

## CARACTERISATION PRELIMINAIRE A PARTIR DE LA LAGUNE DE BIZERTE (TUNISIE) DES BACTERIES TOLERANTES AUX HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAPS).

Olfia BEN SAID<sup>1\*</sup>, M. EL BOUR<sup>1</sup>, M. S. GOÑI<sup>2</sup>, M. DALLELI<sup>3</sup>, R. DURAN<sup>2</sup> et P. AISSA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire de Bactériologie - Pathologie, Institut National des Sciences et Technologies de la Mer  
INSTM-Salammbô - Tunisie.

<sup>2</sup> Equipe Environnement et Microbiologie - UMR CNRS 5254 (IPREM – EEM), EA3525 - IBEAS - UFR Sciences et  
Techniques - Pau cedex - France.

<sup>3</sup> Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement, Faculté des Sciences de Bizerte - Zarzouna Tunisie.

\*nourelimen@yahoo.fr

### ملخص

دراسة أولية للتعريف بالبكتيريا القادرة على استعمال الهيدروكربونات المتأينة من بحيرة بنزرت : تم إنجاز هذه الدراسة لهدف عزل بكتيريا قادرة على استعمال الهيدروكربونات و مقاومة للمعادن والمضادات الحيوية و في هذا الإطار تم أخذ عينات من الماء و التربة على مستوى 16 محطة موزعة ببحيرة بنزرت. كما تم عزل البكتيريا بطريقة الإثراء باستعمال وسط مائي معدني زائد هيدروكربونات (fluoranthène) وقد توصلنا في عملية أولية من عزل 130 من الأجدال المختلفة من البكتيريا والتي تم تعريفها عبر الخاصيات الشكلية و البيوكيميائية. وأثبتت النتائج الأولية أن البكتيريا القادرة على استعمال الهيدروكربونات تنتمي لمجموعات مختلفة Gram<sup>+</sup> و Gram<sup>-</sup> على التوالي بنسبتي 65% و 35%. وتضم مجموعة البكتيريا من نوع العصيات Gram<sup>-</sup> أكبر عدد من الأجدال المعزولة (74%). ختاماً نشير أن دراسة قدرة الأجدال على مقاومة المعادن والمضادات الحيوية أثبتت 90% من مجموع البكتيريا قادرة على مقاومة على الأقل 2 معادن و 2 مضادات حيوية مختلفة. في أغلب الأحيان نلاحظ أن قدرة استعمال الهيدروكربونات تتماشى مع مقاومة المعادن والمضادات الحيوية. **كلمات مفاتيح:** تحلل, هيدروكربونات, مقاومة, المضادات الحيوية, المعادن.

### RESUME

Dans le but d'isoler des bactéries capables de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques et résistantes aux métaux lourds ainsi qu'aux antibiotiques, nous avons réalisé en mai 2004 des prélèvements d'eau et de sédiments dans la lagune de Bizerte au niveau de 16 stations réparties sur tout le plan d'eau. Nous avons procédé à l'isolement des bactéries par méthode d'enrichissement liquide utilisant un milieu minéral de base supplémenté en fluoranthène comme seule source de carbone et d'énergie. Des tests morphologiques et biochimiques ont été utilisés pour la sélection et l'identification de l'ensemble des bactéries cultivables (130 isolats).

Les résultats préliminaires obtenus montrent que les bactéries dégradant les hydrocarbures aromatiques polycycliques appartiennent à différents groupes de bactéries Gram<sup>-</sup> et Gram<sup>+</sup> respectivement à des taux de 70 % et 30 %. Ce sont les bactéries de type bacilles Gram<sup>-</sup> qui sont prédominantes (74 %).

D'après les différents profils biochimiques, antibiologiques et de résistance aux métaux (i.e Chrome, Cobalt, Fer, Nickel, Cadmium, Zinc, Cuivre, et Plomb), 90 % des souches isolées sont capables de résister à au moins deux antibiotiques et deux métaux différents. Dans la majorité des cas, leur capacité à dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques est associée à une résistance multiple (métaux et/ou antibiotiques).

**Mots clefs :** biodégradation, hydrocarbures aromatiques polycycliques, antibiorésistance, résistance, antibiotiques, métaux.

