomonas* (longueur des branches proportionnelle au nombre de substitutions par site)

4. Discussion

Les milieux pollués par les hydrocarbures sont souvent co-contaminés par d'autres polluants tels que les métaux lourds et les antibiotiques [6, 15]. La bioremédiation de ces sites nécessite l'utilisation des microorganismes multi restants. Deux souches de *P. aeruginosa* G2 et G3, émulsionnantes les produits pétroliers et capables de croître en présence du gasoil et de l'huile SAE 90, ont été isolées du gasoil lors de précédentes études [12]. Dans l'optique de leur potentielle utilisation dans la remédiation des sites co-

contaminés, les effets du pH et de la salinité sur la croissance, la tolérance aux hydrocarbures, aux métaux et aux antibiotiques de deux souches ont été évalués. L'intervalle de pH de croissance des souches est compris entre 5 et 9 avec un optimum à pH 7. Cet optimum place ces souches dans la catégorie des bactéries neutrophiles et dans l'intervalle de pH requis pour la réalisation de la bioremédiation [16, 17]. Les concentrations en NaCl qui permettent la croissance des deux souches (0-20g/L pour *P. aeruginosa* G2 et 0-40 g/L pour *P. aeruginosa* G3) sont conformes aux études antérieures qui ont montré que *P. aeruginosa* est capable de croître en présence de fortes doses de NaCl [18]. L'étude de la tolérance aux hydrocarbures montre que le xylène et le toluène formés chacun par un seul type de molécule aromatique inhibent la croissance des deux souches de *P. aeruginosa*. La souche de *P. aeruginosa* G2 croît en présence des produits pétroliers formés d'un mélange de composés (essence, gasoil et l'huile SAE 90). Cependant, la souche *P. aeruginosa* G3 réagit de la même manière sauf dans le cas de l'essence. En effet, ce produit inhibe la croissance de *P. aeruginosa* G3. Cela pourrait s'expliquer par la présence de composés aromatiques en forte proportion qui agissent sur la croissance comme dans le cas du xylène et du toluène. [19] rapportent que les produits pétroliers raffinés sont plus toxiques pour les microorganismes que le pétrole brut. Ces auteurs indiquent que les hydrocarbures volatiles (benzène et xylène) sont plus toxiques que les alcanes à haut poids moléculaires.

Par ailleurs, la tolérance aux hydrocarbures dépend de l'isolat et de la composition du produit pétrolier utilisé. En effet, plusieurs espèces de différents genres bactériens y compris les espèces de *P. aeruginosa* sont tolérantes aux hydrocarbures [20]. Les mécanismes mis en jeu par ces bactéries sont l'isomérisation des acides gras Cis de la membrane plasmique en acides gras Trans, la modification des phospholipides du groupe de tête, la modification des lipopolysaccharides, la variation de l'hydrophobicité de la surface cellulaire, la modification du taux du turnover des composants de la membrane et l'expulsion des composés toxiques par les pompes à efflux [19, 20]. Les souches de *P. aeruginosa* ont une résistance naturelle aux aminopenicillines (ampicillines), aux macrolides (spiramycines), aux phénicols (chloramphénicols) et aux aminosides (kanamycine) [21]. L'étude de la résistance à ces quatre antibiotiques montre que la souche *P. aeruginosa* G2 a perdu sa résistance uniquement au chloramphénicol tandis que *P. aeruginosa* G3 a perdu sa résistance naturelle au chloramphénicol et à la Kanamycine. Ces résultats sont similaires à ceux de Gad et al. [22]. Ces auteurs montrent que 8 % des souches de *P. aeruginosa* isolées sont sensibles au chloramphénicol. Les souches de *P. aeruginosa* peuvent perdre leur résistance naturelle par transfert d'intégrons portant le gène de résistance d'un plasmide à un autre [23]. Les intégrons sont des systèmes génétiques de capture, d'incorporation et de transformation en gènes fonctionnels, de fenêtres de lecture ouverte [24].

