



## Article Original

# Biodégradation Aérobie du Gasoil par des Souches de Bacillus Sp et Sphingomonas Paucimobilis Isolées des Eaux des Plages de Kribi et Limbe, Cameroun

*Aerobic degradation of gasoline by strains of Bacillus sp and Sphingomonas paucimobilis isolated from the beach waters of Kribi and Limbe, Cameroon*

Ntsama E. Claudine<sup>1</sup>, Leme B. Lucie<sup>2</sup>, Abologo A. Larissa<sup>2</sup>, Tombedi Marie Christine<sup>2</sup>, Bilong Bilong Charles F<sup>2</sup>

## RÉSUMÉ

<sup>1</sup> Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales, Université de Yaoundé I

<sup>2</sup> Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I

**Corresponding author:**

Ntsama Essomba Claudine

Tel: (237) 6 99 54 08 35

e-mail : ntsamaclaudine@yahoo.fr

**Mots clés.** Biodégradation, gasoil, hydrocarbures, environnement, bactéries.

**Key words.** sport trauma – University games 2011- standard X-ray

**Introduction.** Les plages abritent de nombreuses activités humaines. Toutefois, leur intégrité est menacée par des polluants de natures diverses dont les hydrocarbures. Dans le but de contribuer à la préservation de l'environnement marin, une étude expérimentale consistant en la détermination des capacités de dégradation du gasoil commercial par des bactéries a été conduite. **Matériel et Méthodes.** L'activité, en aérobiose, sur du gasoil commercial, de souches de Bacillus sp et de Sphingomonas paucimobilis isolées des eaux de plage de Kribi et Limbe a été évaluée durant 35 jours. Le pourcentage de dégradation des hydrocarbures était par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier avec Réflexion Totale Atténuée. Les principaux indicateurs de biodégradation d'un hydrocarbure ont été mesurés. **Résultats :** Les deux souches bactériennes ont été capables de métaboliser les principaux hydrocarbures du gasoil. La durée de la phase de latence et le pourcentage de dégradation en fin d'expérience étaient fonction de la bactérie et de l'hydrocarbure. Les pourcentages de dégradation les plus élevés ont été observés vis-à-vis des hydrocarbures aliphatiques cycliques et le plus faible vis-à-vis des hydrocarbures aromatiques monocycliques. Les autres indicateurs atteignaient généralement des valeurs maximales au 20<sup>ème</sup> jour. **Conclusion.** Bacillus sp et de Sphingomonas paucimobilis seraient dotées d'oxygénases responsables de l'activité métabolique constatée. L'augmentation coordonnée des indicateurs de suivi suggère que les produits issus de la biodégradation du gasoil seraient utilisés pour la croissance bactérienne. Une association de ces deux microorganismes pourrait si elle s'avérait synergique ou additive être bénéfique.

## ABSTRACT

**Introduction.** Beaches play host to many human activities. However, their integrity is threatened by pollutants of various kinds, such as hydrocarbons. In order to contribute to the preservation of the marine environment, an experimental study was carried out, consisting of the determination of the degradation capacities of commercial gasoline by bacteria. **Material and Methods.** The activity, in aerobiosis, on commercial gasoline of strains of Bacillus sp and Sphingomonas paucimobilis isolated from the beach waters of Kribi and Limbe was assessed for 35 days. The percentage of degradation of the hydrocarbons was obtained by attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. The main indicators of biodegradation of a hydrocarbon were measured. **Results.** The two bacterial strains were able to metabolize the main hydrocarbons of gasoline. The duration of the lag phase and the percentage of degradation at the end of the experiment depended on the bacteria and the hydrocarbon. The highest percentages of degradation were observed with respect to the cyclic aliphatic hydrocarbons and the lowest with respect to the monocyclic aromatic hydrocarbons. The other indicators generally reached maximum values on the 20th day. **Conclusion.** Bacillus sp and Sphingomonas paucimobilis possess oxygenases responsible for the observed metabolic activity. The coordinated increase in monitoring indicators suggests that products derived from the biodegradation of gasoline would be used for bacterial growth. An association of these two microorganisms could be beneficial if it proved to be synergistic or additive.

