

CONTRIBUTION DU GENRE BACILLUS A LA DEGRADATION
BACTERIENNE DES HYDROCARBURES

M.F. WILLEMSE-COLLINET¹, J.L. CARVIN², E. BRODARD², Y. L'EMEILLAT².

1. Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire,
BP 815-29279 BREST Cedex
2. Etablissement Principal du Service Hydrographique et Océano-
graphique de la Marine - 29240 BREST Naval.

SUMMARY

MICROBIAL DEGRADATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS : CONTRIBUTION OF THE
GENUS BACILLUS

Evolution of marine oil pollution made the study of microbial degradation a current matter of importance. The present work dealt with preliminary assays in vitro of a systematic study of petroleum degrading Bacillus species.

Degradation of petrol during the different experimentations was followed with infrared analyses. Progressive elimination of alkanes and isoalkanes was controlled by gas-chromatography.

Out of the 37 strains of Bacillus subtilis, B. polymyxa, B. megaterium and Sporosarcina tested, 10 could grow with petrol as unique source of carbon. The factors of growth as supplemented in these experiments hardly accelerated the degradation.

INTRODUCTION

Déversés dans le milieu marin, les hydrocarbures sont soumis aux agents physiques, chimiques et bactériens. Les effets de l'évaporation et de la dispersion se marquent surtout par l'élimination des composés légers possédant pour les paraffines jusqu'à quinze atomes de carbone. Par contre, les activités biochimiques et bactériennes se situent principalement au niveau des chaînes hydrocarbonées longues. La mesure de l'activité des micro-organismes est complexe. Elle peut être approchée par l'étude de la capacité enzymatique de dégradation observée chez certaines populations microbiennes dites "petroleum-degrading" (Walker et Cowell, 1974 a et b). Nombreuses dans le milieu marin, elles se situent aussi bien en surface que dans le sédiment. Leur activité dépend uniquement de certains paramètres physiques et chimiques : température, pression, pH, salinité, oxygène dissous, matière organique. Représentant un faible pourcentage de la flore microbienne permanente du milieu marin (1,2 à 16 %) la majorité des bacilles Gram positif se compose du genre Bacillus (Bonde, 1975). L'existence de ce dernier dans l'eau de mer est connue depuis longtemps puisque dès 1891 Russel isolait de ce milieu des bacilles sporulés et aérobies (Brisou et al., 1977).

Les Bacillus produisent une spore résistante à de nombreux agents physiques et chimiques : chaleur, radiation, désinfectants, antiseptiques, agents oxydants exceptés (Berkeley et Goodfellow, 1981). Possédant une forte potentialité catabolique, ils peuvent produire une gamme diversifiée d'exoenzymes capables de dégrader les macromolécules. L'existence de nombreux plasmides est aussi à noter, ainsi que de fréquents phénomènes de conjugaison et de transduction (Gordon et al., 1973).

Considérant les possibilités métaboliques des bactéries du genre Bacillus, une étude systématique de leur activité de dégradation a été entreprise vis-à-vis d'un produit pétrolier déversé à la mer. Seuls les essais préliminaires in vitro ont été

décrits ici. Dans un premier temps, une première sélection des souches de Bacillus susceptibles de se développer normalement en milieu eau de mer - pétrole est effectuée ; dans un deuxième temps l'activité bactérienne de dégradation de ces souches sur l'Arabian Light est mesurée par l'analyse chimique. Toutes les expériences comportent cinq essais par tests et par souches, avec un témoin négatif non ensemencé et un témoin positif de biodégradation, ensemencé par une microflore mixte naturellement sélectionnée, prélevée sur le terrain dans un endroit de la côte particulièrement exposé aux pollutions pétrolières.