Ils participent donc à la diffusion de la résistance et pour cela sont susceptibles d'acquérir ou de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques. Par ailleurs, [25] montrent également que la perte d'un des composants de l'opéron à efflux mexC-mexD-oprJ chez *P. aeruginosa* restaurait la susceptibilité à l'égard des antibiotiques tels que le chloramphénicol, l'ofloxacine et la gentamycine. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques les plus fréquents répertoriés sont l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, la modification ou le remplacement de la cible de celui-ci, l'efflux actif ou la réduction de la perméabilité à l'agent antimicrobien [24]. Les souches de *P. aeruginosa* G2 et *P. aeruginosa* G3 ont montré une multi-résistance aux métaux. Ces résultats sont en accord avec ceux de [26] qui ont souligné que les microorganismes isolés des zones polluées présentent une multi-résistance aux métaux, et particulièrement aux métaux lourds. Cette résistance aux métaux lourds chez les procaryotes peut être due à la présence des pompes à efflux, les barrières de perméabilité, la séquestration intra et extracellulaire des métaux, leur réduction ou la détoxification enzymatique [27]. Les souches de *P. aeruginosa* utilisées dans cette étude ont été inhibées par une concentration de mercure de 54µg/mL. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus sur des souches de *Pseudomonas spp* avec une concentration de mercure de 120µg/mL [28]. Cette étude montre que les deux souches de *P. aeruginosa* G2 et G3 sont multi résistantes aux différents polluants testés en l'occurrence : les

hydrocarbures, les métaux et les antibiotiques. Ceci peut être due au fait que les caractéristiques fonctionnelles et structurales de la résistance aux antibiotiques partagent les mêmes thèmes que celles de la résistance aux métaux [29]. En effet, ces résistances peuvent être conférées par le chromosome bactérien, les plasmides, les transposons ou les intégrons. [10] rapportent que les métaux lourds aux concentrations subtoxiques induisent la résistance aux antibiotiques. De telles résistances induites peuvent être ubiquistes parmi les différentes espèces bactériennes dans l'environnement. Les résultats de l'analyse phylogénétique montrent que des deux souches de *P. aeruginosa* soumises, seule la souche G2 est incluse dans le clade des *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* G3, par contre, s'éloigne de ce clade. Ce résultat contredit les identifications biochimiques par galerie API 20E et moléculaire par séquençage de Sanger de *P. aeruginosa* G3. Le comportement de la séquence de *P. aeruginosa* G3 laisse supposer la présence de mutations dans son ARNr 16S. Plusieurs auteurs soulignent que malgré l'utilisation de l'ARNr 16S comme marqueur moléculaire standard pour la phylogénie, ce gène peut être soumis à des transferts latéraux et des recombinaisons. [30] ont prouvé que les gènes de l'ARNr 16S des membres du groupe *Streptococcus anginosus* montraient des structures mosaïques. Ces structures suggèrent que les diverses souches dans le groupe *Streptococcus anginosus*, peuvent échanger des fragments d'ADN, y compris des parties du gène taxonomiquement de l'ARNr 16S. D'autres auteurs ont également observé le transfert latéral chez d'autres bactéries [31, 32]. En outre, des phénomènes de recombinaisons sont suggérés dans les genres *Ochrobacterium* et *Brucella* dans les phylogénies fondées sur leur ARNr 16S et 23S [33]. Ainsi quelques espèces bactériennes peuvent avoir une histoire de transfert latéral ou de recombinaison des segments des gènes de l'ARNr 16S. Ces mutations, bien que rare, sont susceptibles de modifier la séquence originelle de l'ARNr 16S. Le changement dans le gène de l'ARNr 16S complique l'identification et peut mener aux mauvaises identifications [31]. En plus, ces modifications dans l'ADNr 16S conduisent à des arbres phylogéniques incongrus. [34] proposent de combiner le BLAST et les données phylogénétiques pour effectuer une identification bactérienne appropriée. En effet, la considération des résultats d'identification taxonomique des données de séquence moléculaire peut être fautive, particulièrement si le procédé d'identification est basé uniquement sur le pourcentage de similarité de BLAST calculé à partir des alignements des séquences partielles [35].