## INTRODUCTION

La pollution du milieu marin par des hydrocarbures peut à court ou à long terme avoir des conséquences d'ordres physique, biologique, sanitaire et socio-économique. En effet, l'étalement d'un film d'hydrocarbures à la surface de la mer empêche notamment les échanges air/mer nécessaires à la mise en route de nombreux cycles géochimiques marins, (ITOPF, 2012). Par ailleurs, les hydrocarbures affectent la biologie des habitants aussi bien de la surface que de la profondeur des mers (Zakir et al., 2012). Ainsi mollusques, faune sessile, poissons, oiseaux et même reptiles, mammifères marins, meurent ou développent des mutations génétiques (Burt et al., 1992 ; Halpern et al., 2008, Zakir et al., 2012). S'agissant de l'homme, le contact, l'inhalation ou l'ingestion massive de produits pétroliers par consommation de certains animaux marins (contaminés avec des hydrocarbures peuvent provoquer des infections cutanées (Bert, 2002), des troubles gastro-intestinaux, respiratoires, hépatiques et rénaux (Gupta et al., 1993) voire des maladies plus graves en raison des effets cumulatifs (Ki-Hyun et al., 2013), des hydrocarbures tels que les aromatiques polycycliques ayant été qualifiés de hautement cancérigènes (Bing et al., 2011). Sur le plan socio-économique, des activités maritimes comme la baignade et la pêche sont entravées. L'identification des techniques ou méthodes de dépollution naturelles est du plus grand intérêt pour préserver l'environnement maritime. Dans le but de contribuer à la préservation de l'environnement marin, nous avons réalisé une étude expérimentale consistant en la détermination des capacités de dégradation du gasoil commercial par des bactéries.

## MATERIELS ET METHODES

La méthode utilisée était celle décrite par Leme et al. (2016) adaptée de celles d'Oudot (2000), de Fernando et al. (2009).

Les bactéries retenues étaient *Sphingomonas paucimobilis* et *Bacillus* sp, isolées des eaux des plages de Kribi et Limbé au Cameroun, et sélectionnées parmi d'autres, sur la base de trois critères à savoir un faible pouvoir pathogène (Mao et al. 2014 ; Opere et al. 2013), un métabolisme à caractère aérobie, et une bonne capacité à croître en présence du gasoil.

### *Choix de la concentration test du gasoil*

Dans une microplaque, des volumes croissants de 0,1 à 2 ml de gasoil, selon une progression géométrique de raison 2, ont été ajoutés respectivement à 2 ml d'une suspension de la bactérie étudiée, titrant environ 108 UFC/ml. Les concentrations de gasoil ainsi obtenues variaient de 5 à 100%. La plaque a ensuite été incubée durant 30 jours, à  $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Tous les 10 jours, 0,5 ml du contenu de chaque puits a étéensemencé par incorporation dans de la gélose marine synthétique. L'incubation a été effectuée à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  durant 24 heures. Les concentrations de gasoil en présence desquelles il était noté une colonisation bactérienne sur

au moins les 3/4 du diamètre de la boîte de Pétri ont été jugés peu toxiques et susceptibles d'être utilisées pour l'essai de biodégradation. Le volume et la concentration retenus pour l'essai ont été respectivement 7,5ml et 7,5% (v/v).

### *Essai de biodégradation aérobie du gasoil*

Dans un Erlenmeyer stérile, 100 ml de milieu Bushnell Haas Broth (BHB) ont été additionnés avec 10 ml de l'inoculum bactérien et 7,5 ml de gasoil. L'ensemble a été incubé, durant 35 jours, sous agitation à 125 rpm, à  $28,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . 5 ml de milieu réactionnel étaient prélevés quotidiennement pour les tests de détermination de suivi de la biodégradation. Un témoin comportant 100 ml du milieu BHB et 7,5 ml de gasoil ont été traités comme l'essai.

Le suivi consistait en la détermination des principaux indicateurs de biodégradation d'un hydrocarbure que sont la quantité de  $\text{CO}_2$  libéré, l'index d'émulsion E24, la croissance bactérienne, la densité optique et le pourcentage de biodégradation. La quantité de dioxyde dégagée a été mesurée en ppm au moyen d'un SPARK. L'index d'émulsion a été calculé selon la formule de Bodour et al. (2004). Une concentration bactérienne < 108 UFC/ml et une densité optique inférieure à 0,28 indiquaient une diminution de la croissance des bactéries.