MATERIEL ET METHODES

1. Organismes : vingt cinq souches de Bacillus subtilis, neuf de B. polymyxa, deux de B. megaterium venant du Central Public Health Laboratory de Londres et une souche de Sporosarcina isolée d'un nid de cormoran ont été étudiées. Le profil d'identification de ces souches fut établi avant et après chaque expérience selon la méthode de Willemsse-Collinet et al., (1980-1981).
2. Inoculum et milieu de culture : L'inoculum est un ml d'un bouillon nutritif cultivé 24 h à 30°C. Le milieu de culture est une eau de mer filtrée de salinité 34,729 g/litre. Les facteurs de croissance, extraits de levure (Oxoid) et la source d'azote (nitrate d'ammonium) (Merck) sont ajoutés dans la proportion de 0,1 % (Fusey et al., 1980).
3. Première sélection des souches de Bacillus susceptible de se développer en milieu eau de mer-pétrole : Dans les tubes à essais de 50 ml, bouchés par du coton cardé, on introduit 10 ml du milieu de culture précédent, plus deux gouttes de pétrole. Les tubes ensemencés sont placés dans les conditions optimales de croissance bactérienne. La lecture de la D.O. est effectuée au bout de huit jours. Les souches sélectionnées sont conservées sur un milieu pétrole-gélose : Agar (N°3, Oxoid), 20g ; Mg SO₄ · 7H₂O (Merck), 0,2g ; KCl (Merck), 0,2g ; (NH₄)₂ HPO₄ (Merck), 1g ; MnSO₄ (Merck), 0,03g et Arabian Light, 5g.
4. Pétrole : Il s'agit d'un pétrole brut léger du type "Arabian Light", étêté à 150°C, fourni par l'Institut Français du Pétrole. Analysé par chromatographie en couche mince, sa composition est la suivante : alcanes (36,8%), aromatiques (43,8 %) et produits polaires (19,3 %). Dans les expériences de mesure de l'activité bactérienne de dégradation, ce pétrole, unique source de carbone, est ajouté dans la proportion de 1 % (V/V).
5. Analyse et identification des produits pétroliers par infra rouge : (IR)
L'appareil utilisé est un spectromètre IR, AcculabIV Beckman, à double faisceau. La teneur en hydrocarbures totaux d'un échantillon d'eau de mer est déterminé, après extraction par le tétrachlorure de carbone, par la mesure de l'absorption due aux vibrations de valence asymétrique des CH₂ à 2920 cm⁻¹ (+ 10 cm⁻¹).
Le spectre complet du produit s'effectue entre 4000 cm⁻¹ et 600 cm⁻¹. L'identification se fait par rapport à des témoins, elle repose sur la comparaison de quatre bandes du spectre IR : 720, 740, 810 et 870 cm⁻¹. L'intervalle de confiance est de 99 % pour la donnée représentative de la bande à 740 cm⁻¹, 5,9 % pour celle de la bande à 810 et 18,0 % pour celle de la bande à 870. La bande 720 cm⁻¹ est représentative des alcanes. Les absorbances relatives sont rapportées à celles de 720 cm⁻¹.
6. Analyse par chromatographie en phase gazeuse : L'appareil utilisé est un Girdel 3000 à colonne capillaire. Seuls les alcanes de nC₁₂ à nC₁₄ et les isoalcanes pristane et phytane sont pris en considération. Leur quantité dans l'échantillon injecté est calculée par rapport à l'étalon interne, le 1-phényl-hexane.
7. Mesure de la biodégradation : Dans les mêmes tubes que pour l'expérience précédente, on ajoute 30 ml d'eau de mer plus des facteurs de croissance. On verse 5 gouttes de pétrole par tube, soit environ 0,31 g. Les tubes ensemencés, agités pendant 5 secondes sont maintenus à 26°C, à l'obscurité, pendant 30 jours.
L'échantillon, mélange d'eau et d'hydrocarbures est porté à pH₂ par de l'acide chlorhydrique normal. On ajoute le tétrachlorure de carbone pour extraire les produits pétroliers de l'eau. Une agitation de 15 minutes favorise la dispersion d'une phase dans l'autre puis une décantation de 10 minutes permet la coalescence des gouttes "hydrocarbures-tétrachlorure". Cette dernière fraction est prélevée puis filtrée sur du sulfate de sodium anhydre. Le filtrat est ensuite passé en chromatographie sur colonne de florisisil pour éliminer les esters et les acides gras susceptibles de fausser la mesure de

l'absorption. On mesure la concentration en hydrocarbures totaux par analyse infra-rouge. La limite de détection de cette méthode est de 0,1 ppm et la précision de la mesure est de 10 %.

8. Témoin de biodégradation positif : Nous avons prélevé du sable à la pointe du Minou, située à la sortie du goulet de Brest. Cette pointe avait reçu des nappes de pétrole en dérive à la suite du naufrage du navire pétrolier "Boehlem" en octobre 1976. 10 g de sable sont lavés par 100 ml d'eau distillée stérile et vigoureusement agités. L'éluat placé à 30°C sera le témoin, culture mixte, de biodégradation positif.

