

THÈSE
UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR
École doctorale des Sciences Exactes et de leurs Applications
(ED211)

Présentée et soutenue le 15 décembre 2014
par **Fanny TERRISSE**

pour obtenir le grade de docteur
de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour

**Spécialité : Physiologie et biologie des organismes-populations-
interactions Microbiologie**

***Influence des oscillations anoxie/oxie
sur des communautés microbiennes
hydrocarbonoclastes de sédiments intertidaux***

MEMBRES DU JURY

RAPPORTEURS

- **Christine Dupuy**
- **Guillermina Hernandez-Raquet**

Pr / LIENSs – CNRS-UMR 7266
DR / LISBP – INRA

EXAMINATEUR

- **Philippe Cuny**

Pr / MIO – CNRS-UMR 7294

MEMBRE INVITÉ

- **Ronan Jézéquel**

Dr / CEDRE

DIRECTEURS

- **Robert Duran**
- **Cristiana Cravo-Laureau**

Pr / CNRS-UMR IPREM 5254
Dr / CNRS-UMR IPREM 5254



« *Celui qui sait qu'il ne sait pas, éduque-le.*
 Celui qui sait qu'il sait, écoute-le.
 Celui qui ne sait pas qu'il sait, éveille-le.
Celui qui ne sait pas qu'il ne sait pas, fuis-le. »

- Proverbe chinois -

Remerciements

Ces travaux ont été réalisés au sein de l'Equipe Environnement et Microbiologie de l'Institut des Sciences Analytiques et de Physico-chimie pour l'Environnement et les Matériaux de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour. Mes remerciements vont en premier lieu au Professeur Robert Duran pour m'avoir accueillie dans cette équipe.

Je tiens également à remercier le Pr. Christine Dupuy, de l'Institut du Littoral et de l'Environnement (LIENSs - UMR 7266 CNRS-Université de la Rochelle) et le D.R. Guillermina Hernandez-Raquet, du laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP - Institut National de la Recherche Agronomique, Toulouse), pour avoir accepté de juger ce travail. Je remercie également le Pr. Philippe Cuny, de l'Institut Méditerranéen d'Océanologie (MIO - UMR CNRS 7294 OSU Institut Pythéas Aix-Marseille Université) et le Dr. Ronan Jézéquel, du Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux (CEDRE, Brest), d'avoir accepté de faire partie du jury.

Mes remerciements vont également à mes deux directeurs de thèse, le Pr Robert Duran et le Dr. Cristiana Cravo-Laureau pour m'avoir encadrée au cours de ce doctorat. Merci pour le temps que vous avez pu me consacrer, les directives et conseils que vous m'avez apportés, ainsi que pour la confiance et la liberté que vous m'avez laissées. Merci également pour les diverses opportunités de formations et de congrès.

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le CEDRE, à Brest. Je remercie le Dr. Ronan Jézéquel et Karine Duboscq pour le temps qu'ils m'ont consacré et leur aide lors de ma venue au CEDRE pour l'analyse de mes échantillons. Merci à Romaric de m'avoir aidée à finir la préparation des échantillons. J'ajoute un clin d'œil à toute l'équipe du CEDRE que j'ai pu côtoyer pendant quelques temps pour leur accueil chaleureux. Des remerciements à la société Normandie Appâts, qui a fourni les polychaetes.

Je remercie également les autres partenaires du projet de l'Institut Méditerranéen d'Océanologie de l'Université d'Aix-Marseille (MIO, Marseille), du laboratoire écologie fonctionnelle et environnement de l'Université Toulouse III (EcoLab UMR 5254 CNRS-UPS-INPT, de l'Equipe de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement (IPREM-LCABIE UMR CNRS 5254) et de l'Ecole des Sciences Biologiques de l'Université d'Essex (School of Biological Sciences, Colchester, UK). Avec un clin d'œil au Dr. Terence McGenity et au Dr. Alex Dumbrell pour leur accueil et leur aide.

Je remercie également le D.R. Dominique Patureau, de l'INRA de Narbonne, pour avoir eu la gentillesse de me prêter les réacteurs. Des remerciements particuliers pour l'Atelier de physique de l'Université pour l'entretien des réacteurs entre les différentes expérimentations et les interventions d'urgences. Je remercie Philippe Bontempi de la société Verre Vagner ainsi que Eddy Lasseur de l'IPREM pour les différentes pièces fournies, parfois en urgence. Mes remerciements vont également à Bertrand Faisencieu pour m'avoir permis de réaliser des séries d'expérimentations en bioréacteurs dans les locaux de l'IPRA.

Je remercie bien sûr tous les membres du laboratoire qui ont eu la gentillesse de m'apporter leur aide, et leurs conseils tout au long de ces trois ans, en remerciant particulièrement Florence et Claire pour votre aide et votre disponibilité. Carole, j'ai également beaucoup apprécié ta disponibilité, ton écoute et ta compréhension. Je remercie Jean-Christophe d'avoir répondu à mes questions lorsque j'étais démunie face à la bio-informatique. Un grand merci à Magalie et Anthony pour votre gentillesse et votre bonne humeur, votre écoute et vos conseils. Merci également à Karima Bergeroo-Campagne et Maud Ezan pour leur aide lors de mon co-encadrement de séances de TP et pour le matériel prêté pour la mise en place des expérimentations en bioréacteurs.

Petite dédicace à tous les thésards côtoyés au cours de cette thèse, ainsi que Isabelle et Paul, une bonne équipe qui a su s'entraider et avec qui j'ai passé également de très bons moments en dehors du labo. Une pensée particulière pour mes compatriotes de 3^{ème} année : Arantxa, Johanne et Fabien, je vous remercie de tous ces moments que l'on a pu vivre ensemble. Merci à Mathilde Gondard qui m'a fait découvrir l'encadrement et qui m'a apportée son aide lors de son stage de Master 2.

Une pluie de remerciements à toutes les personnes qui m'ont soutenue jusqu'ici et plus particulièrement ces trois années. Je remercie ma famille pour leur présence, leur aide, leur confiance et leurs encouragements quotidiens. Je remercie également mes amis qui m'ont permis de m'aérer l'esprit et de garder un pied sur Terre. Enfin, merci à toi Bruno d'avoir participé au collage de plus de 3670 étiquettes, parfois même les dimanches après-midi.... Mais plus sérieusement, je tiens surtout à te remercier pour ta patience, ton soutien moral, ta tendresse, je ne serais jamais arrivé jusque-là sans toi. Tu as toujours été là pour moi et je ne te remercierai jamais assez pour cela. Merci d'être présent.

Merci à tous

Sommaire

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
LISTE DES FIGURES ET TABLES	13
INTRODUCTION	21
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	27
1. Les environnements côtiers : exemple des sédiments intertidaux, lieu aux fonctions écologiques multiples	27
1.1. Généralités.....	27
1.1.1. Caractéristiques physiques.....	27
1.1.2. Caractéristiques écologiques.....	29
1.1.3. Les groupes fonctionnels procaryotes majeurs au sein des sédiments intertidaux.....	30
1.1.3.1. Les micro-organismes photosynthétiques oxygéniques	30
1.1.3.2. Les bactéries hétérotrophes aérobies.....	31
1.1.3.3. Les micro-organismes sulfato réducteurs	32
1.1.3.4. Les micro-organismes dénitrifiants.....	33
1.1.3.5. Les autres groupes fonctionnels.....	34
1.2. Ecosystèmes à l'interface eau/sédiment, caractérisés par une remarquable hétérogénéité	35
1.2.1. L'interface eau/sédiment : zone de diffusion et de transition.....	36
1.2.2. La bioturbation.....	37
1.2.2.1. Processus modifiant la distribution sédimentaire.....	38
1.2.2.2. Processus modifiant les conditions environnementales.....	39
1.2.3. Les contraintes physiques de remaniement.....	40
1.3. Minéralisation de la matière organique : compartimentation des processus biogéochimiques	42
2. Ecosystèmes soumis à des conditions environnementales fluctuantes : capacités de réponse et d'adaptation des communautés microbiennes	45
2.1. Réponse écologique des communautés microbiennes face aux variations des conditions environnementales.....	45
2.2. Réponse aux fluctuations oxie/anoxie des conditions environnementales.....	47
2.2.1. Relations des micro-organismes à l'oxygène	47
2.2.2. Effet de l'oxygène sur des micro-organismes pendant longtemps qualifiés d'anaérobies stricts	49
2.2.2.1. Micro-organismes sulfato-réducteurs et oxygène	49
2.2.2.2. Micro-organismes méthanogènes et oxygène	50
2.3. Réponse aux perturbations d'origines anthropiques, avec les hydrocarbures comme polluant majeur	50
2.3.1. Pourquoi le pétrole est-il toxique ?.....	51
2.3.1.1. Composition du pétrole brut.....	51
2.3.1.2. Impact sur le vivant.....	53
2.3.2. Lorsque les hydrocarbures pétroliers menacent l'environnement suite à un déversement	55
2.3.3. Sélection des micro-organismes hydrocarbonoclastes en réponse à la pollution.....	57

3. Les communautés microbiennes d'environnements côtiers pollués aux hydrocarbures : dynamique et fonction des micro-organismes hydrocarbonoclastes	58
3.1. Les groupes fonctionnels impliqués dans la dégradation	59
3.1.1. Les bactéries aérobies hydrocarbonoclastes	59
3.1.2. Les bactéries anaérobies hydrocarbonoclastes	60
3.1.2.1. Les bactéries dénitrifiantes	61
3.1.2.2. Les bactéries sulfato-réductrices	61
3.1.2.3. Autres métabolismes	61
3.1.3. Combinaison de différents taxons pour la transformation de polluants complexes	62
3.2. Dégradation des hydrocarbures en condition oscillante oxic/anoxie	63
3.3. Dynamique des communautés microbiennes hydrocarbonoclastes, influence des oscillations oxic/anoxie	64
4. Compréhension de l'écologie des communautés hydrocarbonoclastes des écosystèmes côtiers, apport des technologies « -omiques »	66
4.1. L'expérimental au service du décryptage des processus mis en place in situ	67
4.2. Analyse de la diversité microbienne pour la compréhension des facteurs contrôlant sa structuration	69
4.2.1. Diversité de la communauté globale	69
4.2.2. Diversité de groupes fonctionnels ciblés	72
4.3. Caractérisation des capacités fonctionnelles de la communauté : génomiques fonctionnelle, méta-génomique et méta-transcriptomique	73
4.4. L'apport des études en réseaux pour la compréhension des interactions entre micro-organismes sous l'influence des facteurs environnementaux	74
5. Objectifs de la thèse	76

CHAPITRE II : PROCEDURES EXPERIMENTALES81

1. Matériel d'étude	82
1.1. Site de prélèvement : l'Aber Benoît dans le Finistère	82
1.2. Expérimentation en mésocosmes	83
1.2.1. Mise en place du dispositif expérimental	83
1.2.2. Traitements	85
1.2.2.1. Ajout du pétrole dans les mésocosmes	85
1.2.2.2. Ajout des polychaetes	87
1.2.2.3. Hersage de la surface des sédiments	88
1.3. Stratégie d'échantillonnage	89
1.3.1. Echantillonnage pour les analyses chimiques	89
1.3.2. Prélèvements du matériel d'étude	90
2. Mise en place d'expérimentations en bioréacteurs pour l'étude d'impact des oscillations anoxie/oxie sur des communautés microbiennes issues de sédiments intertidaux pollués par du pétrole	90
2.1. Introduction	91
2.2. Materials	92
2.2.1. Bioreactor systems (Figure 27)	92
2.2.2. Culture medium, solutions and reagents	93
2.3. Methods	93
2.3.1. Culture medium	94
2.3.2. Bioreactor experiments set up and experimental conditions	94
2.3.3. Sampling for biological and chemical analyses	95
2.4. Notes	96
2.5. Acknowledgements	97

2.6.	References	97
3.	Incubations sous différents régimes d'oxygénation	98
3.1.	Conditions expérimentales	98
3.2.	Prélèvements d'échantillons	99
3.2.1.	Echantillons pour les analyses chimiques	99
3.2.2.	Echantillons pour les analyses moléculaires	100
4.	Analyses chimiques : quantification des hydrocarbures en réacteurs.....	100
4.1.	Dosage des hydrocarbures pétroliers totaux et des n-alcanes et HAPs d'intérêt dans les échantillons de sédiment	101
4.1.1.	Extraction assistée par ASE Dionex	101
4.1.2.	Analyse en chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse	102
4.2.	Dosage des HAP dans les échantillons d'eau par SBSE-GC/MS	102
4.2.1.	Extraction SBSE des HAP dissous	102
4.2.2.	Analyse par SBSE-GC/MS	103
4.3.	Quantification et traitement des données	103
5.	Outils moléculaires	104
5.1.	Extraction des acides nucléiques	104
5.2.	Contrôle de la qualité, de la taille et détermination de la concentration des acides nucléiques	104
5.2.1.	Par électrophorèse en gel d'agarose	105
5.2.2.	Par électrophorèse en micro-capillaire.....	105
5.2.3.	Quantification au marquage fluorescent SYBR Green	106
5.3.	Transcription inverse des ARN.....	106
5.4.	Réactions de polymérisation en chaîne (PCR), en temps final	107
5.4.1.	Amplification par PCR	107
5.4.2.	Purification des produits de PCR	108
5.5.	Quantification par PCR en temps réel	108
5.5.1.	Génération de standards externes pour la quantification par PCR en temps réel.....	109
5.5.1.1.	Standard pour la quantification de l'ADN	109
5.5.1.2.	Standard pour la quantification de l'ADNc	110
5.5.2.	Amplification en temps réel	110
5.5.3.	Analyse de la PCR en temps réel	111
5.6.	Analyses moléculaires de la diversité	111
5.6.1.	Analyse de la diversité bactérienne et intérêt pour les micro-organismes sulfato-réducteurs	112
5.6.1.1.	Pyroséquençage et technique du 454 (Roche)	112
	Procédure expérimentale :	113
5.6.1.2.	Séquençage MiSeq (Illumina)	114
	Procédure expérimentale :	115
5.6.2.	Traitement des données de séquençage haut-débit	116
5.6.2.1.	Traitement des données de 454.....	116
5.6.2.2.	Traitement des données de MiSeq	116
6.	Estimation de l'effet de la condition d'incubation sur les communautés microbiennes.....	117
6.1.	Analyses de la variance	117
6.1.1.	Modèles linéaires mixtes des effets des paramètres.....	117
6.1.2.	Modèle multivarié de l'effet des paramètres : PerMANOVA.....	118
6.2.	Test de corrélation de deux variables : Pearson	118
6.3.	Indices pour la quantification de la biodiversité	119
6.3.1.	Estimation de l'indice de recouvrement (C, coverage value).....	119
6.3.2.	Estimation de la diversité.....	119
6.3.2.1.	Diversité spécifique ou richesse spécifique	120
6.3.2.2.	Diversité α	120
6.3.2.3.	Diversité β	120

6.4.	Analyse Multidimensionnelle non-métrique (NMDS).....	121
6.5.	Analyse de « co-occurrence » : utilisation d'un modèle probabiliste	122

CHAPITRE III : EFFET STRUCTURANT DE DIFFERENTES CONDITIONS D'OXYGENATION SUR UNE COMMUNAUTE MICROBIENNE HYDROCARBONOCLASTE DE SEDIMENTS INTERTIDAU..... 125

1.	Introduction	125
2.	Effet structurant de différentes conditions d'oxygénation sur une communauté microbienne hydrocarbonoclaste de sédiments intertidaux	127
2.1.	Introduction.....	128
2.2.	Materials and methods.....	129
2.2.1.	Polluted coastal sediments sample.....	129
2.2.2.	Slurry preparation	129
2.2.3.	Bioreactors systems and experiment set up	130
2.2.4.	Sample collection.....	130
2.2.5.	Hydrocarbon analysis.....	131
2.2.6.	Total DNA and RNA co-extraction	132
2.2.7.	Reverse transcription of rRNA	133
2.2.8.	Quantitative-PCR amplification of DNA and cDNA	133
2.2.9.	DNA and cDNA 16S rRNA gene sequencing	134
2.2.10.	Sequence read analysis	134
2.2.11.	Statistical analysis	135
2.3.	Results and discussion	136
2.3.1.	Oxygenation and redox status during incubations	136
2.3.2.	Hydrocarbon biodegradation capacity.....	137
2.3.3.	Bacterial activity during incubation: correlation with the phenanthrene degradation linked to oxygen addition.....	140
2.3.4.	Bacterial communities analysis	142
2.3.4.1.	Influence of oxygenation conditions on richness and diversity	142
2.3.4.2.	Influence of oxygenation conditions on structure and composition of bacterial communities	144
2.4.	Conclusion	151
2.5.	References.....	151
3.	Conclusion du chapitre	155

CHAPITRE IV : REPONSES DE DIFFERENTES COMMUNAUTES MICROBIENNES DE SEDIMENTS INTERTIDAU AUX OSCILLATIONS ANOXIE/OXIE, INTERET POUR LES MICRO-ORGANISMES SULFATO-REDUCTEURS 159

1.	Introduction	159
2.	Réponses de différentes communautés microbiennes de sédiments intertidaux aux oscillations anoxie/oxie, intérêt pour les micro-organismes sulfato-réducteurs	161
2.1.	Introduction.....	162
2.2.	Materials and methods.....	163
2.2.1.	Hydrocarbonoclastic microbial communities sampling	163
2.2.2.	Bioreactor experiments set up and experimental conditions.....	164
2.2.3.	Hydrocarbon analysis.....	165
2.2.4.	Total DNA and RNA co-extraction	165
2.2.5.	Reverse transcription of total RNA.....	166
2.2.6.	Quantitative-PCR amplifications	167

2.2.7.	Bacterial diversity analysis	167
2.2.8.	Functional gene <i>dsrB</i> diversity analysis	168
2.2.9.	Statistical analysis	169
2.3.	Results and discussion.....	170
2.3.1.	Structural responses of the different bacterial communities under different conditions of oxygenation	170
2.3.2.	Different structural responses of the metabolically active bacterial communities under anoxic/oxic oscillating conditions and influence on the hydrocarbon-degradation capacities.....	171
2.3.3.	Different microbial compositions explaining the different ecological responses to anoxic/oxic oscillations.....	174
2.3.4.	Co-occurrence analyses to assess to the global organization of the main OTUs within the microbial network under anoxic/oxic oscillating conditions.....	177
2.3.5.	SRM communities dynamics in anoxic/oxic oscillating conditions	179
2.3.5.1.	Activity comparison of SRM communities from the three microbial communities under oscillating conditions.....	179
2.3.5.2.	Structure comparison of SRM communities from the three microbial communities during incubations.....	180
2.3.5.3.	Composition of SRMs community from the three communities under oscillating conditions..	181
2.4.	Conclusion.....	183
2.5.	References.....	184
3.	Conclusion du chapitre.....	189
 CHAPITRE V : CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		193
 ANNEXE.....		197
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		211

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique.

ADNc : ADN complémentaire.

ANR : Agence Nationale pour la Recherche.

ARN : Acide ribonucléique.

ARNr : ARN ribosomique.

BET : Bromure d'éthidium.

Bp / pb : Base pair / paire de bases.

BPA : Bactéries Phototrophes
Anoxygéniques.

DEPC : DiEthyl PyroCarbonate.

dNTP : Désoxyribonucléotides
triphosphates.

EPS : Extracellular Polymeric Substances.

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse
couplée à un spectromètre de masse (« Gas
Chromatography – Mass Spectrometer »).

HAP / PAH : Hydrocarbure aromatique
polycyclique / Polycyclic aromatic
hydrocarbon.

ID : Internal Diameter.

LIF : Fluorescence induite par laser (« Laser
Induced Fluorescence »).

MES : Matière En Suspension.

MO : Matière Organique.

nMDS : Non-metric Multidimensional
Scaling.

ORP : Oxydo-Reduction Potential.

OTU : Operational taxonomic unit.

PCSO : Procaryotes Chimiolithotrophes
Sulfo-Oxydants.

PCR : Polymerase chain reaction.

PDMS : PolyDiMéthylSiloxane.

Rpm : Rotation par minute (unité de mesure).

SARA : Saturés, Aromatiques, Résines et
Asphaltènes.

SBS : Séquençage par synthèse (“Sequencing
by Synthesis”).

SIM : Single Ion Mode.

SOD : Superoxyde Dismutase.

SOR : Superoxyde Réductase.

SRB/SRM : Sulfate-reducing bacteria /
Sulfate-reducing micro-organisms.

TDU : Unité de désorption thermique
(« Thermal Desorption Unit »).

TPH : Hydrocarbures pétroliers totaux
(« Total Petroleum Hydrocarbons »).

UCM : Mélange complexe non résolu
(« Unresolved Complex Mixture ») en
chromatographie.

Liste des figures et tables

Chapitre I :

- Figure 1 : Modèle conceptuel de zone intertidale. Issu du site internet de OzCoasts (Geoscience Australia) http://www.ozcoasts.gov.au/conceptual_mods/processes/habprov.jsp 28
- Figure 2 : Diagramme conceptuel du biofilm microbien (A) se formant à la surface des sédiments intertidaux (Decho, 2000) et photographies (Stal, 2010) d'un tapis de cyanobactéries (B) et d'un biofilm de diatomées (C)..... 31
- Figure 3 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences quasi complètes du gène de l'ARNr 16S des espèces décrites chez les micro-organismes sulfato-réducteurs (Muyzer and Stams, 2008). Le nombre apparaissant sur les clusters repliés correspond au nombre d'espèces différentes à l'intérieur de ce groupe. L'échelle correspond à une dissimilarité de séquence de 10%..... 32
- Figure 4 : Représentation schématique de la structuration verticale des accepteurs d'électrons dans les différentes zones des sédiments et des métabolismes microbiens associés (Kristensen, 2000)..... 37
- Figure 5 : Schéma conceptuel des connaissances acquises sur les cycles biogéochimiques dans un sédiment bioturbé (A) en comparaison à un sédiment non bioturbé (B) (Stauffer, 2011). 40
- Figure 6 : Modèle conceptuel des propriétés des sédiments et des processus qui affectent l'érodabilité des sédiments. Les différents facteurs intervenant sont liés, et l'impact net d'un des facteurs sur l'érodabilité naturelle des sédiments est dépendant des interactions entre les différents facteurs (Grabowski *et al.*, 2011)..... 41
- Figure 7 : Schéma conceptuel, d'après Bauer *et al.* (2013), représentant le flux et le cycle du carbone, largement influencés par les processus de sédimentation et de remise en suspension de matière dans les écosystèmes côtiers..... 42
- Figure 8 : Représentation schématique des interactions environnement/physiologie microbienne, composition de la communauté et processus de l'écosystème (modifié d'après Schimel *et al.*, 2007). 45
- Figure 9 : Schéma conceptuel de l'effet d'une perturbation sur les communautés microbiennes (Allison and Martiny, 2008)..... 46
- Figure 10 : Schéma descriptif des différents besoins en oxygène des micro-organismes..... 48
- Figure 11: Classification opérationnelle des composants du pétrole brut sur la base du système de fractionnement SARA (Saturés-Aromatiques-Résines-Asphaltènes), avec une des structures représentatives pour chaque fraction. D'après McGenity (2014), modifié de Whitby (2010)..... 52
- Figure 12 : Schéma conceptuel des processus intervenant dans le devenir des composés pétroliers en milieu marin et échelle de temps associée. D'après Miralles (2007). 55

Figure 13 : Métabolismes impliqués dans l'utilisation des hydrocarbures par les micro-organismes. D'après Widdel and Rabus (2001).....	59
Figure 14 : Arbre phylogénétique illustrant la diversité des bactéries aérobies ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures (Head <i>et al.</i> , 2006).....	60
Figure 15 : Schéma conceptuel de l'organisation du réseau microbien impliqué dans la dégradation du pétrole (Head <i>et al.</i> , 2006). Les bactéries qui dégradent les hydrocarbures sont indiquées en vert et ceux ne le dégradant pas sont représentés en jaune. Les flèches pleines indiquent les flux de matière, et les flèches en pointillé indiquent les interactions directes (par exemple, la lyse par phage et la prédation par les protozoaires).	62
Figure 16 : Représentation schématique des changements dans la composition d'un pétrole et des changements correspondants de l'abondance d'organismes clé de la dégradation d'hydrocarbures (Head <i>et al.</i> , 2006).....	66
Figure 17 : Schéma comparatif des plateformes séquenceurs haut-débit de 2 ^{ème} génération (Schéma élaboré d'après Glenn (2011) et mis à jour en 2013; http://www.biorigami.com).	71
Figure 18 : Sous-réseaux réalisés par J.A. Gilbert et ses collaborateurs (2012), à partir des 50 OTU bactériens les plus représentés dans leur étude, représentant des variables fortement corrélées construites autour des facteurs environnementaux.....	75

Chapitre II :

Figure 19 : Schéma descriptif de l'approche expérimentale et des analyses associées, mises en place afin de répondre aux objectifs du projet de thèse. Cette approche se déroulant en deux étapes : une expérimentation d'incubation des sédiments intertidaux en mésocosmes (1) pour l'obtention des différentes communautés, qui ont, par la suite, été incubées sous différents régimes d'oxygénations lors d'une expérimentation en bioréacteurs (2).....	81
Figure 20: Localisation géographique du site de prélèvement dans l'aber Benoît au niveau de la commune de Tréglonou.  : Limite de l'aber.  : Limite de la zone du fleuve de l'Aber-Benoît sous influence océanique.  :	82
Figure 21 : Schéma descriptif de la stratégie d'échantillonnage par carottage de 12 blocs de sédiments vaseux avec un système de « boîte d'allumette » permettant de préserver la structuration verticale du sédiment.	84
Figure 22 : Composition SARA du pétrole de type Oural et proportion (en %) de la part dégradable de chaque fraction estimée suivant la méthodologie décrite par IMO (2004)..	86
Figure 23 : Photographie de la procédure d'ajout de pétrole dans le sédiment de surface des mésocosmes pollués (photos du CEDRE).....	87
Figure 24 : Photographies de l'ajout des <i>polychaetes Hediste diversicolor</i> (à gauche) et du mésocosme après l'ajout des luminophores (à droite) pour la condition « pétrole + bioturbation » (photos du CEDRE).	88

Figure 25 : Photographie du résultat du remaniement physique de la surface des sédiments par hersage pour la condition « <i>pétrole + hersage</i> » (Photo du CEDRE).	88
Figure 26 : Photographie du dispositif expérimental récréant le cycle des marées, mis en place pour l'incubation de sédiments côtiers non-déstructurés sous différents traitements de remaniement du sédiment (Hangar expérimental du CEDRE, Brest).	89
Figure 27: Schematic representation (A) and photography of bioreactor (B). 1, Filtered air or nitrogen gas injection; 2, Dissolved oxygen and temperature probe; 3, Inlet with pH/redox potential probe; 4, Transmitter connected to probes; 5, Syringe connected by Norprene food process tubing (NORPRENE® Alimentary Øi 4.8mm and Øo 8.0mm; Saint-Gobain performance plastics) to a stainless steel perforated extracting tube to collect samples; 6, Stirring system.	92
Figure 28: (A) Example of time scale of the experimental conditions. The first five days allows to stabilize the microbial communities, under oxic or anoxic conditions (for the permanent anoxic condition and the oscillating conditions) before addition of crude oil and starting anoxic/oxic oscillations for the oscillating conditions. Anoxic/oxic oscillations consist in an alternation between anoxic periods and periods of aeration of one-day at days 7 and 10. Dashed lines show sampling times. (B) Profiles of parameters followed in the anoxic/oxic oscillating conditions (T° , temperature; pH; O_2 , oxygen; E_h , redox).	95
Figure 29 : Schéma descriptif du plan expérimental des incubations en bioréacteurs pour l'incubation en bioréacteurs de chaque sédiment pollué issus des mésocosmes, sous des conditions oscillantes anoxie/oxie en comparaison à des conditions permanentes d'anoxie ou d'oxie.	99
Figure 30 : Schéma descriptif de la procédure de préparation des échantillons pour l'extraction et l'analyse des composés pétroliers.	100
Figure 31 : Schéma descriptif du procédé d'extraction séquentielle par solvant à température et pression élevées réalisé par l'appareil Dionex ASE™ 350 Accelerated Solvent Extractor system représenté par la photographie.	101
Figure 32 : Procédure d'extraction et d'analyse des HAP en phase aqueuse par l'approche SBSE-GC/MS. (A) Adsorption des HAP sur le revêtement des barreaux SBSE. (B) Analyse des HAP en GC/MS suite à leur désorption de la phase polymérisée dans l'unité de désorption thermique (TDU) et leur concentration dans la zone de refroidissement avant injection dans la colonne GC. Modifié d'après (Skogerson <i>et al.</i> , 2011).	103
Figure 33 : Schéma descriptif de la procédure d'analyse de la qualité et de la concentration des échantillons d'ARN extraits par l'utilisation d'une puce (A) RNA 6000 Nano LabChips et d'un bioanalyseur (B) Agilent 2100 (Agilent Technologies), consistant en une analyse d'électrophorèse en micro-capillaire (C).	105
Figure 34 : Schéma descriptif du principe de la technologie Roch 454-Pyrosequencing (Mardis, 2008). Le pyroséquençage est une méthode de séquençage par synthèse qui est basé sur la détection de pyrophosphate (PPi) libéré lors de la synthèse d'ADN en utilisant une cascade de réactions enzymatiques et des modules de détection de lumière visible, tels que photodiodes, des tubes photomultiplicateurs, ou un dispositif à couplage de charge (CCD) caméra.	113

Figure 35 : Schéma descriptif du principe de la technologie Illumina (Illumina®). Le séquençage MiSeq utilise une méthode de séquençage par synthèse qui est basée sur la mesure de fluorescence associée à un nucléotide spécifique incorporé au cours de la synthèse de la séquence d'ADN. 115

Table 1 : Différents couples d'amorces utilisés pour les amplifications par PCR. La séquence en rouge correspond à l'adaptateur illumina rajouté à la séquence de l'amorce pour la réalisation du séquençage MiSeq..... 108

Chapitre III :

Figure 36: Oxygenation and redox status during incubations in bioreactors under the different conditions. Oxygen saturation (%; filled circles connected by a solid black line) and redox potential (mV; open circles connected by a dotted grey line) measurements during incubations under permanent anoxic (A), oscillating (B) or permanent oxic (C) conditions. 137

Figure 37: Following of biodegradation ratio : nC17/Pristane (left) and Phenanthrene/Dimethylphenanthrene (right), in order to assess to hydrocarbons biodegradation capabilities during the incubations under oscillating conditions (filled diamonds connected by a solid black line), permanent oxic (filled circles connected by a large dotted black line) or anoxic conditions (filled squares connected by a short dotted black line). The two *shaded periods* correspond to the aerated periods of the oscillating conditions. *Stars* show a significant difference according to Tukey HSD test (p-value < 0.05) compared to the value at 10 hours after oil addition (day 5) from the considered conditions. The lowercases show a significant difference (p-value < 0.05) between the different conditions with the same letter at the considered time..... 140

Figure 38 : Correlation between the 16s rRNA gene expression rate and the phenanthrene degradation linked to oxygen addition. The two shaded periods correspond to the aerated periods of the oscillating conditions. A. Expression rate of the 16s rRNA gene during incubation under oscillating conditions (filled diamonds connected by a solid black line), permanent oxic (filled circles connected by a large dotted black line) or anoxic conditions (filled squares connected by a short dotted black line). *Stars* show a significant difference according to Tukey HSD test (p-value < 0.05) compared to the value at 5 days, before oil addition from the considered conditions. The lowercases show a significant difference (p-value < 0.05) between the different conditions with the same letter at the considered time. B. Phenanthrene/Dimethylphenanthrene ratio (dotted black line) and 16s rRNA gene expression rate (solid black line) under oscillating conditions. C. Pearson's correlation straight line between diminution of the Phenanthrene/Dimethylphenanthrene ratio and the expression rate..... 141

Figure 39 : Comparison of the metabolically active bacterial community structure during bioreactor incubations under oscillating (filled diamonds) and permanent anoxic (filled squares) or oxic (filled circles) conditions. Non parametric Multidimensional Scaling (nMDS) based on pyrosequencing data from 16S rRNA transcripts. Solid and dotted black lines represent 30 and 20% of Bray-Curtis similarity, respectively..... 144

- Figure 40 : Relative abundance at phylum level under the different conditions of oxygenation: permanent anoxic (left), oscillating (middle) and permanent oxic (right) conditions. 145
- Figure 41 : Venn diagram of the OTUs at 0.97 % similarity, affiliated at genus level, between the different conditions and pie charts of the relative abundance of major genus for each part of the diagram. The other* group gathers together the genus related to rare OTUs that are represented by less than 1% of total sequences per sample, being 31 sequences. 147
- Figure 42: Tables value of OTUs shared between the 3 conditions of incubation. A: OTUs for which the total number of sequences is higher than 500. B: OTUs for which the total number of sequences is between 100 and 500. C: OTUs for which the total number of sequences is lower than 100. 149
- Figure 43 : Comparison of the structure of the three metabolically active bacterial communities: “*Petroleum*”, “*Petroleum + Harrowing*” and “*Petroleum + Burrowing organisms*” during bioreactors incubations under oscillating (grey symbols), permanent anoxic (filled black symbols) or oxic (white symbols with black dotted surrounding) conditions. Non parametric Multidimensional Scaling (nMDS) based on pyrosequencing data from 16S rRNA transcripts. Confidence ellipses, included in ordination, were based on cluster analyses using Bray-Curtis distance measures: solid, long dotted and short dotted lines represent 20, 15 and 10% of similarity, respectively. 171
- Table 2: General statistics, observed richness and diversity estimated based on 97% OTU clusters from bacterial (454-pyrosequencing) 16S rRNA sequencing data. 143

Chapitre IV :

- Figure 44: Comparison of the structure of the three metabolically active bacterial communities: “*Petroleum*” (green circles), “*Petroleum + Harrowing*” (yellow cycles) and “*Petroleum + Burrowing organisms*” (red cycles) during bioreactor incubations under anoxic/oxic oscillating conditions. Non parametric Multidimensional Scaling (nMDS) based on pyrosequencing data from 16S rRNA transcripts. Green narrows shows the periods of aeration. 172
- Figure 45: The ratio: $n\text{-C}_{17}$ /Pristane and Phenanthrene/Dimethylphenanthrene were followed in order to assess the hydrocarbons-biodegradation capacities during the incubations under oscillating conditions. The ratio are compared between the communities “*Petroleum*” (green lines), “*Petroleum + burrowing organisms*” (red lines) and “*Petroleum + harrowing*” (yellow lines). The two *shaded periods* correspond to the aerated periods. *Star* show a significant difference according to Tukey HSD test ($p\text{-value} < 0.05$) compared to the value at 10 hours after oil addition (day 5) from the considered community. 173
- Figure 46: Relative abundance at genus level of the sequences reads affiliated at this level, for the communities “*Petroleum*”, “*Petroleum + harrowing*” and “*Petroleum + burrowing organisms*” subjected to anoxic/oxic oscillating conditions. 175

Figure 47: Co-occurrence matrix of the major OTUs (represented by more than 1% of the total sequences per samples) from the three bacterial communities: “Petroleum”, “Petroleum + burrowing organisms” and “Petroleum + harrowing”, in anoxic/oxic oscillating conditions.	178
Figure 48: Redox potentials values and copy number of <i>dsrB</i> transcripts (during incubations of the communities “ <i>Petroleum</i> ” (green line), “ <i>Petroleum + harrowing</i> ” (yellow line) and “ <i>Petroleum + burrowing organisms</i> ” (red line) under anoxic/oxic oscillating conditions.	179
Figure 49 : Relative abundances during anoxic/oxic oscillating conditions of the three communities: “ <i>Petroleum</i> ”, “ <i>Petroleum + harrowing</i> ” and “ <i>Petroleum + burrowing organisms</i> ”, of OTUs whose the <i>dsrB</i> amino acid sequence shared more than 95% similarity with their closest relatives.	182

Introduction

Introduction

Le monde microbien, dont l'existence a longtemps été ignorée, a façonné en grande partie notre environnement. Ces organismes microscopiques unicellulaires ont été, pendant trois milliards d'années, les seules formes de vie présentes sur notre planète. Les micro-organismes ont développé des mécanismes qui leur ont permis de s'adapter à tous les bouleversements climatiques et géologiques survenus sur la Terre depuis l'origine de la vie. Dotés d'une grande diversité métabolique leur permettant de s'adapter aux différentes sources de carbone et d'énergie disponibles, de capacités d'échanges d'informations génétiques, afin de résister et de s'adapter à diverses contraintes, ils possèdent des atouts majeurs leur permettant de coloniser tous les écosystèmes. Les micro-organismes sont donc actuellement retrouvés dans tous les biotopes, aussi bien dans des environnements oxiques que dans des environnements totalement anoxiques, et sont capables de s'adapter aux conditions de vie les plus extrêmes : températures et pressions très élevées ou très basses, pH acides ou basiques, fortes concentrations en sels, etc. Par ailleurs, la petite taille des micro-organismes, qui leur donne une grande capacité d'échange avec le milieu extérieur par rapport à leur biomasse, favorise leur omniprésence dans les environnements naturels où ils sont ainsi à l'origine de transformations fondamentales lors des processus biogéochimiques responsables du cycle des éléments.