Le pourcentage de biodégradation a été déterminé par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier à Réflexion Totale Atténuée (IRTF-ATR). L'échantillon était soumis durant 15 minutes à une centrifugation à 1000 rpm. Ensuite, 5 $\mu\text{l}$  de surnageant étaient prélevés et déposés sur le dispositif IRFT/ATR. Pour chaque échantillon, trois spectres de nombres d'ondes situés entre 400 et 4000  $\text{cm}^{-1}$  ainsi que 32 scans d'une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$  ont été enregistrés. Pour chaque spectre, les bandes de vibrations des principaux constituants hydrocarbonés du gasoil ont été identifiés. Les spectres obtenus ont été prétraités grâce au logiciel OriginPro 8.5 en intégrant la correction de la ligne de base (Eilers & Marx, 1996), la normalisation (Geladi et al. 1985) et les dérivations (Rinnan et al, 2009).

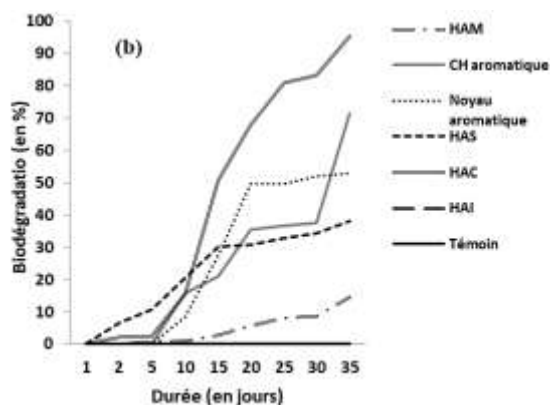
La prédiction des concentrations de gasoil a été effectuée au moyen des méthodes d'analyse chimiométrique. Les courbes de calibrage ont été construites avec diverses concentrations de gasoil en solution dans du chloroforme, choisi pour ses propriétés de solvant et ses longueurs d'ondes d'absorption dans l'infrarouge différentes de celles du produit pétrolier étudié (Stuart, 2004). Le modèle mathématique de transfert utilisé était basé sur la régression linéaire multiple notamment la régression des moindres carrés partiels (PLS). Les modèles de régression PLS (Partiel Least Square) de calibrage et de prédiction ont été élaborés avec le logiciel Unscrambler 9.7. Les variables utilisées étaient les nombres d'ondes sélectionnés. La fiabilité des modèles a été évaluée par la méthode du «cross validation», les calculs du coefficient de corrélation r, du  $R^2$  et du RMSEC (Root Mean square Error of Calibration). Après construction et validation de la courbe de

calibrage, les concentrations (en v/v ou %) du gasoil ont été prédites via l'équation globale suivante (Dumas, 2003):  $Concentration = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_p X_p + e_i$  avec  $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_p$  les coefficients de régression ;  $e_i$  le résidu et  $X_i$  les absorbances aux longueurs d'ondes considérées. Le pourcentage de biodégradation (% BD) a été par la suite déterminé par la relation :  $\% BD = 100 - [concentration]$ . Lorsque le coefficient de corrélation  $r$  et le  $R^2$  étaient proches de 1, le RMSEC (Root Mean square Error of Calibration) et le RMSEP (Root Mean square Error of Prediction) proches de 0, alors le modèle était performant et la valeur de la concentration prédite était fiable (Yang et al. 2010).

## RESULTATS

### Dégradation aérobie des principaux constituants hydrocarbonés du gasoil par *Bacillus sp.*

Tous les principaux hydrocarbures du gasoil ont été métabolisés par *Bacillus sp.* (figure 1).