### ABSTRACT

**Preliminary characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHS) tolerant bacteria from the lagoon of Bizerte (Tunisia) :** In order to isolate bacteria showing ability to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons and to resist to heavy metals and antibiotics, water and sediment samples were taken in may 2004 at 16 stations distributed all over the Lagoon of Bizerte. To isolate bacterial strains from sediment samples, enrichment cultures on basal mineral salt medium supplemented with fluoranthene as unique carbon and energy source were performed. Morphological and biochemical tests were used to select and identify 130 isolates. The preliminary results showed that the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria belong to various Gram<sup>-</sup>

and Gram<sup>+</sup> groups (70% and 30 % respectively). Gram<sup>-</sup> bacilli were prevalent (74 %). According to antibiotic and metal resistances (i.e Chromium, Cobalt, Iron, Nickel, Cadmium, Zinc, Copper and Lead), 90 % of the isolated strains were able to resist at least for two antibiotics and two different metals. In the majority of the cases, their capacity to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons was associated with a multiple resistance (metals and/or antibiotics).

**Keywords :** biodegradation, polycyclic aromatic hydrocarbons, antibioresistance, antibiotics, metals.

## INTRODUCTION

La pollution par les hydrocarbures pose un problème majeur pour les écosystèmes aquatiques, notamment au niveau de la frange côtière, exposée à ces polluants insolubles d'une manière chronique ou accidentelle. Les microorganismes jouent un rôle capital dans le devenir de ces hydrocarbures. En effet, les communautés microbiennes présentes dans les sédiments marins possèdent un potentiel important de biodégradation ; ce processus clé de l'atténuation naturelle de la pollution est de plus en plus couramment envisagé comme une alternative aux procédés agressifs actuels de réhabilitation de sites contaminés (Ballerini et Vandecasteele, 1996).

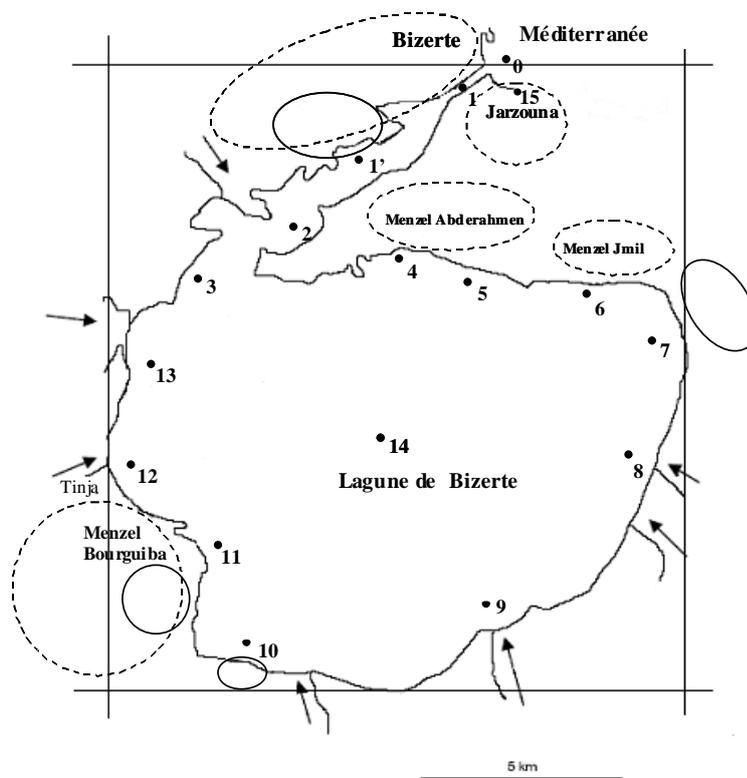
La lagune de Bizerte, située au nord de la Tunisie et fortement affectée par de multiples pressions anthropiques, reçoit des quantités importantes d'eaux usées urbaines des villes et villages avoisinants ainsi

que des rejets industriels. L'activité industrielle sur son pourtour étant très développée et diversifiée (industries pétrolières, aciéries, cimenteries...), ce milieu lagunaire est chroniquement exposé à des xénobiotiques tels les hydrocarbures (Trabelsi et Driss, 2005), les métaux lourds (Chouba *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 2002) ainsi que les antibiotiques. Plusieurs stations ont été choisies dans la lagune de Bizerte dans le but d'isoler des souches bactériennes capables de dégrader les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), résistantes aux métaux lourds (cadmium et plomb) et aux antibiotiques.

