

ÉFFET DU BENZO[A]PYRENE SUR LA CROISSANCE ET LA PRODUCTION DU BACTÉRIOPLANCTON PROVENANT DU CANAL ET DE LA LAGUNE DE BIZERTE

Marwane MEDDEB, H. BEN OTHMAN, H. HADJ MABROUK
et A. SAKKA HLAILI

Laboratoire de Cytologie végétale & Phytoplanktonologie, Faculté des Sciences de Bizerte,
Université de Carthage, Tunisie.
marouansvt@yahoo.fr

تأثير Benzo [a] pyrène على المجتمع البكتيري في قنال و بحيرة بنزرت : تهدف هذه الدراسة إلى تحديد تأثير Benzo [a] pyrène كعنصر من الملوثات العضوية و الذي ينتمي إلى عائلة الهيدروكربونات العطرية المتعددة الحلقات على المجتمع البكتيري في قنال و بحيرة بنزرت. وضعت المجتمعات البكتيرية التي تم جمعها من كلتا المحطتين في الحضانة مدة 6 ايام تحت تأثير ثلاث معالجات مختلفة، وسط غير ملوث (T)، و وسطان ملوثان بواسطة Benzo [a] pyrène بتركيزين مختلفين لتر⁻¹ = 0.5 مغ B[a]py₁ و لتر⁻¹ مغ = 1 B[a]py₂. أثناء الحضانة تم تحديد، وفرة، معدل الإنتاج و معدل نمو البكتيريا. في فصل الصيف مثلت العوالق البكتيرية في البيئة الطبيعية للبحيرة، كثافة (خلية⁻¹ 3.10⁸) اقل من تلك التي لوحظت في القناة (خلية⁻¹ 5.10⁸) على عكس ذلك نلاحظ تركيزات بكتيرية مماثلة بين المحطتين (خلية⁻¹ 10.10⁹) في فصل الخريف.

أظهرت تجارب التلوث ان البكتيريا لا تقوم بتخزين هذا الملوث لكن تقوم بتحليله و استعماله كعنصر غذائي للنمو. تجارب التلوث باستعمال تركيزين مختلفين من B[a]py بينت تزايد بصفة استمرارية في وفرة، معدل النمو و انتاج البكتيريا أيا كان الموسم او الموقع هذه النتائج تشير الى ان Benzo [a] pyrène له تأثيرات على البكتيريا الغيرية و انتاجها في قنال و بحيرة بنزرت **الكلمات المفاتيح :** بحيرة و قنال بنزرت، B[a]py، البكتيريا الغيرية، الانتاج، النمو، تراكم، التحليل البيولوجي

RÉSUMÉ

Cette étude s'est intéressée à déterminer l'effet du Benzo[a]pyrène, un contaminant organique de la famille des HAP, sur la communauté bactérienne planctonique, au niveau de la lagune (zone faiblement polluée par le B[a]py) et le canal (zone très polluée par le B[a]py) de Bizerte en été et automne 2009. Des communautés bactériennes, collectées des deux stations, ont été maintenues en culture pendant 6 jours sous trois différents traitements, un témoin (non contaminé) et deux contaminations avec 0,5 mg l⁻¹ (B[a]py₁) et 1 mg l⁻¹ (B[a]py₂) du B[a]py. Au cours de l'incubation, l'abondance, le taux de production et le taux de croissance du bactérioplancton ont été déterminés.

En juillet, le bactérioplancton a présenté, dans le milieu naturel de la lagune, une abondance cellulaire (3 10⁸ cellules l⁻¹) plus faible que celle observée au niveau du canal (5 10⁸ cellules l⁻¹). Par contre, en novembre, les abondances bactériennes étaient similaires entre les deux stations (10 10⁹ cellules l⁻¹) et moins fortes que celle de l'été.

Les expériences de contamination ont montré que les bactéries n'ont pas accumulé le B[a]py mais elle l'ont dégradé quelque soit les stations et les mois et elles l'ont utilisé comme substrat de croissance.

Au niveau des deux stations et pendant les deux mois, les deux contaminations ont été suivies par des augmentations significatives des abondances, des taux de croissance ainsi que des taux de production. Ces résultats suggèrent que le B[a]py présente un effet stimulateur sur les bactéries hétérotrophes dans le canal et la lagune de Bizerte.

Mots clés: Lagune et Canal de Bizerte – B[a]py – Bactérioplancton – Production Croissance – Accumulation - Biodégradation.

ABSTRACT

Effect of Benzo[a]pyrene, an organic contaminant from the family of HAP on bacterioplankton in the lagoon (area slightly polluted by the B[a]py) and the channel (area heavily polluted by the B[a]py) of Bizerta : This study aims to determine the effect of Benzo[a]pyrene, an organic contaminant from the family of HAP on bacterioplankton in the lagoon (area slightly polluted by the B[a]py) and the channel (area heavily polluted by the B[a]py) of Bizerta in summer (July) and autumn (November) 2009. Planktonic bacterial communities collected from both stations were maintained in culture for 6 days under three different treatments,

control (uncontaminated) and two contaminations with 0.5 mg l⁻¹ (B[a]py1) and 1 mg l⁻¹ (B[a]py2) of B(a)py. During incubations, the abundance of bacteria and their production and growth rates were determined.

In July, the bacterioplankton exhibited higher density in the channel (5 10⁸ cells l⁻¹) than in the lagoon (3 10⁹ cells l⁻¹), whereas bacterial abundances were similar between both stations during November (10 10⁹ cells l⁻¹), but exceeded those of summer. During the incubations bacteria seemed to degrade the B[a]py and used this contaminant as growth substrate during both seasons and in both stations. The contaminations, performed in both stations during the two months, were followed by significant increases in abundance, growth and production of bacteria. These results suggest that B[a]py has a stimulatory effect on heterotrophic bacteria in the canal and the lagoon of Bizerte.

Keywords: B[a]py – bacterioplankton – Production – Growth - Biodegradation.

INTRODUCTION

De nos jours, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont les plus étudiés à cause de leur teneurs relativement élevées dans la colonne d'eau et dans les sédiments au niveau de divers écosystèmes aquatiques tel que la mer Méditerranée (Louati *et al.*, 2001). Plusieurs études ont été réalisées afin de quantifier les concentrations de ces éléments et trouver des solutions pour préserver la qualité des eaux dans plusieurs zones côtières. Parmi les zones polluées par les HAP, on peut citer les côtes de la région de Sfax (Zaghden *et al.*, 2007), la lagune de Ghar El Melh (Ben Ameer et Driss, 2008), le port d'Albia en Sardaigne (De Luca *et al.*, 2005), le port de Naples (Sprovieri *et al.*, 2007), la lagune de Venise (La Rocca *et al.*, 1996), et le port de Sydney (Mc Cready *et al.*, 2000).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont connus parmi les polluants dominants au niveau de la lagune de Bizerte (Souissi *et al.*, 2004). La majorité des études qui se sont intéressées aux HAP dans la lagune ont considéré les sédiments et les organismes benthiques (Amorri *et al.*, 2005) alors que les travaux sur le plancton sont rares. Ben Said *et al.* (2010) ont pu isoler les microorganismes des sédiments la lagune qui ont été capables de dégrader les HAP. Ces microorganismes appartiennent à différents groupes de bactéries à Gram positifs (30%) et à Gram négatifs (70%). Or, les bactéries hétérotrophes jouent un rôle crucial dans le cycle biogéochimique du C dans les eaux marines. Elles utilisent la matière organique dissoute et elles sont les principaux reminéralisateurs de la matière organique. Elles sont aussi les producteurs importants dans les réseaux trophiques microbiens et la boucle microbienne.

Dans la lagune de Bizerte, le bactérioplancton joue un rôle significatif dans l'utilisation du C biogène et son transfert vers les consommateurs planctoniques (Sakka Hlaili *et al.*, 2008; Grami *et al.*, 2008). Pour cela, la présente étude vise à examiner l'effet du B[a]py sur la croissance et la production des bactéries hétérotrophes dans la lagune.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Site d'étude

La lagune de Bizerte (37°8'–37°14'N, 9°48'–9°56'E) est située sur la côte nord de la Tunisie. Elle a une superficie de 150 km² et une profondeur moyenne de 8 m. Ce plan d'eau communique avec la mer Méditerranée par un canal de 12 m de profondeur et de 7 km de longueur. L'apport marin est fort en été, avec une circulation anticyclonique dans la lagune (Harzallah, 2002). Les vents dominants du nord-ouest constituent le facteur principal forçant, puisque les marées sont négligeables (Mansouri, 1996). Cette lagune, connue par une importante activité de pêche et d'aquaculture, supporte une forte biomasse (1–7 µg Chl *a* l⁻¹) et une active production phytoplanctonique (50–360 µg C m⁻³d⁻¹) (Sakka Hlaili *et al.*, 2007). Ceci peut être dû à une disponibilité nutritive assez élevée (NO₂⁻ + NO₃⁻ : 0,8–11 µM ; PO₄³⁻ : 0,14 – 0,48 µM) (Sakka Hlaili *et al.*, 2006).

2. Échantillonnage

Deux stations d'échantillonnage ont été choisies selon la nature du stress anthropique auquel elles sont soumises. La station C, localisée dans le canal est très polluée par les HAP (Trabelsi et Driss, 2004) en raison de sa proximité des apports industriels provenant de la cimenterie et de la raffinerie pétrolière. La station L, située dans la lagune, est faiblement polluée par les HAPs (Trabelsi et Driss, 2004) (Fig1). Ces deux stations (C, L) ont fait l'objet d'un échantillonnage en été (juillet 2009) et en automne (novembre 2009).