RESULTATS

1. Première sélection des souches : Sur les 37 souches testées, sept souches de Bacillus subtilis, deux de B. polymyxa et une de Sporosarcina peuvent se développer en utilisant le pétrole comme seule source de carbone. Le profil d'identification des souches reste inchangé avant et après chaque expérience.
2. Etude de la biodégradation par IR : De ces dix souches capables d'utiliser le pétrole seules deux souches de B. subtilis provoquent une dégradation du pétrole supérieure à 10 % par rapport aux témoins négatifs, limite inférieure de prise en considération de la biodégradation. (fig. 1,2, tableau I).
3. Analyse par chromatographie en phase gazeuse : les deux échantillons Arabian Light dont la dégradation est supérieure à 10 % sont analysés par chromatographie en phase gazeuse. B. subtilis, souche 4568/77, donne une dégradation de 16 %, et la souche 150/79 une dégradation de 28 %, particulièrement au niveau de nC₁₄, nC₁₅ et nC₁₆. La dégradation des isomères pristane et phytane est considérée comme nulle.
4. Témoin de biodégradation positif : La microflore mixte naturellement sélectionnée, composée essentiellement de bactéries gram négatif (Pseudomonadaceae et Entérobacteriaceae) donne une dégradation de 1,7 % en analyse IR.

DISCUSSION

Les bactéries du genre Bacillus ont été peu étudiées dans les phénomènes de biodégradation du pétrole. Seuls Kachholz et Rehm (1980) se sont intéressés aux Bacillus thermophiles. De nombreux auteurs soulignent l'importance de l'étude de l'inter-action "micro-organismes-pétrole-environnement". Dans les études de Walker et Colwell (1973 ; 1974 a et b), les Bacillus sont mentionnés bien que ne faisant pas l'objet d'une attention particulière. Considérant leur ubiquité et leur potentiel métabolique, une étude systématique de leur rôle dans la biodégradation des hydrocarbures est souhaitable. Ce travail théorique, en cultures pures, est nécessaire afin d'établir les bases d'une étude plus large, en cultures mixtes avec d'autres micro-organismes connus, capables de dégrader le pétrole, et ainsi de pouvoir aboutir à des applications pratiques.

L'expérimentation en tube à essais présente un avantage pratique, mais constitue un handicap pour la biodégradation. L'emploi de fioles plus larges semble indispensable pour obtenir une meilleure aération et des résultats plus fiables.

L'Arabian Light est un pétrole connu qui se rapproche le plus des diverses pollutions possibles. (Ward et al., 1980 ; Westlake et Cook, 1980). Les méthodes analytiques mises au point sont fiables et rapides. L'analyse infra-rouge utilisée pour le dosage des hydrocarbures totaux, permet de suivre globalement la dégradation du polluant et d'identifier la composition de ce pétrole (Carsin, 1975). La chromatographie en phase gazeuse à colonne capillaire mesure quantitativement l'élimination progressive de chaque paraffine au cours de la dégradation bactérienne.

Les résultats du témoin de biodégradation positif sont faibles contrairement à ceux attendus. Ceci tend à prouver que les communautés bactériennes provenant de la pointe Minou ne semblent plus être adaptées à la biodégradation des hydrocarbures, malgré la pollution pétrolière de 1976. La recherche d'un témoin positif de biodégradation, microflore mixte naturellement sélectionnée, devra donc s'effectuer dans un endroit de la côte où la pollution est beaucoup plus récente.

Dix souches sur 37 utilisant le pétrole dont deux seulement provoquant une dégradation, la conclusion de cette étude se doit d'être prudente quant au rôle du genre Bacillus dans la dégradation du pétrole in situ.

RESUME

L'augmentation de la pollution marine par les hydrocarbures renforce l'importance de l'étude de la dégradation bactérienne de ces derniers. Ce rapport décrit les essais préliminaires réalisés en laboratoire d'une étude systématique de l'activité de dégradation de certaines souches du genre Bacillus vis à vis d'un produit pétrolier brut.

L'analyse infra-rouge a permis non seulement de doser le polluant au cours des différentes expérimentations, mais également de suivre la dégradation de celui-ci par l'étude de son spectre. En parallèle, la chromatographie en phase gazeuse à colonne capillaire a contrôlé l'élimination progressive des alcanes.

Sur les trente sept différentes souches de Bacillus subtilis, B. polymyxa, B. megaterium et de Sporosarcina testées, 10 furent sélectionnées comme pouvant se développer en utilisant le pétrole comme seule source de carbone. L'apport d'une quantité donnée de facteurs de croissance dans les conditions d'expérience décrites, accélère sensiblement le phénomène.

Les premières conclusions confirment que l'action des bactéries du genre Bacillus est lente vis-à-vis d'un pétrole brut léger.

MOTS CLES

Pétrole, Biodégradation, Bacillus

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Docteur P.C.B. TURNBULL et le laboratoire d'Hygiène de Colindal Avenue à Londres de nous avoir procuré des souches.
Ce travail a été effectué avec l'aide du contrat C.N.E.X.O. n° 80/2334

Tableau I. Dosage d'hydrocarbures totaux par spectrométrie infra-rouge.