L'essor de l'industrialisation, a conduit à une forte pollution des milieux terrestres et aquatiques par divers contaminants. De par son impact sur le fonctionnement du biotope, cette pollution devient un sujet de préoccupation majeure et une forte prise de conscience de ses principaux acteurs, les pays industrialisés, s'est peu à peu installée. Les hydrocarbures sont les polluants organiques les plus répandus, par le rôle fondamental des produits pétroliers dans le monde moderne, principalement en tant que source d'énergie. L'implication des micro-organismes dans leurs transformations a été mise en évidence au milieu du XX^e siècle. Depuis de nombreuses études ont été menées afin de comprendre leur rôle dans le devenir des hydrocarbures au sein des écosystèmes. Ainsi, la biodégradation de ces composés par les bactéries aérobies est bien documentée, tandis que ce mécanisme en anaérobiose a reçu moins d'attention. Ces connaissances acquises ont permis le développement de nombreuses techniques, basées sur les capacités métaboliques et de dégradation des micro-organismes, appliquées pour la réhabilitation des environnements contaminés. Cependant, un certain nombre de paramètres restent à être explorés et constituent une limite pour le développement à grande échelle de ces méthodes. Ces zones d'ombre concernent essentiellement les facteurs déterminant la croissance, l'activité et la réponse des communautés bactériennes au sein même de ces habitats pollués.

L'environnement aquatique représente le compartiment le plus touché par la pollution à des contaminants organiques, incluant les hydrocarbures. Une partie de ces composés, non dégradés au cours de leur sédimentation vers les fonds, vont se déposer au niveau des sédiments. C'est au sein de ces sédiments que des conditions très particulières peuvent se mettre en place. En effet, il existe une interface entre la colonne d'eau et la colonne sédimentaire, présentant généralement une structure topographique en plusieurs couches (oxique, suboxique, anoxique), largement perturbée par des variations journalières ou saisonnières, les courants ou encore les organismes vivants. Ainsi, il règne dans ces environnements des oscillations entre des conditions oxiques et des conditions anoxiques, rythmées par ces différents processus. Les environnements soumis aux oscillations oxie/anoxie sont ainsi largement répandus et constituent un système fonctionnel très particulier. De manière très surprenante, le devenir des composés dans ces systèmes n'a reçu que très peu d'attention par la communauté scientifique. À ce jour, il existe peu d'informations sur la dégradation des hydrocarbures dans les sédiments, sur la composition du réseau microbien impliqué, mettant en place des relations synergiques et de co-métabolismes pour la biodégradation des hydrocarbures, et des paramètres écologiques régissant (et en particulier restreignant) leur dynamique et leurs activités. En outre, la mise en place de procédés pour atténuer les impacts écologiques de sites contaminés aux hydrocarbures exige des connaissances de base sur les paramètres qui influent sur le devenir de ce polluant. À l'heure actuelle, nous n'avons qu'une connaissance fragmentée de ce sujet essentiel.

Par le développement et l'application d'une série d'approches interdisciplinaires, ces travaux de thèse ont mis l'accent sur les communautés microbiennes de sédiments côtiers, afin d'explorer les capacités de dégradation des hydrocarbures, de comprendre l'écologie de ces écosystèmes, en particulier la façon dont les communautés microbiennes dégradent des composés d'hydrocarbures et comment elles sont affectées par les conditions d'oxydo-réduction et d'oxygénation oscillantes régnant dans ces environnements. L'étude s'est intéressée à plusieurs communautés microbiennes de sédiments vaseux intertidaux ayant des capacités similaires de dégradation des hydrocarbures. Ces communautés microbiennes, obtenues lors de l'incubation des sédiments en mésocosmes sous différents traitements en condition polluée, ont été caractérisées par suivi de leur comportement lorsqu'elles ont été soumises à divers régimes d'oxygénation. L'étude comparative de la réponse écologique de ces différentes communautés microbiennes offre une occasion sans précédent de comprendre la structuration des communautés microbiennes exposées au pétrole en tenant compte des conditions oscillantes oxie/anoxie et redox.

L'ensemble des données obtenues est présenté dans ce manuscrit sous forme de cinq chapitres. Une synthèse bibliographique (chapitre I) fait tout d'abord un bref état des connaissances acquises sur les écosystèmes côtiers, en faisant un descriptif écologique et fonctionnel, sur les réponses des communautés microbiennes de ces environnements à des perturbations naturelles ou anthropiques avec plus particulièrement l'impact des composés pétroliers et enfin sur l'apport des technologies «-omiques » pour la compréhension de la dynamique des communautés microbiennes de ces environnements, impliquées dans le devenir des hydrocarbures. Le chapitre II présente les procédures expérimentales mises en place pour les études réalisées. Un chapitre de livre accepté pour publication est rapporté dans ce chapitre. Il décrit le développement d'une approche expérimentale impliquant des bioréacteurs pour la simulation de conditions oscillantes anoxie/oxy. La mise en place d'un tel dispositif expérimental visait à comprendre la dynamique des communautés microbiennes autochtones d'environnements pollués par du pétrole caractérisés par des conditions d'oxydo-réduction oscillantes et l'implication sur le devenir des composés hydrocarbonés. Les deux chapitres suivants présentent les résultats obtenus sous forme d'articles scientifiques en préparation. Une première étude (chapitre III) s'intéresse à une communauté microbienne hydrocarbonoclaste de sédiments intertidaux qui a été soumise à des conditions oscillantes anoxie/oxy en comparaison à des conditions d'oxy ou d'anoxie permanentes afin d'évaluer les interactions au sein de ces communautés de milieux pollués soumis à ces conditions, afin de fournir une meilleure compréhension des facteurs qui influent sur leur dynamique et leur rôle dans la dégradation des hydrocarbures. La seconde étude (chapitre IV) s'intéresse à la réponse aux oscillations anoxie/oxy de communautés microbiennes ayant été pré-exposées à un traitement mécanique (hersage) ou biologique (augmentation de la population en macro-organismes bioturbateurs), par rapport à celle de la communauté précédente. Cette étude a permis d'identifier la réponse globale des communautés de sédiments côtiers aux oscillations anoxie/oxy avec la caractérisation de l'impact sur les communautés de micro-organismes sulfato-réducteurs jouant un rôle majeur dans la minéralisation de la matière organique dans ces environnements. L'ensemble des résultats obtenus ainsi que les perspectives de travail qui en découlent, afin d'approfondir nos connaissances sur le réseau microbien impliqué dans l'élimination des polluants pétroliers en milieu sédimentaire côtiers, sont présentées dans le chapitre V.

Ce travail s'inscrit dans le projet de recherche DECAPAGE (Caractérisation des capacités de dégradation de communautés bactériennes de sédiments marins : adaptation, processus métaboliques et influence des régimes d'oxygénation) financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Ce projet associe 5 laboratoires partenaires abordant diverses spécialités

complémentaires en termes d'expertise : l'Equipe Environnement et Microbiologie (IPREM-EEM UMR CNRS 5254, Pau), l'Equipe de Chimie Analytique Bio-inorganique et Environnement (IPREM-LCABIE UMR CNRS 5254, Pau), le Centre de Documentation, de Recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux (CEDRE, Brest), l'Institut Méditerranéen d'Océanologie de l'Université d'Aix-Marseille (MIO, Marseille), le laboratoire écologie fonctionnelle et environnement de l'Université Toulouse III (EcoLab UMR 5254 CNRS-UPS-INPT) et School of Biological Sciences de l'Université d'Essex (Colchester, UK).

Chapitre I

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Les environnements côtiers : exemple des sédiments intertidaux, lieu aux fonctions écologiques multiples

Les écosystèmes côtiers représentés par les zones côtières humides, les marais salants, les mangroves, les estuaires, les vasières, les herbiers à zostères marines..., constituent des milieux complexes aux fonctions écologiques majeures, gouvernés par des processus physiques et biogéochimiques dont les interactions sont encore insuffisamment comprises à ce jour. Or, le bon fonctionnement de tels environnements présente un intérêt écologique dont les conséquences se répercutent sur l'économie et la santé humaine. La tendance amorcée au cours de la dernière décennie est de comprendre le fonctionnement de ces environnements sensibles en vue de les préserver et maintenir les bienfaits de ces écosystèmes, concrétisée par la mise en place de législations partout dans le monde (Directive Européenne : la directive-cadre sur l'eau, 2000/60/CE ; UK National Ecosystem Assessment, mis en place en 2009 ; United Nations Millennium Ecosystem Assessment, mis en place en 2005).

1.1. Généralités

1.1.1. Caractéristiques physiques

La zone intertidale des écosystèmes côtiers, plus communément appelée l'estran, correspond à la zone de balancement des marées. Lors de pleines mers, l'estran est immergé au moins en partie, et émergé lors des basses mers. L'amplitude des marées et la durée d'exondation (période d'émersion), vont façonner la géomorphologie de l'estran en différentes parties suivant leur emplacement par rapport au niveau moyen de la mer (Figure 1). Suivant le type d'estran considéré, de type côte rocheuse, plage (zone d'accumulation et/ou d'érosion de sédiments) ou estuarien, la structuration en étage est plus ou moins marquée.

L'étage supralittoral est la zone de transition avec la frange terrestre. Cette zone située au-dessus du niveau moyen des hautes marées n'est immergée que rarement, lors des grandes marées d'équinoxe. Cette zone sous l'influence des embruns maritimes correspond aux zones recouverte de lichens des falaises et ensembles rocheux, aux systèmes dunaires ou encore aux schorres dans les estuaires (banquettes de vases recouvertes de plantes vasculaires constituant les prés salés).

L'étage médiolittoral correspond à la zone sous l'influence des cycles des marées d'amplitudes moyennes, soumis à une alternance quotidienne entre les états d'immersion et d'émersion. L'étage infralittoral correspond à l'étage inférieur au médiolittoral et n'est émergé que lors des grandes marées. La limite entre ces deux étages n'est pas toujours discernable, mais l'infralittoral présente des sédiments généralement plus fins et plus imbibés d'eau. Dans les estuaires, les bords vaseux des cours d'eau formés par les apports terrigènes constituent la slikke. Celle-ci équivaut au médiolittoral lorsque les cours d'eau présentent un faible débit et l'infralittoral correspond alors à un milieu moins vaseux. Alors que si le cours d'eau présente un fort débit la slikke occupe le médio et l'infralittoral.

Enfin, la partie inférieure à l'étage infralittoral et qui n'est jamais émergée est dénommée l'étage circalittoral (ou également étage sublittoral).

Les différents étages de l'estran ne sont pas exposés de la même façon à l'action de la mer du fait de périodes d'exondation plus ou moins longues, les exposant ainsi différemment à l'humidité, aux variations de températures et à la lumière. Ces variations génèrent des conditions environnementales particulières qui font de ces environnements des écosystèmes présentant un intérêt écologique exceptionnel.

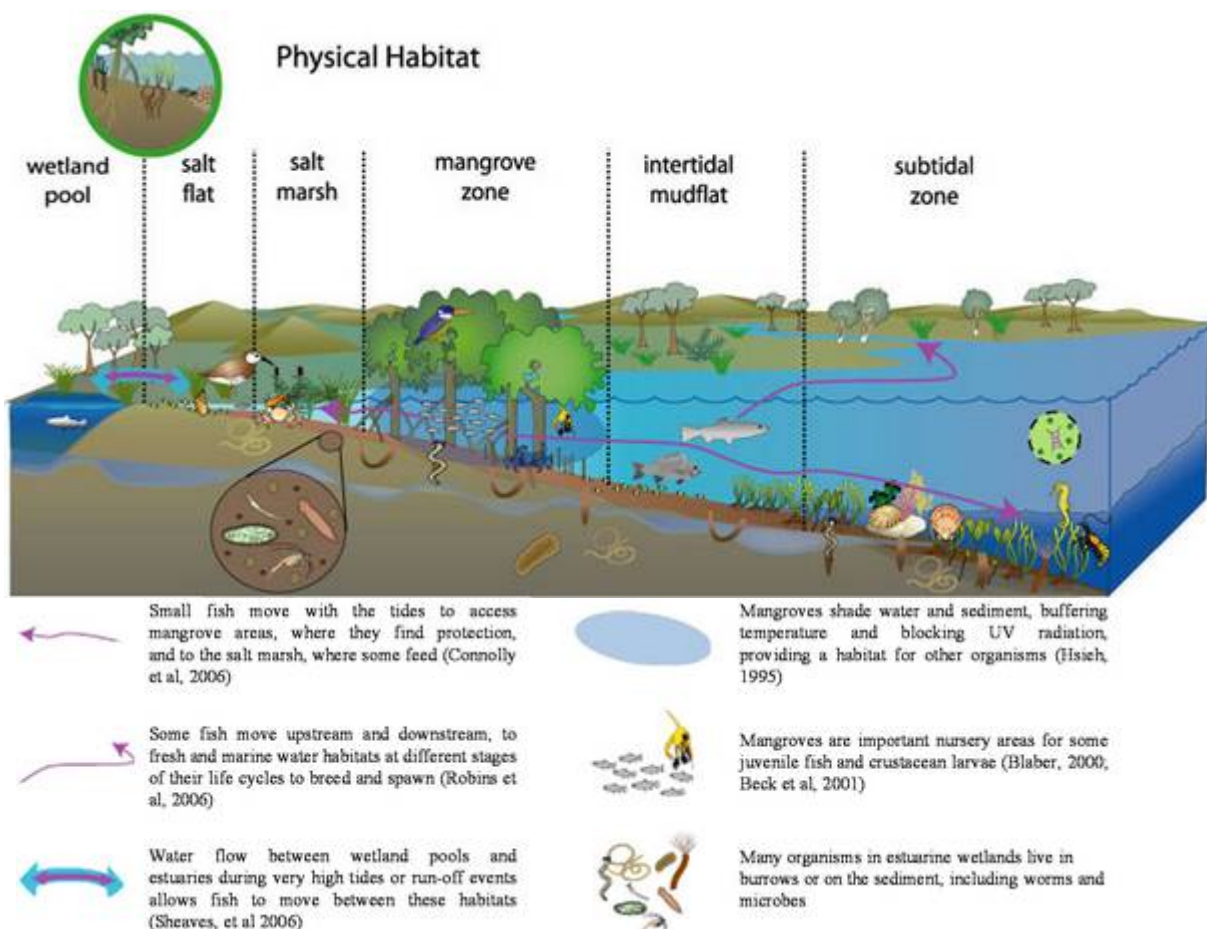


Figure 1 : Modèle conceptuel de zone intertidale. Issu du site internet de OzCoasts (Geoscience Australia) http://www.ozcoasts.gov.au/conceptual_mods/processes/habprov.jsp

1.1.2. Caractéristiques écologiques

Les écosystèmes côtiers comptent parmi les zones de la planète les plus productives biologiquement (Gattuso *et al.*, 1998; Muller-Karger *et al.*, 2005; Chen and Borges, 2009), représentant 18 à 33% de la production océanique mondiale (Wollast, 1991). Parmi ces environnements, les vasières, formées par le dépôt de sédiments meubles dragués par les fleuves ou provenant de l'érosion marine, ont été décrites comme les systèmes les plus productifs (McLusky, 1989).

La production primaire due aux micro-algues de la colonne d'eau des estuaires et du biofilm intertidal, rivalise avec celle des macrophytes représentées que par un petit nombre d'espèces adaptées aux variations de salinité ou à l'exondation fréquente (Mendelssohn *et al.*, 2012). La forte productivité phytoplanctonique et benthique, constituant une source de nourriture, induit une biomasse importante des invertébrés, le benthos : représentés par l'épifaune, l'endofaune et la méiofaune (animaux vivant à la surface des sédiments, au sein des sédiments et de petites tailles, entre 0,1 et 1 mm, se mouvant dans les espaces interstitiels, respectivement). Ils constituent eux-mêmes une source de nourriture pour les organismes pélagiques et les oiseaux fouisseurs. Cette forte productivité constitue donc une source de nourriture pour nombreuses espèces, fournissant les ressources énergétiques nécessaires à différents niveaux de la chaîne trophique en incluant l'homme (Mendelssohn *et al.*, 2012). Peu d'espèces vivantes sont adaptées aux conditions particulières de ces environnements mais la nourriture abondante fait que la densité en individus au sein de chaque espèce est considérable, notamment chez les mollusques, les vers et les crustacés.

En plus des espèces résidant en permanence dans les zones côtières, de nombreuses espèces d'invertébrés mobiles et de poissons, aux cycles de vie complexes, trouvent refuge dans des biotopes abrités de ces environnements (mangroves, estuaires, vasières, herbiers à zostères marines). Ces habitats ont un rôle de nurseries, où les larves se développent jusqu'à des stades dits sub-adultes, pour ensuite rejoindre les habitats de vie en cycle adulte (Beck *et al.*, 2001). La forte productivité attire également de nombreux oiseaux qui viennent s'y nourrir.

Enfin, ces écosystèmes jouent un rôle important dans l'assimilation et le recyclage des nutriments et la minéralisation de matière organique apportés en grandes quantités du continent, par le ruissellement et par les fleuves, et de l'océan, par les courants et par les marées (Chen and Borges, 2009). Ces apports s'accumulent essentiellement aux niveaux des vasières sur les rivages marins, les estuaires et les deltas, et peuvent drainer des contaminants. Ces sédiments ont donc également des fonctions épuratives et de transformation.

1.1.3. Les groupes fonctionnels procaryotes majeurs au sein des sédiments intertidaux

Les communautés microbiennes des écosystèmes côtiers ont un rôle majeur dans la régulation du système en permettant notamment le recyclage des nutriments indispensables au maintien de la production primaire (Alongi, 1994), en empêchant l'accumulation trop importante de sulfures (De Wit *et al.*, 2001) et en constituant une importante source trophique pour d'autres organismes (Alongi, 1994). Leur rôle prépondérant dans les transformations du carbone, du soufre et de l'azote est dû à la richesse métabolique de ces communautés microbiennes (Fenchel, 1999). Le métabolisme énergétique microbien, indispensable au développement cellulaire, qu'il soit de type photosynthétique, respiratoire ou fermentaire, est basé sur des processus d'oxydo-réduction entre des couples donneurs d'électrons et des couples accepteurs d'électrons. La présence, le développement et l'abondance des différents groupes fonctionnels microbiens est donc dépendant principalement de la disponibilité des couples donneurs/accepteurs d'électrons (Bertics and Ziebis, 2009) et aussi des substrats au sein des sédiments.

1.1.3.1. Les micro-organismes photosynthétiques oxygéniques

Ce groupe fonctionnel réalise la photolyse de l'eau (qui est le donneur d'électron) en utilisant les radiations lumineuses du spectre visible comme source d'énergie pour produire du dioxygène. Ces micro-organismes incluent les bactéries phototrophes oxygéniques (phylum *Cyanobacteria* du domaine *Bacteria*) et les eucaryotes unicellulaires photosynthétiques (micro-algues dominés par les diatomées). Leurs capacités à réaliser une photosynthèse oxygénique, et à fixer l'azote atmosphérique pour les cyanobactéries, permettent d'enrichir le sédiment en oxygène, en matière organique et en composés azotés favorisant ainsi le développement d'autres espèces bactériennes par la création de niches favorables à leur développement (Stal, 1994).

Les cyanobactéries, unicellulaires ou filamenteuses, forment un groupe complexe de micro-organismes autotrophes présentant une large diversité (Paerl *et al.*, 2000). Ces micro-organismes photosynthétiques se développent préférentiellement sur les sédiments sableux fins des zones tidales côtières (Watermann *et al.*, 1999). En effet, les cyanobactéries ayant un taux de croissance lents sont défavorisées par rapport à d'autres micro-organismes se développant plus rapidement dans les sédiments intertidaux riches en nutriments (Stal, 2010).

Les diatomées sont un groupe de micro-organismes monophylétiques du domaine *Eukarya* mais morphologiquement très divers (Medlin *et al.*, 1993). Ces micro-algues colonisent plus généralement les sédiments intertidaux plus fins et riches en nutriments telles que les vasières

(Paterson and Black, 1999; Watermann *et al.*, 1999; Blanchard *et al.*, 2001). Ces micro-organismes eucaryotes, participent activement à la forte productivité primaire de ces écosystèmes (Paerl, 1997).

Ces micro-organismes excrètent des polysaccharides ou EPS (extracellular polymeric substances) qui forment une matrice autour des bactéries (Decho and Moriarty, 1990; Decho, 2000), et qui en se liant aux particules de sédiments pour former le « biofilm intertidal » (Figure 2) contribue à la stabilisation des sédiments et prévient les phénomènes d'érosion (Dade *et al.*, 1990; Stal, 2010). Ces biofilms se forment principalement au niveau des zones de basses énergies tels que les estuaires, les bayes et les deltas.

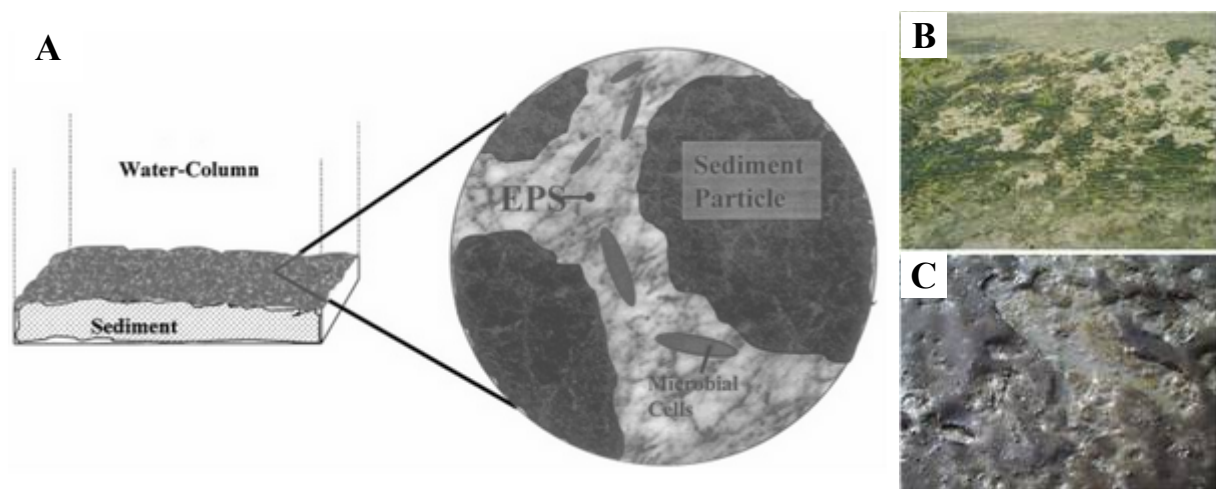


Figure 2 : Diagramme conceptuel du biofilm microbien (A) se formant à la surface des sédiments intertidaux (Decho, 2000) et photographies (Stal, 2010) d'un tapis de cyanobactéries (B) et d'un biofilm de diatomées (C).

1.1.3.2. Les bactéries hétérotrophes aérobies

Les bactéries hétérotrophes aérobies représentent une biomasse importante en surface des sédiments, en présence d'oxygène. Elles se développent grâce à un métabolisme basé sur la respiration aérobie. Elles utilisent des composés organiques comme source de carbone et d'énergie et l'oxygène comme accepteur final d'électrons.

Il existe une remarquable diversité au sein des bactéries hétérotrophes aérobies, qui sont réparties dans plusieurs groupes phylogénétiques tels que les *Proteobacteria*, le cluster des *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* et des *Actinobacteria* (Giovannoni *et al.*, 2000). La diversité des procaryotes hétérotrophes aérobies peut être attribuée à leur implication dans la dégradation d'une multitude de molécules organiques utilisés en tant que substrats, favorisant leur présence au sein de niches écologiques très diverses (Vaulot *et al.*, 2002).

1.1.3.3. Les micro-organismes sulfato réducteurs

En absence d'oxygène, les micro-organismes sulfato-réducteurs (MSR) sont très répandus du fait de la prédominance du sulfate qu'ils utilisent comme accepteur final d'électrons (Muyzer and Stams, 2008). Les facteurs contrôlant la réduction des sulfates dans les sédiments sont principalement la température, la disponibilité en matière organique dégradable et la disponibilité du sulfate.

Les MSR forment un groupe diversifié et sont répartis dans sept groupes phylogénétiques, cinq chez les *Bacteria* et deux chez les *Archaea* (Itoh *et al.*, 1998; Castro *et al.*, 2000; Rabus *et al.*, 2006; Muyzer and Stams, 2008). Les principales espèces identifiées sont représentées ci-dessous (Figure 3).

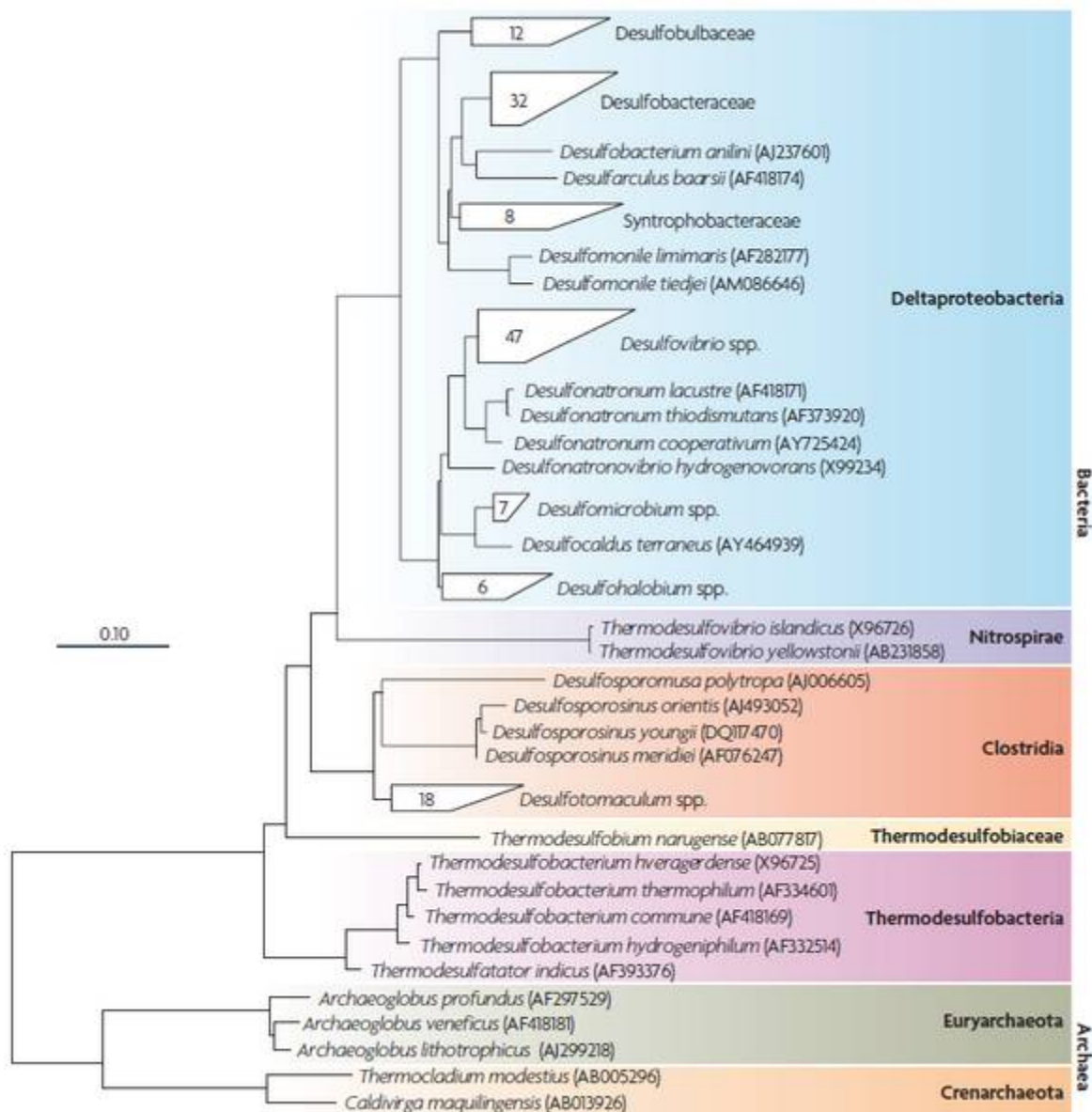


Figure 3 : Arbre phylogénétique basé sur les séquences quasi complètes du gène de l'ARNr 16S des espèces décrites chez les micro-organismes sulfato-réducteurs (Muyzer and Stams, 2008). Le nombre apparaissant sur les clusters repliés correspond au nombre d'espèces différentes à l'intérieur de ce groupe. L'échelle correspond à une dissimilarité de séquence de 10%.

De nombreuses espèces supplémentaires ont pu être décrites depuis, au sein des différents genres présentés ci-contre (Figure 3), ainsi que de nouveaux genres : *Desulfocurvus* gen. nov. (Klouche *et al.*, 2009), *Desulfonatronospira* gen. nov. (Sorokin *et al.*, 2008), *Desulfonauticus* gen. nov. (Audiffren *et al.*, 2003), *Desulfothermus* gen. nov. (Kuever *et al.*, 2005b), *Desulfovermiculus* gen. nov. (Belyakova *et al.*, 2006) et *Desulfobacca* gen. nov. (Oude Elferink *et al.*, 1999) de la classe des *Deltaproteobacteria*, ainsi que les genres *Desulfurispora* gen. nov. (Kaksonen *et al.*, 2007a), *Amonifex* gen. nov. (Huber *et al.*, 1996), *Desulfovirgula* gen. nov. (Kaksonen *et al.*, 2007b) et *Thermacetogenium* gen. nov. (Hattori *et al.*, 2000) de la classe des *Clostridia*.

Les MSR ont également une grande diversité physiologique, ils ont été identifiés comme les micro-organismes réduisant le plus grand nombre d'accepteurs d'électrons différents, y compris les composés soufrés et divers autres composés organiques et inorganiques (Biebl and Pfennig, 1977; Widdel and Hansen, 1992; Dalsgaard and Bak, 1994). Cette diversité leur confère une capacité d'adaptation à des conditions environnementales très variées.

1.1.3.4. Les micro-organismes dénitrifiants

Les micro-organismes dénitrifiants sont également présents au sein des sédiments côtiers. Ces micro-organismes sont généralement aéro-anaérofacsultatifs et peuvent utiliser des formes oxydées de l'azote comme accepteur final d'électrons. La capacité de respiration anaérobie des nitrates se retrouve chez des micro-organismes qui appartiennent à des groupes phylogénétiques très diversifiés présentant un large éventail de caractéristiques physiologiques et métaboliques (Jeter and Ingraham, 1981). Cette capacité métabolique est aussi bien retrouvée chez les archées, les bactéries Gram-négatives et Gram-positives. Les bactéries dénitrifiantes isolées appartiennent essentiellement aux classes des alpha- et des bêtaproteobactéries et sont absentes chez les entérobactéries. Très peu d'archées capables de dénitrifier ont été isolées et la majorité sont halophiles extrêmes et appartiennent aux genres *Haloferax*, *Haloarcula* et *Halobacterium*. Une seule souche hyperthermophile dénitrifiante est connue : *Pyrobaculum aerophilum* (Volkl *et al.*, 1993). Certains micro-organismes dénitrifiants sont aussi capables de fixer le diazote ou de réaliser la nitrification (*Paracoccus denitrificans* ou *Nitrosomonas*).