À chaque échantillonnage, des variables abiotiques ont été mesurées *in situ*. La température de l'eau et la salinité ont été déterminées au moyen d'un salinomètre muni d'un thermomètre (microprocessor conductivity Meter LF 169). La turbidité de l'eau a été mesurée au moyen d'un néophélomètre de type Haech 2100 P alors que le pH des eaux a été relevé à l'aide d'un pH-mètre (WTW 538). Des échantillons d'eau ont été aussi collectés sur toute la colonne d'eau en utilisant un tuyau en plastique. Ces échantillons ont servi à analyser les sels nutritifs (

NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ et $\text{Si}(\text{OH})_4$) et dénombrer le bactérioplancton.

3. Expérience de contamination par le B[a]py

Afin de déterminer l'effet du B[a]py sur le bactérioplancton, quatre expériences de contamination ont été conduites à chaque station (C et L) et durant les deux mois (juillet et novembre 2009). À chaque station, l'eau prélevée (2 l) a été préfiltrée sur un filet Nitex (200 μm , afin d'enlever le mésozooplancton) puis mélangée avec une eau (20 l) filtrée sur une capsule de filtration (Polycap 75 AS, 0,2 μm) et autoclavée (afin d'enlever toutes les particules). Ensuite, ce mélange a été enrichi par des solutions nutritives (NO_3^- , PO_4^{3-} et de $\text{Si}(\text{OH})_4$) mis sous un plafond lumineux (100 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à une température de 25°C et à une photopériode 12 heures de lumières pendant 3 jours pour acclimater les cellules planctoniques. Pour permettre une bonne prolifération des micro-organismes, les solutions nutritives ont été ajoutées chaque jour au mélange.

Après acclimatation, le mélange a été dispersé dans plusieurs bouteilles en polycarbonates de 2 l dont deux bouteilles ont été prises pour faire des analyses immédiates, le reste du mélange a été subdivisé en trois lots. Un lot de bouteilles (6 bouteilles) a été contaminé par une solution de B[a]py à une concentration finale de 0,5 mg l^{-1} (traitement B[a]py1), un second lot (6 bouteilles) a reçu la solution de B[a]py à une concentration finale de 1 mg l^{-1} (traitement B[a]py2) et un troisième lot (6 bouteilles) non traité par le B[a]py a servi comme témoin (traitement T).

Les trois lots de bouteilles contaminées et témoin ont été incubés pendant 6 jours sous un plafond lumineux aux mêmes conditions décrites précédemment. Durant l'incubation, les bouteilles des traitements B[a]py1 et B[a]py2 ont reçu la solution de B[a]py aux concentrations finales de 0,5 mg l^{-1} et 1 mg l^{-1} , respectivement. Des solutions nutritives, ont été ajoutées aux trois lots au début et à chaque jour de l'incubation afin de maintenir la croissance planctonique. Deux bouteilles de chaque traitement ont été prises au début, 2^{ème}, 4^{ème}, et 6^{ème} jours d'incubation pour analyser le B[a]py dissous, dénombrer le bactérioplancton et mesurer la production bactérienne.

4. Analyse au laboratoire

4.1. Nutriments

Pour analyser les nutriments, des échantillons de 500 ml ont été filtrés sur des filtres en polycarbonate de 0,2 μm , les filtrats ont été conservés à -20°C jusqu'à l'analyse. Les nitrites et les nitrates ont été déterminés selon le procédé de (Wood *et al.*, 1967). L'ammonium a été mesuré suivant la technique de (Koroleff, 1969). Les analyses des phosphates et de

l'acide orthosilicique ont été basées sur les méthodes de Murphy et Riley (1962) et de Mullin et Riley (1955), respectivement. Les limites de détection des méthodes analytiques d'analyse de NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} et $\text{Si}(\text{OH})_4$ sont 0,01, 0,05, 0,05, 0,02 et 0,1 μM , respectivement.

4.2. B[a]py dissous

Pour extraire le B[a]py dissous, la méthode d'extraction liquide-liquide a été utilisée.

Cette méthode se repose sur le transfert par agitation dans une ampoule à décantation, des solutés de matrice liquide comme l'eau vers un autre solvant qui est dans notre cas l'acétate d'éthyle. Le surnageant récupéré a été ainsi versé dans une ampoule à décantation de 250 ml, à la quelle 40 ml d'acétate d'éthyle ont été ajoutés et l'agitation s'effectuait doucement. Le gaz formé lors de cette agitation a été évacué de temps en temps en ouvrant le robinet de l'ampoule. À la fin de cette opération, deux phases ont apparues: une inférieure récupérée dans un bécher et une supérieure correspond à la phase organique contenant le B[a]py extrait de l'échantillon (surnageant). Cette dernière a été récupérée dans une bouteille en verre ombrée, en la faisant passer à travers un entonnoir en verre contenant de la laine de verre surmonté de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4). Cette combinaison entre la laine de verre et le sulfate de sodium anhydre permet de concentrer les impuretés contenues dans le solvant. La phase inférieure récupérée dans le bécher a été versée de nouveau dans l'ampoule à décantation et le même processus a été refait en ajoutant 40 ml d'acétate d'éthyle. La récupération de la phase organique s'est réalisée dans la même bouteille, qui a été ensuite préservée au réfrigérateur jusqu'au moment de l'analyse (Lei *et al.*, 2007).

4.3. Abondance du bactérioplancton

Des échantillons de 10 ml ont été préservés avec du formaldéhyde (concentration finale de 4%), puis gardés au froid à 10°C. 2 ml de chaque échantillon ont été marqués par 0,2 ml d'une solution d'acridine orange pendant 2 mn (Hobbi *et al.* 1977, Parson *et al.* 1984), puis filtrés sous faible pression sur un filtre noir (0,22 μm , en polycarbonate). Le filtre noir a été ensuite monté entre lame et lamelle avec une goutte d'huile à immersion. Le comptage a été effectué sous microscope épifluorescent à l'objectif x 100 en utilisant le filtre bleu. Pour chaque échantillon, au moins 200 cellules ont été comptées dans 20 champs pris au hasard. La concentration cellulaire du bactérioplancton a été calculée selon Parson *et al.* (1984).

4.4. Production bactérienne

La production bactérienne (PB) a été estimée par la méthode d'incorporation de thymidine tritiée (^3H -TdR) telle que décrite par Fuhrman et Azam (1982) et modifiée par Torréton et Dufour (1996). La thymidine est rapidement absorbée par les cellules,

elle y demeure stable puis se convertit en nucléotides. Le temps d'incorporation de l' ^3H -TdR est d'une heure, de ce fait elle ne sera pas incorporée par l'ADN des cellules eucaryotes (manquent de

thymidine kinase). En effet, la ^3H -TdR dans les eaux aérobiques et pélagiques peut être considérée comme spécifique aux bactéries hétérotrophes.

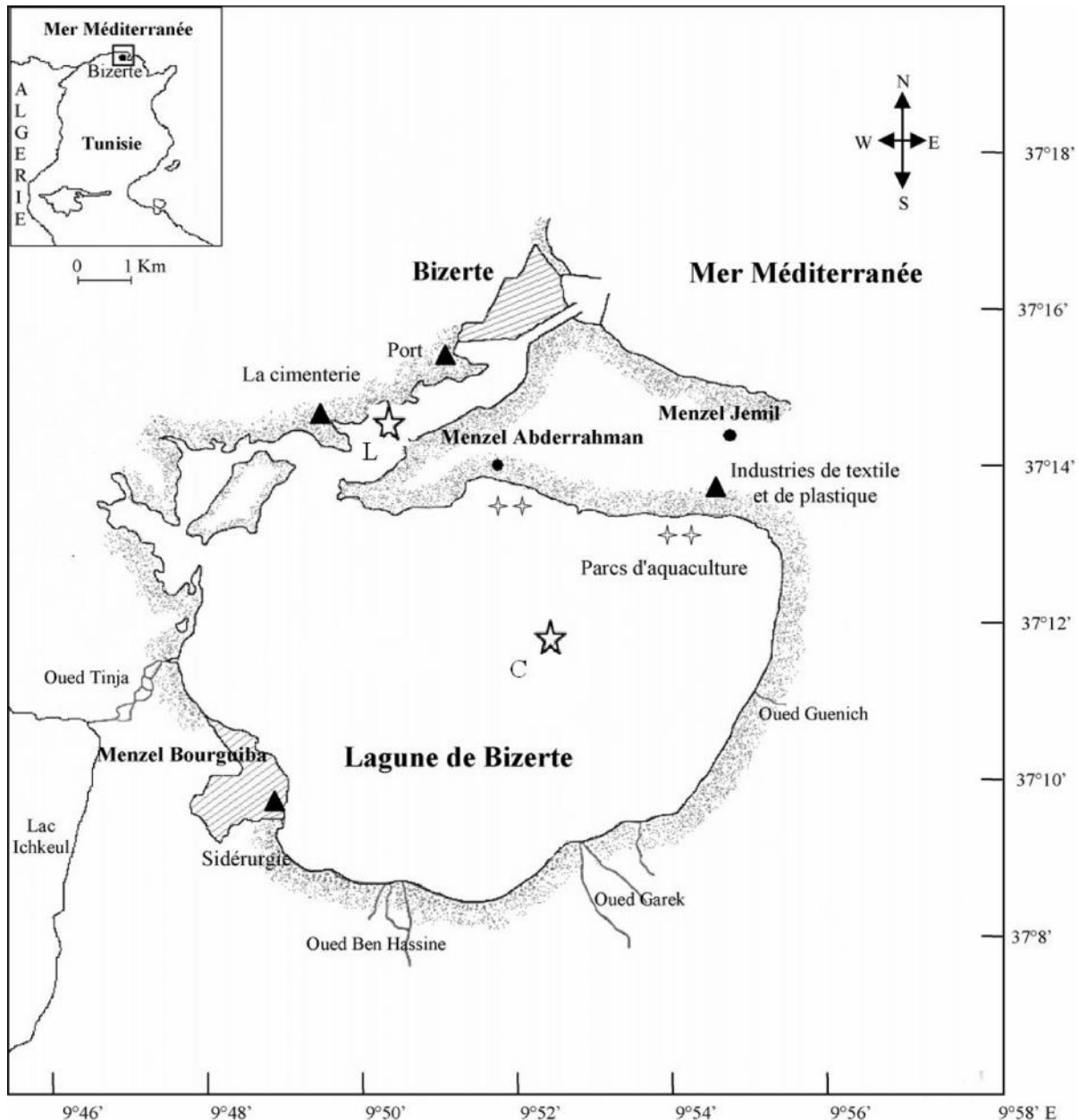


Figure 1. Localisation des stations d'étude dans le canal (C) et la lagune (L) de Bizerte.