## MATERIELS ET METHODES

### Localisation des stations d'échantillonnages

La campagne d'échantillonnage d'eaux et de sédiments a été réalisée en mai 2004 à partir de 16 stations réparties sur tout le plan d'eau (figure 1).



**Figure 1.** Localisation des stations d'échantillonnage (1 à 15) dans la lagune de Bizerte (modifiée d'après Yoshida *et al.*, 2002).

○ Zones polluées      ○ Zones industrielles      → Oueds

### Isolement des souches

Il a été adopté la méthode classique d'enrichissement liquide des cultures bactériennes par agitation à partir des sédiments dans un milieu minéral salin de base (MSB) additionné de fluoranthène (HAP) (Jimenez *et al.*, 1996 ; Boonchan *et al.*, 1998 ; Churchill *et al.*, 1999). Après une nuit d'agitation d'1 g de sédiment dans 9 ml de solution de Ringer à 150 rpm et à 30 °C, 2 ml du surnageant ont été utilisés pour inoculer un volume de 18 ml de MSB additionné de fluoranthène (100mg /litre). A partir de cette préculture, l'inoculum a été rajouté à 10 % v/v dans un nouveau milieu contenant la même concentration de HAP qu'au départ et en gardant les mêmes conditions expérimentales. Cette opération a été répétée chaque 5 jours. La croissance bactérienne a été suivie par spectrophotométrie en mesurant la densité optique à 600 nm. Les cultures ont été arrêtées après 30 jours d'incubation.

A partir des étalement des cultures sur milieu solide complet (Plat Counting Agar ou PCA), les colonies différant morphologiquement ont été isolées et purifiées par la méthode de repiquage en stries et conservées à -80 °C par congélation en duplicat (Bastiaens *et al.*, 2000 ; Daane *et al.*, 2001).

### Caractérisation préliminaire des souches isolées

Les caractères morphologiques des colonies, la structure cellulaire, la coloration de Gram, l'observation de la spore et la mobilité bactérienne ont été étudiés sur des cultures de 18h à 48h incubées à 30° C sur milieu PCA. Pour la caractérisation biochimique, les tests enzymatiques ont été réalisés sur des cultures incubées de 18h à 24h à 30°C sur milieu PCA : l'oxydase a été recherchée sur papier filtre selon la technique de Kovacs (1956), la catalase révélée par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 10 volumes sur les colonies en boîtes de Pétri. Les recherches de l'uréase, de l'indole (avec le réactif de Kovacs) et de la tryptophane désaminase ont été faites à partir du milieu de Ferguson ou encore du milieu urée-indole (Bergey's Manual of Systematic Microbiology, 1984). La fermentation des sucres (glucose, lactose) ainsi que la production de H<sub>2</sub>S ont été étudiés sur le milieu d'identification combiné : milieu lactose-glucose H<sub>2</sub>S ou milieu de Kligler- Hajna.

### Profils de la résistance aux antibiotiques

Les antibiogrammes ont été effectués en boîtes de gélose Müeller - Hinton (MH) par la méthode de diffusion à partir de disques pré-imprégnés et incubés en aérobiose à 30°C pendant 18 à 24 h. Les antibiotiques testés correspondent au panel utilisé en routine en milieu hospitalier (Pénicilline, Amoxicilline, Oxacilline, Céfoxitine, Streptomycine, Néomycine, Sulfamides, Tétracycline) (Tableau I). Les résultats obtenus ont été interprétés selon les critères du Comité de l'Antibiogramme de la Société

Tableau I. Classements et concentrations des antibiotiques utilisés au cours de la présente étude des bactéries dégradant le fluoranthène isolées des sédiments lagunaires. P: pénicilline, AMX: amoxicilline, OX: oxacilline, FOX: céfoxitine, S: streptomycine, N: néomycine, SXT: cotrimoxazole, TE: tétracycline. UI : unités internationales (1 UI correspond à 0,0006 g)