L'intensité de l'activité dénitrifiante est proportionnelle à la concentration en nitrate, qui peut-être limitant dans les environnement côtiers (Sørensen *et al.*, 1979). Même si la dénitrification aérobie a été clairement mise en évidence (Robertson and Kuenen, 1984; Baek *et al.*, 2001; Zehr and Ward, 2002; Gao *et al.*, 2009), en aérobiose, les électrons sont généralement détournés préférentiellement vers l'oxygène. Le processus de dénitrification est également

inhibé en présence de sulfates en excès et surtout de sulfures à raison de 0.3 mM (Sørensen *et al.*, 1980).

1.1.3.5. Les autres groupes fonctionnels

D'autres groupes fonctionnels sont également présents au sein des sédiments côtiers. Bien que présents de façon moins prédominante, ils jouent un rôle essentiel dans les cycles biogéochimiques en influençant la disponibilité des accepteurs finaux d'électrons, et/ou en fournissant des substrats simples. Leurs activités métaboliques vont donc influencer le développement des autres groupes fonctionnels, et ces interactions assurent le bon fonctionnement des écosystèmes.

Les bactéries oxydant l'ammonium (AOB, ou bactéries nitritantes) et les bactéries oxydant le nitrite (NOB, ou bactéries nitrifiantes), qui permettent la production de nitrates par nitrification sont également présentes dans les sédiments marins et dans de nombreux milieux. Ces bactéries sont généralement micro-aérophiles et aérophiles et correspondent à un nombre limité de genres : *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* et *Nitrosolobus* pour les AOB, et *Nitrobacter*, *Nitrospina*, *Nitrococcus* et *Nitrospira* pour les NOB respectivement. Cependant dans différents environnements marins, les archées nitrifiantes sont plus abondantes que les bactéries nitrifiantes (Nicol and Schleper, 2006).

Les micro-organismes sulfo-oxydants réalisent l'oxydation biologique des composés soufrés. Ils se retrouvent dans de nombreux groupes procaryotes aux possibilités métaboliques très diverses. Les sulfo-oxydants dits véritables comptent : les procaryotes chimiolithotrophes sulfo-oxydants (PCSO ; utilisant principalement l'oxygène mais certaines espèces peuvent utiliser le nitrate ou le nitrite comme accepteur d'électrons) et les bactéries phototrophes anoxygéniques (BPA ; utilisant l'hydrogène sulfuré ou d'autres composés soufrés réduits comme donneurs d'électrons). D'autres groupes de micro-organismes peuvent participer à l'oxydation des composés soufrés de façon occasionnelle ou indirecte. C'est le cas des bactéries sulfato-réductrices capables de dismutation et des cyanobactéries en présence de sulfures inhibiteurs du photosystème II (qui réalisent une photosynthèse anoxygénique identique à celle des BPA en photométabolisant le sulfure grâce au photosystème I (Cohen *et al.*, 1975)).

Les bactéries ferri-réductrices sont des bactéries anaérobies qui utilisent le fer comme accepteur final d'électrons. La diversité phylogénétique de ces micro-organismes est grande et ils se répartissent sur les domaines *Bacteria* (phylum *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Deferribacteres*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Thermodesulfobacteria*, *Thermotogae*) et *Archaea* (phylum *Crenarchaeota* et *Euryarchaeota*). Ces micro-organismes peuvent généralement utiliser

d'autres accepteurs finaux d'électrons. Ce groupe bactérien fonctionnel a surtout une influence majeure sur la géochimie des environnements modernes, où ils peuvent jouer un rôle important dans la bioremédiation des environnements contaminés par des contaminants organiques ou métalliques (Lovley *et al.*, 2004).

Les bactéries fermentaires (utilisant des composés organiques comme donneurs d'électrons et des composés organiques endogènes propres au métabolisme endogène comme accepteurs d'électrons) réalisent les étapes préliminaires de la dégradation de la matière organique. Les produits de fermentation correspondent à des substrats simples pouvant être utilisés par les bactéries sulfato-réductrices. Très largement répandus chez les micro-organismes, ces micro-organismes peuvent être fermentaires facultatifs (capables aussi de respirations aérobies ou anaérobies), ou bien fermentaires obligatoires et dans ce cas soit anaérobies stricts, soit aéro-tolérants.

Enfin, les méthanogènes, des archées anaérobies strictes, sont également retrouvées au niveau des sédiments côtiers (Alperin *et al.*, 1994). Au sein du domaine *Archaea*, elles sont toutes réunies dans le phylum *Euryarchaeota* où elles se répartissent en cinq ordres : les *Methanobacteriales*, les *Methanococcales*, les *Methanopyrales*, les *Methanosarcinales* et les *Methanomicrobiales*. Ces micro-organismes occupent la position terminale dans la dégradation anaérobie de la matière organique, mais elles entrent en compétition avec les bactéries sulfato-réductrices, dans les écosystèmes marins anoxiques, pour l'utilisation de l'hydrogène et de l'acétate (Oremland, 1988).

1.2. Ecosystèmes à l'interface eau/sédiment, caractérisés par une remarquable hétérogénéité

Tous les systèmes aquatiques présentent une interface eau/sédiment et par conséquent, une interface oxiqye/anoxique. En effet, la plupart des colonnes d'eau contiennent de l'oxygène jusqu'à une transition oxiqye/anoxique au niveau des sédiments, pour atteindre une parfaite anoxie dans les fonds (Brune *et al.*, 2000). Cette variation de la concentration en oxygène crée une stratification verticale des conditions redox (de la disponibilité des couples donneur/accepteur d'électrons) au niveau des sédiments (Figure 4), influençant la répartition des différentes communautés microbiennes (Kristensen, 2000).

Cependant, dans les environnements côtiers, cette conformation topographique de l'interface eau/sédiments et de la colonne sédimentaire est quotidiennement déstructurée sous

l'action des marées, des vagues, des courants et des macro-organismes benthiques (Jørgensen and Revsbech, 1985; Huettel and Gust, 1992; Graf and Rosenberg, 1997). Ces processus abiotiques et biotiques entraînent des variations de la diffusion de l'oxygène, de la circulation des nutriments et de la matière organique entre la colonne d'eau et les sédiments et sont à l'origine de l'hétérogénéité qui caractérise les sédiments intertidaux côtiers.

1.2.1. L'interface eau/sédiment : zone de diffusion et de transition

La colonne d'eau saturée en oxygène dissous permet une oxygénation des sédiments de surface par diffusion. L'oxygène étant l'accepteur d'électrons le plus favorable énergétiquement, il est très rapidement consommé par les bactéries hétérotrophes capables de respiration aérobie. La zone oxique (potentiels d'oxydo-réduction (ORP) supérieurs à 100 mV) est ainsi généralement réduite à une fine couche supérieure. Son épaisseur a été estimée de l'ordre de quelques millimètres pour les sédiments les plus riches en matière organique dégradable, tels que les sédiments vaseux, à quelques centimètres pour des sédiments plus pauvres de type sédiments sableux (Revsbech *et al.*, 1980; Jørgensen, 1983).

En dessous de la zone oxique, la zone sub-oxique correspond à la zone oxydée des sédiments anoxiques (ORP entre -100 mV et 100 mV), caractérisée par la présence de nitrate, de manganèse et de fer oxydé (Brune *et al.*, 2000), comme accepteurs d'électrons. Les nitrates sont consommés rapidement par les activités microbiennes dans cette zone, leur concentration sédimentaire y est par conséquent généralement faible (Coates *et al.*, 1996; Rothermich *et al.*, 2002). Quant au fer(III), et au manganèse(IV), ces formes précipitant rapidement, étant donc peu biodisponibles, certains micro-organismes ont mis en place des stratégies afin d'augmenter leurs solubilités (Lovley *et al.*, 2004). La réoxydation de ces différents composés réduits aura typiquement lieu à la limite oxie/anoxie ou en dessous (Brune *et al.*, 2000).

Enfin la zone réduite des sédiments anoxiques, en dessous de la zone sub-oxique, est caractérisée par la présence de sulfate et de CO₂ comme accepteurs d'électrons. Les eaux côtières marines et estuariennes sont très riches en sulfate (Rothermich *et al.*, 2002), de ce fait, parmi les différents processus de dégradation anaérobie, la sulfato-réduction (ORP entre -100 mV et -300 mV) est sans doute le processus prépondérant (Jørgensen, 1977). Lorsque le sulfate est épuisé, les composés comme le méthane, le dioxyde de carbone ou la matière organique elle-même sont les composés alors utilisés (fermentation et méthanogénèse ; ORP inférieur à -300 mV) (Sørensen *et al.*, 1979).

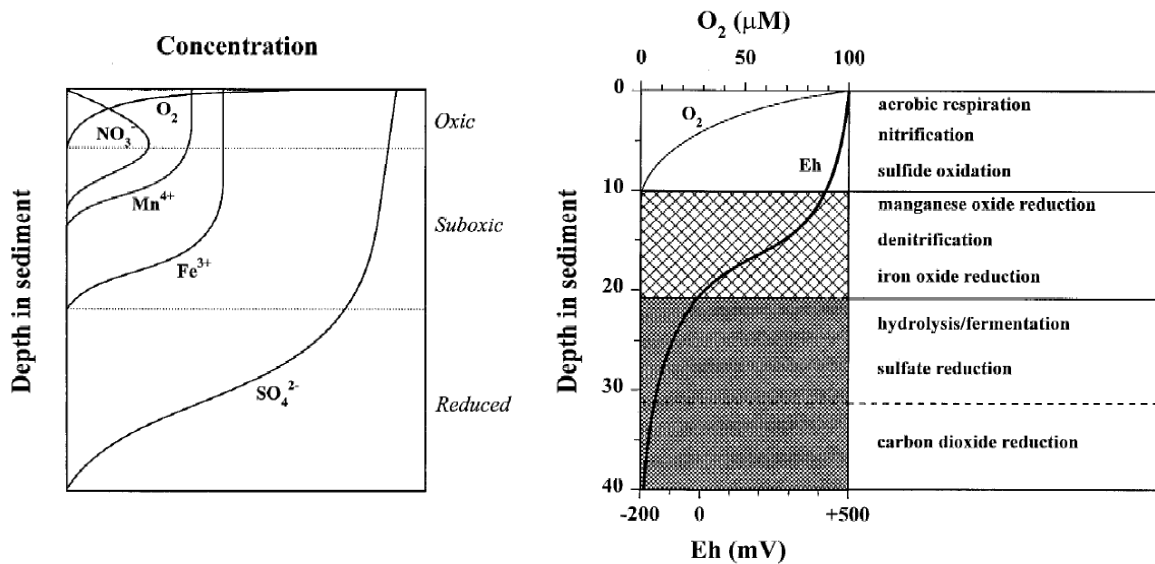


Figure 4 : Représentation schématique de la structuration verticale des accepteurs d'électrons dans les différentes zones des sédiments et des métabolismes microbiens associés (Kristensen, 2000).

Cependant, cette répartition reste très théorique car les différentes conditions et contraintes du milieu modifient radicalement cette structuration verticale pour aboutir à un remaniement total des sédiments et des différents composés, et ainsi de la structuration des communautés microbiennes associées. En effet, il semblerait que l'existence de micro-niches présentant des conditions environnementales distinctes par rapport à celles établies globalement (Bertics and Ziebis, 2010), entraîne la cohabitation de populations microbiennes aux métabolismes différents au sein d'un même niveau sédimentaire (Cypionka *et al.*, 1985). Ainsi, il a même pu être observé la présence de micro-organismes sulfato-réducteurs dans la zone oxicque de sédiments côtiers (Krekeler *et al.*, 1997).

1.2.2. La bioturbation

Les sédiments, au niveau de l'interface eau/sédiments, sont perforés par des galeries ou des tubes construits par la faune fouisseuse telle que les polychètes, certains crustacés ou encore des bivalves, activités qui génèrent des déplacements du matériel particulaire au sein des sédiments. Ce processus appelé bioturbation induit une grande hétérogénéité par la redistribution des particules sédimentaires, la modification des flux d'eau et des accepteurs d'électrons associés, conduisant également à la redistribution de la matière organique (Gerino *et al.*, 1998). Les activités de la faune benthique ont donc un profond impact sur les conditions physiques, chimiques et biologiques des sédiments par la bio-irrigation (ou ventilation) et le remaniement des particules (Pischedda *et al.*, 2008; Nogaro *et al.*, 2009) ; ce qui laisse place à des environnements soumis à des oscillations oxie/anoxie en permanence (Gilbert *et al.*, 2003).

1.2.2.1. Processus modifiant la distribution sédimentaire

Le remaniement des particules par la macrofaune affecte la stabilité et la composition des sédiments. Ainsi, les particules sédimentaires sont redistribuées de la surface vers les couches profondes et *vice versa*. Cependant, cette dislocation peut être différente selon l'animal considéré, son habitat et ses habitudes de vie (Gilbert *et al.*, 2007).

D'une manière générale, on trouve cinq types d'organismes bioturbateurs : les biodiffuseurs, les convoyeurs vers le haut, les convoyeurs vers le bas, les régénérateurs et les diffuseurs à galeries (Francois *et al.*, 1997; Nogaro *et al.*, 2009). Les biodiffuseurs sont des organismes dont les activités provoquent un transport diffusif du sédiment. Ils déplacent les particules de manière aléatoire sur de courtes distances (Robbins *et al.*, 1979). Les convoyeurs vers le haut sont des espèces évoluant verticalement la tête vers le bas qui déplacent les particules de sédiments des profondeurs vers l'interface eau/sédiments. Ils engendrent un transport actif des particules lors de l'ingestion du sédiment et un transport passif autour de leur zone d'alimentation (Fisher *et al.*, 1980). Inversement, les convoyeurs vers le bas évoluent la tête vers le haut et ingèrent le sédiment de l'interface eau/sédiments pour le rejeter en profondeur (Smith *et al.*, 1986). Les régénérateurs sont des organismes fouisseurs qui transfèrent le sédiment profond vers la surface où il sera lessivé et remplacé par le sédiment de surface de l'interface eau sédiment (Gardner *et al.*, 1987). Les diffuseurs à galeries, enfin, déblaient, construisent et bio-irriguent les terriers ce qui entraîne des mouvements de particules et de matière organique par bio-diffusion aux alentours de l'habitat et des mouvements de la surface vers le fond des galeries (Michaud *et al.*, 2005).

Lors de ces activités de construction des terriers ou de bio-irrigation, la redistribution spatiale des particules observée entraîne donc celle des communautés bactériennes associées (Marinelli *et al.*, 2002; Lucas *et al.*, 2003; Mermillod-Blondin *et al.*, 2004). Ces perturbations entraînent des changements en termes de biomasse et de croissance, d'activités métaboliques ou encore de structure de communautés (Kogure and Wada, 2005).

De plus, lors de l'activité d'alimentation, la faune ingère du sédiment et ainsi des micro-organismes, entraînant la diminution de la biomasse bactérienne environnante (Moriarty *et al.*, 1985). Cependant, si certaines bactéries sont éliminées lors du passage à travers l'intestin de l'animal, d'autres sont capables d'y résister et d'augmenter en biomasse grâce à l'apport de nutriments et de matière organique (Plante *et al.*, 1989; Plante and Mayer, 1994). Ces phénomènes sont souvent associés à un changement de structure des communautés microbiennes dans les sédiments (Plante and Mayer, 1996).

1.2.2.2. *Processus modifiant les conditions environnementales*

La bio-irrigation est le processus le plus important dans les échanges de composés solubles entre les sédiments et la colonne d'eau (Galaktionov *et al.*, 2003). Elle peut être passive et se fait par diffusion à travers l'interface eau/sédiments. Elle peut également être active par l'activité des organismes fouisseurs lorsqu'ils irriguent leur terrier afin d'oxygéner leur milieu et d'en éliminer les métabolites et les toxiques créant ainsi un flux d'eau (Meysman *et al.*, 2006).

La bio-irrigation permet ainsi l'apport d'oxygène et de solutés inorganiques par échange entre la colonne d'eau et les fluides appauvris, et stimule ainsi l'activité bactérienne aérobie comme anaérobie. Ce processus permet de propager plus profondément la couche de surface oxydée du sédiment (Figure 5). Les conditions physico-chimiques de l'environnement sont alors modifiées, ce qui peut provoquer une stimulation de l'activité bactérienne (Juniper, 1981; Aller and Yingst, 1985; Aller and Aller, 1998).

En effet, la ventilation des terriers et l'excrétion d'ammonium par les organismes dans les terriers, stimulent la nitrification, tandis que la dénitrification est facilitée par la pénétration accrue de nitrates dans des couches de sédiment périodiquement anoxiques (bio-irrigation intermittente). En outre, la présence de micro-niches oxiques (poche d'oxygène dans les sédiments réduits) et de micro-environnements anoxiques (pelotes fécales dans la couche oxique) renforce la proximité et les échanges entre nitrification et dénitrification. Il en résulte un couplage plus marqué de ces deux processus, à la fois spatialement et temporellement (Svensson and Leonardson, 1996; Stief and de Beer, 2002; Gilbert *et al.*, 2003; Laverock *et al.*, 2011). De plus, les micro-niches anoxiques ainsi que l'augmentation de la matière organique liées à la construction des terriers et à leur maintenance assurent des conditions favorables à la sulfato-réduction, qui sera également stimulée grâce à l'apport de composés oxydés dans le milieu (Bertics and Ziebis, 2010).

Le mode, la fréquence et l'amplitude de bio-irrigation varie selon l'organisme considéré (Francois *et al.*, 1999; Gerino *et al.*, 2003). De manière générale, ce mécanisme entraîne une alternance de conditions oxiques et anoxiques au rythme de l'activité des organismes (Brune *et al.*, 2000).

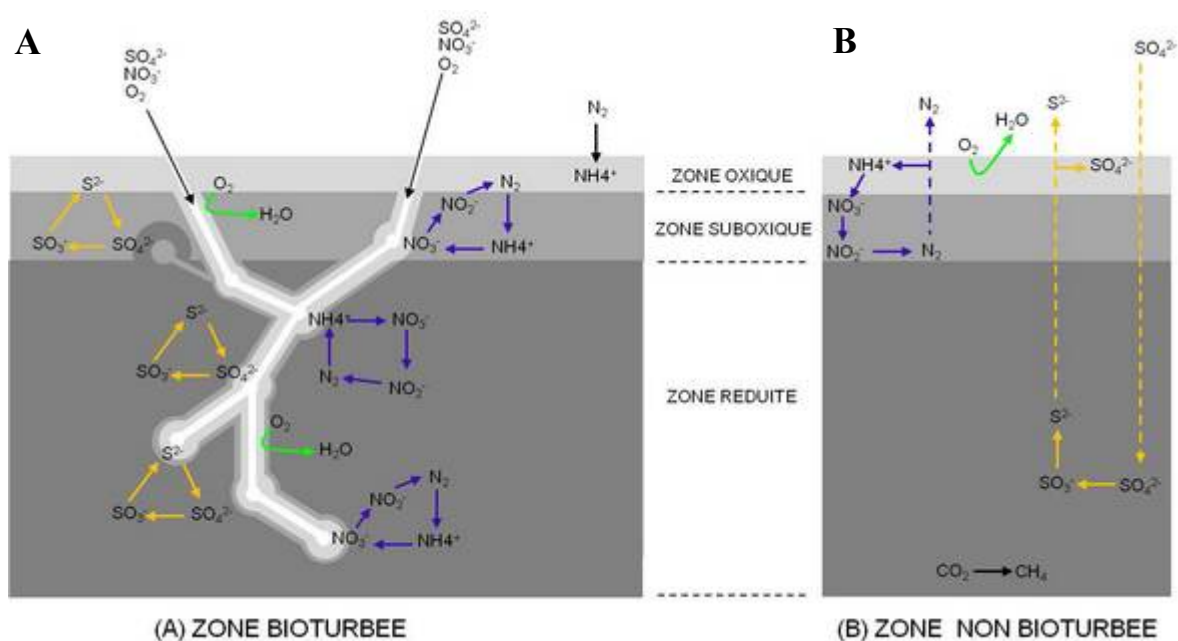


Figure 5 : Schéma conceptuel des connaissances acquises sur les cycles biogéochimiques dans un sédiment bioturbé (A) en comparaison à un sédiment non bioturbé (B) (Stauffer, 2011).

De manière générale, il apparaît que malgré la perte de biomasse provoquée par l'ingestion des sédiments, la bioturbation par la macrofaune conduit à une stimulation à la fois de la diversité et de l'activité des populations microbiennes (Juniper, 1981; Aller and Yingst, 1985). La bioturbation joue donc un rôle prépondérant sur les cycles biogéochimiques, les conditions physico-chimiques et le devenir de la matière organique dans les sédiments. Elle affecte ainsi les communautés bactériennes par l'apport ou le remaniement d'oxygène et de substrats, de nutriments et d'ions tels que les nitrates, les sulfates, l'ammonium, le fer, le manganèse ou encore les phosphates ainsi que par leur propre déplacement physique *via* le remaniement des sédiments (Yingst and Rhoads, 1980; Kogure and Wada, 2005).

Cependant la bioturbation par le macrozoobenthos, en modifiant les conditions physico-chimiques des sédiments et la conformation topographique de l'interface eau/sédiments, change également la force des sédiments superficiels dans les quelques centimètres supérieurs, menant à leur déstabilisation et augmentant l'érodabilité (de Deckere *et al.*, 2001).

1.2.3. Les contraintes physiques de remaniement

Dans la plupart des environnements, la position de l'interface oxic/anoxie est soumise à des variations temporelles. Dans le cas de sédiments, le dépôt de la matière organique fraîche, des inondations périodiques, les changements de l'activité microbienne influencée par les variations de température, ou des événements de mélange causés par la bioturbation ou le mouvement des vagues auront une incidence sur la position relative de l'interface oxic/anoxie, mais aussi tous les

processus dépendants, induisant une série temporelle de changements environnementaux successifs dans une localité donnée (Brune *et al.*, 2000).

Le transport de sédiments à l'interface oxe/anoxie (modifiant ainsi sa position de façon temporelle et spatiale) est donc géré par deux processus physiques principaux : la remise en suspension et la sédimentation, qui peuvent être influencés par les composantes biologiques intervenant sur l'érodabilité du sédiment (Figure 6) (Graf and Rosenberg, 1997; Le Hir *et al.*, 2007; Grabowski *et al.*, 2011).

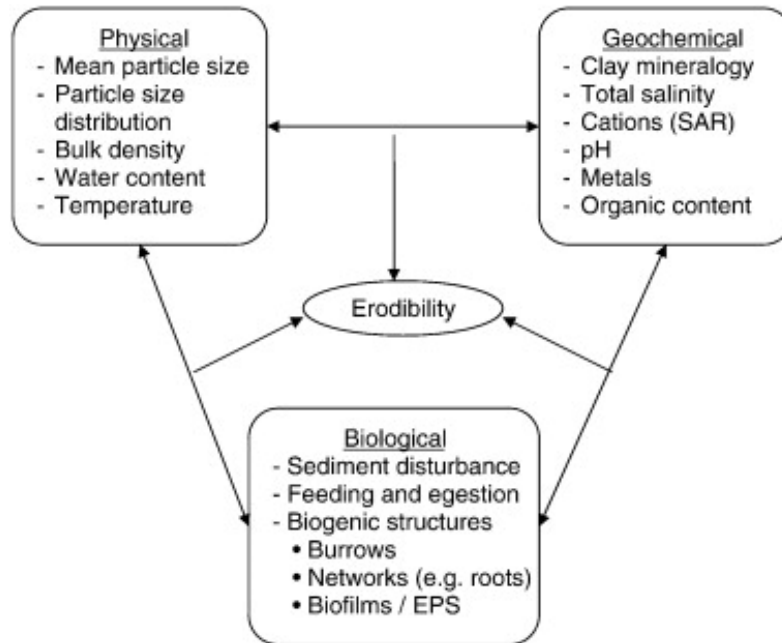


Figure 6 : Modèle conceptuel des propriétés des sédiments et des processus qui affectent l'érodabilité des sédiments. Les différents facteurs intervenant sont liés, et l'impact net d'un des facteurs sur l'érodabilité naturelle des sédiments est dépendant des interactions entre les différents facteurs (Grabowski *et al.*, 2011).

Les forces hydrodynamiques à l'interface eau/sédiment gouvernent la remise en suspension du sédiment. Elles sont typiquement dues aux courantstidaux, aux vagues et aux courants générés par les forces des vents (Mehta, 1988). Le processus de sédimentation est dépendant de la masse de sédiment en suspension, qui est spatialement et temporellement variable. Le profil de concentration est souvent fortement stratifié sur la profondeur de la colonne d'eau, avec des concentrations de matières en suspension (MES) au niveau de la surface du sédiment qui peuvent être de 2 à 3 fois supérieures à celles de l'eau de surface (Mehta, 1988). Cette zone correspond à la couche néphéloïde benthique, elle contient des quantités importantes de sédiments en suspension, qui peuvent être déposés et remis en suspension à partir de zones de dépôts (Figure 7).

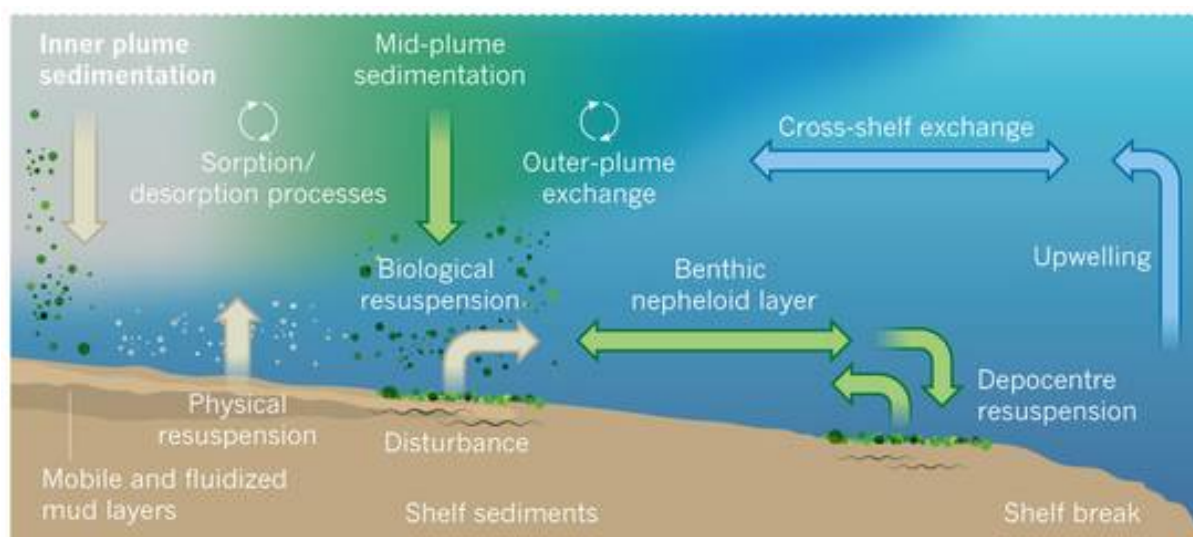


Figure 7 : Schéma conceptuel, d'après Bauer *et al.* (2013), représentant le flux et le cycle du carbone, largement influencés par les processus de sédimentation et de remise en suspension de matière dans les écosystèmes côtiers.

Les turbulences au niveau de l'interface eau/sédiments favorisent l'échange de flux de composés minéraux ou organiques, de nutriments (Graf and Rosenberg, 1997), fournit une stimulation de l'activité microbienne dans ce domaine, qui lui-même peut en outre influencer l'agrégation et désagrégation (Wainright, 1987; Muschenheim *et al.*, 1989; Wainright, 1990; Ritzrau and Graf, 1992). De plus, les variations de la charge particulaire au niveau de la zone néphéloïde benthique peuvent influencer le micro-phytobenthos, et donc la production primaire (Bauer *et al.*, 2013), lui-même impliqué dans la stabilité du sédiment (Stal, 2010). Ces conditions particulières générant des fluctuations, impactent de façon majeure le fonctionnement de cet écosystème à l'interface eau/sédiments, à l'origine l'existence d'une faune benthopélagique spécifique et adaptée impliquée dans la chaîne alimentaire (Childress *et al.*, 1989).

1.3. Minéralisation de la matière organique : compartimentation des processus biogéochimiques

En conséquence à cette exceptionnelle hétérogénéité, cet écosystème héberge une diversité importante de micro-organismes. Cette riche diversité permet une utilisation des ressources et des capacités de dégradation et de minéralisation de la matière organique (MO) selon une efficacité maximale, dans des conditions environnementales et des apports en nutriments changeants (Mendelssohn *et al.*, 2012). La MO est dégradée, au sein des sédiments, par des processus microbiens en conditions d'oxygène et d'anoxie. Les études se sont intéressées pour la plupart à la détermination des taux de dégradation en conditions strictement oxygènes ou strictement anoxiques. Il en découle un grand débat depuis la dernière décennie mettant en cause

l'efficacité de minéralisation de l'une ou l'autre condition et leur rôle dans le stockage de la MO dans les sédiments. Mais dans un environnement si complexe que représente l'interface eau/sédiments, soumis régulièrement à de nombreux bouleversements affectant les conditions physico-chimiques, physiques et biologiques, la compréhension des mécanismes du devenir de la MO dans ces seules conditions reste très limitée.

Les taux de dégradation de la MO dans les sédiments dépendent de plusieurs facteurs tels que sa constitution (concentration en protéines, cellulose, lignine...), de son temps de résidence (niveau de décomposition), de la température ambiante (fonction de la saison) ainsi que de la biomasse bactérienne (Kristensen, 2000). Les principales sources de MO dans les milieux marins côtiers proviennent du phytoplancton et du phytobenthos, ainsi que des différents apports provenant du continent et de l'océan (Chen and Borges, 2009).

Les procaryotes sont responsables d'une partie de la dégradation du carbone organique. Les bactéries aérobies sont capables de réaliser une minéralisation totale des substrats organiques avec l'oxygène comme accepteur d'électrons, en H_2O , CO_2 , nutriments inorganiques et biomasse cellulaire (Canfield, 1994). Lorsqu'une partie de la MO se trouve dans des zones anoxiques, ce sont des consortia de procaryotes anaérobies, par divers métabolismes (dénitrification, ferri-réduction, manganèse-réduction, sulfato-réduction, fermentation, méthanogenèse), qui prennent le relais de sa décomposition conduisant à sa minéralisation totale ou non (Lovley, 1991; Wakeham *et al.*, 2006). Parmi ces métabolismes, la sulfato-réduction est responsable de la plus grande partie de l'oxydation de la MO, pouvant équivaloir celle réalisée par les métabolismes aérobie dans les sédiments côtiers (Jørgensen, 1977, 1982). La MO non dégradée est ensuite séquestrée dans les sédiments.

Dans des environnements soumis à des perturbations permanentes du sédiment, les conditions sont si complexes et la structuration si hétérogène que la conceptualisation généraliste de ce type d'environnement est quasiment impossible à réaliser. Les oscillations oxie/anoxie résidant dans ces milieux ne permettent pas des études se cantonnant simplement à des conditions strictement oxiques ou strictement anoxiques (Aller, 1994). Ces milieux représentent donc des environnements très particuliers n'ayant reçu, de manière surprenante, que peu d'attention.

Quelques auteurs se sont intéressés au devenir de la MO soumise aux oscillations oxie/anoxie, avec pour objectif d'évaluer l'impact de ces variations sur la décomposition du carbone organique (Sun *et al.*, 1993; Aller, 1994; Sun *et al.*, 2002; Caradec *et al.*, 2004; Abril *et al.*, 2010). La plupart de ces travaux se sont intéressés à la dégradation du phytoplancton et plus précisément des lipides provenant des micro-algues, représentant la source majeure des détritiques organiques dans les sédiments marins. G. Abril et ses collaborateurs (2010) se sont intéressés aux

processus biogéochimiques intervenant dans la minéralisation de la MO niveau de zones chargées en matières en suspension d'un estuaire, lieu intense de la minéralisation de MO provenant du continent. Pour l'ensemble de ces études, l'efficacité de dégradation a été comparée dans des conditions oxiques, anoxiques et oscillantes, le plus souvent en bioréacteurs.

R.C. Aller (1994) démontre que les oscillations redox stimuleraient les métabolismes bactériens par remaniement permanent des nutriments disponibles dans les sédiments ce qui augmenterait l'efficacité de dégradation de la MO en minimisant son stockage. Il suggère également que cette efficacité serait dépendante de la fréquence des oscillations qui déterminerait l'adaptation des micro-organismes (consortia), leur potentiel de dégradation et la synthèse de biomasse. Dans ce sens, M.Y. Sun et ses collaborateurs (2002) montrent que la fréquence des oscillations détermine effectivement la dynamique des communautés bactériennes et que plus les oscillations sont fréquentes (un jour d'oxie suivi d'un jour d'anoxie dans ce cas), plus la dégradation des lipides est rapide. De plus, les oscillations régulent l'activité microbienne et la dégradation des lipides tout en minimisant l'accumulation de métabolites intermédiaires. S. Caradec et ses collaborateurs (2004) ont montré également que les changements dans les conditions redox affectent de manière significative le devenir des lipides. Enfin, G. Abril et ses collaborateurs (2010) ont observé une stimulation de la minéralisation de la MO lors des périodes de ré-oxydation, à des taux supérieurs de ceux observés en conditions d'oxie permanente, sauf en cas de période d'anoxie trop longue. Le recyclage répété de la biomasse bactérienne dû au changement des conditions d'oxydo-réduction, augmenterait la quantité de MO labile disponible et permettrait la dégradation de la MO réfractaire par des processus de « co-oxydation » (Aller, 1998). A ce processus peut s'ajouter la remise à disposition permanente de composés oxydés pour l'oxydation de la MO, qui expliqueraient l'efficacité de re-minéralisation de la matière récalcitrante à l'interface eau/sédiments (Aller, 1998).

Malgré ces quelques conclusions prometteuses, le fonctionnement biogéochimique et la dynamique des communautés bactériennes dans ce type d'environnements restent des thématiques très peu documentées et le devenir des contaminants tels que les hydrocarbures reste à explorer. La difficulté réside aussi dans le fait que les expérimentations *in situ* sont quasi irréalisables.

2. Ecosystèmes soumis à des conditions environnementales fluctuantes : capacités de réponse et d'adaptation des communautés microbiennes

Les micro-organismes répondent naturellement aux variations de facteurs de leur environnement (physico-chimiques, biologiques) en faisant face à ces nouvelles conditions environnementales. Ils mettent en place des mécanismes d'acclimatation physiologiques afin de survivre et de maintenir un certain niveau d'activité face à cette perturbation. Ces stratégies d'adaptation et d'acclimatation créent des coûts physiologiques au niveau de l'organisme et peuvent modifier la composition de la communauté microbienne active. A leur tour, les processus engendrés, pourront également modifier les caractéristiques de l'environnement proche (Schimel *et al.*, 2007).