Des bouteilles (A (blanc), B, et C) ont été remplies d'eau (20 ml) collectées des trois traitements (T, B[a]py1 et B[a]py2) et pré-filtrée sur un filet Nitex de maille 20 μm . Les bouteilles ont été préalablement enveloppées avec du papier adhésif noir pour éviter la photo-perturbation du métabolisme bactérien. Les bouteilles (A) ont été immédiatement fixées avec 400 μl de formol 37 % (préfiltré sur 0,2 μm). Toutes les bouteilles ont été ensuite inoculées avec une solution de ^3H -TdR à une concentration finale de 20 nM et

incubées pendant 1 h, aux mêmes conditions de l'expérimentation.

À la fin des incubations, le développement bactérien a été arrêté en ajoutant 400 μl de formol (37%) aux bouteilles B et C. Le contenu de chaque bouteille a été transvasé dans un tube à essai de 100 ml et placé dans un bain de glace. En effet, l'ADN bactérien est extraite à froid (- 4°C) en ajoutant 20 ml d'acide trichloroacétique (10 %) au contenu de chaque tube. Après 5 min, les échantillons ont été filtrés sur des

filtres en nitrate de cellulose (0,22 µm). Les macromolécules retenues sur les filtres ont été par la suite précipitées en rinçant 5 fois le filtre avec 1 ml d'acide trichloroacétique (TCA glacé 5%) puis 3 fois avec 2 ml d'une solution refroidie d'éthanol (80%) afin d'éliminer la thymidine non incorporée dans l'ADN. Chaque filtre a été ensuite placé dans une fiole à scintillation contenant 1 ml d'acétate d'éthyle (afin de dissoudre le filtre) puis laissé 30 mn sur agitateur. Enfin, le liquide de scintillation (BCS Amersham) a été ajouté (7 ml) aux fioles et la quantité de radioactivité émise par le tritium incorporé à l'ADN a été quantifiée par un compteur à scintillation liquide (Beckman LS 6000IC).

4.5. Calcul

4.5.1. Calcul du taux de la production bactérienne

Le nombre de moles de thymidine incorporée dans chaque échantillon a été calculé selon l'équation (A):

$$\text{mmol TdR l}^{-1} \text{ h}^{-1} = (U \times 4,5 \times 10^{-13} \times 1) / (As \times t \times V) \quad (A)$$

Avec :

U : Différence de radioactivité (en dpm) entre l'un des duplicata (B et C) et le blanc (A)

As : Activité spécifique de la solution de thymidine radioactive (65 Ci mmol⁻¹ 4,5 10⁻¹³ : le nombre de curie par dpm

t : temps d'incubation

V : volume incubé (l)

Le nombre de bactéries produites a été calculé à partir du nombre de mmol de TdR incorporée selon l'équation (B) :

$$\text{Bactéries l}^{-1} \text{ h}^{-1} = A \times 10^{-3} \text{ FCT Bactéries l}^{-1} \text{ h}^{-1} = A \times 10^{-3} \text{ FCT}$$

Avec :

A : nombre de mmol de TdR l⁻¹ h⁻¹ déterminé par l'équation A.

FCT (facteur de conversion de thymidine): le nombre des bactéries produites par mole de thymidine incorporée. Selon Fuhrman et Azam (1982) il correspond à 1,4 x 10¹⁸.

Le nombre des bactéries produites a été converti en termes de biomasse carbonée produite selon l'équation (C) :

$$\text{PB} (\mu\text{g C l}^{-1} \text{ j}^{-1}) = B \times 10^{-9} \text{ FCC} \times 24$$

Avec:

B: le nombre de bactéries l⁻¹ h⁻¹ déterminé par l'équation (B)

FCC (facteur de conversion de carbone): la quantité de carbone par biovolume bactérien. Un facteur de 10 fg C cellule⁻¹ a été utilisé dans notre calcul.

4.5.2. Calcul du taux de croissance des bactéries

Pour les différents traitements (T, B[a]py1, B[a]py2), les abondances bactériennes ont été utilisées dans le but de calculer le taux de croissance bactérien en utilisant le modèle exponentiel de Landry et Hassett (1982) selon l'équation initiale (1):

$$N_t = N_0 e^{\mu t}$$

Avec:

N₀: Abondance bactérienne (cellules l⁻¹) initiale

N_t: Abondance bactérienne (cellules l⁻¹) au temps t

μ: Taux de la croissance nette (j⁻¹) = Taux de croissance brute - Taux de mortalité

t: durée d'incubation (j)

L'équation (1) est transformée comme suit:

$$\text{Ln} (N_t / N_0) = \mu t \quad (2)$$

L'équation (2) est celle d'une régression de Ln (N_t / N₀) en fonction du temps de la forme y = a x. La pente de cette régression représente le taux de croissance nette (a = μ).

6. Analyses statistiques

Les données obtenues de l'étude du milieu naturel et des expériences de contamination ont été traitées statistiquement par le logiciel SPSS version 14.0 pour Windows.

6.1. Moyenne

La moyenne se définit par : $M = [d(x_i)] / N$

Avec N : nombre de sujets d'un échantillon donné

6.2. Écart-type

L'écart-type (δ) se définit comme étant la racine carrée de la variance (δ²) avec:

$$u^2 = d(x_i - m)^2 / (n - 1)$$

n : nombre de replicats.

6.3. Analyse des variances et test de comparaison multiple

Pour tester l'effet de la contamination par le B[a]py sur les variables bactériologiques (abondance, taux de croissance, taux de production), une analyse des variances (ANOVA) à deux facteurs fixes (le jour et le traitement) a été utilisée. La normalité de la distribution des données (test de Shapiro-Wilk) et l'homogénéité des variances (test de Bartlett-Box) ont été vérifiées. L'ANOVA a permis de comparer les moyennes des différents traitements (T, B[a]py1, B[a]py2). Lorsque l'ANOVA a été significative, l'analyse a été suivie par un test de comparaison multiple entre les différents traitements (test de Tukey).

6.4. Corrélation

Le coefficient de corrélation de Spearman a été calculé pour tester la relation linéaire entre les abondances du bactérioplancton et les facteurs abiotiques (température, salinité, concentration en éléments nutritif).

RÉSULTATS

1. Variation spatio-temporelle du milieu naturel

1.1. Variation des facteurs physico-chimiques

La température de l'eau a montré des valeurs élevées en juillet (moyenne: 27,30°C) et des valeurs plus

faibles en automne (moyenne: 19,45°C) au niveau des deux stations (Tableau I). La salinité n'a pas présenté une grande différence entre les saisons dans les deux stations avec un écart maximum de 1,8 PSU entre novembre (moyenne: 35,8 PSU) et juillet

Tableau I. Facteurs physico-chimiques enregistrés au niveau des stations d'étude en juillet et novembre 2009.

	Canal		Lagune	
	Juillet	Novembre	Juillet	Novembre
Température (°C)	27,5	19,4	27,1	19,5
Salinité (PSU)	34,1	35,6	33,9	36,00
Turbidité (NTU)	3,57	12,00	2,67	10,00
pH	8,23	8,12	8,18	8,08
NO ₃ ⁻ + NO ₂ ⁻ (μM)	12,55 ± 0,46	17,19 ± 0,23	0,36 ± 0,13	1,81 ± 0,44
NH ₄ ⁺ (μM)	1,36 ± 0,20	3,70 ± 0,11	1,79 ± 0,07	2,35 ± 1,63
PO ₄ ³⁻ (μM)	0,93 ± 0,00	0,06 ± 0,03	0,15 ± 0,10	2,35 ± 1,63
Si(OH) ₄ (μM)	Nd	0,62 ± 0,03	Nd	Nd

(moyenne: 34 PSU). Le pH enregistré en juillet ne différait pas de celui de l'automne dans les deux stations, sa valeur moyenne étant de 8,14. La turbidité mesurée pendant la saison estivale a été de l'ordre de 3,57 NTU au niveau du canal et de 2,67 NTU au niveau de la lagune. Elle a été plus faible que celle enregistrée pendant la saison automnale (10-12 NTU) au niveau des deux stations (Tableau I).

Les données concernant les sels nutritifs, ont révélé que les concentrations en phosphates ont été fluctuantes entre les stations et les mois (Tableau I). La valeur la plus élevée a été enregistrée au niveau de la station lagune (2,35 μM) en novembre et la plus faible (0,06 μM) mesurée au niveau de la station canal pour le même mois. Les concentrations en ammonium ont été plus élevées en novembre (C: 3,70 μM; L: 2,35 μM) qu'en juillet (C: 1,36 μM; L: 1,79 μM). Par ailleurs, les concentrations en nitrates et nitrites enregistrées au niveau du canal (12,55-17,19 μM) ont largement dépassé celles observées au niveau de la lagune (0,36-0,81 μM). Seule la concentration en Si(OH)₄ au niveau du canal en novembre a été mesurée, elle était de l'ordre de 0,62 μM.

1.2. Variation du bactérioplancton

En juillet, l'abondance cellulaire de bactérioplancton au niveau de la station lagune (3 10⁸ cellules l⁻¹) a été

plus faible que celle observée au niveau de la station canal (5 10⁸ cellules l⁻¹). Par contre en novembre, le bactérioplancton a montré des abondances similaires entre les deux stations. (10 10⁸ cellules l⁻¹) qui ont été plus prononcées que celles de juillet. (Figure 2).