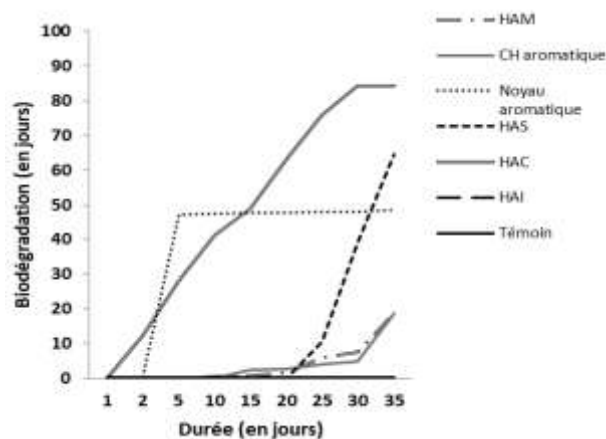


**Figure 1 :** cinétique de dégradation du gasoil par *Bacillus sp.*  
HAM : hydrocarbures aromatiques monocycliques ; LHA : liaisons CH des hydrocarbures aromatiques ; HAS : hydrocarbures aliphatiques saturés ; HAC : hydrocarbures aliphatiques cycliques

Il existait toujours une phase de latence dont la durée variait avec la nature de l'hydrocarbure. De 2 jours pour les hydrocarbures aliphatiques saturés (HAS) et les hydrocarbures aliphatiques cycliques (HAC) à 10 jours pour les liaisons CH des hydrocarbures aromatiques (LHA) et les noyaux des hydrocarbures aromatiques (NHA), en passant par 5 jours pour les hydrocarbures aromatiques monocycliques (HAM). La cinétique de dégradation variait aussi selon l'hydrocarbure. Le pourcentage de dégradation mesuré pour les HAM à J5, était bas (0,64). Il a faiblement varié jusqu'au 15<sup>ème</sup> jour d'incubation puis, a subi une légère augmentation pour atteindre la valeur de 14,57 au 35<sup>ème</sup> jour. Le pourcentage de début de dégradation des LHA était assez élevé (15,67%). Cette valeur a augmenté jusqu'à J20. Elle a ensuite stagné jusqu'à J30 pour doubler à J35 (71,36%). Le pourcentage de début de dégradation des NHA était égal à 8,49. Il a augmenté jusqu'au 20<sup>ème</sup> jour d'incubation et est ensuite resté stable jusqu'à la fin de l'expérience (52,85%). En ce qui concernait les HAS dont la

dégradation avait été mise en évidence au 2<sup>ème</sup> jour d'incubation avec un pourcentage non négligeable (6,72), il y a eu augmentation jusqu'au 15<sup>ème</sup> jour. Les valeurs sont restées stables jusqu'au 35<sup>ème</sup> jour. L'activité la plus efficace a été conduite sur les HAC dont la dégradation, débutée au 2<sup>ème</sup> jour d'incubation a augmenté régulièrement et a atteint 95,43% au 35<sup>ème</sup> jour.

En présence du gasoil, cette bactérie n'a produit que 10% d'émulsion au 1<sup>er</sup> jour ; celle-ci a augmenté progressivement et, a atteint 100% au 20<sup>ème</sup> jour de contact (figure 2).



**Figure 2 :** cinétique de biodégradation du gasoil par *Sphingomonas paucimobilis.*

HAM : hydrocarbures aromatiques monocycliques; HAS : hydrocarbures aliphatiques saturés ; HAC : hydrocarbures aliphatiques cycliques.

La production de CO<sub>2</sub> par *Bacillus sp.* a été intense. Ainsi à 20 jours de contact, les pics de production de CO<sub>2</sub> étaient de 3621,33 ppm en présence du gasoil. Au 20<sup>ème</sup> jour, on a dénombré un pic de croissance à  $1258 \times 10^5$  UFC/ml. Les valeurs de DO étaient élevées, avec un pic de 1,26 au 15<sup>ème</sup> jour.