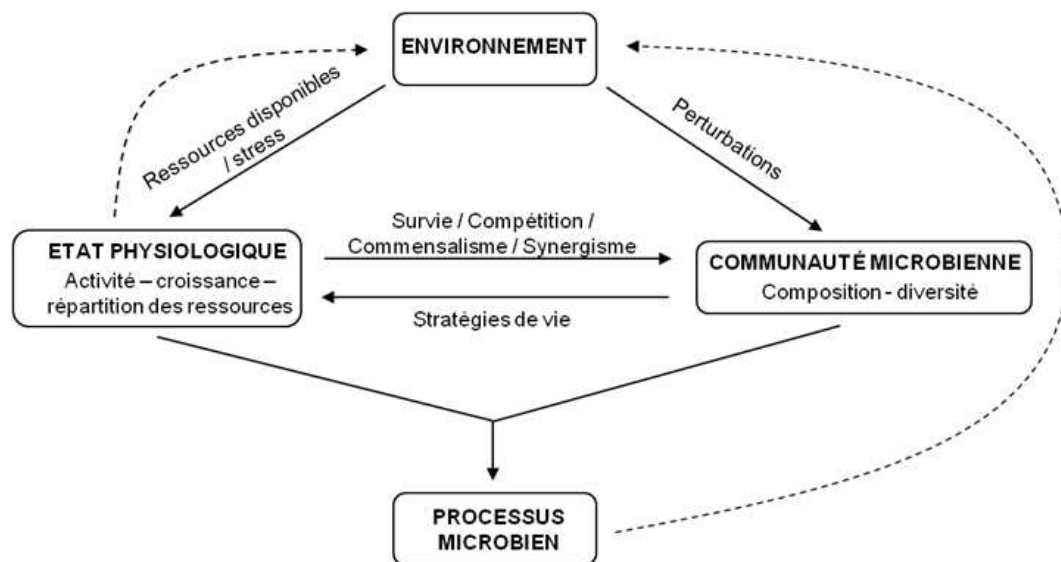


Figure 8 : Représentation schématique des interactions environnement/physiologie microbienne, composition de la communauté et processus de l'écosystème (modifié d'après Schimel *et al.*, 2007).

2.1. Réponse écologique des communautés microbiennes face aux variations des conditions environnementales

Le comportement de la communauté microbienne dans des environnements perturbés reste encore difficile à mesurer et à prédire. Comprendre les facteurs de stabilité de la communauté microbienne, est important pour prédire la réponse de la communauté à la perturbation (Shade *et al.*, 2012). De manière générale, une perturbation provoque une réponse différente selon la composition et les capacités de la communauté microbienne (Allison and Martiny, 2008; Nogales *et al.*, 2011). Une communauté adaptée peut montrer une résistance à la perturbation conduisant au maintien relatif de sa structure et de ses capacités métaboliques, dépendante de l'intensité de

la perturbation (Degens *et al.*, 2001; Philippot *et al.*, 2008). Si la communauté est adaptée mais sensible à la perturbation, la communauté peut être altérée mais se montrer capable de revenir à sa structure initiale (résilience) (Girvan *et al.*, 2005; Tobor-Kapłon *et al.*, 2006). Ce phénomène peut être dû à la flexibilité métabolique et à la tolérance physiologique des micro-organismes, à des taux de croissance rapide ou encore une évolution adaptative (transferts horizontaux) des micro-organismes.

Dans le cas d'une communauté sensible et non résiliente, la composition de la communauté va être modifiée. Au cours de la perturbation ou dans les situations post perturbation, tous les taxons de la communauté ne sont pas égaux. Certains, par leurs capacités à s'adapter à la nouvelle situation, peuvent prendre le dessus sur les autres et en conséquence accroître leurs représentations au sein de la communauté. La nouvelle communauté peut montrer des capacités fonctionnelles totalement différentes. Dans ce cas, partant du principe que chaque espèce assure une part du processus de façon irremplaçable, la fonction globale de la communauté est modifiée.

La communauté peut également montrer des capacités métaboliques similaires à la communauté d'origine (redondance fonctionnelle). Dans ce cas, le processus étudié est peu affecté par le changement de la biodiversité, chaque espèce étant capable d'assurer le processus considéré à la place des espèces supprimées. La nouvelle communauté peut présenter des taxa qui sont fonctionnellement redondants avec l'ancienne communauté, ou alors des taxa fonctionnant différemment mais la fonction globale est assurée de la même manière (Loreau *et al.*, 2002).

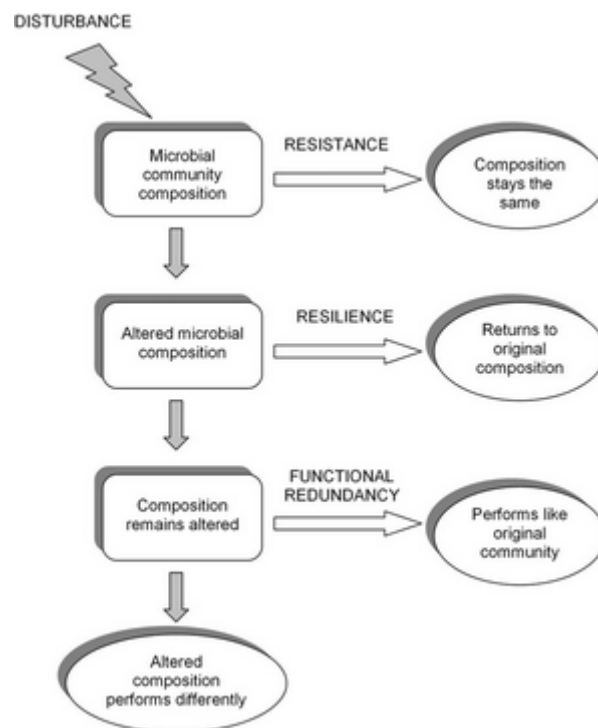


Figure 9 : Schéma conceptuel de l'effet d'une perturbation sur les communautés microbiennes (Allison and Martiny, 2008).

Ainsi, le lien existant entre diversité et fonction d'un écosystème est complexe et dépend fortement des atouts fonctionnels de chacun de ses membres (Swift *et al.*, 2004). Une expérimentation sur le rôle fonctionnel des bactéries en milieu contrôlé avec des assemblages « artificiels » a été conduite avec l'objectif de trouver une relation espèce/processus (Bell *et al.*, 2005). A travers l'étude du processus de la respiration bactérienne, ces auteurs confirment que les interactions synergiques entre les espèces bactériennes ainsi que la composition des communautés sont des facteurs importants qui jouent sur un rôle fonctionnel dans l'écosystème. Par conséquent, la réponse fonctionnelle des bactéries dépend de l'assemblage dont elles font partie (Hansen *et al.*, 2007). Afin d'explorer les relations entre les fonctions des écosystèmes et la diversité, plusieurs aspects différents de la diversité doivent être pris en compte : la richesse des espèces, la présence d'espèces clé et le nombre de groupes fonctionnels (Bengtsson, 1998).

2.2. Réponse aux fluctuations oxic/anoxie des conditions environnementales

Dans un environnement stratifié, les communautés microbiennes adoptent généralement une répartition verticale. Néanmoins, les variations de la position relative de la limite oxic-anoxique peuvent nécessiter des adaptations particulières permettant à un micro-organisme de coloniser des micro-niches caractérisées par un état fluctuant de l'oxygène. Beaucoup de bactéries anaérobies tolérantes à l'oxygène sont bien adaptées pour survivre au stress oxydatif. Un phénomène plus intéressant, cependant, est la capacité récemment découverte des bactéries généralement considérées comme « anaérobies strictes » à maintenir un métabolisme énergétique fonctionnel en présence de -ou même sur la base de- l'oxygène moléculaire (Brune *et al.*, 2000).

2.2.1. Relations des micro-organismes à l'oxygène

L'oxygène a deux facettes. D'un côté, c'est l'accepteur terminal d'électrons de la respiration aérobie, le moteur le plus efficace du métabolisme énergétique. D'un autre côté, l'oxygène est toxique en raison du fait que la réduction de l'O₂ moléculaire crée des espèces réactives de l'oxygène tel que l'anion superoxyde, le peroxyde, et le radical hydroxyle (Fenchel and Finlay, 2008). De manière générale, les micro-organismes qui vivent en présence d'oxygène, sont qualifiés d'aérobies (signifiant «vivre avec l'oxygène»), tandis que ceux qui vivent en absence d'oxygène sont dits anaérobies (Figure 10). Cette discrimination est à la fois physiologiquement et biogéochimiquement importante.

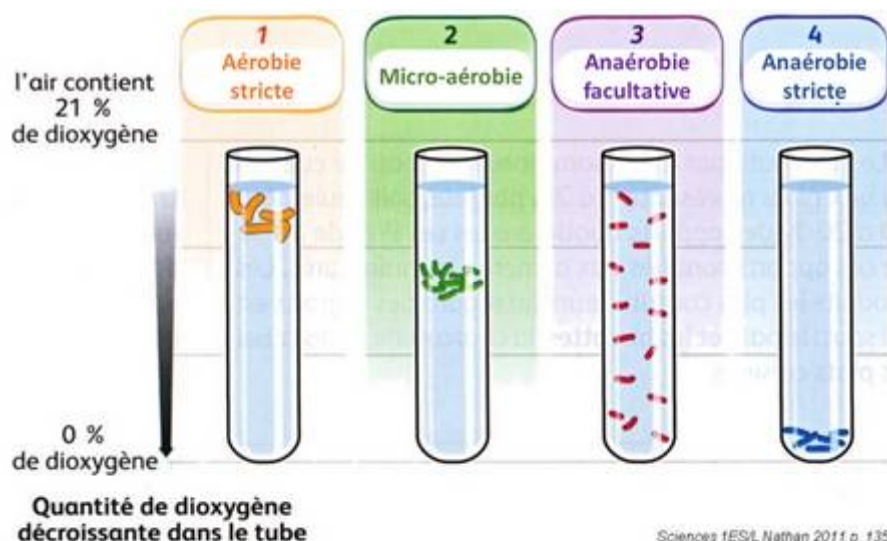


Figure 10 : Schéma descriptif des différents besoins en oxygène des micro-organismes.

Dans tous les micro-organismes aérobies, les formes toxiques de l'oxygène formées comme sous-produits du métabolisme aérobie, vont être rapidement dégradées. En effet, ces micro-organismes dégradent rapidement ces espèces agressives avec des enzymes telles que la catalase, la peroxydase ou la superoxyde dismutase. De nombreux micro-organismes, qui sont anaérobies stricts, ne possèdent pas ces enzymes et ne sont donc pas capables de se développer en présence d'oxygène, du fait notamment de ce manque.

Certains micro-organismes ont besoin d'oxygène pour leur respiration, et pourtant ils sont tués si la concentration en O_2 est trop élevée. Ces micro-organismes, dits micro-aérophiles, se développent de façon optimale à la limite inférieure de la zone de diffusion de l' O_2 , entre la zone oxique (contenant de l'oxygène) et la zone anoxique (sans oxygène). Les micro-organismes micro-aérobies présentent des exigences très spécifiques quant à la concentration en O_2 de leur environnement (Fenchel and Finlay, 2008). De nombreuses espèces microbiennes ne semblent prospérer qu'à une gamme de concentration en oxygène très limitée et ceci pour différentes raisons. Les bactéries chimiolithotrophes qui oxydent les sulfures ou réduisent le fer sont en compétition avec l'oxydation spontanée des sulfures, et elles doivent donc vivre à proximité de la source anaérobie de leur substrat. Les conditions de micro-aérobie constituent donc un repère pour un habitat convenable. Aussi, à travers leur consommation simultanée d'oxygène et sulfure, ces micro-organismes créent des gradients chimiques, améliorant ainsi les flux diffusifs opposés. Ces organismes sont dits organismes de gradient et ils dépendent de ces gradients chimiques abrupts pour leur subsistance (Jørgensen, 2000). Certains micro-organismes, tels que *Azospirillum spp.*, qui ont la capacité de fixer le N_2 nécessitent une faible concentration en O_2 ambiante afin de garantir l'anoxie intracellulaire nécessaire pour ce processus (Krieg and Hoffman, 1986). Enfin, de nombreux autres types physiologiques bactériens, peuvent être micro-

aérophiles et se développer à des concentrations en O₂ bien définies, du fait des coûts énergétiques qu'exige la protection contre les formes toxiques de l'oxygène (Jørgensen, 2000).

D'autres micro-organismes, les bactéries anaérobies non-obligatoires (ou facultatives), peuvent vivre à la fois au niveau des zones oxygène et anoxique des sédiments (Jørgensen, 2000).

2.2.2. Effet de l'oxygène sur des micro-organismes pendant longtemps qualifiés d'anaérobies stricts

2.2.2.1. Micro-organismes sulfato-réducteurs et oxygène

Jusqu'en 1990, les MSR étaient considérés comme des organismes anaérobies stricts, cependant, des études d'exposition de cultures pures de bactéries sulfato-réductrices (BSR) à l'oxygène ont démontré que certains de ces micro-organismes étaient encore viables après quelques heures voire plusieurs jours d'exposition (Fukui and Takii, 1990; Kjeldsen *et al.*, 2004). De plus en plus d'études montrent qu'ils sont capables de tolérer l'oxygène (Dilling and Cypionka, 1990; Cypionka, 2000; Dolla *et al.*, 2006; Santana, 2008).

Les MSR ont développé différentes stratégies en réponse à la présence d'O₂ dans l'environnement : l'agrégation, la migration vers les zones anaérobies, des réponses de type aérotactisme (Krekeler *et al.*, 1998; Dolla *et al.*, 2006; Brioukhanov and Netrusov, 2007). Certains MSR disposent de mécanismes de détoxification pour se protéger de ces composés, qui reposent sur l'action d'enzymes spécifiques comme la Superoxyde Dismutase (SOD), la Superoxyde Réductase (SOR), la catalase et la peroxydase (Lombard *et al.*, 2000; Coulter and Kurtz, 2001). Cependant, certains sulfato-réducteurs ont également la faculté de le respirer (i.e. de l'utiliser comme accepteur final d'électron), telles que les souches *Desulfobulbus propionicus*, *Desulfococcus multivorans*, *Desulfobacterium autotrophicum*, et chez certaines *Desulfovibrio* (Dilling and Cypionka, 1990). Ainsi, ces organismes peuvent survivre sous des conditions micro-oxygènes où ils respireraient l'oxygène ou également le nitrate (Dannenberg *et al.*, 1992). D'ailleurs, *Desulfovibrio desulfuricans* est capable de passer de la réduction du sulfate à celle du nitrate ou de l'oxygène en une minute lors d'une modification des conditions environnementales (Cypionka, 1994). Ces études ont permis d'expliquer la présence des MSR dans notamment des zones oxygènes de sédiments marins et estuariens (Jørgensen, 1977; Sahm *et al.*, 1999).

2.2.2.2. Micro-organismes méthanogènes et oxygène

Bien que les archées méthanogènes soient incapables de croître ou de former du méthane en présence d'oxygène (Thauer, 1998), elles montrent une certaine tolérance lorsque l'oxygène est présent en petite quantité (Brioukhanov and Netrusov, 2007). Les premières démonstrations de leur capacité à survivre à des expositions courtes à l'oxygène fut apportée dans les années 1970 sur les archées du genre *Methanosarcina* et *Methanobacterium* (Zhilina, 1972; Zehnder and Wuhrmann, 1977), puis d'autres études ont suivi, montrant que cette tolérance à l'oxygène est très variable d'une souche à l'autre. Ainsi, la viabilité des souches *Methanococcus voltae* et *M. vannielii*, est diminuée de 100 x sur une période de 10h en présence d'oxygène. Au contraire les archées *Methanobrevibacter arboriphilus* et *Methanobacterium thermoautotrophicum* peuvent le tolérer pendant plusieurs heures, et *Methanosarcina barkeri* peut survivre à des expositions supérieures à 24h (Zhilina, 1972; Kiener and Leisinger, 1983). Cette adaptation a également été mise en évidence dans l'environnement car des archées méthanogènes ont été détectées dans des habitats qui ne sont pas strictement anoxiques (Kusel and Drake, 1995; Wagner *et al.*, 1996) et certaines étaient métaboliquement actives (Hirasawa *et al.*, 2008). Enfin, la capacité à réaliser la méthanogénèse et la réduction de l'oxygène simultanément a été démontrée chez *Methanobrevibacter cuticularis* (Tholen *et al.*, 2007).

Les méthanogènes ont ainsi développé plusieurs systèmes en réponse à la présence de l'oxygène : une activité superoxyde dismutase (SOD), la formation d'agglomérats, l'attachement à des particules organiques, et la formation de consortia avec des micro-organismes anaérobie facultatifs qui atténuent les effets du stress oxydatif sur les cellules (Zhilina, 1972; Kirby *et al.*, 1981; Kiener and Leisinger, 1983; Kato *et al.*, 1993).

2.3. Réponse aux perturbations d'origines anthropiques, avec les hydrocarbures comme polluant majeur

Les activités d'origine humaine ont un impact important sur les écosystèmes marins. Les pressions exercées sont variées et résultent de nombreuses activités telles que le développement urbain, le transport maritime, la pêche, le tourisme, les activités agricoles et industrielles, etc. (Islam and Tanaka, 2004; Halpern *et al.*, 2007; Halpern *et al.*, 2008; Nogales *et al.*, 2011). Toutes ces activités ont un effet sur toutes les composantes de la chaîne alimentaire marine, des micro-organismes aux animaux prédateurs en haut de la chaîne trophique. Un récent rapport a analysé l'impact écologique des activités humaines dans les océans du monde entier en mettant l'accent

sur les facteurs de stress qui pourraient être évalués à l'échelle mondiale (Halpern *et al.*, 2008). Selon cette étude, plus d'un tiers des océans de la planète (41%) ont été identifiés comme étant moyennement à hautement impactés et certaines régions, qui représente 0,5% des océans mais une surface d'environ 2,2 millions de km², ont été identifiés comme hautement impactés. Les activités d'origine humaine sont directement ou indirectement impliquées dans toutes les menaces qui pèsent sur les écosystèmes océaniques et en accord avec cela, si l'on considère l'échelle mondiale, la majorité des régions avec des niveaux d'impact les plus faibles sont des zones où l'accès des personnes est limité, telles que les zones polaires. Les niveaux d'impacts les plus élevés correspondent aux zones côtières et de plateau océanique (< 200m de profondeur), correspondant aux zones exploitées de manière intensive et recevant également l'influence des activités terrestres.

Les composés pétroliers constituent le polluant organique le plus abondant dans les mers et les océans (Spormann and Widdel, 2000). En effet, les apports d'hydrocarbures dans les milieux marins ont été estimés entre 1,3 à 8,8 Mt/an (Berthe-Corti and Nachtkamp, 2010). Le déversement sans précédent du DeepWater Horizon dans le Golfe du Mexique en 2010 est un exemple majeur des accidents pétroliers encore possibles à l'heure actuelle et dont l'impact sur l'environnement est dramatique (Reddy *et al.*, 2012).

2.3.1. Pourquoi le pétrole est-il toxique ?

La toxicité du pétrole et son impact sur le vivant sont principalement déterminés par sa composition chimique. Pétrole et gaz naturel sont issus de matières biologiques dont la composition a été modifiée par la diagenèse durant des millions d'années pour produire le mélange complexe de composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés qui constituent ces combustibles fossiles. Des recherches basées sur la spectrométrie de masse en ultra haute résolution ont permis l'identification de plus de 20 000 composés chimiques distincts (Marshall and Rodgers, 2004; Marshall and Rodgers, 2008). En règle générale, tous les pétroles bruts sont constitués des mêmes types d'hydrocarbures moléculaires. Toutefois, la proportion de molécules spécifiques dans le pétrole brut à partir d'un réservoir donné dépend de l'emplacement, la profondeur et l'âge du réservoir.

2.3.1.1. Composition du pétrole brut

Un pétrole est typiquement constitué de composés hydrocarbonés, saturés et aromatiques, de composés polaires (molécules hétérocycliques tels que composés oxygénés, soufrés et azotés), et de composés plus complexes comme les résines et asphaltènes, récalcitrants à la dégradation

(Figure 11). On trouve également des insaturés en faible proportion (les alcènes et les alcynes, possédant une ou plusieurs doubles ou triples liaisons, respectivement), et des métaux à l'état de traces, notamment du soufre, du vanadium et du nickel (généralement associés aux asphaltènes), du fer, du cuivre et de l'uranium (Yemashova *et al.*, 2007). Les composés du pétrole sont généralement regroupés en 4 classes : Saturés, Aromatiques, Résines et Asphaltènes (SARA) ; obtenues par fractionnement du pétrole brut selon l'analyse des fractions SARA permettant l'analyse des composés d'un pétrole (Harayama *et al.*, 1999). La classification des pétroles légers à lourds repose sur la proportion respective que représente chacune de ces familles (Tissot, 1984).

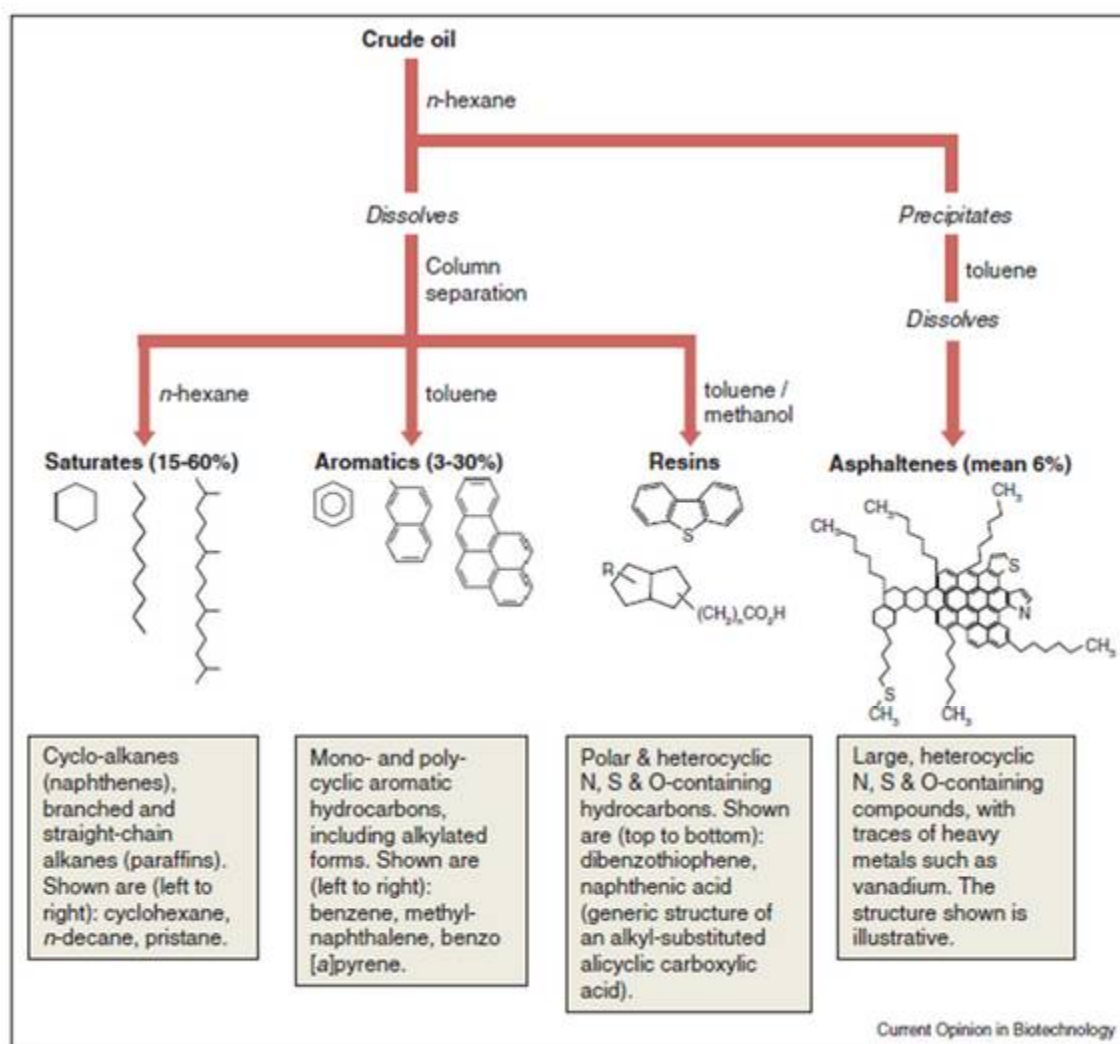


Figure 11: Classification opérationnelle des composants du pétrole brut sur la base du système de fractionnement SARA (Saturés-Aromatiques-Résines-Asphaltènes), avec une des structures représentatives pour chaque fraction. D'après McGenity (2014), modifié de Whitby (2010).

Les hydrocarbures saturés constituent la fraction la plus importante du pétrole brut. Ces composés, ne possédant pas de double ou triple liaisons, regroupent les alcanes linéaires, les alcanes ramifiés, et les cycloalcanes (Harayama *et al.*, 1999). Les alcanes linéaires (n-alcanes, C_nH_{2n+2}) ont une longueur qui varie de 7 à 40 atomes. Les alcanes ramifiés peuvent posséder un

groupement méthyle (iso ou antéiso-alcanes) ou plusieurs groupements méthyles (isoprénoïdes). Les cycloalcanes (C_nH_{2n}) sont constitués de un ou plusieurs composés cycliques à 5 ou 6 atomes de carbone le plus souvent substitués, dont certaines molécules à haut poids moléculaires (C19-C30), particulièrement résistantes à la biodégradation, peuvent être utilisés comme biomarqueurs de pétrole brut (e.g., $\alpha\beta$ -hopanes ; Prince *et al.* (1994)).

La fraction des hydrocarbures aromatiques représente la deuxième fraction la plus importante constituant le pétrole brut. Parmi les hydrocarbures aromatiques, on compte les hydrocarbures monoaromatiques, contenant un seul noyau benzénique, rassemblant les molécules de benzène, toluène, éthylbenzène et xylène, appelés plus communément les BTEX, et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ces derniers font partie d'une famille extrêmement diversifiée avec près de 100 composés organiques contenant deux ou plusieurs noyaux benzéniques fusionnés. Ils sont thermodynamiquement stables et possèdent des points de fusion et d'ébullition très élevés avec une faible solubilité dans l'eau. Les propriétés chimiques et leur devenir dans l'environnement dépendent étroitement du nombre de cycles aromatiques présents, et de la nature de leur assemblage. Les HAP sont généralement divisés en composés à faible poids moléculaire (contenant 2 à 3 cycles aromatiques) et composés à haut poids moléculaire (contenant 4 cycles aromatiques et plus). Leur hydrophobicité, leur récalcitrance à la biodégradation et leur toxicité augmentent avec le nombre de cycles aromatiques. Les HAP à faible poids moléculaire sont plus solubles et volatils et présentent moins d'affinités avec les surfaces que ceux à haut poids moléculaire, qui ont une tendance à s'accumuler dans les environnements. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques alkylés font partie des HAP substitués. L'alkylation, au sens large, est la réaction chimique par laquelle un groupe alkyle est introduit dans un composé organique par addition ou substitution. Dans le cas des HAP, la substitution sur un cycle aromatique rend leur dégradation difficile. En effet, leur présence semblerait inhiber l'orientation et l'accessibilité des HAP vis à vis des dioxygénases (Seo *et al.*, 2009). Les HAP alkylés sont donc plus récalcitrants encore à la dégradation que les composés parents desquels ils dérivent.

2.3.1.2. Impact sur le vivant

Les dommages environnementaux causés par une pollution pétrolière touchent les différents compartiments terrestres : l'atmosphère, la colonne d'eau et le sédiment, impactant tous les niveaux trophiques, à travers plusieurs mécanismes (Mendelssohn *et al.*, 2012).

En premier lieu, le déversement de grandes quantités de pétrole brut notamment sous forme de nappe de pétrole telles que les marées noires va être à l'origine de dégradations importantes

du biotope et de l'écosystème via l'asphyxie du milieu. Ceci peut être la conséquence directe du recouvrement des milieux, « mazoutage » des organismes vivants (faune et flore), absorption par la peau ou les structures respiratoires. Le revêtement affecte les échanges gazeux, la régulation de la température, ou d'autres processus de maintien de la vie. Puis de façon indirecte, l'apport de matière organique fraîche qui va être dégradée par les processus microbiens va induire l'appauvrissement du milieu en oxygène.

Le pétrole brut, étant un mélange très complexe d'hydrocarbures et d'autres molécules, génère des stress très disparates dépendant des propriétés physico-chimiques diverses de ces composés ayant également des potentiels de dégradabilité variés. Cependant, il est admis de façon générale que l'augmentation du nombre de carbone, rend les hydrocarbures moins bio-disponibles, volatiles et solubles (plus hydrophobes) et ils auront tendance à s'adsorber plus facilement, bien que le degré d'aromaticité, la position des cycles et des branchements peuvent modifier cette règle générale (Harms *et al.*, 2010).

Les composés bio-disponibles dans le milieu ont un impact néfaste sur les espèces et biocénoses par leur toxicité associée à leur ingestion. En particulier les animaux filtreurs vont bio-accumuler une fraction des éléments composant le pétrole, ces produits vont contaminer le réseau trophique. Les animaux benthiques qui se nourrissent par broutage des sédiments de surface peuvent ainsi être exposés par ingestion de composés pétroliers adsorbés au niveau du sédiment (Muijs and Jonker, 2010). Les effets toxiques du pétrole sur des espèces de poisson ont été documentés (Whitehead *et al.*, 2012). Bohne-Kjersem *et al.* (2009) ont notamment montré d'importants changements dans la composition des protéines du plasma ; 137 protéines étaient exprimées différemment, selon le niveau d'exposition au pétrole brut et bon nombre des changements survenus apparaissaient après de faibles niveaux d'exposition (protéines du système immunitaire, de la fertilité, associées à l'apoptose, du métabolisme des acides gras ...).

Les hydrocarbures aromatiques correspondent aux composés du pétrole les plus préoccupants en terme notamment de santé humaine, certains HAP ayant été listés comme polluants prioritaires (ATSDR, 1995). Ces molécules sont reconnues comme étant toxiques, mutagènes et cancérigènes (Doyle *et al.*, 2008). Leur hydrophobicité, leur récalcitrance à la biodégradation et leur toxicité, augmentent avec le nombre de cycles aromatiques. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques alkylés font partie des HAP substitués et présentent une toxicité non négligeable. En plus des hydrocarbures la toxicité d'un pétrole est également liée à la présence de métaux.

L'état d'altération d'un pétrole, c'est-à-dire la modification de ses propriétés physico-chimiques, modifie l'efficacité de ces mécanismes (toxicité, les voies d'exposition, la biodisponibilité) à impacter les environnements et la biocénose.

2.3.2. Lorsque les hydrocarbures pétroliers menacent l'environnement suite à un déversement

La composition chimique et la nature physique du pétrole brut évoluent à partir du moment où il est déversé dans les environnements marins, sous l'action des événements climatiques : selon les vents, les vagues, les courants d'eau, exposition à la lumière, et la température, mais également en fonction du type de pétrole et de la disponibilité des nutriments (McGenity *et al.*, 2012; McGenity, 2014), influençant son devenir. Les processus d'altération comprennent l'étalement, l'évaporation, la photo-oxydation, l'émulsification, la dissolution, la dispersion, la sédimentation, et l'oxydation microbienne/biodegradation (Figure 12). Ces différents mécanismes vont altérer le pétrole, modifiant ainsi ces propriétés physiques, chimiques et sa toxicité, pour conduire à court, moyen ou long-terme à l'élimination de ces différents constituants.

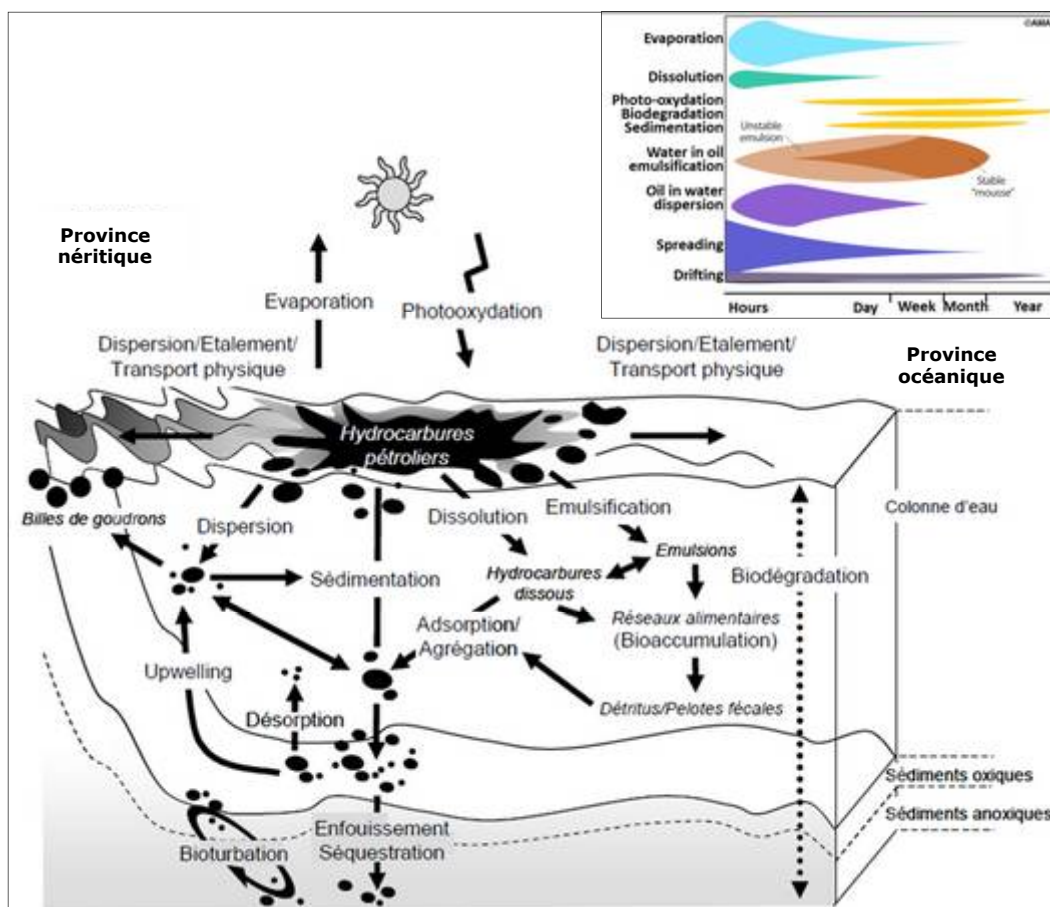


Figure 12 : Schéma conceptuel des processus intervenant dans le devenir des composés pétroliers en milieu marin et échelle de temps associée. D'après Miralles (2007).