2. Effet du B[a]py sur le bactérioplancton

2.1. Évolution temporelle du B[a]py dissous au cours des expériences de contamination

À la saison estivale au niveau du canal, la concentration du B[a]py a chuté de 0,01 à 0,005 mg l⁻¹, dans le milieu témoin. Par contre, les teneurs de ce contaminant ont augmenté lors des incubations avec les contaminants B[a]py1 (de 0,01 à 0,3 mg l⁻¹) et B[a]py2 (0,01 à 1,07 mg l⁻¹) (Fig 3). Pour le mois de novembre, au niveau du canal, la concentration du B[a]py est restée presque constante (0,0006 mg l⁻¹) dans le témoin. Après les contaminations par B[a]py1 et B[a]py2, les teneurs du B[a]py ont augmenté respectivement de 0,0006 à 1,95 mg l⁻¹ et de 0,0006 à 1,009 mg l⁻¹ (Figure 3). Au niveau des deux stations, les concentrations du B[a]py dissous mesurées à la fin des incubations étaient plus élevées dans les traitements B[a]py2 que les traitements B[a]py1.

À la station lagune, pendant la saison estivale, les témoins ont montré une chute de la concentration du B[a]py de 0,1 à 0,005 mg l⁻¹. Dans le traitement

B[a]py1 une augmentation de la concentration du B[a]py (de 0,1 à 0,9 mg l⁻¹) a été observée. Une élévation plus importante (de 0,11 à 2,23 mg l⁻¹) a été détectée après la contamination B[a]py2. À la saison automnale, la concentration en B[a]py dans le témoin a aussi peu changé au cours des incubations (0,0006

à 0,008 mg l⁻¹), mais elle a augmenté dans les milieux contaminés (Figure 3).

2.2. Évolution des abondances du bactérioplancton au cours des expériences de contamination

Au cours des expériences menées en été au niveau des deux stations, les deux contaminations par B[a]py

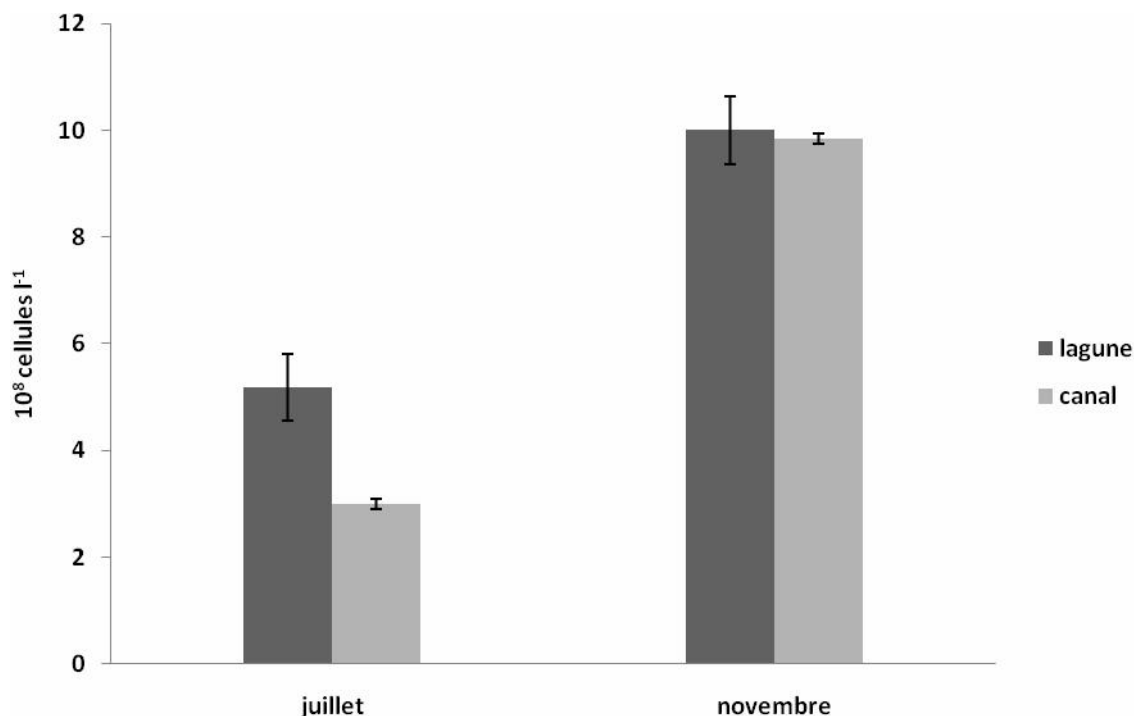


Figure 2. Abondance du bactérioplancton au niveau du canal et la lagune de Bizerte en juillet et novembre 2009 (Moyennes ± écart-types).

ont été suivies par une augmentation significative de l'abondance du bactérioplancton par rapport au témoin (Figure 4). L'augmentation la plus prononcée a été observée après le traitement B[a]py2. En effet, l'abondance a passée de 500 10⁶ cellules l⁻¹ au début d'incubation à 2700 10⁶ cellules l⁻¹ en fin d'expérience.

Pendant l'automne, au niveau de la lagune de Bizerte, l'abondance bactérienne est presque restée constante dans le témoin (1000 10⁶ cellules l⁻¹). Cependant après traitement B[a]py1, on a remarqué une augmentation de l'abondance cellulaire de 1000 10⁶ cellules l⁻¹ jusqu'à un maximum de 5500 10⁶ cellules l⁻¹ observé au 4^{ème} et 6^{ème} jours d'incubation. De même les concentrations des bactéries ont augmenté progressivement du début (1000 10⁶ cellules l⁻¹) à la fin des expériences (6000 10⁶ cellules l⁻¹) après contamination B[a]py2 (Figure 4).

Les expériences menées au niveau du canal, pendant la saison automnale, ont montré aussi un effet

stimulateur du B[a]py sur le bactérioplancton. Ainsi, les abondances ont augmenté significativement dans les traitements B[a]py1 (de 2000 10⁶ à 3000 10⁶ cellules l⁻¹) et B[a]py2 (de 5000 10⁶ à 5900 10⁶ cellules l⁻¹), par rapport au témoin. Dans ce traitement, les concentrations ont resté presque constantes (de 1000 10⁶ à 2000 10⁶ cellules l⁻¹) (Figure 4).

2.3. Évolution du taux de croissance du bactérioplancton au cours des expériences de contamination

Le taux de croissance du bactérioplancton a montré une différence significative entre les traitements (p<0,05) quelque soit le mois. En juillet, au niveau des deux stations, la croissance du bactérioplancton a été stimulée par les ajouts de deux concentrations du B[a]py. En effet les taux de croissance de ces microorganismes dans les traitements B[a]py 1 et

B[a]py 2 ($0,41 - 0,66 \text{ j}^{-1}$) ont été 1,5 – 2,5 fois plus élevés que les témoins ($0,23 - 0,29 \text{ j}^{-1}$) (Tableau II).

En novembre, on a aussi observé un effet stimulateur du B[a]py sur la prolifération bactérienne. En effet, les taux de croissance dans les témoins ont chuté ($-0,58 - -0,14 \text{ j}^{-1}$) alors qu'ils ont montré des valeurs

positives dans les traitements B[a]py 1 et B[a]py 2. Il est à noter que la croissance du bactérioplancton après contamination a été plus élevée dans la lagune ($0,50 - 0,54 \text{ j}^{-1}$) qu'au niveau du canal ($0,11 - 0,33 \text{ j}^{-1}$) (Tableau II).