Dégradation aérobie des principaux hydrocarbures du gasoil par *Sphingomonas paucimobilis*

Tous les principaux hydrocarbures du gasoil ont été métabolisés par *S. paucimobilis* (figure 2). Pour cette bactérie aussi, la cinétique de dégradation était fonction de la nature de l'hydrocarbure. Exception faite des HAC, l'activité de la bactérie s'est relevée faible avec des phases de latences longues et des pourcentages de dégradation en fin d'expérience assez bas. Ainsi, la durée de la phase de latence était respectivement de 2, 5, 10, 15 et 25 pour les HAC, les NHA, les HAM, les LHA et les HAS. Les profils cinétiques des HAM et des LHA étaient similaires. La valeur de pourcentage de début restait stable jusqu'à J30. Il y'avait ensuite une légère augmentation à J35. Les valeurs des pourcentages de dégradation en fin d'expérience étaient faibles. 18,61% pour les HAM et 18,65% pour les LHA. La dégradation des NHA débutait avec un pourcentage élevé (47,28%) lequel est ensuite resté stable jusqu'à la fin de l'expérience. La phase de

latence de la dégradation des HAS a été tardive. Toutefois, le pourcentage de dégradation a augmenté de façon exponentielle et a atteint, en fin d'expérience la valeur de 64,62. Quant aux HAC dont la dégradation était mise en évidence dès J2 avec un pourcentage de 12,05, la dégradation a évolué régulièrement et a atteint une valeur de 83,18% en fin d'expérience.

L'émulsion des polluants par *S. paucimobilis* a été progressive puis totale (100%) au 20ème jour pour le gasoil. Cette activité bactérienne a engendré une forte production de CO<sub>2</sub> qui a été maximale (14880 ppm) au 20ème jour. La croissance de la bactérie a été accentuée durant les 15 premiers jours. Ainsi la concentration maximale au 15ème jour était de 987 x 10<sup>5</sup>UFC/ml en présence du gasoil. Le pic de la densité optique, soit 1,76, a été enregistré au 25ème jour de l'expérience ; Les valeurs de densité optique étaient élevées.

## DISCUSSION

L'action de *Bacillus* sp. sur les hydrocarbures aromatiques monocycliques a été faible; Toutefois, cette bactérie dégradait les ¾ des LHA et la moitié des NHA. Cette bactérie posséderait des dioxygénases capables de s'associer aux NHA pour transformer les hydrocarbures aromatiques en catéchol (Ladino-Orjuela et al. 2016 ; Fan & Krishnamurthy, 1995). Le cycle de ce dernier composé s'ouvrirait alors pour que le pyruvate et le succinate formés soient utilisés par la bactérie comme source d'énergie à travers le cycle de Krebs (Wilson & Jones, 1993). *Bacillus* sp. a agi sur tous les constituants du gasoil certes avec des compétences variables. Cette activité serait liée à la brièveté des étapes de la formation des aldéhydes et des cétones lors de la transformation du gasoil. Tout se passait comme si les alcools ont directement été transformés en acides, ce qui a accéléré le processus de biodégradation. Hormis les HAC, les pourcentages de dégradation des principaux hydrocarbures du gasoil ont été inférieurs aux valeurs obtenues par Darsa et al. (2014), qui ont montré que *Bacillus subtilis* dégradait entre 80% et 89% du pétrole brut. Notre résultat suggère que les oxygénases de *Bacillus* sp. interviennent dans l'oxydation et la rupture du cycle des HAC (Brzostowicz et al. 2000 ; Opere et al., 2013). Pourtant, plusieurs études ont démontré que les HAC sont favorablement dégradés par co-métabolisme (Lee & Cho, 2008 ; Maier, 2009).

L'émulsion totale du gasoil à partir du 20ème jour d'expérience correspondrait à la période de grande activité bactérienne. En effet, on a observé des valeurs maximales de CO<sub>2</sub>, de croissance bactérienne et de DO entre 15 et 20 jours de contact ; ces données suggèrent que les produits issus de la biodégradation du gasoil ont été utilisés par *Bacillus* sp. pour sa multiplication.

L'activité de *S. paucimobilis* sur les HAC et les NHA du gasoil a débuté rapidement. Cela pourrait s'expliquer par le fait que lors de l'émulsion des produits pétroliers, cette bactérie libère des