5. Conclusion

Cette étude a évalué la tolérance aux hydrocarbures, aux métaux et aux antibiotiques de deux souches de *P. aeruginosa* G2 and G3 isolées du gasoil. Les résultats montrent que la souche *P. aeruginosa* G2 tolère tous les produits pétroliers testés excepté le xylène. Tandis que la souche *P. aeruginosa* G3 tolère seulement le gasoil et l'huile SAE 90. Ces deux souches sont capables de croître en présence SnCl_2 and ZnSO_4 . Cependant, *P. aeruginosa* G2 tolère la présence du CuCl_2 , NiCl_2 et CoCl_2 dans le milieu de culture et *P. aeruginosa* G3 du FeSO_4 . Les deux souches ont conservé leur résistance naturelle à l'ampicilline et la spiramycine tandis seule la souche *P. aeruginosa* G2 résiste la kanamycine. Ainsi, les deux souches de *P. aeruginosa* G2 et G3 sont multirésistantes, une caractéristique très importante dans la perspective de leur utilisation dans les technologies de bioremédiation des sites co-contaminés. Cependant, des études complémentaires seront menées afin de vérifier leur capacité à dégrader les hydrocarbures et d'autres composés récalcitrants.

Références

- [1] - R. A. WUANA, F. E. OKIEIMEN and R. N. VESUWE, *African Journal of Environmental Science and Technology*, 8 (12) (2014) 691 - 706, doi: 10.5897/AJEST2013.1624
- [2] - T. R. SANDRIN and R. M. MAIER, *Environ. Health Perspect.*, 111 (2003) 1093 - 1101
- [3] - L. CANG, G.-P. FAN, D.-M. ZHOU and Q.-Y. WANG, *Chemosphere*, 90 (2012) 2326 - 2331, doi:10.1016/j.chemosphere.2012.10.062
- [4] - C. CHEN, W. LEI, M. LU, J. ZHANG, Z. ZHANG, C. LUO, Y. CHEN, Q. HONG, Z. SHEN, *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (7) (2016) 6861 - 6872
- [5] - A. O. OLANIRAN, A. BALGOBIND and B. PILLAY, *International Journal of Molecular Science*, 14 (2013) 10197 - 10228, doi:10.3390/ijms140510197
- [6] - I. MÁTHÉA, T. BENEDEK, A. TÁNCSICS, M. PALATINSZKY, S. LÁNYI and K. MÁRIALIGETI, *International Biodeterioration and Biodegradation*, 73 (2012) 41 - 49, doi:10.1016/j.ibiod.2012.05.018
- [7] - Z. ZHANG, Z. HOU, C. YANG, C. MA, F. TAO and P. XU, *Bioresour. Technol.*, 102 (2011) 4111 - 4116
- [8] - N. DAS and P. CHANDRAN, *Biotechnology Research International*, 2011 (Article ID 941810) (2011) 13, doi:10.4061/2011/941810
- [9] - L. B. SALAM, *3 Biotech*, 6 (2016) 98, doi: 10.1007/s13205-016-0419-5
- [10] - S. CHEN, X. LI, G. SUN, Y. ZHANG, J. SU and J. YE, *Int. J. Mol. Sci.*, 16 (2015) 23390 - 23404, doi:10.3390/ijms161023390
- [11] - D. R. TIKU, S. P. ANTAI, A. D. ASITOK and M. G. EKPENYONG, *Imperial Journal of interdisciplinary Research*, 2 (11) (2016) 1448 - 1462
- [12] - A. A. LEBONGUY, J. GOMA-TCHIMBAKALA, E. MIAMBI and S. KELEKE, *African Journal of Microbiology*, 11 (22) (2017) 920 - 926. doi: 10.5897/AJMR2016.8095
- [13] - O. B. SAID, M. EL BOUR, M. S. GOÑI, M. DALLELI, R. DURAN ET P. AISSA, *Bull. Inst. Natn. Scien. Tech. Mer de Salammbô*, 34 (2007) 129 - 134
- [14] - A. DEREPPER, V. GUIGNON, G. BLANC, S. AUDIC, S. BUFFET, F. CHEVENET, J. F. DUFAYARD, S. GUINDON, V. LEFORT, M. LESCOT, J. M. CLAVERIE, and O. GASCUEL, *Nucleic. Acids Res.*, 36 (2008) W465 - 9
- [15] - J. GODHEJA, S. K. SHEKHAR, G. N. V. SATYANERAYAN, S. P. SINGH and DR MODI, *int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 6 (3) (2017) 194 - 211, doi: 10.20546/ijcmas.2017.603.021
- [16] - THAPA BIJAYNN, K. C. AJAY KUMAR, ANISH GHIMIRE, *Kathmandu University Journal of Science, Engineering and Technology*, 8 (1) (2012) 164 - 170
- [17] - R. M. PAWAR, *J. Bioremed. Biodeg.*, 6 (3) (2015) 291, doi:10.4172/2155-6199.1000291
- [18] - M. R. SAMAEI, S. B. MORTAZAVI, B. BAKHSI AND A. J. JAFAR, *Fresenius Environmental Bulletin*, 22 (4) (2013) 1304 - 1312
- [19] - J. SIKKEMA, J. A. DE BONT and B. POOLMAN, *Microbiol. Rev.*, 59 (2) (1995) 201 - 222
- [20] - F. DUBOIS-BRISSONNET, M. NAITALI, A. A. MAFU and R. BRIANDIT, *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (3) (2011) 906 - 910
- [21] - A. MERENS, H. DELACOUR, P. PLESIAI, J.-D. CAVALLO et K. J. EANNOT, *Revue Francophone des Laboratoires*, 435 (2011) 49 - 62
- [22] - G. F. GAD, R. A. EL-DOMANY and H. M. ASHOUR, *Journal of Urology*, 180 (2008) 176 - 181
- [23] - S. R. PARTRIDGE, *FEMS Microbiol. Rev.*, 35 (2011) 820 - 855
- [24] - A. MUYLEAERT and J. G. MAINIL, *Ann. Méd. Vét.*, 156 (2012) 109 - 123
- [25] - K. POOLE, N. GOTOH, H. TSUJIMOTO, Q. ZHAO, A. WADA, T. YAMASAKI, S. NESHAT, J.-I. YAMAGISHI, X.-Z. LI and T. NISHINO, *Mol. Microbiol.*, 21 (1996) 713 - 724
- [26] - Y. SINGH, P. W. RAMTEKE, A. TRIPATHY and P. K. SHUKLA, *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 2 (11) (2013) 525 - 530