Station C

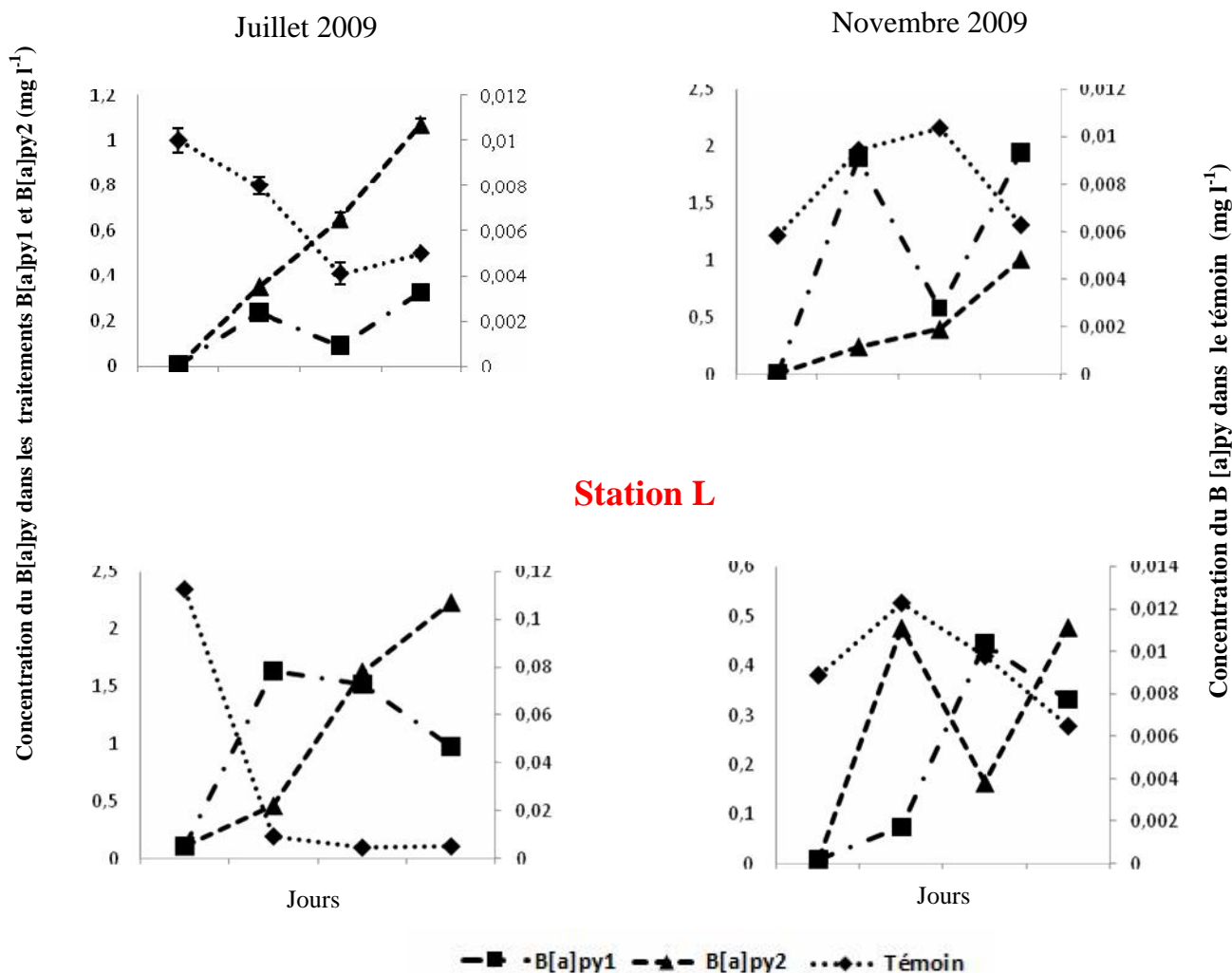


Figure 3. Évolution temporelle des concentrations du B[a]py dissous après les différents traitements [T, B[a]py1, B[a]py2] au cours des expériences menées en juillet et novembre au niveau du canal et de la lagune de Bizerte (Moyennes ± écart-types).

2.4. Évolution de la production bactérienne au cours des expériences de contamination.

Au cours des expériences menées en été au niveau des deux stations, les deux contaminations ont induit une augmentation significative de la production

bactérienne par rapport au témoin (Figure 5). L'augmentation la plus prononcée a été observée après traitement B[a]py2. En effet, le taux de production est passé de $45,13 \text{ mg C m}^{-3} \text{ j}^{-1}$ au début d'incubation à $135,61 \text{ mg C m}^{-3} \text{ j}^{-1}$ au quatrième jour au niveau des deux stations (Figure 5).

Pendant l'automne, au niveau de la lagune la production bactérienne est restée presque constante dans le témoin (26,72 mg C m⁻³ j⁻¹). Cependant après traitement B[a]py1, on a remarqué une augmentation de la production jusqu'à un maximum de 416,03 mg

C m⁻³ j⁻¹ observé au 4^{ème} jour d'incubation. De même la production a augmenté progressivement du début (22,43 mg C m⁻³ j⁻¹) à la fin des expériences (779,227 mg C m⁻³ j⁻¹) dans le traitement B[a]py2 (Figure 5).

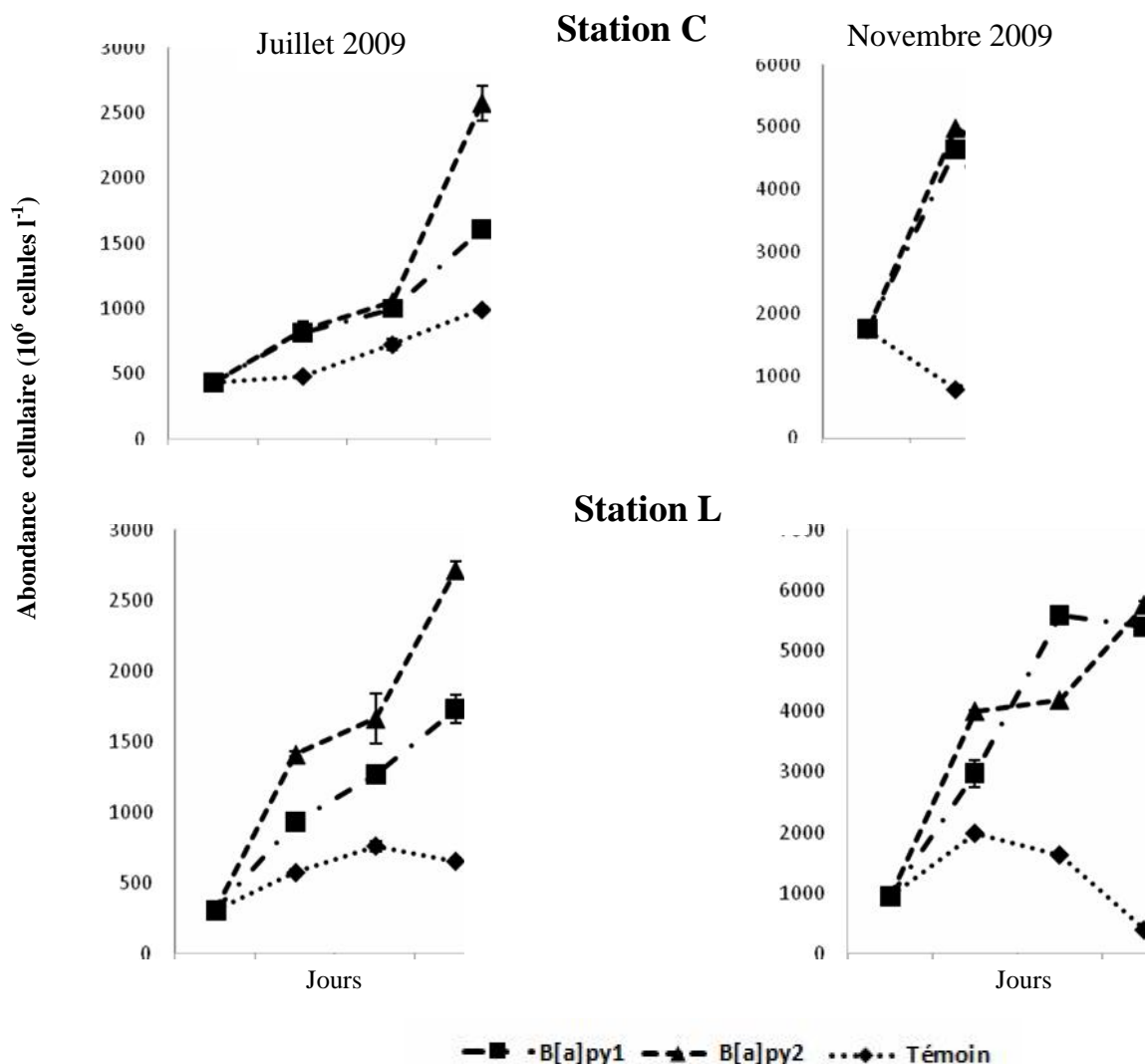


Figure 4. Évolution temporelle des abondances cellulaires du bactérioplancton après les différents traitements [T, B[a]py1, B[a]py2] au cours des incubations de juillet et de novembre réalisées dans le canal et la lagune de Bizerte (Moyennes ± écart-types).

Tableau II. Taux de croissance (j⁻¹) du bactérioplancton mesurés après les différents traitements [T, B[a]py 1, B[a]py 2] au cours des expériences menées au niveau du canal et la lagune de Bizerte (Moyennes ± écart-types).

	Canal			Lagune		
	T	B[a]py 1	B[a]py 2	T	B[a]py 1	B[a]py 2
Juillet 2009	0,29±0,00	0,41±0,03	0,57±0,02	0,23±0,043	0,54±0,01	0,66±0,01
Novembre 2009	-0,14±0,01	0,11±0,00	0,33±0,00	-0,58±0,44	0,50±0,01	0,54±0,00

Les expériences menées au niveau du canal, pendant la saison automnale, ont montré aussi un effet stimulateur du B[a]py sur le taux de production des bactéries surtout après la contamination B[a]py2. En

effet, les taux ont augmenté significativement dans ce traitement (de 93,49 à 288,4 mg C m⁻³ j⁻¹) par rapport au témoin (Figure 5).