biosurfactants dont le rôle sur l'adhésion bactérienne a été décrit plus haut (Matvyeyeva et al.2014 ; Maiqian et al., 2010). Toutefois, les pourcentages de dégradation en fin d'expérience étaient relativement faibles pour les HAM et les LHA en particulier. Ces résultats diffèrent de ceux décrits par Chuling et al. (2010), pour une souche de *Sphingomonas* sp, isolée des sédiments d'une mangrove en Chine qui dégradait 100% des hydrocarbures aromatiques en 7 jours. Ces auteurs avaient attribué cette activité à la présence chez *Sphingomonas* sp. des gènes nahAC et phnAC codant pour des dioxygénases actives sur les hydrocarbures aromatiques. Les pourcentages de dégradation en fin d'expérience les plus élevés ont été obtenus pour les HAS (64,62) et les HAC (84,18). Cette activité serait liée à la présence, des oxygénases. La forte production de CO<sub>2</sub>, les fortes DO et concentrations bactériennes enregistrées entre le 10ème et le 25ème jour de l'expérience ont été notées durant la période d'intense activité bactérienne qui induit une forte biodégradation du gasoil. *S. paucimobilis* utiliserait le gasoil comme source de carbone et d'énergie en dégradant progressivement ces produits en alcools, en acides et en éthers.

Malgré sa valeur scientifique, la mise en application, en environnement naturel des résultats obtenus au cours de cette étude pourrait être entravée par une faible maîtrise de la teneur en oxygène, en nutriments et en polluants autres que les hydrocarbures. Par ailleurs, les essais de biodégradation ayant été réalisés durant 35 jours, en système fermé, il serait possible d'envisager que pour certains hydrocarbures, les pourcentages de biodégradation obtenus soient plus élevés qu'en système ouvert.

## CONCLUSION

*Sphingomonas paucimobilis* et *Bacillus* sp sont capables de dégrader les principaux hydrocarbures du gasoil. Toutefois, la durée fixée pour l'expérience n'a pas favorisé l'atteinte d'une dégradation complète. Une association des deux microorganismes pourrait si elle s'avérait synergique ou additive être bénéfique pour la préservation de l'environnement en situation de déversements d'hydrocarbures.

## CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

NEC a œuvré à la conception de l'étude, au suivi des travaux et à la rédaction de l'article. LBL a réalisé les descentes sur le terrain, les manipulations au laboratoire et l'analyse des résultats. AAL et TMC ont participé à la collecte des échantillons et aux manipulations. CFBB a œuvré à la conception de l'étude et à l'analyse des résultats.

## CONFLIT D'INTERET

Les auteurs déclarent qu'il n'existe aucun conflit d'intérêt.