Famille	Antibiotique utilisé	Code	Quantité
β-lactamines	Pénicilline	<b>P</b>	10 UI
	Amoxicilline	<b>AMX</b>	25 µg
	Oxacilline	<b>OX</b>	5 UI
	Céfoxitine	<b>FOX</b>	30 UI
Aminosides	Streptomycine	<b>S</b>	10 UI
	Néomycine	<b>N</b>	30 UI
Tétracyclines	Tétracycline	<b>TE</b>	30 UI
Sulfamides	cotrimoxazole	<b>SXT</b>	1.25UI

Française de Microbiologie (Société française de Microbiologie, 1998)

Profils de la résistance aux métaux lourds

Les huit métaux lourds considérés sont le chrome, le cobalt, le fer, le nickel, le cadmium, le zinc, le Cuivre et le plomb. Pour évaluer qualitativement leur effet, nous avons eu recours à une méthode de diffusion en gélose à partir de puits (de 1 cm de diamètre et 4mm de profondeur) remplis de la solution aqueuse métallique [CoCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CdCl<sub>2</sub>, CrCl<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] à une concentration finale de 200 mM. Les boîtes ont été incubées en aérobiose à 30 °C pendant 48 à 72 h (Hassen *et al.*, 1998).

## RESULTATS

Les résultats préliminaires (morphologiques et biochimiques) montrent que les bactéries dégradant les HAPs appartiennent à différents groupes de bactéries Gram<sup>+</sup> (30 %) et Gram<sup>-</sup> (30 %) parmi lesquels prédominent les bacilles Gram<sup>-</sup> (74 %). D'après les résultats des tests de résistances aux différents antibiotiques et aux métaux présentés respectivement dans les tableaux II et III, 90 % des souches sont capables de résister aux moins à deux antibiotiques et à deux métaux différents.

## DISCUSSION

Sachant que les méthodes de microbiologiques classiques (isolement sur milieu de culture) ne permettent de détecter qu'une faible proportion des microorganismes présents, moins de 1% des bactéries sont cultivables (Wards *et al.*, 1990 ; Amann *et al.*, 1995), la biodégradabilité du fluoranthène semble essentiellement le fait des bacilles gram.

Tableau II. Profils des résistances aux métaux lourds des souches les plus résistantes isolées à partir des sédiments lagunaires (mai 2004) sur milieu minéral salin de base supplémenté de fluoranthène. + : croissance, - : inhibition de la croissance.

Souche	Station	Zinc	Cadmium	Cuivre	Plomb	Cobalt	Chrome	Fer	Nickel
S 99	12	-	-	-	+	+	+	-	+
S 112	3	+	-	-	+	+	+	+	+
S 10	6	+	+	+	+	+	+	-	-
S 7	13	+	-	+	-	+	+	+	+
S 26	7	+	+	+	+	+	+	-	+
S 77	8	-	-	+	+	+	+	+	+
S 94	4	+	+	+	+	+	+	+	+

Tableau III. Profils des résistances aux antibiotiques des souches les plus résistantes isolées à partir des sédiments lagunaires (mai 2004) sur milieu minéral salin de base supplémenté de fluoranthène. + : croissance, - : inhibition de la croissance, P: pénicilline, AMX: amoxicilline, OX: oxacilline, FOX: céfoxitine, S: streptomycine, N: néomycine, SXT: cotrimoxazole, TE:tétracycline.