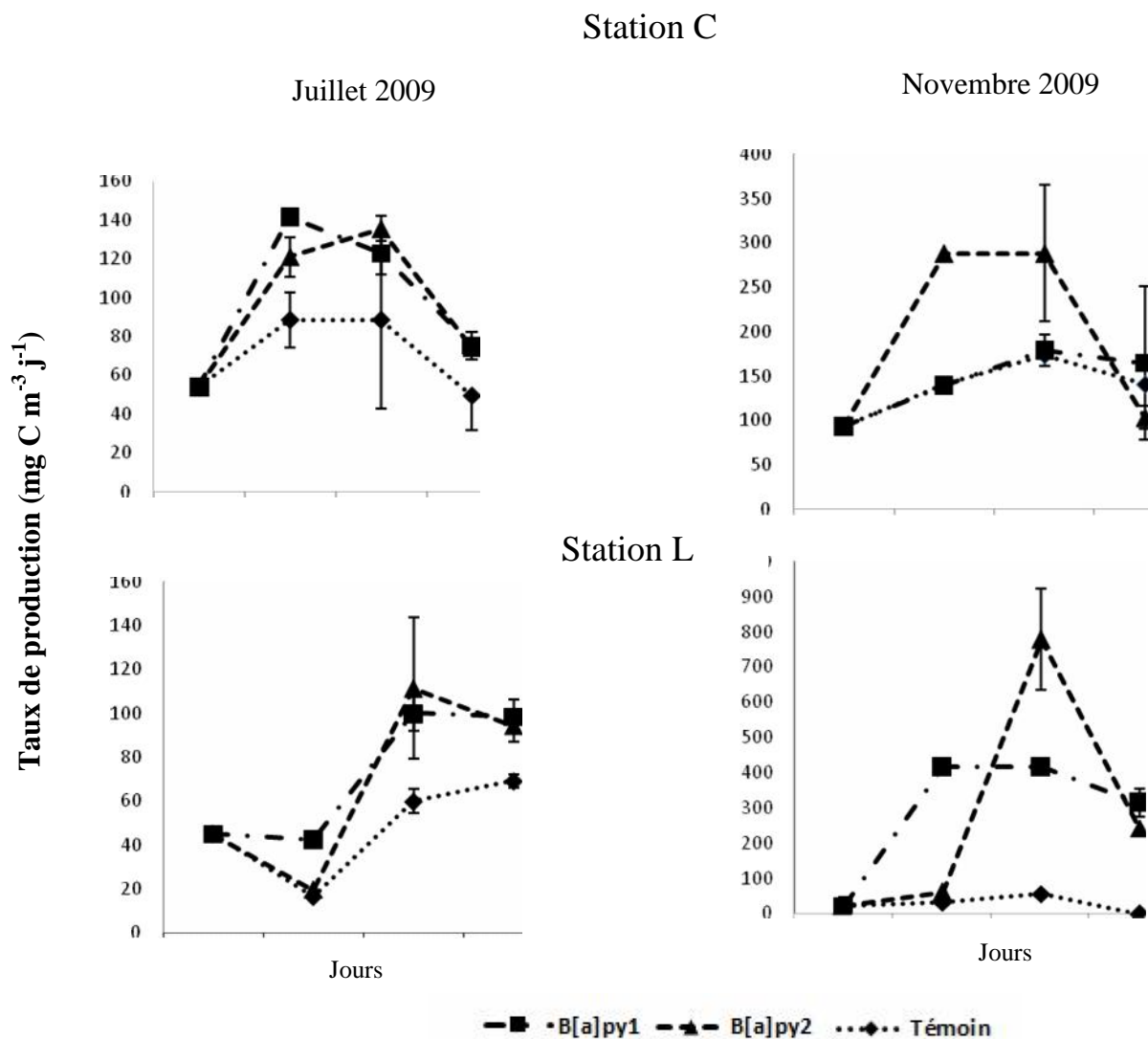


Figure 5. Évolution temporelle de la production bactérienne après les différents traitements [T, B[a]py1, B[a]py2] au cours des incubations de juillet et novembre réalisées dans le canal et la lagune de Bizerte (Moyennes ± écart-types).

DISCUSSION

1. Variation estivo-automnale du bactérioplancton au niveau du milieu naturel

Les abondances cellulaires du bactérioplancton ont varié significativement entre les saisons ainsi que les stations. En été elles étaient de l'ordre de 3 10⁸ cellules l⁻¹ et de 5,2 10⁸ cellules l⁻¹ dans la lagune et le canal, respectivement. En automne, les abondances bactériennes enregistrées dans les deux stations ont été similaires (10,5 10⁸ cellules l⁻¹). Ces intervalles de

densité se rapprochent de ceux déterminés (3,7-13,4 10⁸ cellules l⁻¹) dans différentes stations de la lagune de Bizerte dans une étude antérieure (Grami, 2009). Ces valeurs sont aussi similaires à celles reportées pour le Golfe de Lion (Méditerranée nord ouest) ou l'abondance des bactéries a varié entre 3 et 12 10⁸ cellules l⁻¹ avec les plus importantes concentrations aux stations côtières (Van Wambeke *et al.*, 2002). Par contre, dans les eaux nord-ouest méditerranéennes les abondances bactériennes correspondent à la limite inférieure des valeurs rapportées pour la lagune

($\leq 5 \cdot 10^8$ cellules l^{-1} , Gasol *et al.*, 1998; Pedrós-Alió *et al.*, 1999). Van Wambeke *et al.* (2001) ont rapporté pour le nord-ouest méditerranéen une abondance parmi les plus élevées pour des milieux marins méditerranéens ($2 \cdot 10^9$ cellules l^{-1}).

Plusieurs facteurs environnementaux peuvent interagir pour contrôler le bactérioplancton. La température a été reportée comme un facteur majeur qui contrôle le métabolisme des bactéries et par suite leur croissance. En effet, plusieurs travaux ont signalé des corrélations positives entre la densité cellulaire de bactérioplancton et ce facteur abiotique dans différents milieux, tel que les eaux de l'Orégon (Sherr *et al.*, 2001), un estuaire sub-tropicale (Murell, 2003), la baie de Narragansett (Staroscik *et al.*, 2004) et le fleuve de Mondego (Bacelar-Nicolau *et al.*, 2003). De même dans la lagune de Bizerte Grami (2010) a trouvé aussi une relation linéaire positive entre la température et les bactéries. Contrairement à ces travaux, aucune corrélation significative n'a été observée entre la densité bactérienne et la température au cours de cette étude. La croissance bactérienne a été stimulée en automne par rapport en été dans les deux stations. Ceci pourrait être expliqué par la forte disponibilité en nutriments phosphorés. En effet une corrélation négative a été trouvée entre les bactéries et le PO_4^{3-} ($r = -0,390$ $p < 0,01$) aux cours de cette étude, témoignant de l'utilisation de cet élément lors de la croissance bactérienne. Plusieurs travaux ont effectivement montré que le phosphore est le principal nutriment inorganique qui limite la croissance bactérienne (Thingstad *et al.*, 1998, Vrede *et al.*, 1999 ; Pinhassi et Berman 2003, Jardillier *et al.*, 2004, Rejas *et al.*, 2005). Vrede *et al.* (1999) ont déclaré que même dans les écosystèmes où le phytoplancton est N-limité, le bactérioplancton est limité par le P.

La croissance des bactéries dépend aussi de la matière organique dégradable disponible. L'évolution des bactéries est donc liée à la présence de phytoplancton dans le milieu pélagique où elles baignent. Le cycle de vie du phytoplancton étant court (de l'ordre de quelques jours maximum) (Bougis, 1974), la nutrition des bactéries est toujours assurée tant que le phytoplancton se développe dans la colonne d'eau. Le développement des communautés bactériennes dans un milieu semi-ouvert (ce qui est le cas de la lagune de Bizerte) dépend du temps de résidence des populations bactériennes (Crump *et al.*, 2004). C'est le temps moyen nécessaire pour un volume d'eau dans une parcelle spécifique du milieu pour le quitter (Monsen *et al.*, 2002). Dans de petits estuaires, le temps de résidence peut être trop court pour assurer le développement des communautés bactériennes locales (Troussellier *et al.*, 2002; Henriques *et al.*, 2006). Dans la lagune, le temps de résidence est assez long et atteint plusieurs mois, ce qui favorise une

prolifération bactérienne accrue en présence de conditions favorables à leur développement.

2. Évolution du B[a]py dissous au cours des expériences de contamination

Les courbes représentant les teneurs de B[a]py dans le milieu de culture, ont montré des fluctuations de la concentration de ce polluant après les traitements B[a]py1 et B[a]py2. Ces variations ont révélé une élévation suivie ou non par une chute quelque soit le traitement (B[a]py1 ou B[a]py2) (Figure 3). Ceci peut être expliqué en premier lieu, par le fait que l'intervalle de temps qui sépare le moment de la dernière contamination et le moment de la contamination suivante a été relativement long (24 heures), ce qui n'est pas en accord avec le temps inscrit par Wang *et al.* (2008) qui ont additionné les HAPs chaque 8 heures. Cette variation de B[a]py peut être expliquée par le fait qu'il y a déplacement du B[a]py du milieu de culture vers le particulaire, ce qui a été auparavant signalé par Lei *et al.* (2007).

Puisque nos traitements ont été effectués sur toute la communauté microplanctonique, le B[a]py a été donc soumis à plusieurs facteurs y compris les conditions environnantes telles que la température et la lumière, ainsi que la composition du milieu, notamment les espèces planctoniques présentes.

Plusieurs études ont montré que le bactérioplancton n'accumule pas le B[a]py mais il l'utilise comme substrat de croissance (Ye *et al.*, 1996). La dégradation du fluorène par les bactéries, se fait le plus souvent en conditions aérobies (Kanaly et Harayama, 2000; Samanta *et al.*, 2002). L'attaque se fait au niveau d'un anneau, en général terminal, grâce à une enzyme, la dioxygénase, donnant une structure de type catéchol. Ensuite, par action d'une seconde dioxygénase, il y a rupture de la structure formée (en ortho ou méta des groupes hydroxyles), suivie par d'autres ruptures. Les sous-produits formés sont généralement plus solubles, plus mobiles et peuvent présenter une toxicité. Le naphthalène est l'un des HAPs les plus simples et les plus facilement biodégradables. Ainsi, les voies métaboliques de dégradation par des souches de *Pseudomonas sp.* ont été les premières voies étudiées et sont très connues (Sutherland *et al.*, 1995). Le B[a]py est métabolisé avec difficulté, dû à sa faible solubilité dans l'eau, sa forte énergie de résonance et sa toxicité (Cerniglia, 1992; Wild et Jones, 1993).

Les études menées dans la lagune de Bizerte par Ben Said *et al.* (2010) ont montré en premier lieu que les microorganismes isolés capables de dégrader les HAP appartiennent à différents groupes de bactéries à Gram positifs (30%) et à Gram négatifs (70%). Parmi celles-ci les bacilles à Gram négatifs (74%) sont prédominants. Un faible nombre de souches (6%) dégradant les HAP a été isolé à partir des sédiments faiblement à moyennement contaminés, contre un

nombre élevé de bactéries résistantes aux métaux lourds et aux antibiotiques à partir des sédiments les plus contaminés (42%).

La température est un paramètre pouvant influencer la biodégradation du pétrole en modifiant son état physique, sa composition chimique, l'activité physiologique de microorganismes et par conséquent la vitesse de dégradation des hydrocarbures. (Atlas, 1981; Leahy et Colwell, 1990). Une diminution de la température est généralement accompagnée par une diminution de la vitesse de biodégradation qui peut être expliquée par une décroissance de l'activité enzymatique. Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation (Walworth *et al.*, 2001; Sandvik *et al.*, 1986; Song *et al.*, 1990).