Au moment du déversement, le pétrole brut « frais », généralement moins dense que l'eau de mer s'étale en surface formant une nappe de pétrole qui se disperse facilement à partir de la source, en fonction de sa viscosité. L'étendue et le devenir de cette nappe sont également intimement liés au vent, aux vagues et à la température (Dutta and Harayama, 2000).

Rapidement, les composées du pétrole les plus volatiles, les plus solubles dans l'eau, c'est-à-dire les molécules de faible poids moléculaire (température d'ébullition $< 250^{\circ}\text{C}$) vont respectivement être éliminées du pétrole par évaporation et dissolution. Ainsi, en quelques heures, un quart, un tiers, parfois jusqu'à la moitié du volume déversé part dans l'atmosphère, sous forme de gaz et d'aérosols (Venosa and Zhu, 2003). En parallèle, la dissolution de composés du pétrole dans la colonne d'eau concerne environ 1% de la masse du pétrole, comprenant notamment des hydrocarbures aromatiques fortement toxiques. L'impact de ce processus peut donc être très important d'un point de vue toxicologique (Sebastiao and Soares, 1995; Harayama *et al.*, 1999). Les composés dissous dans l'eau, représente une fraction bio-disponible pour les micro-organismes, acteurs majeurs de la minéralisation des hydrocarbures de pétrole brut (Head *et al.*, 2006; Yakimov *et al.*, 2007).

En surface des eaux, la nappe de pétrole est exposée à la photo-oxydation. Cette réaction d'oxygénation se produit sous l'action du dioxygène (O_2) et des rayonnements solaires (UV). Les hydrocarbures aromatiques sont les plus sensibles à ce processus de par la présence de leur cycle aromatique, les alcanes étant plus résistants. Le haut poids moléculaire et les substitutions alkyles augmentent cette sensibilité (Garrett *et al.*, 2003). La photo-oxydation conduit à la formation de molécules plus solubles et ainsi plus facilement biodégradables (Dutta and Harayama, 2000).

Sous l'action des courants et des vagues, des émulsions eau-dans-huile (« mousse au chocolat ») ou huile-dans-eau se forment. Ce phénomène d'émulsification modifie considérablement les propriétés du pétrole puisqu'il peut incorporer plus de 80% d'eau, ce qui, par conséquent, augmente sa viscosité et son volume. Les émulsions huile-dans-eau sont constituées d'hydrocarbures à haut poids moléculaires et sont difficilement biodégradables. *A contrario*, les émulsions eau dans-huile sont moins stables et facilitent la biodégradation des hydrocarbures (Venosa and Zhu, 2003).

Ces différentes altérations rendent le pétrole plus visqueux, sa densité augmente, les particules de pétrole sont plus susceptibles de coaguler, ils peuvent également s'agglomérer avec des particules sédimentaires (Sebastiao and Soares, 1995; Lipiatou *et al.*, 1997; Gogou *et al.*, 2000). Lorsque la densité des résidus goudronneux excède celle de l'eau de mer, le pétrole passe alors de la surface et de la colonne d'eau vers le fond marin, il sédimente.

Néanmoins, les nappes de pétrole atteignent fréquemment les zones intertidales, avec différents degrés d'altération en fonction de la localisation de la source de déversement et donc au temps d'exposition aux différents mécanismes cités ci-dessus (McGenity, 2014). En effet sous l'action des vagues et des marées les nappes de pétrole dérivent vers les côtes et se déposent sur les sédiments intertidaux. Dans les zones de faible énergie marémotrice et houlomotrice, la nappe de pétrole va être piégée au niveau des sédiments et de la végétation, les courants d'eau étant trop faibles pour évacuer le pétrole déposé. De plus, l'abondance de minéraux argileux couplés avec des charges organiques élevées dans ces zones encourage la sorption des hydrocarbures les plus hydrophobes (Rivas, 2006). Ainsi, suite à la catastrophe pétrolière du DeepWater Horizon en 2010, des concentrations s'élevant à plus de 510 mg de pétrole brut par g de sédiments de surface (sur les 2 premiers centimètres) ont pu être détectées dans une baie du Golfe du Mexique (Lin and Mendelssohn, 2012).

Le dépôt de sédiments frais et l'action de la macrofaune (*e.g.* la bioturbation) peuvent alors entraîner l'enterrement d'hydrocarbures déposés ou sédimentés au niveau des sédiments jusque dans les zones de faible potentiel redox (Brion and Pelletier, 2005) où ils peuvent être séquestrés pour de nombreuses décennies (White *et al.*, 2005). Ces hydrocarbures séquestrés seront donc peu bio-disponibles pour les processus de biodégradation aérobie par les micro-organismes (Button *et al.*, 1992). Cependant, ces hydrocarbures peuvent à nouveau devenir accessibles par leur remobilisation, resuspension et désorption, suite à des perturbations naturelles telles que la houle ou la bioturbation, ou anthropiques tels que le dragage, le chalutage.... Cette accessibilité est une épée à double tranchant puisqu'elle améliore le potentiel de biodégradation (en favorisant la biodégradation aérobie (Eggleton and Thomas, 2004)), tout en augmentant le risque pour le biote (Venosa *et al.*, 2010; McGenity, 2014).

2.3.3. Sélection des micro-organismes hydrocarbonoclastes en réponse à la pollution

Une exposition à une contamination par les hydrocarbures peut se traduire par des effets sur la biomasse, l'activité métabolique, la structure et la diversité taxonomique ou fonctionnelle d'une communauté microbienne. En général, cette contamination provoque l'inhibition de la croissance de certains membres de la communauté au profit d'organismes hydrocarbonoclastes, plus adaptés aux nouvelles conditions environnementales (MacNaughton *et al.*, 1999; Yakimov *et al.*, 2005; McGenity *et al.*, 2012). Il y a donc une sélection des micro-organismes capables d'utiliser la nouvelle source de carbone et d'énergie et restructuration de la communauté d'origine.

Les bactéries hydrocarbonoclastes sont largement distribuées dans divers habitats comme les milieux marins, les milieux d'eau douce ou encore les sols (Atlas, 1981; van Hamme *et al.*, 2003). Elles sont relativement peu abondantes dans un environnement vierge, de l'ordre de 0,1% de la communauté cultivable tandis que dans un environnement contaminé, elles peuvent représenter 100% des bactéries viables (Atlas, 1981; Ridgway *et al.*, 1990). Cette sélection ou adaptation au moment de l'exposition au contaminant peut être due à trois facteurs : 1) l'induction ou la dé-répression d'enzymes spécifiques, absentes (ou présentes en faible quantité) dans la population avant l'exposition, 2) la sélection de nouvelles capacités métaboliques découlant de changements génétiques ou, 3) l'augmentation du nombre d'organismes capables de catalyser une réaction spécifique liée au substrat arrivant (Spain *et al.*, 1980). Ainsi, de nombreuses études ont observé un changement important de la structure des communautés initialement présentes au moment de l'exposition aux hydrocarbures (Bordenave *et al.*, 2004; Kaplan and Kitts, 2004; Cappello *et al.*, 2007b). La plupart du temps, une exposition aux hydrocarbures sélectionne préférentiellement des organismes à Gram négatif et en particulier des Protéobactéries, dont un grand nombre de genres a été décrit pour leurs capacités à dégrader les hydrocarbures (MacNaughton *et al.*, 1999; Chao and Hsu, 2004; Yakimov *et al.*, 2005).

3. Les communautés microbiennes d'environnements côtiers pollués aux hydrocarbures : dynamique et fonction des micro-organismes hydrocarbonoclastes

Les micro-organismes ont eu des millions d'années pour s'adapter à la contrainte imposée par les hydrocarbures et pouvoir exploiter leur «valeur de carburant» (Widdel and Musat, 2010; McGenity, 2014). Ainsi, une large variété de micro-organismes dans les trois domaines de la vie ont développé les capacités nécessaires à leur utilisation à la fois comme source d'énergie et de carbone (McGenity, 2010; Prince, 2010; Prince *et al.*, 2010). Les processus de biodégradation microbienne jouent un rôle majeur dans l'évolution de la composition du pétrole et dans la détermination de son devenir dans les écosystèmes pollués (Lovley, 2003). Le développement des connaissances de l'écologie des micro-organismes hydrocarbonoclastes d'écosystèmes complexes tels que les milieux côtiers, par notamment la compréhension des facteurs qui influent sur leur dynamique et leur rôle dans la dégradation des hydrocarbures est primordiale afin d'évaluer le devenir des hydrocarbures et pour la préservation de ces écosystèmes.

3.1. Les groupes fonctionnels impliqués dans la dégradation

La capacité à dégrader les hydrocarbures est distribuée parmi de nombreux genres bactériens appartenant principalement aux Protéobactéries ou aux bactéries à Gram positif (Berthe-Corti and Höpner, 2005). Les bactéries hydrocarbonoclastes sont ubiquistes et sont présentes dans les environnements marins et terrestres (Leahy and Colwell, 1990). Elles sont capables de dégrader une gamme plus ou moins large de substrats et peuvent être aérobies ou anaérobies (Atlas, 1981). Des espèces ayant la capacité de réaliser la dégradation des hydrocarbures sous des conditions oxygène et anoxique ont pu être identifiées : des souches isolées dénitrifiantes des genres *Pseudomonas* et *Brevibacillus* (Grishchenkov *et al.*, 2000) et du genre *Thauera* (Shinoda *et al.*, 2004).

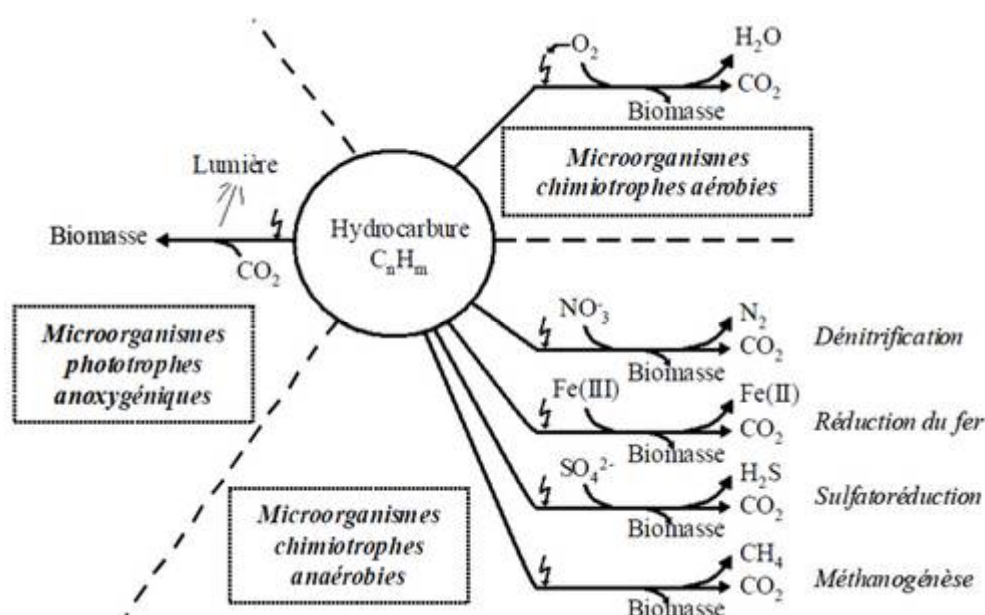


Figure 13 : Métabolismes impliqués dans l'utilisation des hydrocarbures par les micro-organismes. D'après Widdel and Rabus (2001).

3.1.1. Les bactéries aérobies hydrocarbonoclastes

Les souches aérobies hydrocarbonoclastes, connues pour dégrader les hydrocarbures aromatiques, les plus fréquemment décrites appartiennent aux différentes classes des Protéobactéries. Elles appartiennent aux genres *Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* (Juhasz *et al.*, 1997; Mueller *et al.*, 1997; Johnsen *et al.*, 2002). Parmi les bactéries à Gram positif, on trouve les genres *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium* et *Bacillus* (Kästner *et al.*, 1994; Moody *et al.*, 2001; Zeinali *et al.*, 2007). Le genre *Cycloclasticus* compte également des souches hydrocarbonoclastes (Dyksterhouse *et al.*, 1995).

Les souches aérobies dégradant les alcanes appartiennent à divers genres de bactéries à Gram positif, *Corynebacterium*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* (Radwan *et al.*, 1996; Churchill *et al.*, 1999; Sharma and Pant, 2000) et à Gram négatif, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Burkholderia* et *Paracoccus* (Yuste *et al.*, 2000; van Beilen *et al.*, 2002; Wentzel *et al.*, 2007).

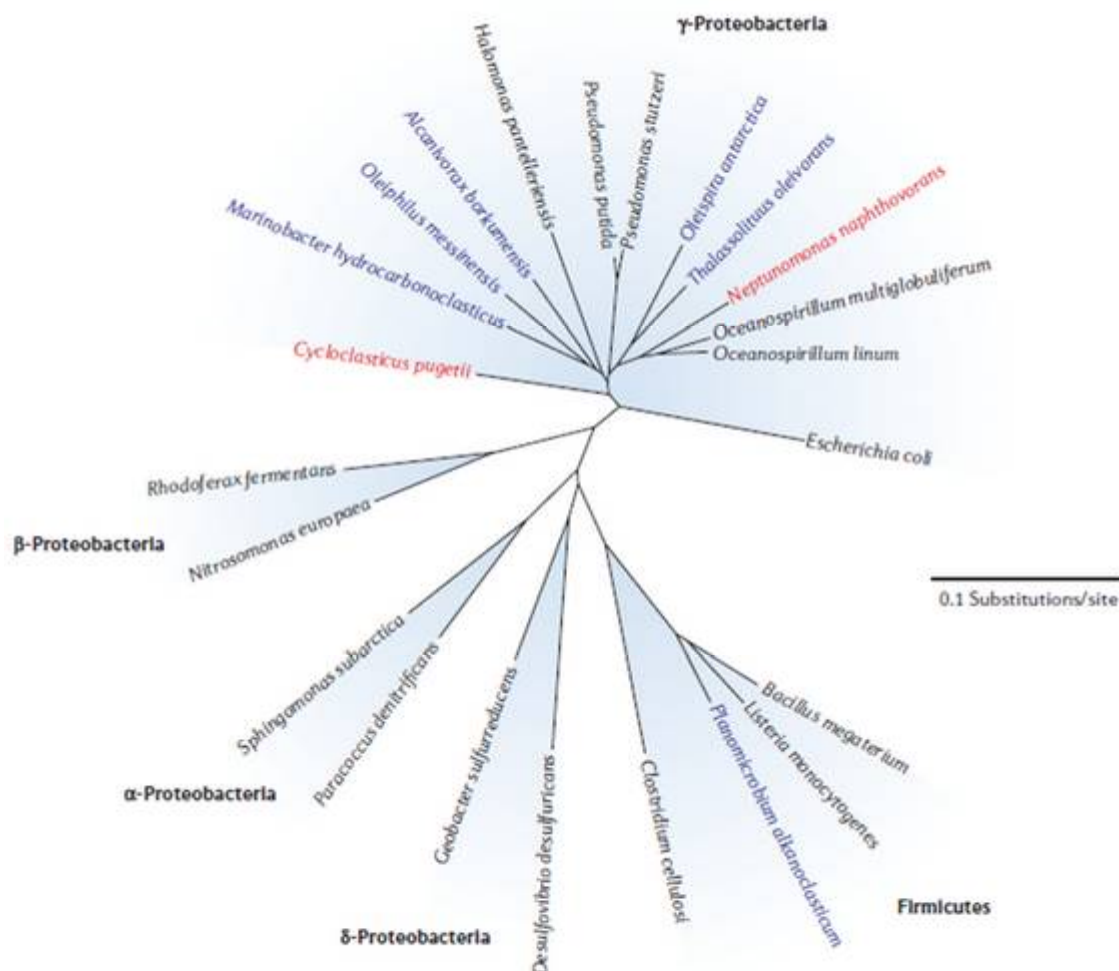


Figure 14 : Arbre phylogénétique illustrant la diversité des bactéries aérobies ayant la capacité de dégrader les hydrocarbures (Head *et al.*, 2006).

3.1.2. Les bactéries anaérobies hydrocarbonoclastes

D'abord décrite à l'aide de consortia de bactéries, l'utilisation d'hydrocarbures par des bactéries anaérobies a été réellement démontrée au début des années 1990 avec l'isolement d'une souche pure sulfato-réductrice utilisant l'hexadécane comme seule source de carbone et d'énergie (Aeckersberg *et al.*, 1991). Depuis, de nombreuses souches pures dégradant les hydrocarbures ont été isolées et décrites comme appartenant à un large panel de types respiratoires.

3.1.2.1. Les bactéries dénitrifiantes

En comparaison des autres mécanismes respiratoires anaérobies, la dénitrification est la plus favorable énergétiquement. Cela explique que, pour des raisons de rapidité de croissance, les bactéries dénitrifiantes ont été préférentiellement utilisées comme modèles pour les études génétiques et biochimiques liées à la dégradation des hydrocarbures.

Ces bactéries sont capables de dégrader les alcanes et les hydrocarbures aromatiques (Coates *et al.*, 1997), selon la souche considérée, en utilisant les nitrates comme accepteurs d'électrons. Les genres impliqués dans la dégradation des alcanes connus actuellement sont *Azoarcus*, *Dechloromonas* et *Pseudomonas* et ceux impliqués dans la dégradation des molécules aromatiques sont *Thauera*, *Azoarcus* et *Dechloromonas* (Widdel and Rabus, 2001; Bonin *et al.*, 2004).

3.1.2.2. Les bactéries sulfato-réductrices

L'intérêt porté aux sulfato-réducteurs est double. D'une part, il a été démontré que les bactéries sulfato-réductrices marines sont capables d'utiliser les composés aliphatiques et aromatiques directement à partir d'un pétrole brut (Rueter *et al.*, 1994). D'autre part, ces bactéries jouent un rôle majeur dans le cycle du carbone en milieu marin (Jorgensen, 1982; Rabus *et al.*, 2006). Elles effectuent la minéralisation des hydrocarbures avec réduction des sulfates en sulfures. De manière générale, les principaux genres bactériens impliqués et connus à ce jour, sont *Desulfobacula*, *Desulfobacterium*, *Desulfotomaculum*, *Desulfatibacillum*, *Desulosarcina*, *Desulfococcus*, *Desulfatiferula* (Vandecasteele, 2005; Cravo-Laureau *et al.*, 2007; Savage *et al.*, 2010; Widdel *et al.*, 2010; Kleindienst *et al.*, 2014).

3.1.2.3. Autres métabolismes

D'autres souches pures anaérobies ont été isolées et caractérisées comme utilisant les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie. C'est le cas des bactéries ferri-réductrices appartenant au genre *Geobacter*, utilisant le Fe(III) comme accepteur d'électrons (Lovley *et al.*, 1989; Coates *et al.*, 2001). Une souche phototrophe, *Blastochloris sulfoviridis*, est également capable de dégrader le toluène (Zengler *et al.*, 1999) ainsi qu'une souche fermentative, *Pelobacter acetylenicus*, dégradant l'acétylène (Schink, 1985). De plus, quelques consortia fermentaires et méthanogènes ont été décrits (Edwards and Grbic-Galic, 1994; Zwolinski *et al.*, 2000; Hirschler-Rea *et al.*, 2012).

3.1.3. Combinaison de différents taxons pour la transformation de polluants complexes

La biodégradation des hydrocarbures pétroliers dans l'environnement, est le résultat de la coopération d'un réseau de micro-organismes (Figure 15), dont tous ne sont pas directement impliqués dans la dégradation (Head *et al.*, 2006). Cela est particulièrement vrai pour les hydrocarbures piégés dans les matrices environnementales complexes, et dans des conditions anaérobies.

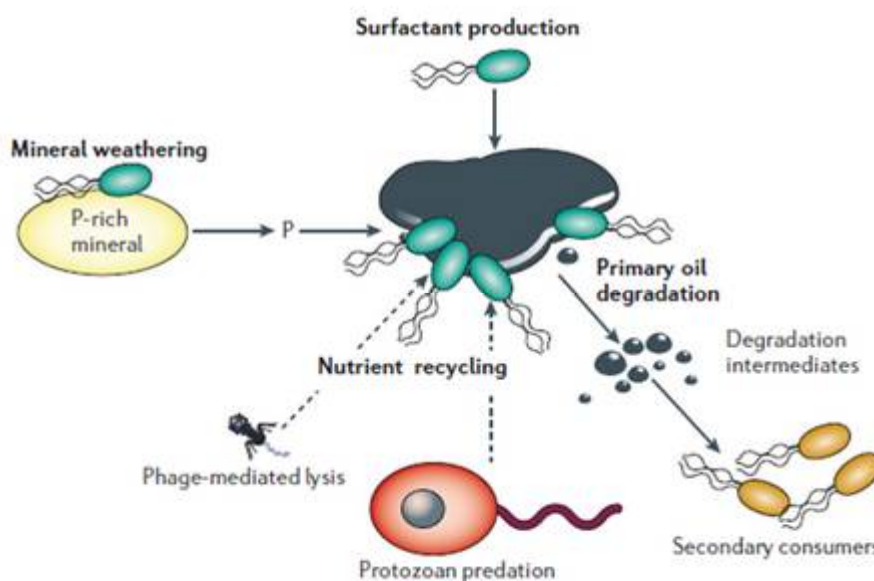


Figure 15 : Schéma conceptuel de l'organisation du réseau microbien impliqué dans la dégradation du pétrole (Head *et al.*, 2006). Les bactéries qui dégradent les hydrocarbures sont indiquées en vert et ceux ne le dégradant pas sont représentés en jaune. Les flèches pleines indiquent les flux de matière, et les flèches en pointillé indiquent les interactions directes (par exemple, la lyse par phage et la prédation par les protozoaires).

Les micro-organismes hydrocarbonoclastes ont en général une capacité de dégradation spécifique d'un groupe d'hydrocarbures (alcanes, aromatiques). La capacité de certaines espèces à dégrader les aromatiques n'implique pas automatiquement que ces espèces puissent dégrader les alcanes, et inversement (Berthe-Corti and Höpner, 2005). De plus, pour la biodégradation des HAP, la biodégradation préférentielle de structures différentes par différents microbes a été clairement démontrée (Head *et al.*, 2006); par exemple, certains micro-organismes sont mieux adaptés pour dégrader des groupes latéraux des HAP alkylés, alors que d'autres utilisent les oxygénases afin d'activer et de cliver les cycles aromatiques. Toutefois, certaines espèces isolées peuvent dégrader plusieurs types d'hydrocarbures en condition oxygène. Par exemple, les souches *Pseudomonas* sp. B17 et B18 dégradent à la fois les alcanes et les aromatiques (Whyte *et al.*, 1997). De même, des souches du genre *Alcanivorax*, *Cellulomonas* ou encore *Marinobacter*, ont été isolées pour leur capacité à dégrader le pyrène ainsi que l'octadécane (Brito *et al.*, 2006).

Cependant, en milieu naturel, la biodégradation du pétrole n'implique pas seulement les micro-organismes qui attaquent directement les composés du pétrole mais également d'autres composants biologiques et abiotiques, avec lesquelles les agents primaires de dégradation du pétrole interagissent (Berthe-Corti and Höpner, 2005). Les dégradeurs primaires peuvent notamment rivaliser avec d'autres micro-organismes pour les ressources limitées en nutriments (tels que P et N) et les micro-organismes non dégradant peuvent être affectés par des métabolites et d'autres composés libérés par les processus de dégradation, et vice versa (Head *et al.*, 2006). Ainsi, des interactions coopératives clés vont jouer un rôle majeur dans l'élimination des composés du pétrole en milieu naturel, tels que la consommation des métabolites, la production de bio-surfactants, l'apport d'oxygène et de nutriments (McGenity *et al.*, 2012).

3.2. Dégradation des hydrocarbures en condition oscillante oxie/anoxie

Actuellement, seulement quelques études ont décrit les capacités de dégradation des hydrocarbures dans des conditions oscillantes anoxie/oxie (Löser *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2009; Vitte *et al.*, 2011; Vitte *et al.*, 2013) par comparaison avec une condition oxique. Ces études ne montrent pas de conclusions concordantes.

C. Löser et ses collaborateurs (1998) montrent moins de 50% de dégradation dans l'une ou l'autre condition et ne voit aucune différence, ni accélération ni diminution du taux de dégradation dans le cas des oscillations, sur 27 jours d'expérience sur du sable vierge contaminé avec du diesel. Cependant, le taux de consommation d'oxygène et la production de CO₂ sont plus élevés dans cette dernière condition.

Inversement, P.A. Vieira et ses collaborateurs (2009), en soumettant des effluents contaminés à une aération permanente, à des intermittences d'aération et sans aération, montrent 82%, 90% et 70% de réduction des hydrocarbures totaux (comprenant paraffines, isoparaffines et oléofines naphténiques et aromatiques) respectivement, en 22 jours. Ils démontrent ainsi que les intermittences d'aération sont plus efficaces sur les taux de disparition des hydrocarbures et concluent à une méthode prometteuse et alternative pour le traitement des effluents contaminés.

Tandis que I. Vitte et ses collaborateurs (2011, 2013) ont montré des taux d'élimination des HAP similaires (dépassant 90%) entre les conditions oscillantes anoxie/oxie et d'oxie permanente par des communautés bactériennes autochtones d'une boue contaminée, sur une période d'incubation de 23 ou 26 jours. En considérant les incubations en conditions oscillantes anoxie/oxie, ils ont montré la corrélation de l'accélération de la dégradation des HAP avec la 1^{ère} période d'aération, aboutissant à des taux de dégradation équivalant à ceux mesurés en condition

d'aération permanente. Ces études ont émis l'hypothèse de la mise en place du potentiel enzymatique, avec la détection de transcrits d'HAP oxygénases, rapidement après l'ajout de pétrole et se maintenant tout au long de l'incubation ainsi qu'au cours des périodes d'anoxie, et pouvant s'activer en présence d'oxygène.

Ces conclusions divergentes entre la première et les autres études pourraient s'expliquer par l'inadaptabilité des micro-organismes à dégrader les hydrocarbures (matériel enzymatique) dans le cas de la première étude. Le contact avec les hydrocarbures pourraient ainsi constituer un stress pour ces bactéries ne présentant pas de capacités de biodégradation spécifiques, ainsi inhibées. En effet, dans le cas des autres études les communautés étaient soit naturellement pré-adaptées (Vitte *et al.*, 2011; Vitte *et al.*, 2013) à la pollution des hydrocarbures soit pré-exposés lors d'une expérimentation préliminaire (Vieira *et al.*, 2009), ceci ayant permis d'observer une réponse rapide aux hydrocarbures et des capacités de dégradation élevées. De nombreuses études ont en effet pu démontrer que les capacités de dégradations des communautés microbiennes de sites contaminés étaient dépendantes de l'historique de pollution de l'écosystème considéré (MacNaughton *et al.*, 1999; Roling *et al.*, 2002; Head *et al.*, 2006) et donc des capacités d'adaptation des communautés. Ensuite, P.A. Vieira et ses collaborateurs (2009) ont pu observer des taux de dégradation supérieur en condition oscillante d'aération par rapport à la condition d'oxie permanente en fin d'incubation alors que I. Vitte et ses collaborateurs (2011, 2013) ont obtenus des taux similaires. Il est envisageable que cette différence soit notamment due à des intervalles d'aération différents puisque P.A. Vieira et ses collaborateurs (2009) ont obtenus des taux de dégradations différents pour les mêmes conditions expérimentales mais en testant différents intervalles d'aération.

3.3. Dynamique des communautés microbiennes hydrocarbonoclastes, influence des oscillations oxie/anoxie

Malgré la quantité considérable d'études sur la dégradation microbienne des hydrocarbures, nos connaissances sur la dynamique adaptative des communautés microbiennes en réponse à la contamination pétrolière, en considérant les conditions environnementales, restent encore limitées. Seulement deux études ont abordé la caractérisation de la dynamique de communautés bactériennes couplée à l'élimination de composés pétroliers en conditions d'oscillations oxie/anoxie (Vitte *et al.*, 2011; Vitte *et al.*, 2013).

Ces études ont démontré qu'après un cycle complet anoxie/oxie (4 jours/3jours) en conditions oscillantes d'incubation, l'élimination des HAP avait lieu juste après une modification importante de la structure de la communauté bactérienne active après le 1^{er} jour d'aération. Cette observation suggère que la communauté bactérienne a d'abord répondu à l'ajout d'oxygène, l'ajout d'oxygène conduisant à une structuration spécifique de la communauté en réponse à la condition d'incubation. Après cette modification de la structure de la communauté bactérienne due à l'ajout d'oxygène, une succession de populations bactériennes a été démontrée, étant due à une utilisation séquentielle du substrat. Un tel comportement de succession des populations bactériennes liée à une utilisation séquentielle des substrats au cours du temps a déjà été rapporté et décrit par différentes études (Greene *et al.*, 2000; Kaplan and Kitts, 2004).

Ainsi, la dynamique des communautés bactériennes soumises à une pollution par des hydrocarbures est dépendante de la nature des contaminants et de la complexité des molécules, ainsi que de l'évolution quantitative et qualitative de ces composés. Un modèle décrivant cette dynamique a pu être proposé (Figure 16) (Head *et al.*, 2006). Dans une première phase la communauté est dominée par des bactéries qui vont dégrader les hydrocarbures aliphatiques (par exemple du genre *Alcanivorax*). Au fur et à mesure que les hydrocarbures aromatiques deviennent plus abondants dans le mélange (due à la « disparition » des aliphatiques), la communauté se modifie et les bactéries dégradant les hydrocarbures aromatiques, prédominent à leur tour (par exemple du genre *Cycloclasticus*). Le suivi de la dégradation des alcanes, a montré que les alcanes étaient dégradés séquentiellement en fonction de leur poids moléculaire (du plus petit au plus haut). Cependant, des résultats basés sur la dynamique des communautés hydrocarbonoclastes concernées (Alcanes mono-oxygénases de type I, II et III) ont montré la présence simultanée et non pas séquentielle de ces différents groupes (Sei *et al.*, 2003). Il a donc été suggéré que les taux de croissance de ces différents groupes ne seraient pas identiques et que les alcanes à longues chaînes seraient tout simplement dégradés à des taux plus faibles que les alcanes à courte chaîne. Par conséquent, la dégradation séquentielle des alcanes ne serait qu'apparente (Head *et al.*, 2006).

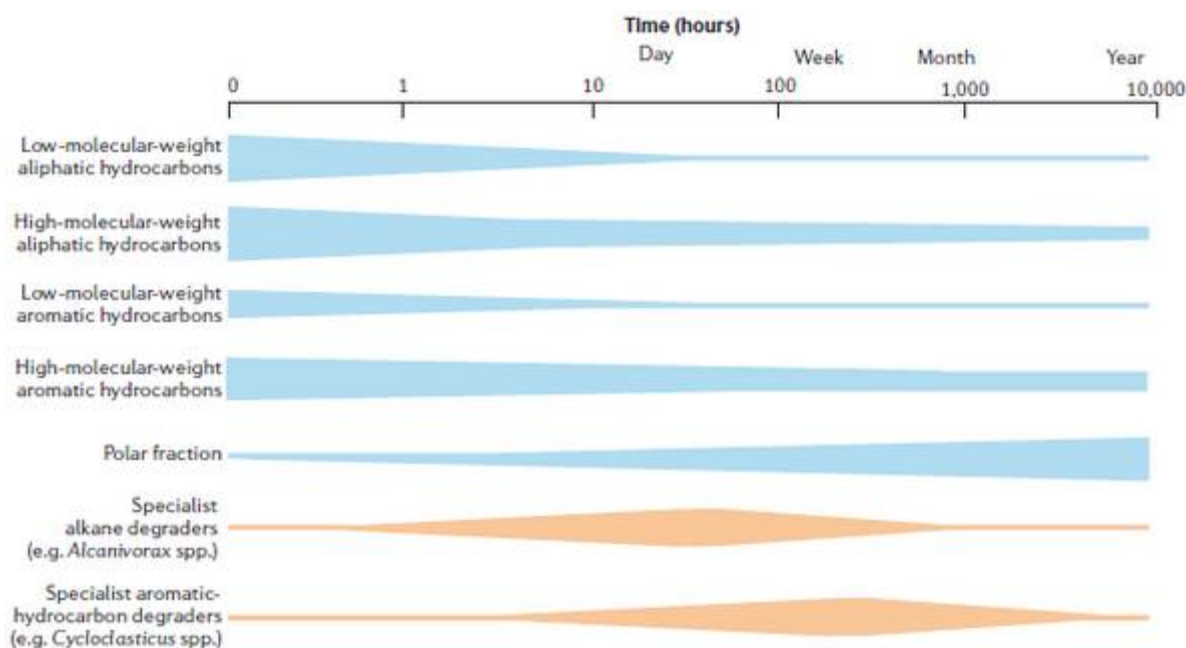


Figure 16 : Représentation schématique des changements dans la composition d'un pétrole et des changements correspondants de l'abondance d'organismes clé de la dégradation d'hydrocarbures (Head *et al.*, 2006).

De plus, d'autres facteurs environnementaux ont été reportés comme influençant les communautés microbiennes et les capacités de dégradations des hydrocarbures tels que des paramètres physico-chimiques (voir Berthe-Corti and Höpner (2005)) et biologiques dont la bioturbation (Cuny *et al.*, 2007; Cravo-Laureau *et al.*, 2011; Stauffert *et al.*, 2013). Cependant les connaissances des facteurs influençant les communautés microbiennes hydrocarbonoclastes dans les environnements complexes tels que les écosystèmes intertidaux soumis à des conditions d'oxygénation et d'oxydo-réduction fluctuantes restent limitées.