Souche	Station	P	AMX	OX	FOX	S	N	TE	SXT
S 99	12	+	+	+	+	+	-	+	+
S 112	3	+	-	+	+	+	-	-	+
S 10	6	+	+	+	+	+	+	-	-
S 7	13	+	+	+	+	+	-	+	+
S 26	7	+	+	+	+	+	-	+	+
S 77	8	+	+	+	+	+	+	-	+
S 94	4	+	+	+	+	+	-	+	+

Ces résultats sont en accord avec des résultats antérieurs utilisant des souches pures (Boonchan *et al.*, 1998; Solano-Serena *et al.*, 1999; Bastiaens *et al.*, 2000 ; Danne *et al.*, 2001). Cependant, quelques espèces bactériennes parmi les gram positif, essentiellement *Bacillus* spp et *Mycobacterium* spp capables de dégrader des HAPs ont été isolées (Jimenez *et al.*, 1996 ; Churchill *et al.*, 1998). Toutefois ces résultats sont à prendre avec précaution car les méthodes culturales imposent des contraintes ne permettant qu'un accès limité à la biodiversité en comparaison avec les méthodes moléculaires.

Nous avons par ailleurs constaté que la capacité de dégrader les HAPs des souches isolées dans la lagune de Bizerte est dans la majorité des cas associée à une résistance multiple aux métaux et/ou antibiotiques, à cela rien de bien singulier puisque les polluants organiques, les métaux lourds et les antibiotiques sont fréquemment présents dans les secteurs proches des zones urbanisées (Bouchez *et al.*, 2000). Divers auteurs

(Halling-Sorensen *et al.*, 1998 ; Sarmah *et al.*, 2006) ont constaté dans certains environnements des concentrations en antibiotiques suffisamment élevées pour inhiber beaucoup d'espèces bactériennes. Plusieurs bactéries ont développé des mécanismes de résistance aux antibiotiques, souvent liés à une résistance aux métaux lourds (DeVicente *et al.*, 1990 ; Baker-Austin *et al.*, 2006). Si beaucoup d'études ont démontré que les bactéries peuvent développer des résistances à divers métaux et antibiotiques, peu d'entre elles se sont intéressées à leurs aptitudes conjointes à dégrader les HAPs et à résister aux métaux et/ou aux antibiotiques. Ainsi, Dore *et al.* (2003) ont isolé des bactéries utilisant le naphthalène et résistantes au mercure dans un environnement acide. A notre connaissance, seule une étude (Campbell *et al.*, 1995) a décrit des bactéries capables de résister aux métaux et aux antibiotiques ainsi que de dégrader les HAPs. La présence de gros plasmides extrachromosomiques transmissibles transportant les différents gènes de

résistances permet d'acquérir ces résistances multiples (Springael *et al.*, 1993 ; Nakajima *et al.*, 1995 ; Alonso *et al.*, 2000). Selon Lawrence (2000), le groupement de plusieurs gènes sur un plasmide est bénéfique pour les souches bactériennes qui auront plus de chance pour survivre lorsque les gènes sont transférés ensemble lors de la conjugaison.

Il reste maintenant à approfondir nos recherches actuelles selon deux axes principaux, à savoir l'analyse phylogénétique et physiologique des souches les plus résistantes aux hydrocarbures, aux métaux et aux antibiotiques mais aussi la détection et la caractérisation des mécanismes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques, la transformation des métaux lourds et la résistance aux antibiotiques.

### Remerciements

Ce travail n'aurait pu voir le jour sans l'aide scientifique de tout le personnel du Laboratoire d'Écologie Moléculaire de l'Université de Pau et des pays de l'Adour (France) et celui du Laboratoire de Bactériologie – Pathologie de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer (Salammbô). Nous exprimons nos plus vifs remerciements au MRSTDC pour son soutien financier.