Roe *et al.* (1998) ont mis en évidence que certains copépodes tels que *Calanus finmarchius* accumule du naphthalène dans les premiers jours d'exposition à ce HAP. Landrum *et al.* (2003), ont reporté que chez l'amphipode *Diporeia* spp., le facteur de bioconcentration diminue lorsque la concentration de naphthalène augmente.

Concernant le phytoplancton, diverses études ont montré que les microalgues sont capable de bioconcentrer et métaboliser les HAP. Hong *et al.* (2008) ont mis en évidence la capacité d'accumulation et de dégradation du phénanthrène et du fluoranthène chez *Skeletonema costatum* et *Nitzschia* sp. Lei *et al.*, (2007). ont trouvé que les espèces *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus capricornutum*, *Scenedesmus platydiscus* et *Senedesmus quadricauda* peuvent accumuler le fluoreanthène et le pyrène.

Comme il peut les accumuler, le phytoplancton est capable aussi de dégrader les contaminants. Des études ont montré que certains microalgues (*Chlorella* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus capricornutum* et *Ochromonas danica*) sont capables de dégrader divers xénobiotiques comme l'herbicide 2,4 dichlorophénoxyacétique acide (Butler *et al.*, 1975), des composés phénoliques (Klekner et Kosaric, 1992) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Cerniglia *et al.*, 1980 ; Warshawsky *et al.*, 1995).

En plus de l'effet des microorganismes, on peut attribuer la chute de la concentration du B[a]py dans le milieu de culture à l'effet de la lumière. En effet, Miller *et al.* (2000) ont montré que la lumière provoque la photodécomposition des HAP, la demi-vie de photodécomposition du B[a]py étant de 20 heures (Djomo *et al.*, 2004).

Nos résultats ont montré que la biodégradation est variable d'un milieu à un autre, d'une station à une autre et d'un mois à un autre. Ce ci peut être dû à la variabilité de la composition des différents groupes planctoniques.

3- Effet du B[a]py sur le bactérioplancton

La contamination par les deux concentrations de B[a]py a montré que, l'ajout de cet hydrocarbure a induit un effet stimulateur sur le bactérioplancton. En effet, en novembre, au niveau des deux stations, les abondances des bactéries ont augmenté dans les deux traitements B[a]py1 et B[a]py2 (de 1 à 6 10^9 cellules l^{-1}) par rapport au témoin. Dans ce dernier les concentrations de ces microorganismes est restée aux alentours de 1 10^9 cellules l^{-1} (Figure 4). Le même effet a été observé durant les expériences de l'été. Pendant cette saison le bactérioplancton atteignait des concentrations maximales dans les milieux contaminés (B[a]py1: 2,59 10^9 cellules l^{-1} , B[a]py2 : 2,72 10^9 cellules l^{-1}) par rapport au témoin (6,18 10^8 cellules l^{-1}).

En général, les charges bactériologiques les plus importantes observées dans la lagune de Bizerte ont été localisées en face des zones urbaines ou conchylicoles. Ces zones, étant exposées aux rejets domestiques ou exploitées par des activités anthropiques, sont riches en matière organique. Ceci favorise la survie et la multiplication des bactéries (Essid *et al.*, 2008). La richesse en composantes organiques dans le sédiment a induit une augmentation dans la charge en bactéries hétérotrophes cultivables (BHC) et particulièrement les Vibrios, suggérant que ces bactéries sont de bons indicateurs quant à l'accumulation de la matière organique dans le sédiment (La Rosa *et al.*, 2004).

Peu d'études ont mis en évidence l'effet des polluants sur la production bactérienne. La présente étude a montré une augmentation significative de cette production en été par rapport au milieu témoin, après les traitements B[a]py1 et B[a]py2. L'augmentation la plus prononcée a été observée après la contamination B[a]py2. En effet, le taux de production est passé de 45,13 $mg\ C\ m^{-3}\ j^{-1}$ au début d'incubation à 135,61 $mg\ C\ m^{-3}\ j^{-1}$ au quatrième jour au niveau des deux stations (Figure 5). De même pour la saison automnale, les traitements par le B[a]py ont été suivis par une augmentation plus ou moins importante de la production bactérienne. La station lagune a montré une augmentation de la production jusqu'à un maximum de 416,03 $mg\ C\ m^{-3}\ j^{-1}$ observé au 4^{ème} jour d'incubation après traitement B[a]py1 et une production de 779,227 $mg\ C\ m^{-3}\ j^{-1}$ à la fin des expériences dans le traitement B[a]py2 (Figure 5). Au niveau du canal, on a aussi signalé un effet stimulateur du B[a]py sur le taux de production après la contamination B[a]py2. Les taux ont augmenté significativement après contamination (de 93,49 à 288,4 $mg\ C\ m^{-3}\ j^{-1}$) par rapport au témoin.

CONCLUSION

La présente étude nous a permis de conclure qu'au niveau des deux stations il existe une dynamique importante du bactérioplancton. L'abondance bactérienne a été plus importante en automne au niveau des deux stations. Ceci peut être dû au changement saisonnier des facteurs abiotiques, surtout des nutriments. Au cours de l'été, le bactérioplancton a présenté des abondances plus faibles. Le suivi de la communauté bactérienne contaminée par le B[a]py, nous a permis de conclure que les contaminations ont induit une augmentation significative de l'abondance du bactérioplancton et de son taux de production par rapport au témoin. L'augmentation la plus prononcée a été observée après contamination avec la plus forte concentration du B[a]py. L'étude de l'évolution temporelle de la concentration du B[a]py dissous nous a montré que quelque soit les stations et les mois, le B(a)py dissous a été détecté au 0 jour. Au cours des jours de l'expérience, cette teneur a chuté dans les milieux non contaminés (Témoin). Ceci a été expliqué par la mise en place des processus de photo-oxydation et de biodégradation du B[a]py. En effet les bactéries n'accumulent pas le B[a]py mais elles le dégradent.

Remerciements

Nous adressons nos remerciements à Mme S. Trabelsi Majdoub et M. R. Driss pour leur aide en analyses chimiques du B[a]py.

BIBLIOGRAPHIE

Amorri, J., boufahja, F., mahmoudi E., Ounissi, M. et Aissa, P., 2005. Réponse des copépodes benthiques à la pollution ponctuelle par les métaux lourds et les hydrocarbures dans la lagune de Bizerte (Automne 2002). Actes du Sixième Congrès Maghrébin des Sciences de la Mer Monastir TUNISIE (18 – 22 décembre 2005). *Bull Inst. Nat. Sc. Tech. Mer*, Numéro Spécial (10) :133-136.

Atlas, R.M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbial Reviews*, 45: 180-209.

Bacelar-Nicolau, P.L., Nicolau, B., Marques, J.C., Morgado, F., Pastorinho, R., Azeiteiro, U.M., 2003. Bacterioplankton dynamics in the Mondego estuary (Portugal). *Acta Oecol.*, 24: 67–75.

Ben Ameer, W., Driss, M.R., 2008. Contribution à l'évaluation du niveau de contamination des sédiments superficiels de la lagune de Ghar El Melh par les hydrocarbures aromatique polycycliques. *Mémoire de mastère en*

Hydrobiologie, Faculté des Sciences de Bizerte. 74p.

Bougis, P., 1974. Ecologie du plancton marin (II). *Edition Masson et Cie*, 200p.

Cerniglia, C.E., 1992. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Biodegradation*, 3: 351-368.

Cerniglia, C.E., Gibson, D.T., Van Baalen, C., 1980. Oxidation of naphthalene by cyanobacteria and microalgae. *J. Gen. Microbiol.*, 116:495-500.

Crump, B.C., Hopkinson, C.S., Sogin, M.L., Hobbie, J.E., 2004. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 1494-1505.

De Luca, G., Furesi, A., Leardi, R., Micear, G., Panzanelli, A., Piu, P.C. et Sanna, G., 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons assessment in the sediments of the of the porto Torres Harbor (Northern Sardinia, Italy). *Mar. Chem.*, 86:15-32.

Djomo, J.E., Dauta, A., Ferrier, V., Narbonne, J.F., Monkiedje, A., Njine, T., Garrigues, P., 2004. Toxic effects of some major poly aromatic hydrocarbons found in crude oil and aquatic sediment son (*Scenedesmus subspicatus*). *Water Res.* 38 : 1817–1821.

Essid, N., 2008. Caractérisation de la pollution organique et minérale des sédiments de la lagune de Bizerte et impact écologique sur les peuplements de nématodes libres: Etude à grande échelle et au niveau d'un parc mytilicole. *Thèse doctorat. Fac. Sci. Bizerte - Univ 7 Nov Carthage*– 364 pp.

Fuhrman, J.A., Azam, F., 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.*, 66: 109-120.

Gasol, J.M., Doval, M.D., Pinhassi, J., Caldern-Paz, J.I., Guixa-Boixareu, N., Vaqué, D., Pedrs-Alis, C., 1998. Diel variations in bacterial heterotrophic activity and growth in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 164: 107-124.

Gready Mc , S., Slee, D.J., Brich, G.F., Taylor, S.E., 2000. The Distribution of polycyclic of Radio-labeled Substrates by Soil Microbial Communities. *Microbiol. Ecol.*, 15:257-273

Harzallah, A., 2002. État actuel et évolution de l'exploitation halieutique des lagunes, (Bizerte), *Institut national des sciences et technologie de la mer*, Tunisie, 128 p.