4. Compréhension de l'écologie des communautés hydrocarbonoclastes des écosystèmes côtiers, apport des technologies « -omiques »

Les principales questions relatives à la pollution des écosystèmes marins par les hydrocarbures ont été déjà discutées (McGenity *et al.*, 2012), et les processus microbiens impliqués dans la dégradation des hydrocarbures largement décrits (Timmis *et al.*, 2010; McGenity, 2014). Cependant les sédiments marins côtiers constituent des écosystèmes particuliers, plus spécifiquement les zones intertidales où les conditions environnementales sont modifiées tous les jours en fonction du cycle des marées, influençant par conséquent les communautés microbiennes ainsi que les processus de dégradation. Bien que l'impact du pétrole

sur les communautés microbiennes, résultant en une succession écologique des populations microbiennes couplée à la dégradation des hydrocarbures, ait été largement démontré (Bordenave *et al.*, 2004; Harayama *et al.*, 2004; Head *et al.*, 2006; Bordenave *et al.*, 2007; Paisse *et al.*, 2008; Nogales *et al.*, 2011) plusieurs questions écologiques et scientifiques restent à résoudre.

Différentes approches d'écologie microbienne, y compris des études *in situ* et des expériences de laboratoire soutenues par les avancées récentes des technologies de « métagénomiques » visent à répondre à des questions majeures d'écologie microbienne. La volonté scientifique des écologistes microbiens est de faire une description précise des communautés microbiennes, afin d'établir précisément leur contribution dans le fonctionnement des écosystèmes (Fuhrman, 2009; Roling and van Bodegom, 2014) et de comprendre le comportement microbien face à la pollution. Parmi ces questions, l'organisation des structures des communautés microbiennes face à la présence de pétrole, les mécanismes impliqués dans leur adaptation pour permettre une dégradation efficace des hydrocarbures, la relation structure/fonction et la contribution de la redondance fonctionnelle microbienne pour aboutir à la résilience communautaire, sont quelques-uns des points à élucider. Les connaissances apportées dans ce domaine aideront à mieux appréhender la réponse des communautés microbiennes face à la pollution, par la connaissance des facteurs influençant leur dynamique et leurs interactions dans la restauration de ces écosystèmes exposés aux pollutions pétrolières afin de pouvoir établir des modèles, et de mener des stratégies de bio-remédiation appropriées.

4.1. L'expérimental au service du décryptage des processus mis en place in situ

Les approches expérimentales impliquant la mise en place d'écosystèmes expérimentaux ont été largement développées pour aborder le rôle écologique des communautés microbiennes sur l'atténuation des hydrocarbures dans les sédiments marins. Ces approches ont évolué et tendent à se rapprocher toujours plus des conditions environnementales de l'écosystème étudié (Cravo-Laureau and Duran, 2014) pour répondre aux questions écologiques en simplifiant le système et permettant des conditions contrôlées (Jessup *et al.*, 2004; Jessup *et al.*, 2005) et ce sans risque pour l'environnement. La taille, le type, la conception et la complexité de ces unités expérimentales vont varier d'une étude à l'autre. Néanmoins, leur conception dépendra essentiellement de la question scientifique adressée.

Par la mise en place d'expérimentations semblables aux cultures d'enrichissement, ou d'approches similaires à celles utilisées pour l'isolement de souches microbiennes, de nombreuses

études ont pu mettre en évidence les réponses écologiques des populations microbiennes à des composés d'hydrocarbures dans les sédiments marins profonds sains (Cui *et al.*, 2008), les sédiments de mangrove (dos Santos *et al.*, 2011), les sédiments portuaires pollués marins (Wang and Tam, 2011; Dell'Anno *et al.*, 2012; Rocchetti *et al.*, 2012) et de la zone anoxique de tapis microbiens (Abed *et al.*, 2011). Ces approches sont utiles pour évaluer les capacités de dégradation microbienne de composés hydrocarbonés (Cui *et al.*, 2008; Abed *et al.*, 2011), l'efficacité des stratégies de bio-remédiation (Dell'Anno *et al.*, 2012) et la réponse fonctionnelle précoce impliquée dans la dégradation des hydrocarbures (Paisse *et al.*, 2011; Paisse *et al.*, 2012).

Cependant, un environnement naturel est très complexe et, de ce fait, très difficile à reproduire. Les écosystèmes expérimentaux offrent un bon compromis pour l'étude des communautés microbiennes et offrent de nombreux avantages (Fahy and McKew, 2010). Entre autres, l'utilisation de systèmes d'incubations tels que les bioréacteurs permettent de contrôler individuellement ou de façon croisée des paramètres tels que la température, le pH, l'agitation, la disponibilité en oxygène, les conditions d'oxydo-réduction. Ainsi, pour des études voulant prendre en considération l'influence des paramètres physico-chimiques sur les communautés microbiennes, ces approches peuvent constituer l'unique alternative. Ainsi, I. Vitte et ses collaborateurs (2011, 2013) ont mis en place des approches expérimentales impliquant des bioréacteurs pour la simulation d'oscillations anoxiques/oxiques afin de comprendre le sort des composés hydrocarbonés et d'appréhender l'impact sur les microbiennes autochtones, dans des environnements caractérisés par des conditions d'oxydo-réduction fluctuantes. Ces études ont également constitué un aperçu de l'écologie des communautés microbiennes dans les écosystèmes caractérisés par des conditions fluctuantes et contaminés aux hydrocarbures, montrant l'influence des conditions oscillantes d'oxygénation sur la structuration des communautés microbiennes autochtones et leurs capacités de biodégradations.

Combinés avec les avancées récentes dans les technologies de méta-omiques qui fournissent des outils puissants pour l'analyse des communautés microbiennes, leur diversité et de leur fonctionnement dans son ensemble (Röling *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013), les systèmes expérimentaux microbiens sont des approches prometteuses pour l'acquisition de nouvelles connaissances sur les réseaux fonctionnels impliqués dans les processus de dégradation des hydrocarbures dans les sédiments marins côtiers. La simplification des systèmes microbiens induit tout de même certaines limites à considérer dont une capacité à extrapoler aux environnements complexes limitée par la déstructuration physique du milieu générant une contrainte non négligeable.

4.2. Analyse de la diversité microbienne pour la compréhension des facteurs contrôlant sa structuration

La distribution et l'abondance des espèces et les facteurs qui les contrôlent sont centraux pour la compréhension et l'appréhension du fonctionnement des écosystèmes et de la réponse aux changements environnementaux. Un principe central de l'écologie des communautés est que de fortes tendances spatiales et temporelles de la distribution et l'abondance des taxons sont régies par des processus environnementaux (par exemple, abiotique, biotique, éléments nutritifs, ou autre), et que ces processus lient le fonctionnement de l'écosystème à la diversité biologique. Mais s'il existe des modèles de prédiction pour les animaux et les plantes (espèces macrobial), en l'absence d'information sur les tendances de la biodiversité microbienne de résolution équivalente à celle de la biodiversité macrobial, la mesure dans laquelle les interactions entre les processus abiotiques et biotiques régissent l'écosystème et les processus biogéochimiques reste difficile à évaluer (Fuhrman *et al.*, 2006). L'étude des changements dans la structure des communautés nous aident à comprendre les facteurs qui contrôlent les communautés (Fuhrman, 2009) ce qui est donc crucial dans la compréhension du fonctionnement des écosystèmes et de leur capacité de réponse face à la pollution.

4.2.1. Diversité de la communauté globale

En écologie microbienne, les méthodes culture-dépendantes sont incapables d'évaluer ou d'accéder à la majorité microbienne incultivable (Desai and Madamwar, 2007). Par conséquent, le profilage de la communauté microbienne par les méthodes culture-indépendantes correspond généralement à l'approche choisie. Cette approche analytique des structures des communautés microbiennes globales soumises à la pollution, contribue à notre compréhension de la dynamique de la communauté, de l'abondance et de la distribution des micro-organismes activement impliqués dans la bio-remédiation (Desai *et al.*, 2010). Pour accéder à la diversité bactérienne des communautés, le gène de l'ARNr 16S hautement conservé est généralement analysé comme cible. Les analyses basées sur ce gène ont largement été utilisées pour étudier la diversité microbienne dans les environnements contaminés (MacNaughton *et al.*, 1999; Roling *et al.*, 2002; Bordenave *et al.*, 2004; Evans *et al.*, 2004). Différentes approches peuvent être mises en place pour l'analyse de ce gène phylogénétique.

Les techniques d'empreintes moléculaires telles que l'analyse du polymorphisme de longueur des fragments de restriction (TRFLP), l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE), l'analyse automatisée de l'espace intergénique de l'ADN ribosomique (ARISA) ou bien

d'autres (Nocker *et al.*, 2007), sont des méthodes peu coûteuses fournissant des données globales sur la structuration de la communauté, mais fournissant peu d'informations sur les individus et permettent généralement l'identification présumée de composants par comparaison. Les organismes identifiés par une empreinte moléculaire sont classés en unités taxonomiques opérationnelles (OTU) sur la base d'une variété de critères qui peuvent varier en fonction de la méthode, comme une similarité de séquence ou la taille des fragments. Ces techniques d'empreintes moléculaires multiplexes ont été largement utilisées pour identifier des bio-indicateurs de la pollution, pour la détermination de l'état de santé d'environnements et pour l'étude de la réponse de divers taxons microbiens à différents stress environnementaux (Singh *et al.*, 2006). Ces techniques nécessitent généralement d'être complétées par la construction de bibliothèques de clones, alors séquencés dont les séquences obtenues sont regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTU) incluant des séquences avec des valeurs de similarités égales ou supérieures à 97% (Zaballos *et al.*, 2006), afin de fournir des informations au niveau des individus.

L'approche classique consistant à l'amplification directe, au clonage puis au séquençage des gènes de l'ARNr 16S à partir d'échantillons d'ADN de l'environnement, a complètement redéfini la recherche écologique microbienne au cours des dernières décennies, aboutissant à l'accumulation d'une énorme quantité de données de séquences de ce gène. En Avril 2009, le projet de base de données ribosomique (RDP) contenait 836 814 séquences alignées de gènes de l'ARNr 16S obtenues à partir de différentes études d'écologie microbienne et le nombre de séquences a été régulièrement mis à jour (www.rdp.cme.msu.edu/index). Cette approche a été fréquemment utilisée pour étudier les processus de bio-remédiation ou pour l'identification de bio-indicateurs microbiens de la pollution anthropique, permettant la caractérisation de la structure, de la composition et des changements au sein de communautés microbiennes de sites contaminés (Desai *et al.*, 2009; Desai *et al.*, 2010). Même si cette approche fournit un recensement plus précis et fiable de phylotypes microbiens, il est en même temps très lourd, chronophage et coûteux.

Depuis l'introduction des technologies de séquençage de nouvelle génération (e.g. Roche 454-Pyrosequencing, Illumina sequencing... ; Figure 17) une croissance rapide des applications et des développements dans la caractérisation des communautés microbiennes complexes a été observé (Petrosino *et al.*, 2009; Novais and Thorstenson, 2011). En particulier, la caractérisation de la diversité des gènes de l'ARNr 16S bactériens via le séquençage d'amplicons, qui devient une méthode de choix et dépasse actuellement les méthodes de séquençage traditionnelles (de type Sanger), et potentiellement même les techniques d'empreintes moléculaires. Ces techniques

de séquençage *de novo* offrent une réduction substantielle des coûts, un séquençage ultra-rapide, des analyses multiplex de communautés microbiennes et contournent l'obligation de clonage des gènes d'ARNr à partir d'échantillons environnementaux (Liu *et al.*, 2008).

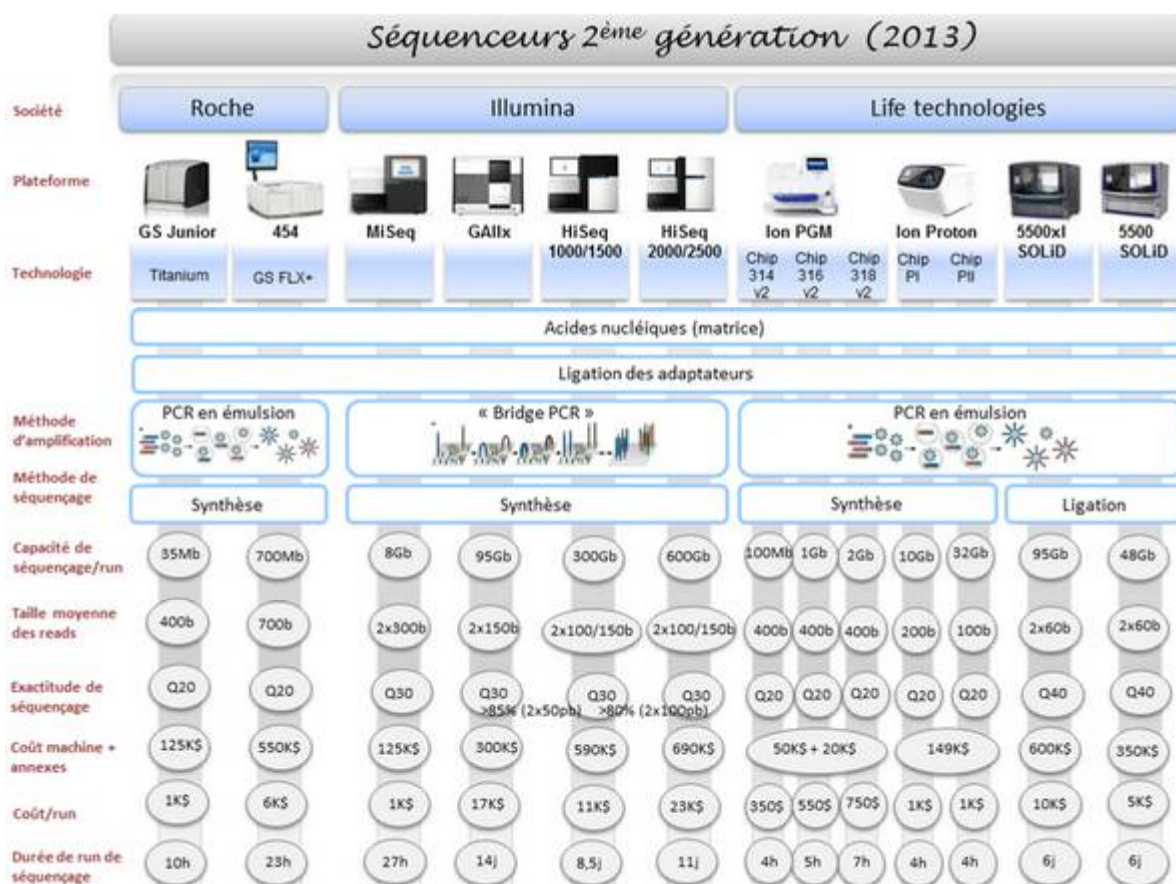


Figure 17 : Schéma comparatif des plateformes séquenceurs haut-débit de 2^{ème} génération (Schéma élaboré d'après Glenn (2011) et mis à jour en 2013; <http://www.biorigami.com>).

L'analyse de la diversité des marqueurs phylogénétiques, tels que le gène de l'ARNr 16S, est un outil essentiel pour l'étude des communautés microbiennes, mais ne fournit pas de preuves directes des capacités fonctionnelles d'une communauté. Récemment, certaines études d'analyses de diversité basées des données du gène de l'ARNr 16S ont émis l'hypothèse de pouvoir suggérer la contribution fonctionnelle de certains membres de la communauté par similarité de séquences abondantes obtenues à leur plus proche séquences issues de génomes de référence (Muegge *et al.*, 2011; Barott *et al.*, 2012; Morgan *et al.*, 2012). La précision de ces approches n'a pas été évalué, mais la corrélation entre le contenu génétique et la phylogénie (Konstantinidis and Tiedje, 2005; Chaffron *et al.*, 2010; Zaneveld *et al.*, 2010) –à l'exception des cas particuliers tels comme les éléments transférés latéralement et les endo-symbiontes intracellulaires avec des génomes réduits– suggère qu'il pourrait être possible de prédire approximativement le potentiel fonctionnel des communautés microbiennes à partir de la phylogénie.

C'est dans cet objectif que M. Langille et ses collaborateurs (2013) ont développé l'outil PICRUST (phylogenetic investigation of communities by reconstruction of unobserved states), une approche de calcul pour prédire la composition fonctionnelle d'un méta-génome en utilisant les données de gènes marqueurs et une base de données de génomes de référence. Ils démontrent que la phylogénie et la fonction sont suffisamment liées, ainsi cette approche «méta-génomique prédictive» devrait fournir des indications utiles sur les milliers de communautés microbiennes pour qui seules des données basées sur les gènes marqueurs sont actuellement disponibles.

4.2.2. Diversité de groupes fonctionnels ciblés

Si les gènes de l'ARNr restent les marqueurs les plus couramment utilisés, les gènes clés dans les voies d'importance écologique, par exemple, ceux qui sont impliqués dans les cycles du carbone, du soufre et de l'azote, peuvent fournir des informations importantes sur la composition des communautés.

L'étude de la diversité des MSR basée sur l'analyse des gènes fonctionnels *dsrA* et *dsrB* (Zelege *et al.*, 2013) constitue une bonne alternative par rapport à l'étude des gènes de l'ARNr 16S (Leloup *et al.*, 2007). En effet, les topologies des arbres phylogénétiques basés sur les gènes de l'ARNr 16S et *dsrAB* sont congruentes (Zverlov *et al.*, 2005), malgré quelques discordances expliquées par des transferts génétiques horizontaux (Klein *et al.*, 2001). Ces gènes forment l'opéron *dsrAB* (dissimilatory sulfite reductase) qui possèdent un haut degré de conservation (Karkhoff-Schweizer *et al.*, 1995) et codent pour les sous-unités DsrA et DsrB constituant une enzyme hétérodimérique : la Bisulfite réductase. Ils ont été proposés comme marqueur fonctionnel des MSR (Stahl *et al.*, 2002). Ces gènes sont détectés chez tous les MSR étudiés jusqu'ici et chez quelques organismes ne réduisant pas le sulfate mais respirant le sulfite (*Clostridium sp.*) (Zverlov *et al.*, 2005).

De même, les arbres phylogénétiques construits à partir du gène *mcrA* pour l'étude de la diversité des méthanogènes présentent des topologies comparables à celles des arbres construits à partir des gènes de l'ARNr 16S (Hales *et al.*, 1996; Luton *et al.*, 2002). Ce gène ainsi que les gènes *mcrB* et *mcrG*, font partie de l'opéron *mcrBDCGA* et codent pour les trois sous-unités de la Méthyl co-enzyme M réductase, détectés chez tous les méthanogènes. Le gène *mcrA*, étant hautement conservé, constitue donc un bon candidat comme marqueur moléculaire pour des études en écologie microbienne.

Les Nitrite réductases actives, codées par les gènes *nirS* et *nirK* sont des enzymes impliquées dans la deuxième étape de la dénitrification (réduction des nitrites en oxyde nitrique). Ce sont les enzymes clés de la dénitrification et de ce fait elles constituent de bons marqueurs moléculaires, utiles pour comprendre la composition des communautés dénitrifiantes (Braker *et al.*, 1998; Hallin and Lindgren, 1999; Braker *et al.*, 2000; Priemé *et al.*, 2002). Ces deux types de Nitrite réductases n'ont jamais été localisés simultanément dans un même micro-organisme. NirS est largement distribuée parmi les bactéries dénitrifiantes étudiées alors que NirK, n'est présente que dans 30 % d'entre elles (Coyne *et al.*, 1989).

Toutefois, le travail avec des données génétiques eco-fonctionnelles nécessite des outils autres que ceux nécessaires à l'analyse de l'ARNr. Ainsi, Functional Gene Pipeline and Repository (FunGene; <http://fungene.cme.msu.edu/>) met à disposition des bases de données de nombreux gènes communs et des protéines fonctionnelles associées, ainsi que des outils intégrés qui permettant de parcourir ces collections, pour pouvoir choisir et récupérer des sous-ensembles pour une analyse plus approfondie (Fish *et al.*, 2013).

4.3. Caractérisation des capacités fonctionnelles de la communauté : génomiques fonctionnelle, méta-génomique et méta-transcriptomique

L'analyse des gènes ribosomiques n'est généralement pas adaptée pour la mise en évidence de micro-organismes capables de dégrader les hydrocarbures comme ces derniers sont phylogénétiquement dispersés sur plusieurs lignées bactériennes qui contiennent aussi des espèces incapables de dégradation des hydrocarbures (Widdel and Rabus, 2001; Winderl *et al.*, 2007). Des gènes cataboliques spécifiques peuvent donc être utilisés pour détecter des capacités fonctionnelles précises au sein des communautés microbiennes autochtones. Ainsi, la présence de micro-organismes dégradant les hydrocarbures peut être établie par le ciblage des gènes fonctionnels spécifiquement impliqués dans la dégradation des hydrocarbures (Staats *et al.*, 2011). Par exemple, le gène *alkB* (codant pour l'alkane hydroxylase, l'enzyme qui catalyse l'étape initiale d'activation des alcanes pour leur dégradation en aérobiose) présentant une conservation de séquence suffisante, a largement été exploité dans une série d'études écologiques moléculaires pour évaluer la distribution et de la diversité de micro-organismes impliqués dans la dégradation des alcanes dans différents environnements contaminés par les hydrocarbures (Van Beilen *et al.*, 2003; Harayama *et al.*, 2004; Kloos *et al.*, 2006; van Beilen and Funhoff, 2007; Wasmund *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Smith *et al.*, 2013). De même, les gènes *assA* (codant pour l'alkylsuccinate synthase, l'enzyme qui catalyse l'étape initiale d'activation des alcanes par

addition de fumarate) et *bssA* (codant pour la benzylsuccinate synthase, pour l'activation de composés aromatiques par addition de fumarate) ont été utilisés comme bio-marqueurs, afin de détecter et de quantifier, les micro-organismes anaérobies intervenant dans la dégradation des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques respectivement (Winderl *et al.*, 2007; Beller *et al.*, 2008; Callaghan *et al.*, 2010; Yagi *et al.*, 2010; Oka *et al.*, 2011; Wawrik *et al.*, 2012; Kimes *et al.*, 2013). Cependant, cette approche basée sur l'utilisation d'amorces de PCR spécifiques nécessite des connaissances préalables du gène d'intérêt et cible habituellement seulement un sous-ensemble d'une famille de gènes cataboliques. La mise au point d'amorces spécifiques exige du temps pour une conception soignée et les résultats obtenus ont également besoin de validation pour confirmer l'exactitude de l'amplification de la cible (Vilchez-Vargas *et al.*, 2010).

De nouveaux mécanismes métaboliques et enzymatiques impliqués dans la dégradation des polluants sont encore découverts et notamment par les approches basées sur l'utilisation d'amorces spécifiques, conçues sur la base de la diversité métabolique connue et sur les mécanismes décrits (Vilchez-Vargas *et al.*, 2010). Les progrès récents des approches de méta-génomiques et méta-transcriptomiques permettent la découverte d'une nouvelle richesse de la diversité génétique qui n'avait pas été précédemment imaginée (Ferrer *et al.*, 2005; Belouqui *et al.*, 2006). La mise en place de ces approches, avec notamment l'étude des profils de transcription des ARNm (méta-transcriptome), permet une caractérisation plus approfondie et l'identification de la communauté microbienne active dans le métabolisme des hydrocarbures dans l'environnement avec la mise en évidence des gènes cataboliques intervenants (McGrath *et al.*, 2008; Desai *et al.*, 2010).

4.4. L'apport des études en réseaux pour la compréhension des interactions entre micro-organismes sous l'influence des facteurs environnementaux

Les communautés microbiennes, dans le cadre des écosystèmes naturels, sont intrinsèquement complexes. Les outils traditionnels de la microbiologie, tels que des cultures pures et des études génétiques, ont tendance à offrir un point de vue réductionniste, par l'étude de chaque organisme dans l'isolement. Cependant, une approche réductionniste n'est pas bien adaptée à l'apprentissage des interactions et des propriétés émergentes des communautés. Les approches holistiques, qui étudient les habitats naturels directement, peuvent fournir des données complémentaires pour aider à déduire les interactions. Les schémas de co-occurrence (exemple du modèle probabilistique de Veech (2013)), peuvent montrer comment des organismes particuliers dans un système se produisent en même temps et varient en fonction des paramètres

environnementaux. Ces modèles montrent des détails importants d'une structure particulière de la communauté et peuvent être représentés sous forme de diagrammes d'interactions mathématiques ou de réseaux (exemple en Figure 18). Si les conditions environnementales sont incluses dans les modèles de co-occurrence, les résultats indiquent quelles conditions les assemblages concomitants d'organismes préfèrent ou évitent. L'inclusion de mesures de taux biogéochimiques peut relier des groupes d'organismes ayant des fonctions particulières. Ces types de résultats nous permettent d'examiner les interactions possibles entre les organismes et les aspects des niches de micro-organismes dans les communautés naturelles extrêmement complexes et dynamiques (Fuhrman, 2009).

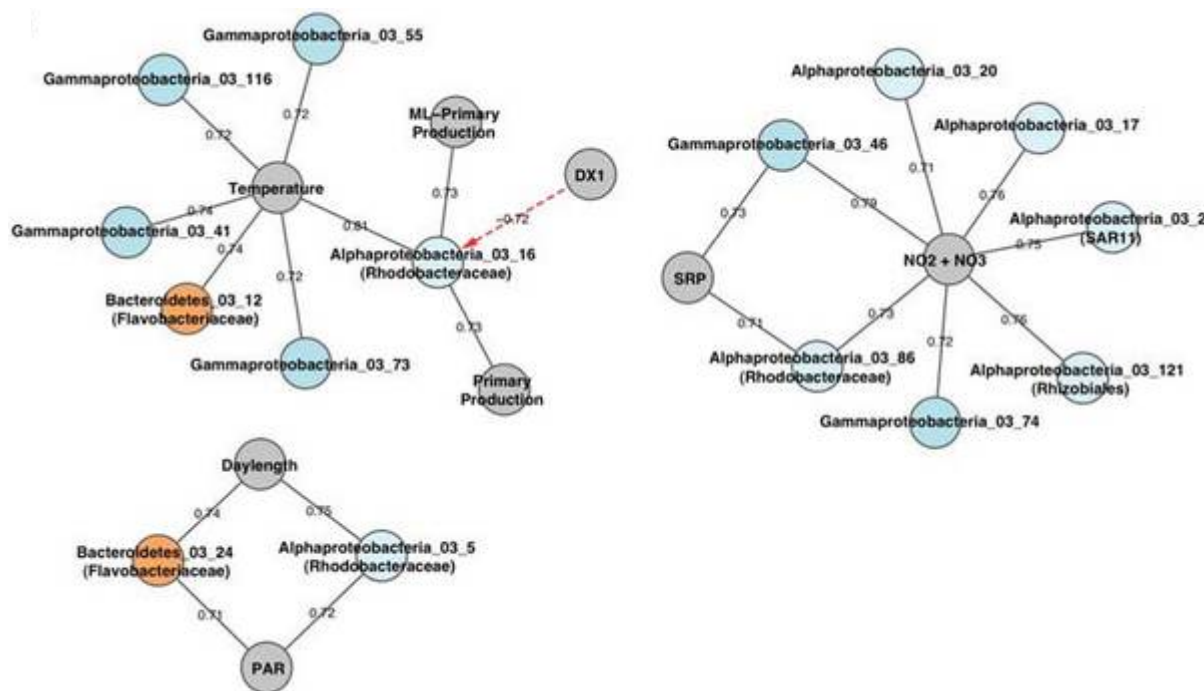


Figure 18 : Sous-réseaux réalisés par J.A. Gilbert et ses collaborateurs (2012), à partir des 50 OTU bactériens les plus représentés dans leur étude, représentant des variables fortement corrélées construites autour des facteurs environnementaux.

Ces études de réseaux microbiens sont à un stade précoce et, compte tenu de la forte variabilité naturelle, ils nécessitent une grande quantité de données pour que les résultats soient statistiquement significatifs. Ils exigent également des outils d'analyse appropriés pour l'évaluation et le tri des quantités énormes d'interactions possibles. Des études initiales (Ruan *et al.*, 2006; Fuhrman and Steele, 2008) ont utilisé les données du site de l'observatoire microbien San Pedro Ocean Time-Serie (SPOT ; sud de la Californie). Q. Ruan et ses collaborateurs (2006) ont alors développé « l'analyse de similarité locale » pour évaluer les corrélations contemporaines et décalée dans le temps entre les paramètres étudiés, et discerner une partie d'un réseau à l'aide de cette approche. Les relations décalées dans le temps (par exemple entre les prédateurs et leurs proies) sont communes en écologie. J.A. Fuhrman et J.A. Steele (2008) ont étendu cette analyse à l'aide des outils de la biologie des systèmes pour visualiser les résultats sous forme de réseaux

centrés sur les membres de certains groupes d'organismes reliés à leurs «voisins les plus proches», qui sont des organismes ou des paramètres qui sont en corrélation directe positive ou négative.

Dans ces réseaux, les «interactions» sont des relations mathématiques (corrélations ou anti-corrélations) qui ont besoin d'une enquête plus approfondie pour distinguer les interactions directes de celles qui sont indirectes. Il s'agit d'une distinction importante, en partie parce que les réseaux écologiques classiquement étudiés (Montoya *et al.*, 2006) ne considèrent que les interactions directes. Des corrélations positives dans ces réseaux mathématiquement dérivés pourraient être dues à la préférence commune de conditions privilégiées ou peut-être d'activités coopératives telles que l'alimentation croisée. De même, des corrélations négatives peuvent représenter des saisonnalités inverses, la concurrence pour des ressources limitées ou peut-être les interactions négatives actives telles que l'allélopathie ciblée (Long and Azam, 2001) ou des relations prédateur-proie (Davidov *et al.*, 2006). La capacité de l'analyse de similarité locale de voir les relations retardées, montrant quand un paramètre change à l'avance d'un autre, peut aider à démêler la cause et l'effet.

Pour capturer les interactions importantes qui régulent les fonctions du système, l'analyse de réseau devrait inclure tous les paramètres importants de ce système (Fuhrman, 2009); les premiers réseaux, incluant avec les bactéries certains paramètres environnementaux, ne montrent que la pointe de l'iceberg. Parce que les communautés microbiennes comprennent clairement de nombreuses interactions avec des protistes, des virus et métazoaires (Fuhrman and Hagström, 2008), tous ces organismes devraient être inclus à terme dans l'analyse, sinon l'identification des facteurs importants contrôlant le système ne sera pas atteinte. L'analyse de réseau peut également être intégrée aux études « omiques » (voir DeLong (2009)) pour une image plus complète des fonctions des organismes dans un contexte environnemental. Les études globales peuvent permettre de mettre en évidence les interactions possibles, et les études « omiques » de décrire les fonctions des organismes, éclaircissant les mécanismes d'interactions (Fuhrman, 2009).

5. Objectifs de la thèse

Au travers de cette synthèse bibliographique, l'importance écologique, économique et sociétale des environnements côtiers paraît évidente. Ces environnements sont décrits comme des écosystèmes complexes au sein desquels les communautés microbiennes, jouant un rôle majeur dans leur fonctionnement et leur maintien, s'adaptent et sont tolérantes à des conditions

environnementales fluctuantes. Dans ces écosystèmes, des oscillations oxie/anoxie influencent la composition et la dynamique des communautés microbiennes et par conséquent leurs capacités métaboliques impliquées dans le fonctionnement de l'écosystème.

Cependant, cette synthèse met également en évidence un manque de connaissances et des connaissances contradictoires sur l'organisation des communautés microbiennes face à des conditions environnementales fluctuantes telles que celles rencontrées au niveau des écosystèmes côtiers. En effet, le comportement des communautés microbiennes dans les milieux complexes reste peu connu, particulièrement la dynamique des communautés microbiennes hydrocarbonoclastes dans les milieux anoxiques et les milieux soumis aux oscillations oxie/anoxie, ainsi que les facteurs environnementaux influençant. Le développement des connaissances sur l'écologie des micro-organismes hydrocarbonoclastes des environnements côtiers où règnent des conditions oscillantes oxie/anoxie, représente manifestement une préoccupation actuelle et un enjeu majeur pour le bon fonctionnement et le maintien de ces écosystèmes sensibles.

Le projet DECAPAGE, a ainsi été élaboré dans ce contexte, visant à caractériser les capacités de dégradation de communautés microbiennes de sédiments marins, en s'intéressant aux capacités d'adaptation, aux processus métaboliques impliqués et à l'influence des régimes d'oxygénation. Dans le cadre de ce projet, les travaux de thèse présentés ici se sont intéressés à caractériser l'influence des conditions oscillantes anoxie/oxie sur la composition et la dynamique de communautés procaryotes hydrocarbonoclastes de sédiments intertidaux en comparaison à des conditions d'oxie ou d'anoxie permanentes, et les conséquences sur les capacités de dégradation des hydrocarbures. De plus, aucune étude à l'heure actuelle ne s'est intéressée directement à l'impact des oscillations oxie/anoxie sur la dynamique des micro-organismes sulfato-réducteurs. Etant donné qu'en milieu marin, ces micro-organismes jouent un rôle majeur notamment dans la minéralisation de la matière organique et dans l'élimination des hydrocarbures au niveau des sédiments, ces micro-organismes ont été particulièrement ciblés dans cette étude.

Pour cette étude, une expérimentation d'incubation de sédiments intertidaux en mésocosmes a d'abord été mise en œuvre en condition polluée. Différents traitements induisant une déstructuration d'origine biologique ou mécanique du sédiment ont été appliqués afin d'obtenir différentes communautés microbiennes ayant des capacités à dégrader les hydrocarbures (CEDRE, Brest). A partir de ces communautés, des expérimentations en bioréacteurs ont été réalisées sous différents régimes d'oxygénations (IPREM-EEM, Pau).

L'étude comparative de la réponse écologique de ces différentes communautés microbiennes offre une occasion sans précédent dans le décryptage des facteurs

environnementaux déterminant l'assemblage des communautés microbiennes des sédiments côtiers, impliquées dans des processus de dépollution.

Chapitre II :
Procédures expérimentales

Chapitre II : Procédures expérimentales

La méthodologie mise en place afin de répondre aux objectifs de ce travail de thèse (Figure 19) a nécessité l'utilisation de techniques issues de différents domaines de compétences. De la mise en place des expérimentations à l'analyse des résultats, les différentes approches et techniques utilisées sont décrites dans ce chapitre.