### BIBLIOGRAPHIE

- Alonso A., P. Sanchez & J. L. Martinez. 2000. *Stenotrophomonas maltophilia* D457R Contains a Cluster of Genes from Gram-Positive Bacteria Involved in Antibiotic and Heavy Metal Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44: 1778–1782.
- Amann R.L., Ludwig W., Schleifer K.II. 1995. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, 59:143-169.
- Baker-Austin, C., Wright, M.S, Stepanauskas, R., McArthur, J.V., 2006. Co-selection of metal and antibiotic resistance. *Trends Microbio.* 14, 176-182.
- Ballerini D. & J. P. Vandecasteele. 1996. La restauration par voie microbiologique des sols contaminés par les polluants organiques : Biotechnologie. René Scriban. TEC et DOC ; Paris : 836-865.
- Bastiaens L., D. Springael, P. Wattiau, H. Harms, R. De Wachter, H. Verachtert & L. Diels. 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-Sorbing carriers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1834-1843.
- Boonchan S., M. L. Britz & G. A. Stanley. 1998. Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnol. Bioeng.*, 59: 482-494.
- Bouchez, T., Patureau, D., Dabert, P., Juretschko, S., Dore, J., Delegenes, P., Moletta, R., Wagner, M., 2000. Ecological study of bioaugmentation failure. *Environ. Microbiol.* 2 : 179–190.
- Calorimis, J. Armstrong, J. L., and Seidler, R. J. 1984. Association of metal tolerance with multiple antibiotics resistance bacteria isolated from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 47 : 1238-1242.
- Campbell, J.I.A., Jacobsen C.S., Sorensen J., 1995. Species variation and plasmid incidence among fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from agricultural and industrial soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 18, 51-62.
- Chouba L., H. Amara & A. El Abed. 1996. Etat de contamination par les éléments traces des sédiments de la lagune de Bizerte, *Bull INSTM*, 6: 128-131.
- Churchill S. A., J. P. Harper & P. F. Churchill. 1999. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 549-552.
- Comité De l'Antibiogramme De La Société Française De Microbiologie. 1998. Communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 13: 243-258.
- Danne, L. L., I. Harjono, G. J. Zylstra, and M. M. Häggblom. 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 2683-2691.
- De Vicente, A., Avilés, M., Codina J.C., Borrego, J.J., Romero, P., 1990. Resistance to antibiotics and heavy metals of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from natural waters. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 625-632.
- Dore, S.Y., Clancy, Q.E., Rylee, S.M., Kulpa, C.F.Jr., 2003. Naphthalene-utilizing and mercury-resistant bacteria isolated from an

- acidic environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63,194-199.
- Halling-Sorensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Liitzhofl, H.C., Jorgensen, S.E., 1998. Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment- A Review. *Chemosphere* 32, 357-393.
- Hamdi H., M. Yoshida, I. Abdunnasser & N. Jedidi. 2002. Contamination of potentially toxic elements (PTEs) in Bizerte lagoon bottom sediments, surface sediment and sediment repository. In: Ghrabi A., Yoshida M. (eds) *Study on Environmental Pollution of Bizerte Lagoon*. INRST-JICA Publishers: 139 p.
- Hassen A., N. Jedidi, M. Cherif, A. M'hiri, A. Boudabous & O. V. Cleemput. 1998. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. *Bioresour. Technol.*, 64: 7-15.
- Holt J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley & S. T. Williams (ed.). 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th ed. Williams and Wilkins, Co., Baltimore, 1: 964 p.
- Jimenez I. Y. & R. Bartha. 1996. Solvent-augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2311-2316.
- Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*: 178-703.
- Lawrence, J.G. 2000. Clustering of antibiotic resistance genes: beyond the selfish operon. *ASM News*. 66: 281-286.
- Nakajima H., K. Kobayashi, M. Kobayashi, H. Asako & R. Aono. 1995. Overexpression of the *robA* gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2302-2307.
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*. 65, 725-759.
- Solano-Serena F., R. Marchal, T. Huet, J. M. Lebeault & J. P. Vandecasteele. 1999. Biodegradability of volatile hydrocarbons of gasoline. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54: 121-125.
- Springael D., L. Diels, L. Hooyberghs, S. Kreps & M. Mergeay. 1993. Construction and characterization of heavy metal-resistant haloaromatic-degrading *Alcaligenes eutrophus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 334-339.
- Trabelsi S., & M. R. Driss. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons in superficial coastal sediments from Bizerte Lagoon, Tunisia. *Mar. Pollut Bull.*, 50: 344-359.
- Ward D.M. Weller R., Bateson M.M. 1990. 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well studied thermal community. *FEMS Microbiol. Rev.*, 6, 105-115.
- Yoshida, M., K. Hamadi & A. Ghrabi. 2002. Solid waste landfills and soil/sediment contamination around Bizerte lagoon: Possible pollution sources. In: Ghrabi A., Yoshida M. (eds) *Study on Environmental Pollution of Bizerte Lagoon*. INRST-JICA Publishers: 55 p.