Henriques, I.S., Alves, A., Tacao, M., Almeida, A., Cunha, A., Correia, A., 2006. Seasonal and spatial variability of free-living bacterial

- community composition along an estuarine gradient (Ria de Aveiro, Portugal). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 68: 139-148.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J., Jasper, S., 1977. Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl Environ Microb.* 33: 1225–1228.
- Hong, Y.W., D.X., Lin, Q.M., Yang, T.L., 2008. Accumulation and biodegradation of phenanthrene and fluoranthene by the algae enriched from a mangrove aquatic ecosystem. *Mar. Pollut. Bull.*, 56:1400-1405.
- Jardillier, L., Basset, M., Domaizon, I., Belan, A., Amblard, C., Richardot, M., Debroas, D., 2004. Bottom-up and top-down control of bacterial community composition in the euphotic zone of a reservoir. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 35: 259-273.
- Kanaly RA, Harayama S. 2000. Biodegradation of high-molecularweight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacterio* 1182:2059–2067.
- Klekner, V., Kosaric, N., 1992. Degradation of phenols by algae. *Environ, Technol.* 13:493-501.
- Koroleff F., 1969. Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue, ICES, C.M. Hydr. Comm., 1969.
- La Rocca, C., Conti, L., Crebelli, R., Crochi, B., Icovella, N., Rodriguez, F., Turrio-Baldassarri, L., DiDomenico, A., 1996. PAH content and mutagenicity of marine sediments from the Venice Lagoon. *Ecotoxicol. Environ. Safe.*, 33:236-245.
- La Rosa, T., Mirto, S., Mazzola, A., et al., 2004. Benthic microbial indicators of fish farm impact in a coastal area of the Tyrrhenian Sea. *Aquaculture*, 230 (1-4), pp. 153–167.
- Leahy, J.G. and Colwell, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 54, 305-315.
- Lei, A.P., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2007. Removal of fluoranthene and species. *Water .Sc. technolo.*, 46: 195-201.
- Louati, A., Elleuch, B., Kallel, M., Saliot, A., Dagaut, J., Oudot, J., 2001. Hydrocarbon of coastal sediments from the Sfax area (Tunisia), Mediterranean sea. *Mar. dodu. Bull.*, 42: 444-451
- Mansouri, T., 1996. Application de la télédétection et des SIG à l'étude du fonctionnement hydrobiologique du lac de Bizerte, *DEA, Fac. Sci. Tunis*, pp 91.
- Miller, B.s., Pine, D.j., Redshaw, C.J., 2000. An assesment of the contamination and toxicity of marine sediments in the Holy Loch, Scotland. *Mar. Pollut. Bull.* 40:22-34.
- Monsen, N.E., Cloern, J.E., Lucas, L.V., Monismith, S.G., 2002. A comment on the use of flushing time, residence time, and age as transport time scales. *Limnol. Oceanogr.*, 47: 1545 1553.
- Mullin J.B. , J.P. Riley., 1955. The colorimetric determination of silicate with special reference to sea and natural waters, *Anal. Chem. Acta* 12, 162–176.
- Murphy J. , J.P. Riley., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters, *Anal. Chem. Acta* 27, 31–36.
- Murrel, M., 2003. Bacterioplankton dynamics in a subtropical estuary: evidence for substrate limitation. *Aquat. Microb. Ecol.*, 2: 239–250.
- Parsons, T.P., Maita, Y., Lalli, C.M., 1984. A manuel of Chemical and Biological Methods for Seawater analysis. Pergamon Press., Oxford, England, 1-173.
- Pedrós-Alió C., Calderón-Paz, J.I., Guixa-Boixereu, J., Estrada, M., Gasol, J.M., 1999. Bacterioplankton and phytoplankton biomass and production during summer stratification in the northwestern Mediterranean Sea. *Deep-Sea Res. I*, 46: 985-1019.
- Pinhassi, J, Berman T., 2003. Differential growth response of colony-forming and proteobacteria in dilution culture and nutrient addition experiments from Lake Kinneret, the Eastern Mediterranean Sea, and the Gulf of Eilat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 199–211.
- Postma, H., 1981. Processes in the sediment and in the water interface. In Coastal lagoon research, present and future. *Unesco technical papers in marine science*, 33 : 111-118.
- Rejas, D., Muylaert, K., De Meester, L., 2005. Nutrient limitation of bacteria and sources of nutrients supporting nutrient-limited bacterial growth in an Amazonian floodplain lake. *Aquat. Microb. Ecol.*, 39: 57–67.
- Roe, T.L., 1998. Produced water discharges to the North Sea. A study of bioavailability of organic produced water compounds to marine organisms Ph.D.thesis , Faculty of Chemistry and Biology, Norwegian, University of science and technology, Norway pp1-69.
- Sakka, Hlaili, A., Grami, B., Hadj Mabrouk, H., Gosselin, M., Hamel, D., 2007. Phytoplankton growth and microzooplankton grazing rates in a restricted Mediterranean lagoon (Bizerte Lagoon, Tunisia). *Mar. Biol.*, 151: 767-783.
- Samanta SK, Singh OV, Jain RK. 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechno* 120:243– 248.

- Sandvik, S., Lode, A. and Pederson, T.A., 1986. Biodegradation of oily sludge in Norwegian soils. *Applied Microbiology Biotechnology* 23, 297-301.
- Sherr, E.B., Sherr, B.F., Cowles, T.J., 2001. Mesoscale variability in bacterial activity in the Northeast Pacific Ocean of Oregon, USA. *Aquat. Microb. Ecol.*, 25:21–30.
- Song, H.G., Wang, X. And Bartha, R., 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 652-656.
- Souissi, N., Bousselmi, L., Ghrabi, A., 2004. Essais de caractérisation de la pollution chromés et nitrates dans les eaux du lac de Bizerte par chromatographie des paires d'ions avec détection conductimétrique. *Research Programme (RPP-SEPMCL). Study on Environmental pollution of Bizerte Lagoon, Final Report.*133-139.
- Sprovieri, M., Feo, M.L., prevedello, L., Salvagio Manta, D., Sammartino, S., Tamburrino, S., Marsella, E., 2007. Heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in surface sediments of the Naples harbour (southern Italy).*Chemosphere.* 67:998-1009.
- Staroscik, A.M., Smith, D.C., 2004. Seasonal patterns in bacterioplankton abundance and production in Narragansett Bay, Rhode Island, USA. *Aquat. Microb. Ecol.*, 35: 275–282.
- Sutherland, J.B; Raffi, F; Khan, A. A. and Cerniglia, C.E. (1995). Mechanisms of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation. In *Microbial Transformation and degradation of toxic organic chemicals.* Edited by Young, L.L and C.E. Cerniglia. Wiley-Liss. New York.
- Thingstad, F.T., Zweifel, U.L., Rassoulzadegan, F., 1998. P limitation of heterotrophic bacteria and phytoplankton in the northwest Mediterranean. *Limnol. Oceanogr.*, 43: 88–94.
- Trabelsi, S., Driss, M.H., 2004. Distribution polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Bizerte Lagoon, Tunisia. *Research promotion programme (RPP-SEPMCL).* Study on Environmental pollution of Bizerte Lagoon, Final Report: 81-86.
- Torréton, J.P., Dufour, P., 1996. Bacterioplankton production determined by DNA synthesis, protein synthesis and frequency of dividing cells in Tuamotu atoll lagoons and surrounding Ocean. *Microb. Ecol.*, 32 : 185-202.
- Troussellier, M., Schäfer, H., Batailler, N., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P., Muyzer, G., Servais, P., Vives-Rego, J., 2002. Bacterial activity and genetic richness along an estuarine gradient (Rhône River plume, France). *Aquat. Microb. Ecol.*, 28: 13-24.
- Van Wambeke, F., Goutx, M., Striby, L., Sempéré, R., Vidussi, F., 2001. Bacterial dynamics during the transition from spring bloom to oligotrophy in the northwestern Mediterranean Sea: relationships with particulate detritus and dissolved organic matter *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 212: 89–105.
- Van Wambeke, F., Heussner, S., Diaz, F., Raimbault, P., Conan, P., 2002. Small-scale variability in the coupling/uncoupling of bacteria, phytoplankton and organic carbon fluxes along the continental margin of the Gulf of Lions, North-western Mediterranean Sea. *J. Mar. Sys.*, 33-34: 411-429.
- Vrede, K., Vrede, T., Isaksson, A., Karlsson, A. 1999. Effects of nutrients (phosphorus, nitrogen, and carbon) and zooplankton on bacterioplankton and phytoplankton, a seasonal study. *Limnol. Oceanogr.*, 44: 1616–1624.
- Walworth, J., Braddock, J. and Woolard., 2001. Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soil. *Cold Region Science and Technology* 32, 85-91.
- Wang, L., Zheng, B., Meng, W., 2008. Photo-induced toxicity of four polycyclic aromatic hydrocarbons, singly and in combination, to the marine diatom *Phaeodactylum tricorinitum*. *Eco.Tox. and Envir Safety.*, 71: 465-472.
- Warshawsky, D., Cody, T., Radike, M., Reilman, R., Schumann, B., Ladow, K., Schneider, J., 1995. Biotransformation of Benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algae species under gold and wite light. *Chem. Biol.Interact.*, 97:131-148.
- Wild, S.R. and Jones, K.C. (1993). Biological and abiotic losses of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) from soils freshly amended with sewage sludge. *Environ. Toxicol. Chem.* 12:5-12.
- Wood E.D. , F.A.J., 1967. Armstrong, F.A. Richards, Determination of nitrate in seawater by cadmium–copper reduction to nitrite, *J. Mar.Biol. Assoc. UK* 47, 23–31.
- Ye, B., Siddiqui, M., Amaccubin, A., Kumar, E., SandSikka, H.C., 1996. Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimaubilis*. *Environmental Science and Technology* 30, pp.136-142.
- Zaghden, H., Kallel, M., Elleuch, B., Oudot, J., Saliot, A., 2007. Sources and distribution of aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in sediments of Sfax, Tunisia, Mediterranean sea. *Mar.Chem.*, 105:70-89.