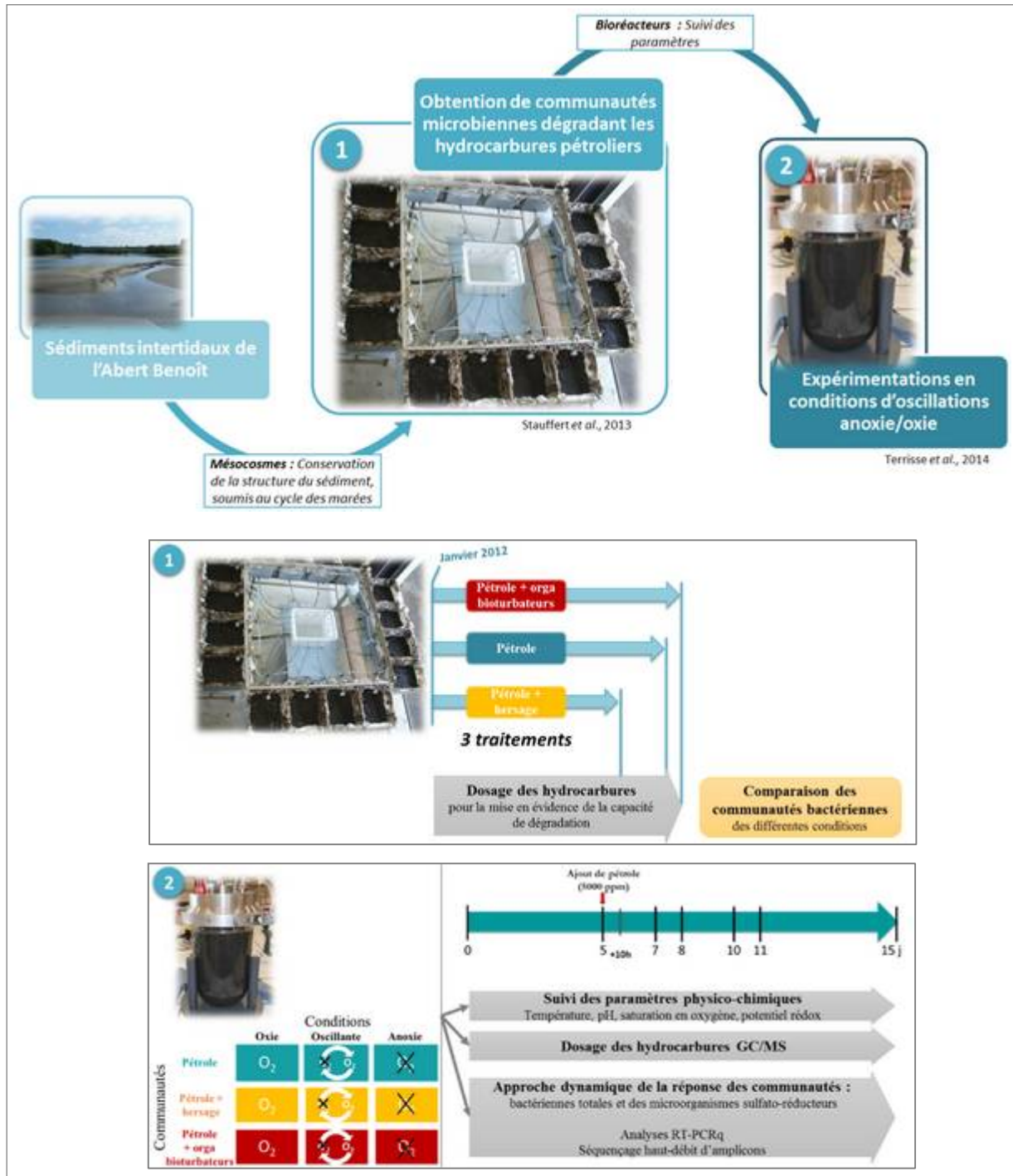


Figure 19 : Schéma descriptif de l'approche expérimentale et des analyses associées, mises en place afin de répondre aux objectifs du projet de thèse. Cette approche se déroulant en deux étapes : une expérimentation d'incubation des sédiments intertidaux en mésocosmes (1) pour l'obtention des différentes communautés, qui ont, par la suite, été incubées sous différents régimes d'oxygénations lors d'une expérimentation en bioréacteurs (2).

1. Matériel d'étude

1.1. Site de prélèvement : l'Aber Benoît dans le Finistère

Dans sa partie fluviale, l'Aber-Benoît est un fleuve côtier de 2 m de large et 31 km de long qui prend sa source sur le territoire de la commune de Saint-Divy. Il s'écoule vers le nord-ouest en direction de la Mer d'Iroise, longeant 5 communes. À partir de la confluence du ruisseau de Bourg-Blanc, la plus grande partie de l'Aber-Benoît est un aber, c'est-à-dire une baie formée par la partie inférieure de la vallée d'un fleuve côtier envahie en partie ou en totalité par la mer, qui s'étend sur 8 km de long (Figure 20).

Au sein des abers, les faibles énergies marémotrices et houlomotrices, ainsi que des courants d'eau faibles, favorisent le dépôt de matière apportée par la voie fluviale et la voie maritime, au niveau des sédiments intertidaux, pouvant drainer des contaminants. Ces sédiments intertidaux jouent un rôle important dans l'assimilation et le recyclage des nutriments et la minéralisation de matière organique, présentant des fonctions épuratives et de transformation ; constituant un sujet d'étude adéquat pour la compréhension des mécanismes d'élimination des hydrocarbures dans les sédiments marins côtiers.



Figure 20: Localisation géographique du site de prélèvement dans l'aber Benoît au niveau de la commune de Trégelonou.  : Limite de l'aber.  : Limite de la zone du fleuve de l'Aber-Benoît sous influence océanique.  : Site de prélèvement.

C'est donc au niveau de cet aber, sur le territoire de la commune de Tréglonou, que des prélèvements de sédiments vaseux ont été réalisés en Janvier 2011 (Figure 20) dans le cadre du projet ANR DECAPAGE (In DEpth CAracterization of HC-degradation caPAcilities of marine sediment microbial communities: adaptation, metabolic processes and influence of oxyGENation regimes).

Les prélèvements ont été réalisés lors de grandes marées, d'un coefficient compris entre 100-110, correspondant à des amplitudes de marée (ou marnage) de 10 m. Les sédiments ont été extraits en zone intertidale à 5m en dessous du niveau haut de la marée, soit à mi-hauteur de cette zone, correspondant donc à un cycle de marée de 12h avec une durée d'exondation de 6h.

Le pH de ces sédiments s'élevait à la valeur de 7.8. La salinité mesurée était équivalente à celle d'une eau de mer, soit environ 35 ‰. Dans le cadre d'un précédent projet (DHYVA : Dégradation d'HYdrocarbures dans les VAsières), une analyse chimique a permis de détecter environ 4 mg d'hydrocarbures biogéniques par gramme de sédiment sec dans la couche supérieure du sédiment (0-2cm).

La densité et la caractérisation de la macrofaune autochtone avait été établie. Quatre espèces différentes caractéristiques des estuaires envasés ont été recensées : *Hediste diversicolor*, *Mya arenaria* et *Nephtys hombergi* et *Hydrobia ulvae*, un gastéropode, correspondant à l'espèce la plus représentée ($68.3\% \pm 14.5$ des espèces macrobenthiques recensées). La densité moyenne de la macrofaune autochtone a été estimée à $2419 \pm 6,08$ ind.m⁻² et la densité du polychaete *Hediste diversicolor* atteignait 509 ind.m⁻² correspondant à une biomasse de 61 g.m⁻² (Stauffert *et al.*, 2013).

1.2. Expérimentation en mésocosmes

1.2.1. Mise en place du dispositif expérimental

Afin de mettre en place l'expérimentation en mésocosmes, 12 blocs de vase ont été prélevés à l'aber Benoît en prenant soin de ne pas déstructurer les sédiments grâce à un système de carottage selon le principe de la « boîte d'allumette » (Figure 21). Ils ont ensuite été transférés dans des bacs recouverts d'une membrane géotextile (65 cm x 50 cm x 41 cm ; environ 30 L de sédiments).

Dispositif d'échantillonnage : « boîte d'allumette ».

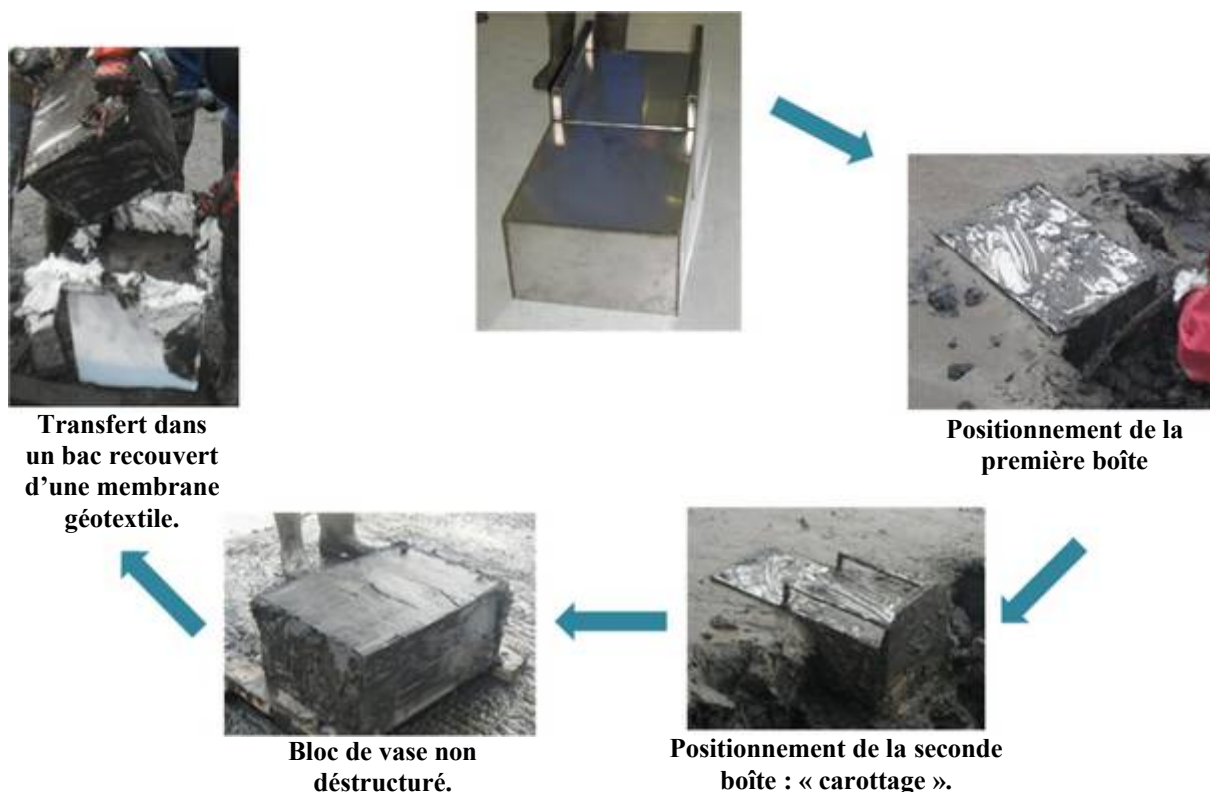


Figure 21 : Schéma descriptif de la stratégie d'échantillonnage par carottage de 12 blocs de sédiments vaseux avec un système de « boîte d'allumette » permettant de préserver la structuration verticale du sédiment.

Les douze mésocosmes ont ensuite été raccordés à un dispositif alimenté en eau de mer provenant de l'aquarium Océanopolis (Brest). Cette eau est naturellement filtrée (sable) et traitée aux UV. Grâce au dispositif fourni par le CEDRE (Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux), des cycles de marées de 12 heures avec 6h d'exondation ont été appliqués, équivalent au cycle des marées observé *in situ* dans la zone de prélèvement. L'arrivée d'eau était programmée à chaque marée montante. A marée haute, le niveau d'eau était maintenu à environ 5 cm au-dessus de la surface des sédiments grâce à un robinet flotteur. Chaque bac était relié à un même bac collecteur lui-même placé sur une table élévatrice au centre du dispositif. Celle-ci était programmée pour s'abaisser au moment de la marée descendante, et ainsi permettre la vidange progressive des bacs jusqu'à mi-profondeur du sédiment. Ainsi l'eau était renouvelée à chaque cycle de marée (20 L par bac), consommant environ 500L d'eau par jour. Ainsi, la proximité d'Océanopolis a permis de répondre au besoin massif d'eau consommée pour le renouvellement de l'eau dans le dispositif.

1.2.2. Traitements

Après 2 jours de stabilisation des sédiments, un mélange de pétrole brut de type Oural, préalablement étêté à 110°C, a été ajouté dans les mésocosmes afin de simuler une pollution pétrolière. Puis différents traitements ont été appliqués, correspondant à des scénarios de bio-remédiation qui peuvent être mis en place lors de pollutions pétrolières, afin d'obtenir différentes communautés microbiennes suivant le traitement appliqué, ayant des capacités globales similaires de dégradation des hydrocarbures. Les traitements qui ont été réalisés sont les suivants:

- Pas de traitement, mimant le processus « d'atténuation naturelle », qui représentait donc la condition contrôle nommée plus tard « *pétrole* ».
- Une augmentation de la population des organismes bioturbateurs par l'ajout d'individus de l'espèce *Hediste diversicolor*, correspondant à un « traitement biologique » mis en œuvre pour augmenter le remaniement et par conséquent l'oxygénation des sédiments, dont l'influence sur le devenir des hydrocarbures dans les sédiments côtiers (Gilbert *et al.*, 1996; Christensen *et al.*, 2002; Grossi *et al.*, 2002) et sur les communautés microbiennes (Stauffert *et al.*, 2013) ainsi que sur leurs activités métaboliques (Hansen *et al.*, 1996; Mermillod-Blondin *et al.*, 2004; Satoh *et al.*, 2007), a été décrite. Cette condition sera nommée par la suite « *pétrole + bioturbation* ».
- Une perturbation mécanique des sédiments par hersage qui correspond à un « traitement physique » également mis en œuvre pour accroître les activités microbiennes aérobies par oxygénation des sédiments en impactant fortement la structure de ceux-ci. Ce traitement peut être mise en place comme moyen de dépollution dans des conditions bien définies (<http://www.cedre.fr/fr/lutte/lutte-terre/fiche/hersage.pdf>). Cette condition sera ensuite désignée par le nominatif « *pétrole + hersage* »

Les trois conditions ci-dessus ont été réalisées en triplicata (N = 12) et trois blocs de vase supplémentaires n'ayant pas été contaminés et n'ayant pas subis de traitement ont constitué les « *blancs* » (c'est-à-dire les contrôles pour le dosage des hydrocarbures au cours de l'incubation).

1.2.2.1. Ajout du pétrole dans les mésocosmes

Le pétrole brut de type OURAL, choisi pour l'expérimentation, est un pétrole brut sulfureux de gravité moyenne, obtenu par le mélange d'un pétrole lourd avec un pétrole plus léger provenant des régions de l'Oural en Russie. Autrement dit ce type de pétrole couvre une large

gamme de molécules d'hydrocarbures pétroliers : de molécules «facilement» dégradables à des molécules plus récalcitrantes (Figure 22). Il est composé majoritairement d'hydrocarbures saturés (environ 59.9 %) et en plus faible proportion d'hydrocarbures aromatiques (24.8 %), de résines (10.2 %) et d'asphaltènes (5.1 %), avec une concentration finale de 50 mg/kg de nickel et 100 mg/kg de vanadium (métaux utilisés, dans le cadre du projet DECAPAGE, comme indicateurs de dégradation d'où la nécessité d'utiliser un pétrole avec des concentrations en métaux facilement détectables). Malgré la forte proportion d'hydrocarbures saturés et aromatiques, les alcanes et des HAP (composés du pétrole identifiables en chromatographie gazeuse) ne représentent que 6,2 % et 0,8 % de ce pétrole. La biodégradabilité théorique de ce pétrole a été déterminée selon la méthode décrite par l'Organisation Maritime Internationale (IMO, 2004) et atteint seulement 48,3 % du pétrole (alcanes et HAP biodégradables à 85 % et 90 % respectivement).

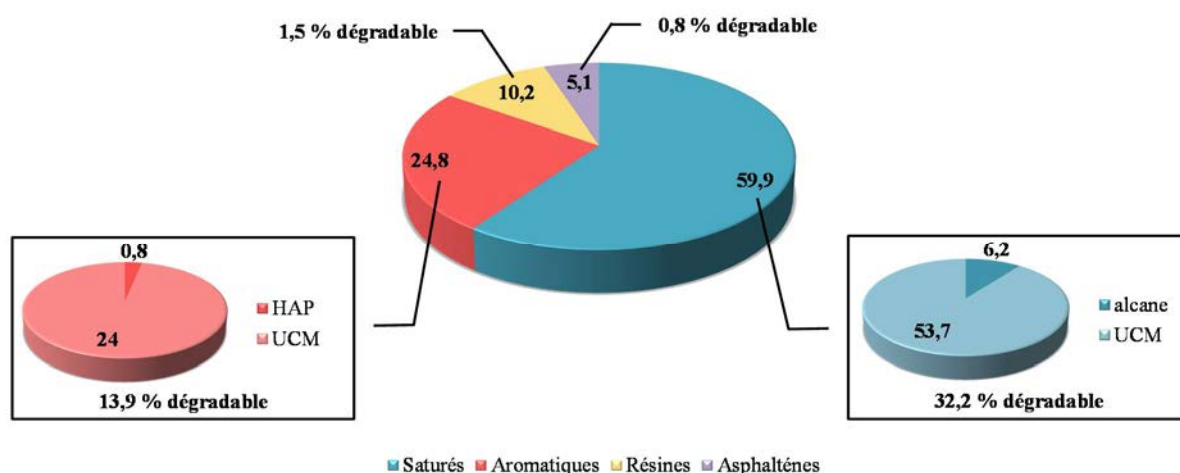


Figure 22 : Composition SARA du pétrole de type Oural et proportion (en %) de la part dégradée de chaque fraction estimée suivant la méthodologie décrite par IMO (2004).

La couche supérieure des sédiments de chaque mésocosme (0-2 cm) a été collectée, ces sédiments ont ensuite été mélangés puis homogénéisés. Ce mélange a été divisé en deux. Le pétrole a été ajouté à l'une des deux parties à une concentration finale de 24 ± 4 mg/g de sédiment sec (Figure 23). Le tout a ensuite été homogénéisé vigoureusement avec un mélangeur. Les sédiments sans pétrole ont également été homogénéisés en parallèle afin de subir le même traitement. Enfin, les sédiments ont été répartis entre les mésocosmes et étalés à la surface des sédiments (couche 0-2 cm). Le sédiment contaminé a été réparti entre les mésocosmes « *pétrole* », « *pétrole + bioturbation* » et « *pétrole + hersage* », et le sédiment non contaminé entre les mésocosmes « *Blancs* ».

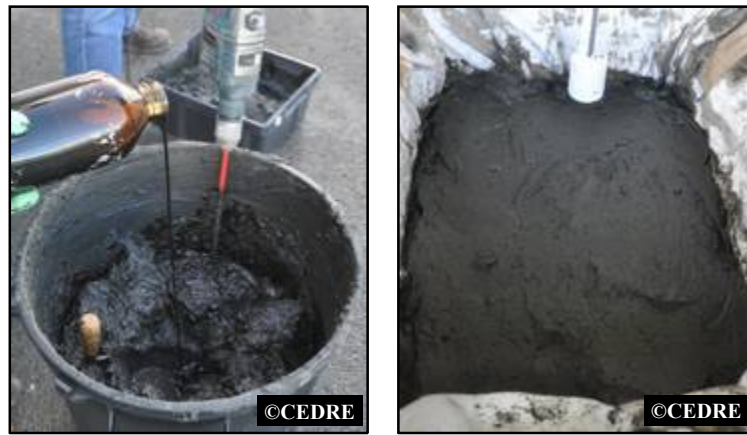


Figure 23 : Photographie de la procédure d'ajout de pétrole dans le sédiment de surface des mésocosmes pollués (photos du CEDRE).

Cette méthode de contamination et la concentration utilisée correspond à l'équivalent d'une mince couche de pétrole qui se déverserait sur les sédiments, simulant une marée noire, tout en étant plus homogène au niveau des sédiments par l'homogénéisation de ceux-ci avec le pétrole. (Lors du déversement de *Deep Water Horizon* la concentration retrouvée dans les 2 cm de surface de sédiments côtiers a atteint 510 mg/g de sédiments sec ; Lin and Mendelsohn (2012)).

1.2.2.2. Ajout des polychaetes

Afin d'augmenter les activités de bioturbation au sein des mésocosmes, la biomasse initiale des *polychaetes Hediste diversicolor* a été augmentée de 50 fois. Autrement dit, une biomasse de 3332 ± 42 g/m² a été rajoutée correspondant à 1267 ± 16 ind/m², dans les mésocosmes « pétrole + bioturbation » (Figure 24). Ces annélides polychètes appartiennent à la famille des Nereididae et font partie des espèces macrobenthiques les plus représentées dans les sédiments côtiers sablo-vaseux (Clay, 1967; Kristensen, 1988). Ils s'adaptent très bien aux fluctuations de la salinité et de la température et survivent dans des environnements relativement pollués. En général, leur taille adulte varie de 2 à 10 cm de long et leur densité est comprise entre 50 et 5000 ind/m² (Kristensen, 1988).

Le remaniement sédimentaire lié aux activités des *polychaetes* a été estimé grâce à l'ajout de traceurs particuliers fluorescents, des luminophores (Gilbert *et al.*, 2007). Ces particules inertes ont été ajoutées dans tous les mésocosmes une heure après l'introduction des *polychaetes*, pour leur laisser le temps de pénétrer dans les sédiments. Ainsi, une suspension de luminophores oranges (100 g, 63-125 µm) a été homogénéisée et répandue à la surface des mésocosmes. A 50 jours, des luminophores de couleur verte ont également été ajoutés à la surface des mésocosmes. A 150 jours, ce sont des luminophores de couleur rose qui ont été ajoutés à la surface des mésocosmes témoignant cette fois-ci de l'activité de remaniement des derniers mois d'incubation (150-280 jours).



Figure 24 : Photographies de l'ajout des *polychaetes Hediste diversicolor* (à gauche) et du mésocosme après l'ajout des luminophores (à droite) pour la condition « pétrole + bioturbation » (photos du CEDRE).

1.2.2.3. Hersage de la surface des sédiments

Afin d'augmenter l'oxygénation des sédiments, un remaniement physique par hersage a été mis en place deux fois par semaine à marée basse. Pour cela, un râteau a été passé sur la surface des sédiments, impactant ceux-ci sur une profondeur de 6 cm (Figure 25). L'application de ce traitement physique avait pour objectif de mimer le hersage, technique parfois utilisée comme stratégie de bio-remédiation de plages polluées par des produits pétroliers. En effet, cette technique intervient généralement après la collecte des accumulations de produits pétroliers et du sable fortement contaminé, puisqu'il reste souvent une contamination plus ou moins importante due au mélange de composés pétroliers avec le substrat. Le remaniement du sédiment pollué généré par le hersage permet sa fragmentation ce qui accroît la superficie des composés pétroliers exposée aux processus de vieillissement, facilite la floculation argile-pétrole ou l'agrégation minéraux-pétrole et aère les sédiments (Guide d'informations techniques 7, *ITOPF* ; <http://www.itopf.com>). Ce dernier point permet d'accélérer la dégradation du pétrole par l'action des micro-organismes aérobies.



Figure 25 : Photographie du résultat du remaniement physique de la surface des sédiments par hersage pour la condition « pétrole + hersage » (Photo du CEDRE).

Cette expérience mise en place dans le hangar expérimental du CEDRE (Figure 26) a été maintenue 280 jours, de janvier 2012 à novembre 2012. Des communautés microbiennes différentes ayant des capacités de dégradation des hydrocarbures, ont alors pu être obtenues.

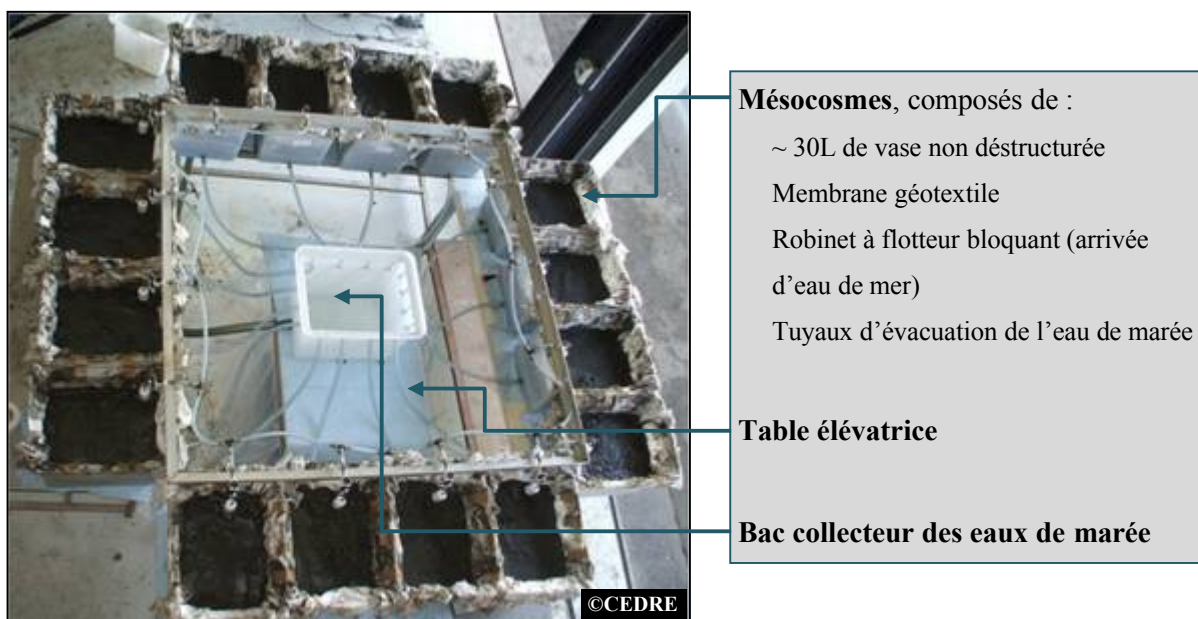


Figure 26 : Photographie du dispositif expérimental récréant le cycle des marées, mis en place pour l'incubation de sédiments côtiers non-déstructurés sous différents traitements de remaniement du sédiment (Hangar expérimental du CEDRE, Brest).

1.3. Stratégie d'échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé à 0, 1, 1.5, 2 mois d'incubation, puis tous les mois jusqu'à la fin de l'incubation, le 12 novembre 2012 pour les analyses chimiques de détermination de la biodégradation. Le temps de référence (t_0) correspondait à l'ajout de pétrole et des *polychaetes* dans les mésocosmes. Une fois la biodégradation mise en évidence successivement pour les différentes conditions, le matériel d'étude a été récupéré. Pour chaque prélèvement effectué au cours de l'incubation, un récipient de même volume a été placé au sein du sédiment afin d'éviter de déstructurer le sédiment.

1.3.1. Echantillonnage pour les analyses chimiques

Un échantillon de 1.5mL de sédiment de surface (0-2 cm) par bac a été prélevé afin de réaliser une analyse des hydrocarbures par chromatographie en phase gazeuse avec détecteur à ionisation de flamme (GC-FID). A partir de ces mesures, les rapports C17/pristane et C18/phytane ont pu être suivis afin de mettre en évidence la capacité de biodégradation au sein des différents mésocosmes pollués.

En parallèle, un prélèvement par carottage avec des seringues de 50 mL (conservation de la structure du sédiment sur 10 cm de profondeur) a été réalisé par mésocosme pour la caractérisation chimique des hydrocarbures dans les mésocosmes au cours de l'incubation.

1.3.2. Prélèvements du matériel d'étude

Lorsque la biodégradation a pu être estimée, par les analyses en GC-FID, dans les mésocosmes pollués, les sédiments ont été extraits d'une zone préservée de deux des trois mésocosmes de chaque condition. Les sédiments ont été prélevés sur une surface de 400 cm² et sur une profondeur de 6 cm (soit 2400 cm³ de sédiments par mésocosme échantillonné). La capacité de biodégradation a pu être observée en premier lieu pour la condition « *pétrole + hersage* », après 150 jours d'incubation. Les sédiments de cette condition ont donc été prélevés fin juin 2012. Ils ont été maintenus à 6°C, recouverts de 5 cm d'eau de mer bullée à l'air filtré (filtres en PTFE avec un diamètre de pore de 0.20 µm ; Fisher Scientific), pendant 10 jours avant la mise en place de l'expérimentation en bioréacteurs.

De la même façon, les sédiments de la condition « *pétrole* » ont été prélevés début octobre 2012 et ceux de la condition « *pétrole + bioturbation* » mis novembre 2012.

2. Mise en place d'expérimentations en bioréacteurs pour l'étude d'impact des oscillations anoxie/oxie sur des communautés microbiennes issues de sédiments intertidaux pollués par du pétrole

La description de cette approche expérimentale a été valorisée par la rédaction d'un chapitre technique, qui a été accepté par l'éditeur *Springer*, pour parution dans un ouvrage intitulé « *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols* », sous le titre :

Simulation of anoxic/oxic oscillations in crude oil-degrading bioreactors

Par : Fanny Terrisse¹, Robert Duran¹, Isabelle Vitte², Cristiana Cravo-Laureau^{1**}

¹ Equipe Environnement et Microbiologie, MELODY group, Université de Pau et des Pays de l'Adour, IPREM UMR CNRS 5254, BP 1155, 64013 Pau Cedex, France

² Laboratoire des Pyrénées et des Landes, 64 150 Lagor, France

Abstract

Anoxic/oxic oscillations are commonly found in nature as for example at water/sediment interfaces or in bioturbated sediments. These fluctuating environmental conditions influence the microbial dynamic and thus affect the role of micro-organism on the degradation of organic compounds such as hydrocarbons. Little attention has been dedicated to this phenomenon and therefore the knowledge on how the anoxic/oxic oscillations may affect the fate of hydrocarbons, their associated toxicity and the native microbial communities in chronically contaminated environments is still scarce. In order to characterize the ecological responses of hydrocarbonoclastic microbial communities to fluctuating conditions, we present here a protocol describing the incubation of oil-polluted sediments in bioreactors with anoxic/oxic oscillations, coupled with exposure to crude oil.

Keywords: environmental fluctuations, anoxic/oxic oscillations, microbial communities, hydrocarbons biodegradation, bioreactors systems.

2.1. Introduction

Most studies aiming to assess the behavior of bacteria and pollutant elimination, have focused on simplified systems (pure cultures or bacterial enrichments), which are not representative of natural environments. The impact of environmental fluctuations on pollutant degradation and microbial community structure thus remains insufficiently investigated. Although microbial communities in the environment are frequently exposed to varying levels of oxygen, studies have focused on aerobic or anaerobic biodegradation. Hydrocarbon degradation under anoxic/oxic oscillating conditions awakened less interest (Cravo-Laureau *et al.*, 2011) and further knowledge is still required.

Environments subjected to anoxic/oxic oscillations (due to tides and bioturbation activities of macrofauna) are widespread in nature and constitute particular functional systems. Quite surprisingly, the fate of compounds in these systems has received very little attention by the scientific community. Most studies concerning the impact of oxygen and redox oscillations on the organic matter degradation were performed in marine environments. Some authors (e.g. Sun *et al.* (1993), Aller (1994), Sun *et al.* (2002), Caradec *et al.* (2004), Abril *et al.* (2010)) have studied the fate of organic matter subjected to oxic/anoxic oscillations, with the aim to assess the impact of these changes on the decomposition of organic carbon. Despite some promising findings, the biogeochemical functioning and dynamics of microbial communities in such

environment remain poorly documented. More particularly, the fate of contaminants such as hydrocarbons remains to be explored (Cravo-Laureau *et al.*, 2011; Vitte *et al.*, 2011). Insights on the ecology of microbial communities in hydrocarbon contaminated and fluctuating ecosystems are essential to understand the mechanisms of biodegradation. We developed an experimental approach involving bioreactors for simulating anoxic/oxic oscillations to study indigenous microbial communities. The experimental setup aims to understand the fate of hydrocarbon compounds in oil-polluted environments characterized by fluctuating redox conditions (Vitte *et al.*, 2011; Vitte *et al.*, 2013).

In this chapter, a method is described to simulate anoxic/oxic oscillations in crude oil-degrading bioreactors.

2.2. Materials

2.2.1. Bioreactor systems (Figure 27)

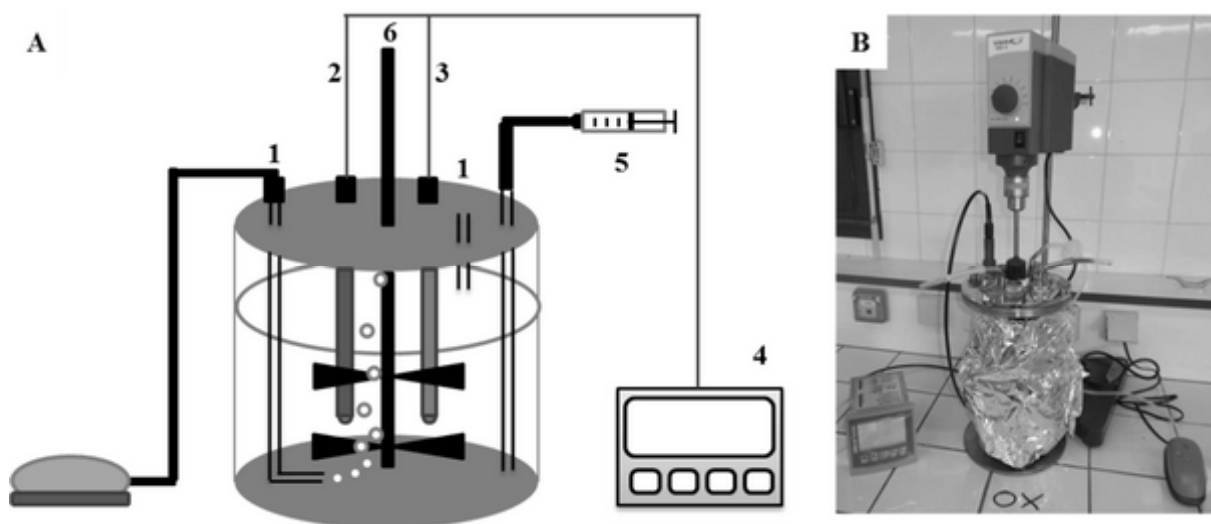


Figure 27: Schematic representation (A) and photography of bioreactor (B). 1, Filtered air or nitrogen gas injection; 2, Dissolved oxygen and temperature probe; 3, Inlet with pH/redox potential probe; 4, Transmitter connected to probes; 5, Syringe connected by Norprene food process tubing (NORPRENE® Alimentaire Øi 4.8mm and Øo 8.0mm; Saint-Gobain performance plastics) to a stainless steel perforated extracting tube to collect samples; 6, Stirring system.