## REFERENCES

- 1- TOPF, 2012. Devenir des déversements d'hydrocarbures en mer: guide d'informations. 1 Oliver's yard, 55 city road, London EC1Y 1HQ, Royaume Uni: 2-11 p.
- 2- Zakir A. A., Desilva C. & Badesab S. 2012. Total petroleum hydrocarbon in the tissues of some commercially important fishes of the Bay of Bengal. *Marine Pollution Bulletin*, 64: 2564-2568.
- 3- Burt J. R., Hardy R. & Whittle K. J. 1992. Pelagic fish: the resource and its exploitation fishing. News Books, Oxford: 352 p.
- 4- Bert J. B. 2002. The wreckage of the oil tanker 'Erika' human health risk assessment of beach cleaning, sunbathing and swimming. *Toxicology Letters*, 128: 55-68.
- 5- Gupta P., Banerjee D. & Bhargava S. 1993. Prevalence of impaired lung function in rubber manufacturing factory workers exposed to benzo(a)pyrene and respirable particulate matter. *Indoor Environmental*, 2: 26-31.
- 6- Ki-Hyun K., Shamin A. J., Ehsanul K. & Richard J. C. B. 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*, 60: 71-80
- 7- Bing W., Yan Z., Xu-Xiang Z. & Shu-Pei C. 2011. Health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the source water and drinking water of China: quantitative analysis based on published monitoring data. *Science of the Total Environment*, 410: 112-118.
- 8- Oudot J. 2000. Biodégradabilité du fuel de l'Erika. *Microbiologie*, 923: 945-950.
- 9- Fernando B. L., Sanz R., Carmen M.M., Gonzalez M. & Sanchez D. 2009. Effect of different non ionic surfactants on the biodegradation of PAHs by diverse aerobic bacteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63: 913-92
- 10- Leme Banock L., Ntsama E. C, Raducanu D., Caraman I., Abologo A. L. & Bilong B. C. F. 2016. Gasoline and diesel aerobic biodegradation investigated by spectral and chemometrics techniques. *Environmental Engineering and Management Journal*, 15: 605-612.
- 11- Mao C. D., Jing L., Fu-Rui L., Meisheng Y., Xiao-Ming X., Juan P., Chou-Fei W., Jiang-Hai W. & Jian-Ping Y. 2014. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. *Marine Pollution Bulletin*, 83: 79-86.
- 12- Opere B. O., Oluwafemi S. O. & Adebajji A. R. 2013. Degradation of cyclohexane and cyclohexanone by *Bacillus lentus* strain LP32. *African Journal of Biotechnology*, 12:6632-6635.
- 13- Bodour A., Drees K. P. & Maier R. M. 2004. Distribution of biosurfactant producing bacteria in disturbed and contaminated arid southwestern soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 3280-3287
- 14- Eilers P. & Marx B. 1996. Flexible smoothing with b-splines and penalties. *Statistical Science*, 11: 89-121.
- 15- Geladi J. P., MacDougal D. & Martens H. 1985. Linearization and scatter correction for near infrared reflectance spectra of meat. *Applied Spectroscopy*, 39: 491-500
- 16- Rinnan A., Berget V. A. F. & Balling E. S. 2009. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *Analytical Chemistry*, 28: 1201-1222.
- 17- Stuart B. 2004. Infrared spectroscopy : Fundamentals and applications. In *Analytical techniques in the Sciences*. Ed John Wiley & Sons, Ltd ISBNs: 0-470-85427-8 (HB); 0-470-85428-6 (PB): 15-132 p.
- 18- Dumas S. 2003. Dosage du polymorphisme spectrométrie IRTF et chimiométrie: application aux formes polymorphes du CL20 (Hexaazaheptanitrosowurtzitane/ HNIW). Thèse de Doctorat de l'Université Claude Bernard-Lyon I, France : 110-204 p.
- 19- Yang M., L., Nie S., Hu J., Yu Q., Xie M., Xiong H., Den Z. & Zheng W., 2010. Rapid determination of docosahexaenoic acid in powdered oil by near infrared spectroscopy. *Food Science and Technology International*, 16: 187-193.
- 20- Ladino-Orjuela G., Gomes E., Da Silva R., Salt C., Parsons J. R. 2016. Metabolic pathways for degradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 237:105-21.
- 21- Fan C.Y. & Krishnamurthy S. 1995. Enzymes for enhancing bioremediation of petroleum contaminated soils. *Journal air Waste Manage Assessment*, 45: 453-460.
- 22- Wilson S. C. & Jones K. C. 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Environmental Pollution*, 81: 229-249.
- 23- Darsa K.V., Thatheyus A. J. & Ramya D. 2014. Biodegradation of petroleum compound using the bacterium *Bacillus subtilis*. *Science International*, 2: 20-25.
- 24- Brzostowicz P. C., Gibson K. I., Thomas S., Blasko M. S. & Rouviere P. 2000. Simultaneous identification of two cyclohexanone oxidation genes from an environmental *Brevibacterium* isolate using mRNA differential display. *Journal of Bacteriology*, 182: 4241-4248.
- 25- Lee E. H. & Cho K. S. 2008. Characterization of cyclohexane and hexane degradation by *Rhodococcus* sp. EC1. *Chemosphere*, 7: 1738-1744.
- 26- Maier R. M. 2009. Microorganisms and organic pollutants. In: Maier RM, Pepper IL, Gerba CP (eds) *Environmental Microbiology*, 2nd Edition, Academic Press, Burlington: 387-420 p.
- 27- Matvyeyeva O. L., Vasylichenko O. A. & Aliieva O. R. 2014. Microbial biosurfactants role in oil products biodegradation. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 2: 69-74
- 28- Maiqian N., Xihou Y., Chunyan R., Yang W., Feng X. & Qirong S. 2010. Novel rhamnolip biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3. *Biotechnology Advances*, 28: 635-643.
- 29- Chuling G., Zhi D., Yukshan W. & Fungyee N. T. 2010. Biodegradation ability and dioxygenase genes of PAH-degrading *Sphingomonas* and *Mycobacterium* strains isolated from mangrove sediments. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64: 419-426;