	Perte de poids d'hydrocarbures Moyenne en %	Dégradation Moyenne en %
T-	39,77	-
T+	44,6	1,7
B.subtilis 211A/78	34,1	-
B.subtilis 215A/78	46,9	4
B.subtilis 209/78	34,5	-
B.subtilis 217/78	43,4	1,5
B.subtilis 150/79	55	13,1
B.subtilis 582/78	45,2	2,3
B.subtilis 4568/77	53,4	10,5
Sporosarcina 1	33,82	-
B.polymyxa F2572A/77	33,76	-
B.polymyxa F2662/77	38,54	1,90

T- = Témoin négatif non ensemené ; T+ = Témoin positif, culture mixte.

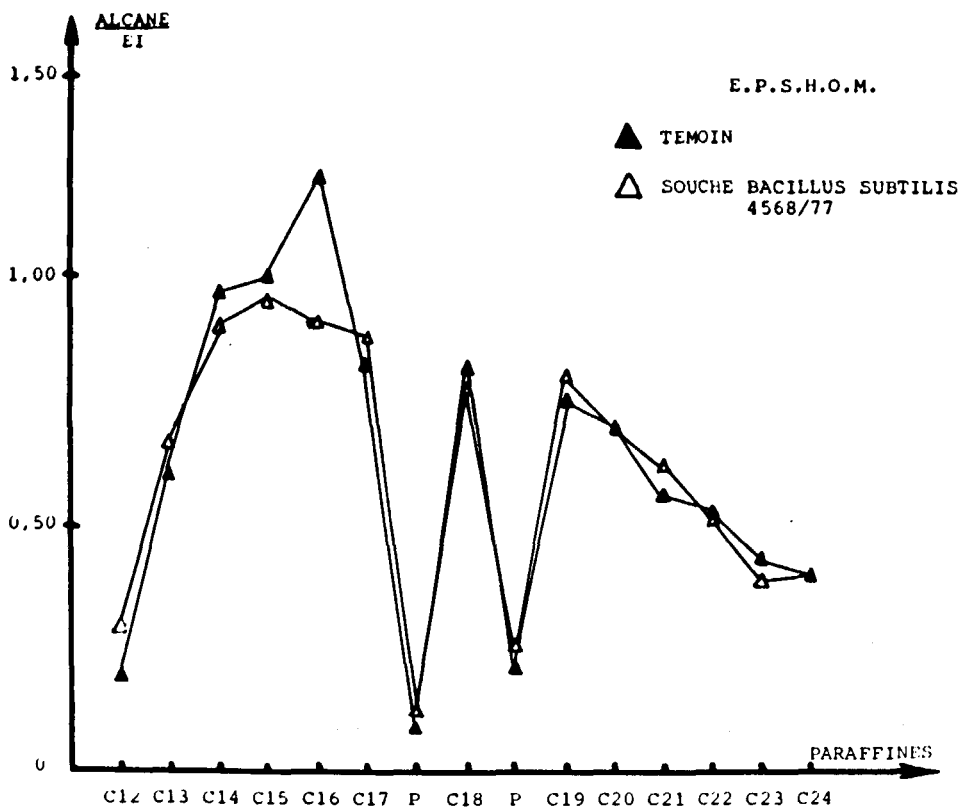


Figure 1. Activité de la souche Bacillus subtilis 4568/77 en chromatographie en phase gazeuse.