- [27] - C.-H. KANG and J.-S SO, *Ecological Engineering*, 97 (2016) 304-312, doi:10.1016/j.ecoleng.2016.10.016
- [28] - A. A. LIMA E SILVA, M. A.RIBEIRO CARVALHO, S. A. L. SOUZA, P. M. TEIXEIRA DIA, Renato G. DA SILVA FILHO, C. S. MEIRELLES SARAMAGO, C. A. MELO BENTO and E. HOFER, *Brazilian Journal of Microbiology*, (2012) 1620 - 1631
- [29] - G. O. OYETIBO, M. O. ILORI, S. A. ADEBUSOYE, O. S. OBAYORI, O. O. AMUND, *Environ. Monit. Assess.*, 168 (2010) 305 - 314, doi: 10.1007/s10661-009-1114-3
- [30] - P. D. SCHLOSS, S. L. WESTCOTT, T. RYABIN, J. R. HALL, M. HARTMANN, E. B. HOLLISTER, R. A. LESNIEWSKI, B. B. OAKLEY, D. H. PARKS, C. J. ROBINSON, J. W. SAHL, B. STRES, G. G. THALLINGER, D. J. VAN HORN and C. F. WEBER, *App. Environ. Microbiol.*, 75 (23) (2009) 7537 - 7541
- [31] - P. VAN BERKUM, Z. TEREFWORK, L. PAULIN, S. SUOMALAINEN and B. D. EARDLY, *J.Bacteriol.*, 185 (2003) 2988 - 2998
- [32] - W. H. YAP, Z. ZHANG and Y. WANG, *Journal Of Bacteriology*, 181 (17) (1999) 5201 - 5209
- [33] - C. TEYSSIER, H. MARCHANDIN, M. S. DE BUOCHBERG, M. RAMUZ and E. JUMAS-BILAK, *J. Bacteriol.*, 185 (2003) 2901 - 2909
- [34] - G. DEVULDER, G. PERRIÈRE, F. BATY AND J. P FLANDROIS, BIBI, *J. Clin. Microbiol.*, 41 (4) (2003) 1785 - 1787, doi: 10.1128/JCM.41.4.1785-1787.2003
- [35] - J.-P. FLANDROIS, G. PERRIÈRE AND M. GOUY, *BMC Bioinformatics*, 16 (2015) 251, doi: 10.1186/s12859-015-0692-z