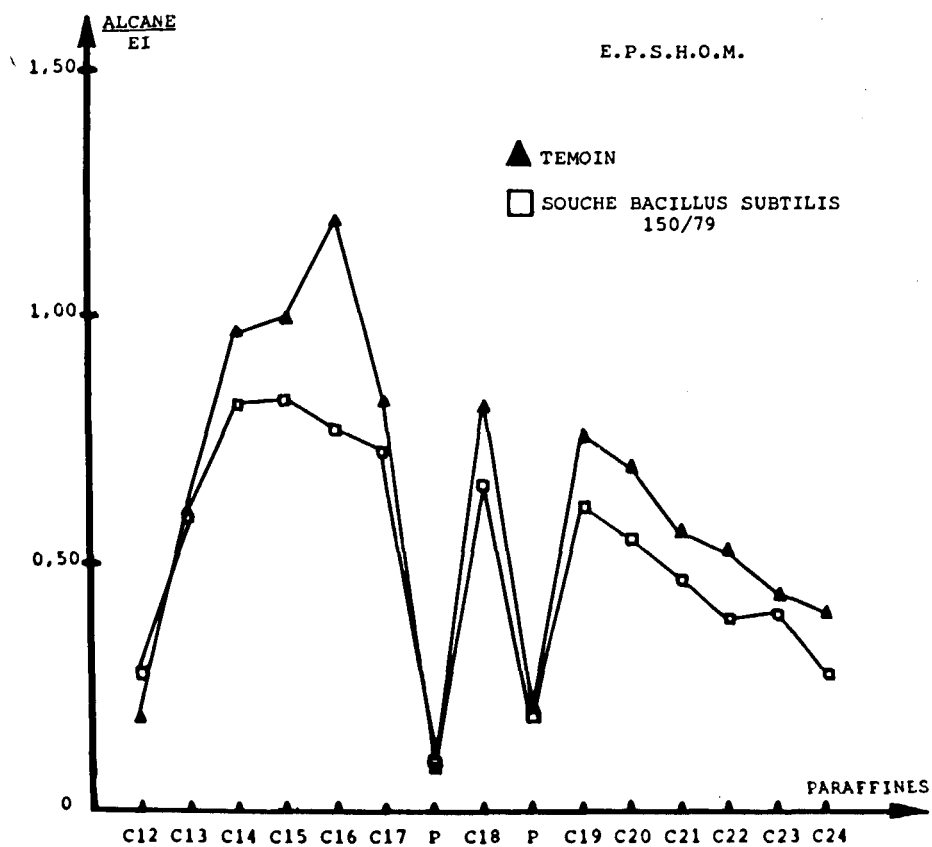


Figure 2. Activité de la souche Bacillus subtilis 150/79 en chromatographie en phase gazeuse.

BIBLIOGRAPHIE

- BERKELEY R.C.W. and GOODFELLOW M., 1981. The aerobic endospore forming bacteria; classification and identification. Society for General Microbiology, Ac. Press, pp. 373.
- BONDE G.J., 1975. The genus Bacillus. Danish Med. Bull. 22; 41-61.
- BRISOU J., DARTEVELLE Z. et BARJAC H. de, 1977. Sur un Bacillus halophile préférentiel isolé du sable littoral belge. Comm. Int. Explor. Sci. Mer Méditerran. Monaco 24 : 35-36.
- CARVIN J.L., 1975. Dosage et caractérisation des hydrocarbures prélevés dans l'eau de mer par chromatographie en phase gazeuse. EPSHOM N° 624, pp 49.
- FUSEY P., OUDOT J. et BENKIRANE-BENNIS S., 1980. Influence de la vitamine B 12, de l'extrait de levure et du magnésium sur le taux de dégradation bactérienne d'un pétrole brut. Mat. und. Orga. 2 : 149-159.
- GORDON R.E., HAYNES W.C. and PANG C.H.N., 1973. The genus Bacillus Agriculture Handbook N° 427, Washington, D.C. pp. 283.
- KACHHOLZ T. and REHM H.J., 1980. Dégradation of long chain alkanes by bacilli. European J. appl. Microbiol. Biotechnol. 10 : 95-97.
- WALKER J.D. and COLWELL R.R., 1973. Microbial ecology of petroleum utilization in Chesapeake Bay. Conference on Prevention and Control of Oils spills. Am. Pet. Inst. Washington, D.C. 685-691.
- WALKER J.D. and COLWELL R.R., 1974a. Mercury resistant bacteria and petroleum degradation. Appl. Microb. 285-287.
- WALKER J.D. and COLWELL R.R., 1974b. Microbial petroleum degradation : Use of mixed hydrocarbon substrates. Micro. 1053-1060.
- WARD D.M., ATLAS R.M., BOEHM P.D. and CALDER J.A., 1980. Microbial biodegradation and chemical evolution of oil from the Amoco spill. AMBIO 9 : 277-283.
- WESTLAKE D.W.S. and COOK F.D., 1980. Petroleum biodegradation potential of northern Puget Sound and strait of Juan de Fuca environments. Interagency Energy Environment B & D Program Report, EPA 600/7-80-133.
- WILLEMSE-COLLINET M.F., TROMP Th.F.J. and HUIZINGA T., 1980. A simple and rapid computer-assisted technique for identification of some Bacillus species using biochemical tests. Jour. appl. Bact. 49 : 385-393.
- WILLEMSE-COLLINET M.F., TURNBULL P.C.B., HOSPER G.T. and OPPENRAAY A.B.W.G.V., 1981. Computer-assisted method for identification of Bacillus species isolated from liquid antacids. Appl. Env. Micro. 41 : 169-172.