1. Glass tanks with a working volume of two liters with rounded bottom, airtight sealed cover made of stainless steel (*inox*). The cover has several connections for gas inlet, collection of samples from a perforated *inox* tube and inlet for different probes.
2. Stirring system consisting of an axis, with two horizontal propellers at the bottom extremity, through the cover connected to a motor (Stuart SS20) in order to continuously homogenise the slurry.

3. Probes for pH/redox (InPro 4260i/SG/225, Mettler Toledo International Inc.) and dissolved oxygen/temperature (InPro6800, Mettler Toledo International Inc.) determination connected to transmitters (M300 ISM multipar, Mettler Toledo International Inc.).
4. N₂ (instrument 5.0, LindeGas) and air pumps (Rena air 50) connected to bioreactors with gastight tubes (VERSILIC® silicone tube 5 mm internal diameter and 8.0 mm external diameter, Fisher Scientific).

2.2.2. Culture medium, solutions and reagents

1. Natural seawater filtered through a MFTM membrane filter of 0.45 µm pore size (Millipore) (*see Note 1*).
2. Potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.2; 71.7 ml of 1M K₂HPO₄ and 28.3ml of 1M KH₂PO₄ per 1L of water), autoclaved.
3. Vitamin V7 solution: 10 mg p-amino benzoate; 2 mg biotine; 10 mg thiamine; 5 mg panthotenate; 50 mg pyridoxamine; 20 mg vitamine B12; 20 mg nicotinate per 1 L, sterilized by filtering (0.20 µm pores size, Millipore) and stored in the dark at 4 °C.
4. NaHCO₃ stock solution (0.8 M): dissolve 2.016 g NaHCO₃ in 30 ml water and autoclave.
5. RNA stabilizing solution: 5 ml of phenol, 5 ml of 1 M acetate buffer pH5.5 (6.804g of sodium acetate trihydrate in 50 ml final volume, pH adjusted with acetic acid). The two phases are separated by centrifugation at 4,000 g during 3 minutes. The phenolic phase is then added to 95 ml of pure ethanol.

2.3. Methods

In this section, the bioreactor experiment set up at the Environment and Microbiology Research Team is described. The incubation system in batch conditions facilitates the control of the major physical-chemical variables. It is particularly suitable for assessing the effect of anoxic/oxic oscillating conditions on hydrocarbonoclastic microbial communities from coastal sediments. In order to perform robust statistical analyses of the data sets we recommend to design experiments with at least three biological replicates. Generally, the anoxic/oxic oscillating conditions are compared with the permanent anoxic or oxic conditions, leading to an experimentation involving nine bioreactors with three biological replicates per condition (*see Note 2*).

2.3.1. Culture medium

1. Supplement natural filtered seawater (*see* Subheading 2.2) with 0.2 g/L of NH_4Cl before sterilization by autoclaving at 120°C, 15 minutes.
2. After sterilization add the following solutions at final concentration: 30 ml/L of NaHCO_3 (0.8 M) solution, 4 ml/L of potassium phosphate buffer (0.1 M pH 7.2) and 1 ml/L vitamins V7 solution (*see* Subheading 2.2), under sterile conditions.

2.3.2. Bioreactor experiments set up and experimental conditions

1. Collected sediments could be stored in glass container in natural seawater at 4 °C before use (*see* **Note 3**).
2. Homogenize vigorously the sediments manually.
3. Prepare slurry at 20 % (w/v) in natural seawater medium at pH 7.2 (*see* Subheading 3.1).
4. After homogenization, distribute slurry (1.5 L or 1.8 L) in each reactor, incubate in the dark with continuous agitation at 250 rpm, at room temperature (*see* **Notes 2 and 3**).
5. Crude oil or hydrocarbons could be introduced in bioreactors (*see* **Note 4**) before or after a stabilization period (*see* **Note 3**).
6. Permanent oxic conditions and aeration periods in oscillating conditions are produced by injection of filtered air (Acro® 37 TF Vent Device with 0.2µm PTFE Membrane, Life Sciences) using air pumps (**flow rate of 70 L/h**) into the gas and aqueous phases, generating bubbling (*see* **Note 5**).
7. Periods of anoxic conditions are achieved by stopping aeration, sealing and closing the system. A slight overpressure in nitrogen gas is created (*see* **Note 5**). Permanent anoxic conditions are obtained by flushing aqueous and gas phases with filtered N_2 . Figure 2 shows an example of a time scale of experimental conditions.

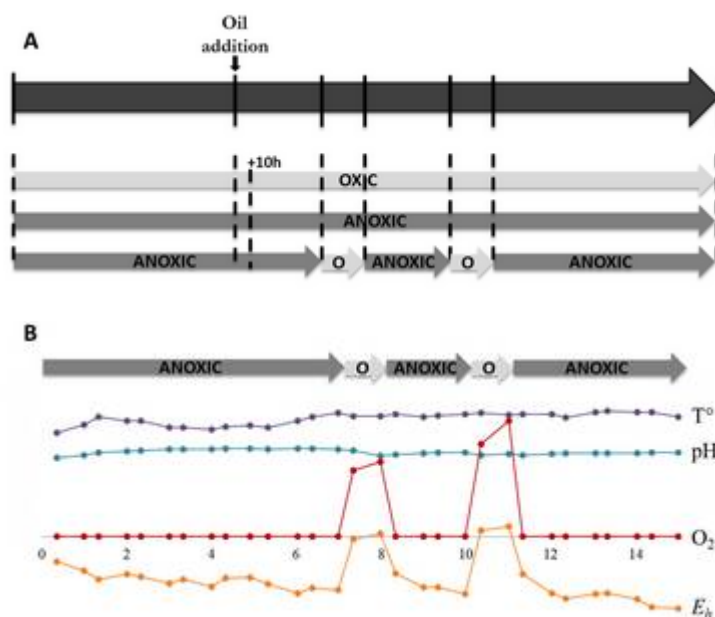


Figure 28: (A) Example of time scale of the experimental conditions. The first five days allows to stabilize the microbial communities, under oxic or anoxic conditions (for the permanent anoxic condition and the oscillating conditions) before addition of crude oil and starting anoxic/oxic oscillations for the oscillating conditions. Anoxic/oxic oscillations consist in an alternation between anoxic periods and periods of aeration of one-day at days 7 and 10. Dashed lines show sampling times. (B) Profiles of parameters followed in the anoxic/oxic oscillating conditions (T° , temperature; pH; O_2 , oxygen; E_h , redox).

2.3.3. Sampling for biological and chemical analyses

Sub-sampling in the bioreactors should be performed in triplicates per bioreactor in order to ensure robust statistical analyses.

1. Collect samples with a sterile syringe (TERUMO Corporation) connected to the *inox* tube by a Norprene tube (Saint-Gobain performance plastics). Before each sampling series, extract with a syringe at least an equal volume of the extracting tube (*inox* plus Norprene tubes), to purge the system (Figure 1).
2. For chemical analysis (e.g. hydrocarbons content, total organic carbon) and toxicity assessment, store samples (10 ml) in amber glass bottles (to prevent photo-oxidation) with Teflon stopper (to avoid adsorption of hydrocarbons on the stopper) at -20°C .
3. For biological analysis (DNA and RNA extraction), 190 μl of RNA stabilizing solution (see Subheading 2.2) is immediately added to 1.5 ml of collected sample in Eppendorf tubes, to preserve rRNA transcripts integrity. Samples are homogenized and centrifuged at 10,000 g for 5 minutes at 4°C (Jouan MR 1812). The supernatant is removed and the Eppendorf tube is introduced immediately in liquid nitrogen and stored at -80°C (see Note 6).

4. For enrichment cultures or strain isolation, samples are, either introduced immediately in a culture medium, or stored at 4 °C before inoculation.

2.4. Notes

1. Synthetic mineral medium could also be used if natural seawater is not available, or to avoid the introduction of supplementary carbon source or pollutants, containing (in distilled water): KCl, 1.5 g/L; CaCl₂·2H₂O, 2.94 g/L; NH₄Cl, 2.65 mg/L; NaCl, 24 g/L; MgSO₄·7H₂O, 13.28 g/L; MgCl₂·6H₂O, 10.56 g/L; Na₂CO₃, 0.53 g/L; phosphate buffer 0.1 M (*see* Subheading 2.2), 4 mL/L; vitamin V7 solution (*see* Subheading 2.2), 1 mL/L; trace element solution SL12 (EDTA-di-Na, 3 g; FeSO₄·7H₂O, 1.1 g; CoCl₂·6H₂O, 0.19 g; ZnCl₂, 0.042 g; NaMoO₄·2H₂O, 0.018 g; MnCl₂·4H₂O, 0.05 g; NiCl₂·6H₂O, 0.024 g; H₃BO₃, 0.3 g; CuCl₂·2H₂O, 0.002 g; per 1 L water, autoclaved and stored in the dark), 1 mL/L; selenite–tungstate solution (NaOH, 0.4 g; Na₂SeO₃·5H₂O, 0.006 g; Na₂WO₄, 0.008 g; per 1 L water, autoclaved), 1 mL/L; pH 7.2.
2. Locate bioreactors inside a spacious room (enough for the 9 bioreactors), provided with a fume hood or an exhaust vent. Odors from oil and volatile compounds in the slurry could be released into the atmosphere. Also, sulfide and methane, as well as fermentation products, produced during the anoxic period of oscillating conditions could go into the room air during oxic periods.
3. Stabilization periods could be considered: before use, the slurry could be maintained at 4 °C, in the dark, without agitation. In order to maintain aerobic and anaerobic metabolisms and simulate in situ conditions, air could be provided only in the first few millimeters of the slurry using bubble diffusers. These conditions could be maintained during a stabilization period of few weeks to 1 or 2 months, in order to avoid the microbial response to the containment effect.

Another possibility could be to stabilize the microbial communities once slurries are introduced in the bioreactors. In this case the stabilization could be performed, under oxic condition (for the permanent oxic condition) or anoxic condition (for the permanent anoxic and the oscillating conditions) before the initialization of the anoxic/oxic oscillations (for the oscillating conditions).
4. Addition of labeled molecules is useful especially when studying chronically oil-contaminated samples, without addition of new crude oil. Indeed, deuterated hydrocarbons used as internal standards and spiked in the slurry before the beginning of the experiment,

allow evaluation of the kinetics of endogenous hydrocarbons removal in the oily sample. Two labeled polycyclic aromatic hydrocarbons (d_{12} chrysene and d_{10} fluoranthene ; Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) could be added at concentrations of 55 and 140 mg/L (w/v), respectively. These four aromatic ring hydrocarbons, chosen as bioavailability indicators, were considered as recalcitrant to biological activity. Nevertheless, it was shown that they could be used as a source of carbon and energy by various bacteria under several conditions (Cerniglia, 1992; Peng *et al.*, 2008).

5. When performing the anoxic/oxic switches, a tube clamp is positioned on the gas inlet tube between the reactor and the filter to avoid the contamination of the filter by liquid push back in the tube due to the nitrogen overpressure in the reactor. Disconnect nitrogen gas tube and connect air pumps. The nitrogen overpressure is then removed opening the gas outlet connection and loosening progressively the tube clamp. Conversely, performing the oxic/anoxic switches, all outlet and inlet connections should be closed. Start positioning tube clamp on the gas inlet tube between the reactor and the filter. Disconnect air pumps and connect nitrogen gas tube and then progressively loosen tube clamp. At the same time, a tube clamp on the gas outlet is slightly loosened to flush reactor with nitrogen. Then close the system to obtain anoxic conditions.
6. For metatranscriptomic analysis, several Eppendorfs of slurry should be taken, in the aim to get enough biological material.

2.5. Acknowledgements

We acknowledge the support of the urban community of Pau-Pyrénées (France), the French program EC2CO CNRS-INSU (Diverdhy Project) and ANR DECAPAGE (project ANR-CESA-2011-006 01). We would like to thank all partners of the DECAPAGE project and MELODY group for their useful discussions.

2.6. References

- Cravo-Laureau C, Hernandez-Raquet G, Vitte I et al (2011) Role of environmental fluctuations and microbial diversity in degradation of hydrocarbons in contaminated sludge. *Research in Microbiology* 162:888-95.
- Abril G, Commarieu MV, Etcheber H et al (2010) In vitro simulation of oxic/suboxic diagenesis in an estuarine fluid mud subjected to redox oscillations. *Estuar Coast Shelf Sci* 88:279-91.
- Aller RC (1994) Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation. *Chemical Geology* 114:331-45.

Caradec S, Grossi V, Gilbert F et al (2004) Influence of various redox conditions on the degradation of microalgal triacylglycerols and fatty acids in marine sediments. *Organic Geochemistry* 35:277-87.

Sun MY, Lee C, Aller RC (1993) Anoxic and oxic degradation of C-14-labeled chloropigments and a C-14-labeled diatom in long-island sound sediments. *Limnology and Oceanography* 38:1438-51.

Sun MY, Aller RC, Lee C et al (2002) Effects of oxygen and redox oscillation on degradation of cel-associated lipids in surficial marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 66:2003-12.

Vitte I, Duran R, Hernandez-Raquet G et al (2013) Dynamics of metabolically active bacterial communities involved in PAH and toxicity elimination from oil-contaminated sludge during anoxic/oxic oscillations. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97:4199-211.

Vitte I, Duran R, Jezequel R et al (2011) Effect of oxic/anoxic switches on bacterial communities and PAH biodegradation in an oil-contaminated sludge. *Environmental Science and Pollution Research* 18:1022-32.

Cerniglia CE (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3:351-68.

Peng RH, Xiong AS, Xue Y et al (2008) Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* 32:927-55.

3. Incubations sous différents régimes d'oxygénation

3.1. Conditions expérimentales

L'expérimentation en bioréacteurs a été réalisée sur une période de quinze jours (Figure 29) à température ambiante. Les cinq premiers jours d'incubation, soit en conditions d'anoxie soit en conditions d'oxie, ont permis la stabilisation des communautés dans les systèmes, avant l'addition de 5000 ppm de pétrole Oural et l'initialisation des oscillations anoxie/oxie.

L'incubation en conditions oscillantes anoxie/oxie a consistait en une alternance entre des périodes anoxiques de 2 jours à partir du jour 5 et des périodes d'aération d'une journée aux jours 7 et 10. Les périodes d'aération ont été réalisées par injection d'air filtré (filtres PTFE avec un diamètre de pores de 0.20 µm, Fisher Scientific) à l'aide de pompes à air (débit de 70 L/h, Rena air 50) au niveau des phases aqueuse et gazeuse. La condition d'oxie permanente a été maintenue selon la même procédure. Les périodes d'anoxie ont été mise en place par l'arrêt de l'aération, fermeture des sorties de gaz et en créant une légère surpression en azote gazeux. Le processus a été le même pour atteindre les conditions d'anoxie permanente.

Les systèmes ont été maintenus à l'obscurité tout au long des incubations afin d'éviter l'apport d'oxygène dans le système par la photosynthèse pouvant compromettre l'état d'anoxie pour les conditions d'anoxie permanente et d'oscillations anoxie/oxie.

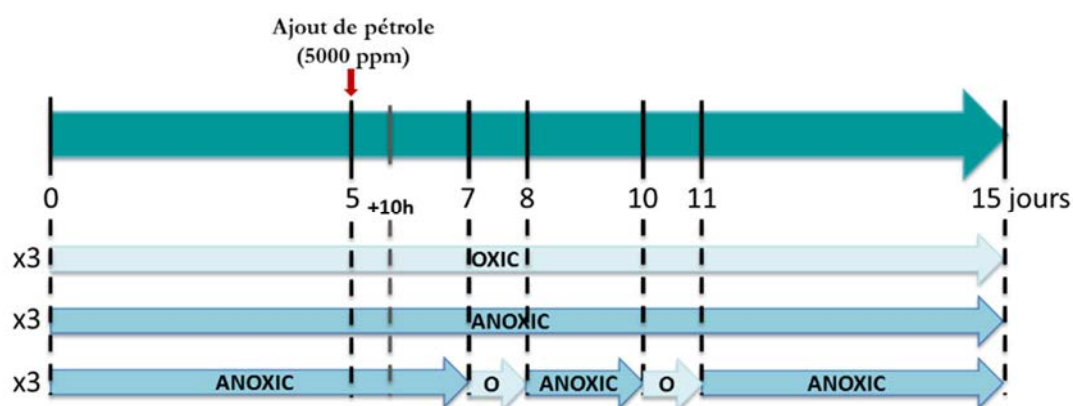


Figure 29 : Schéma descriptif du plan expérimental des incubations en bioréacteurs pour l'incubation en bioréacteurs de chaque sédiment pollué issus des mésocosmes, sous des conditions oscillantes anoxie/oxie en comparaison à des conditions permanentes d'anoxie ou d'oxie.

3.2. Prélèvements d'échantillons

Au cours de l'incubation, les prélèvements d'échantillons dans les bioréacteurs ont été réalisés à l'aide d'une seringue stérile (TERUMO Corporation) reliée par un tube en Norprène (Saint-Gobain performance plastics) au tube perforé en inox. Avant chaque série de prélèvements, le tube a été purgé. Des échantillons ont été prélevés pour des analyses chimiques et biologiques à 0, 5 (avant l'ajout de pétrole), 5.4 (10 heures après l'ajout de pétrole), 7, 8, 10, 11 et 15 jours d'incubation (voir échelle de temps de la Figure 29). Tous les échantillonnages réalisés à des temps intermédiaires ont été effectués avant le basculement d'un état d'oxygénation à un autre.

3.2.1. Échantillons pour les analyses chimiques

Pour les analyses chimiques, 6 échantillons de 10 mL de suspension ont été prélevés par réacteur au temps 0 jours. A chaque temps d'échantillonnage au cours de l'incubation, un échantillon de 10 mL et un échantillon de 5 mL ont été prélevés à partir de chaque réacteur. A la fin de l'expérience, trois échantillons de 10 mL et 5 mL ont été prélevés à partir de chaque réacteur. Les échantillons ont été stockés dans des bouteilles en verre ambré (pour préserver les échantillons de la photo-oxydation des hydrocarbures) avec un bouchon de téflon (pour éviter l'adsorption des hydrocarbures sur le bouchon) à -20 °C, jusqu'à leur analyse. La teneur en hydrocarbures pétroliers a été estimée au cours des incubations par des analyses GC-MS.

3.2.2. Echantillons pour les analyses moléculaires

Comme des analyses transcriptomiques étaient planifiées, l'échantillonnage pour les analyses biomoléculaires a été réalisé avec des précautions particulières, afin de préserver l'intégrité de l'ARN. Une solution de stabilisation de l'ARN a été préparée en mélangeant 5 mL de phénol avec 5 mL d'un tampon acétate 1 M à pH 5,5 (ajusté avec de l'acide acétique). Les deux phases ont été séparées par centrifugation à 4000 g pendant 3 minutes (Heraeus Multifuge X 3 FR, Thermo Scientific). On a ensuite ajouté la phase phénolique de 95 mL de solution d'éthanol à 100 %. 190 μ L de cette solution ont été ajoutés à 1,5 mL de suspension dans 7 tubes Eppendorf de chaque réacteur à chaque série d'échantillonnage. Les échantillons contenant la solution de stabilisation de l'ARN ont été homogénéisés et centrifugés à 10000 g pendant 5 minutes à 4 °C (Jouan MR 1812). Le surnageant a ensuite été éliminé et les tubes Eppendorf ont été immédiatement jetés dans de l'azote liquide puis stockés à -80 °C.

4. Analyses chimiques : quantification des hydrocarbures en réacteurs

Pour les analyses chimiques, les échantillons ont d'abord été filtrés sur membrane filtrante en microfibrilles de verre (qualité GF/F, diamètre des pores de 0.7 μ m, Whatman). Les composés du pétrole contenus au sein de la phase sédimentaire et ceux de la phase aqueuse ont ainsi pu être extraits puis analysés par l'utilisation de méthodes adaptées à chacune des matrices.



Figure 30 : Schéma descriptif de la procédure de préparation des échantillons pour l'extraction et l'analyse des composés pétroliers.

4.1. Dosage des hydrocarbures pétroliers totaux et des *n*-alcanes et HAPs d'intérêt dans les échantillons de sédiment

4.1.1. Extraction assistée par ASE Dionex

Les filtres, ayant retenu le sédiment, ont séché à température ambiante sous une hotte pendant 24 heures, afin d'estimer le poids sec de chaque échantillon de sédiment avant extraction et analyse. Les sédiments secs ont ensuite été dopés avec des solutions d'étalonnage interne : 100 μL d'une solution d'eicosane deutéré ($n\text{-C}_{20}\text{d}_{42}$) à 1000 $\mu\text{g/mL}$, et 100 μL d'une solution composée de cinq HAP deutérés (210 $\mu\text{g/mL}$ de d_8 -naphtalène, 110 $\mu\text{g/mL}$ de d_{10} -biphényle, 210 $\mu\text{g/mL}$ de d_{10} -phénanthrène, 40 $\mu\text{g/mL}$ de d_{12} -chrysène et 40 $\mu\text{g/mL}$ de d_{12} -benzo-(a)-pyrène ; Sigma-aldrich, États-Unis). L'étalonnage interne permet de passer outre le calcul des rendements d'extraction (même s'ils ont été précédemment estimés à plus de 80% sur différentes matrices) car cette méthode corrige les pertes éventuelles pendant la préparation des échantillons. Les extractions ont été réalisées à l'aide du système d'extraction Dionex ASETM 350 Accelerated Solvent Extractor system (Thermo ScientificTM) dans des cellules de 10 mL (Figure 31). Ce système automatisé d'extraction séquentielle par solvant à température élevée (100 °C) et sous pression (1600 Psi), a réalisé deux cycles d'extraction au dichlorométhane (moins de 10 mL/cycle, correspondant au volume nécessaire pour remplir la cellule) d'une durée de 5 minutes, puis un rinçage (70 % du volume de la cellule).

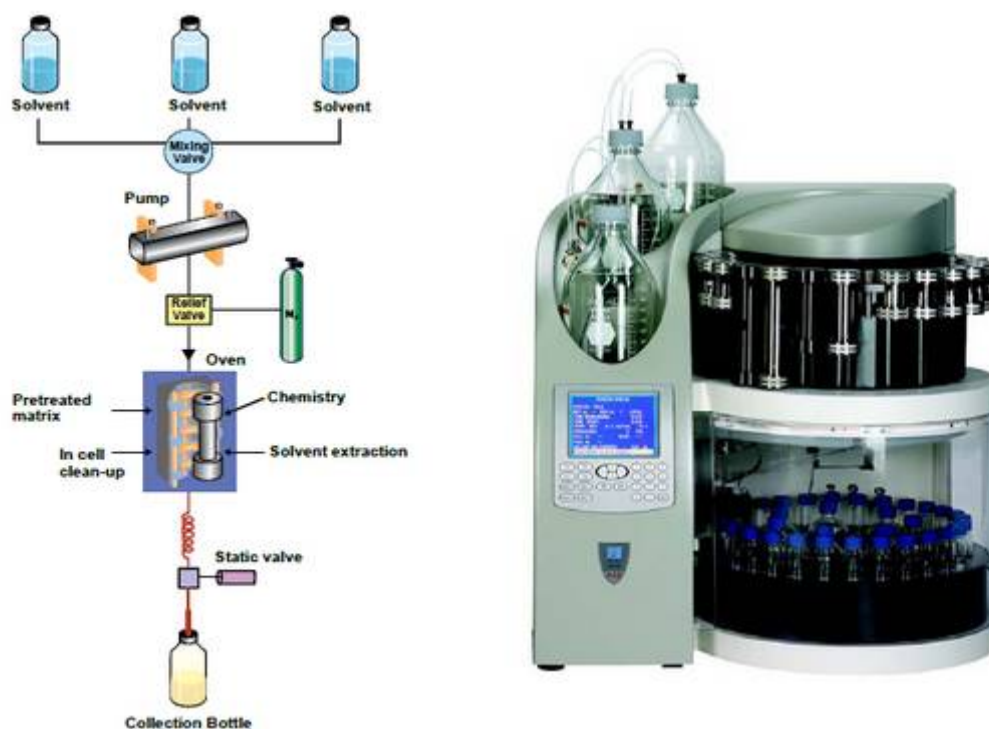


Figure 31 : Schéma descriptif du procédé d'extraction séquentielle par solvant à température et pression élevées réalisé par l'appareil Dionex ASETM 350 Accelerated Solvent Extractor system représenté par la photographie.

Les extraits organiques ont ensuite été passés au travers de sulfate de sodium anhydre (préalablement activé pendant 4 heures à 400 °C) afin d'éliminer d'éventuelles traces aqueuses. Puis, ils ont été concentrés à 2 mL en utilisant un Syncore (sous agitation à 200 rpm et sous vide jusqu'à 570 mPSI ; Büchi, Allemagne) et transvasés dans des flacons ambrés de chromatographie.

4.1.2. Analyse en chromatographie gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse

Les échantillons extraits ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS). L'appareil GC était un 6890N HP (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) équipé d'un injecteur split/splitless utilisé en mode « pulsed splitless » (temps de Splitless: 1 min, débit de 50 mL/min). La température de l'injecteur a été maintenue à 300 °C. La température d'interface était de 300 °C. Le gradient de température de la GC a été programmé pour commencer à 50 °C (1 min) et atteindre 300 °C (20 min) avec une augmentation de 5 °C/min. L'hélium a été utilisé en gaz vecteur, à un débit constant de 1 mL/min. La colonne capillaire utilisée était une MS HP-5 (HP, Palo Alto, États-Unis) : 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm d'épaisseur de film. La GC a été couplée à un détecteur sélectif de masse (MSD) HP 5973 (impact électronique: 70 eV, tension: 1200 V). Les analyses ont été réalisées en mode SIM (Single Ion Monitoring) avec l'ion moléculaire de chaque composé (minimum de 1,4 cycles/s) afin de déterminer leurs abondances. Cette méthode d'analyse a une limite de quantification de 4-5ng/g de sédiments secs.

4.2. Dosage des HAP dans les échantillons d'eau par SBSE-GC/MS

4.2.1. Extraction SBSE des HAP dissous

Les échantillons aqueux ont été dopés avec 10 mL d'une solution de méthanol contenant cinq HAP deutérés utilisés comme standards internes (d_8 -naphtalène, d_{10} -biphényle, d_{10} -phénanthrène, d_{12} -chrysène et d_{12} -benzo-(a)-pyrène ; Sigma-aldrich, États-Unis), à la concentration de 1 µg/L. L'extraction SBSE (Stir Bar Sorbants extraction) a été réalisée pour extraire les HAP des échantillons aqueux (Figure 32). Cette approche a consisté à placer un barreau d'agitation magnétique recouvert de polydiméthylsiloxane (un polymère, PDMS, aussi appelé TWISTER ; GERSTEL, Germany) dans chaque échantillon dopé et d'agiter à 500 tours par minute pendant 2 heures, dans l'obscurité. Du fait de l'affinité des HAP avec le polymère de revêtement des barreaux, les HAP viennent s'y adsorber.

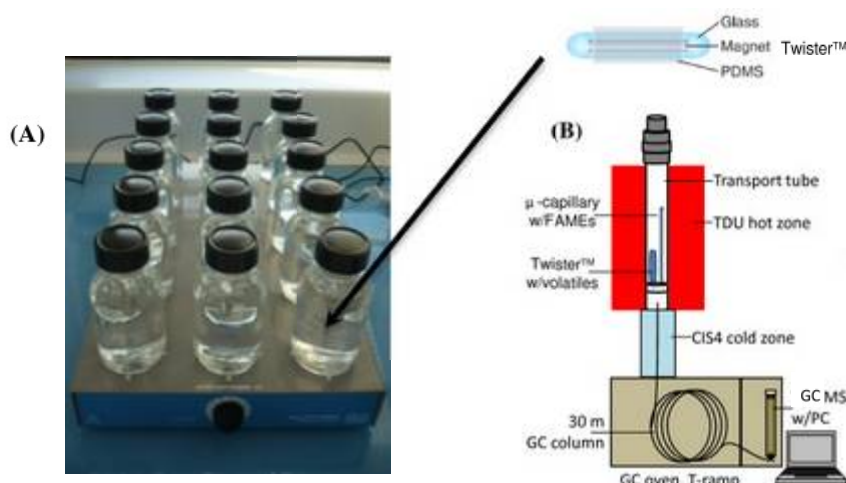


Figure 32 : Procédure d'extraction et d'analyse des HAP en phase aqueuse par l'approche SBSE-GC/MS. (A) Adsorption des HAP sur le revêtement des barreaux SBSE. (B) Analyse des HAP en GC/MS suite à leur désorption de la phase polymérisée dans l'unité de désorption thermique (TDU) et leur concentration dans la zone de refroidissement avant injection dans la colonne GC. Modifié d'après (Skogerson *et al.*, 2011).

4.2.2. Analyse par SBSE-GC/MS

Les HAP adsorbés sur la phase PDMS des barreaux SBSE ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à de la spectrométrie de masse (GC-MS). La désorption des HAP à partir de la phase PDMS a été effectuée au niveau de l'unité de désorption thermique (TDU). Un gradient de température a été appliqué en commençant à 50 °C pendant 30 secondes puis en augmentant la température de 115 °C par minute jusqu'à atteindre 300 °C. Cette température a été maintenue pendant 6 minutes pour une désorption totale. Les molécules de HAP libérées ont été concentrées dans le système d'injection (Cooled Injection System, CIS) qui était maintenue à -50 °C par refroidissement à l'azote liquide. Les molécules ont été injectées dans le système GC/MS par une augmentation rapide de la température de 12 °C/s pour atteindre un palier de 10 minutes à 300 °C pour ensuite augmenter de 0.5 °C/s jusqu'à 310 °C, alors maintenue pendant 1 minute. L'appareillage GC/MS et le programme utilisés étaient identiques à ceux utilisés pour l'analyse des échantillons de sédiments.

4.3. Quantification et traitement des données

Les chromatogrammes obtenus en GC/MS ont été interprétés en utilisant le logiciel ChemStation A.03.00 (Agilent). Les quantifications des hydrocarbures pétroliers totaux (TPH) et de chaque composé ont été réalisées à partir des concentrations en étalons internes (écoisane et HAP deutérés ; voir § 4.1.1), en utilisant des courbes d'étalonnage de pétrole brut OURAL (de 0,05 à 5 mg/mL), des n-alcanes (TRPH standard de 0,5 à 50 pg/mL, Ultra scientifique, Floride)

et des HAP (CUS-9306 de 0,25 à 25 pg/mL, normes LGS, France). Certains indices de biodégradation des alcanes et des HAP ont été déterminés.

5. Outils moléculaires

5.1. Extraction des acides nucléiques

Les acides désoxyribonucléiques (ADN) et les acides ribonucléiques (ARN) génomiques ont été extraits à partir d'un même échantillon. Les extractions ont été réalisées en triplicatas sur les communautés microbiennes d'étude (« *pétrole* », « *pétrole + hersage* » et « *pétrole + bioturbation* »), puis au cours de l'incubation de chaque communauté sur un échantillon de suspension de sédiments par réacteur de chaque condition (conditions d'oxie et d'anoxie permanentes et oscillantes), soit un total de 225 échantillons.

Pour l'extraction des ARN certaines précautions sont indispensables afin d'éviter toute contamination par des RNases qui pourraient les dégrader très rapidement. Tout le matériel utilisé au cours de leur extraction ainsi que les solutions, ont été préalablement traités au diéthylpyrocarbonate (DEPC), pour inactiver les RNases, puis stérilisés. Ces précautions ont également été appliquées lors de manipulations ultérieures des échantillons d'ARN.

Le kit commercial *RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit* de *MOBIO* a été utilisé en premier lieu jusqu'à l'étape de remise en suspension des acides nucléiques totaux dans 100 µL de tampon SR5 (fournit dans le kit) après précipitation à l'éthanol à 70 %. La séparation et la purification des ADN et des ARN ont été réalisées avec le kit commercial *Allprep DNA/RNA Mini Kit* de *QIAGEN* suivant les recommandations du fournisseur. Les ADN et ARN génomiques ont été séparément élués dans 100 µL finaux d'eau MilliQ stérilisée exempte de DNase et de RNase. Les éluats d'ADN et d'ARN ont été aliquotés et conservés à -80 °C.

5.2. Contrôle de la qualité, de la taille et détermination de la concentration des acides nucléiques

La pureté et la bonne qualité des échantillons d'ADN et d'ARN extraits sont des éléments importants pour la réussite globale des méthodes d'analyse qui en découlent. Il est donc indispensable de s'assurer de l'intégrité des molécules d'ADN mais surtout d'ARN qui sont extrêmement sensibles.

5.2.1. Par électrophorèse en gel d'agarose

Après extraction, la qualité et la taille des ADN et des ARN obtenus ont été vérifiées par électrophorèse en gel d'agarose. Les gels ont été réalisés par dissolution de 1 % d'agarose (m/v) (EuroBio) dans un tampon TBE 1X (acide borique 90 mM, Tris-base 90 mM, EDTA 2,5 mM pH 8,3) en présence de 0.125 µg/ml de bromure d'éthidium (BET), un agent intercalant des acides nucléiques. La migration des différents échantillons, ainsi que d'un marqueur de poids moléculaire (Smart Ladder, échelle de 200 à 10 000 pb, ou Smart Ladder Small Fragment, échelle de 100 à 1000 pb ; Eurogentec), a été réalisée sous une tension de 150 V, pendant 20 minutes. Les gels d'agarose ont ensuite été placés sous UV afin de visualiser par fluorescence les acides nucléiques avec l'ImagerMaster®VDS (PharmaBiotech). Le marqueur de taille a également permis la quantification des acides nucléiques puisque les différentes bandes d'ADN qui le composent correspondent à différentes quantités d'ADN.

5.2.2. Par électrophorèse en micro-capillaire

La qualité des ARN et leur concentration a également été investie par électrophorèse en microcapillaires par l'utilisation conjointe du kit *RNA 6000 Nano LabChips* et d'un bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies). Ce dispositif bio-analytique est basé sur l'utilisation de puces micro-fluidiques, la séparation sous tension des ARN selon la taille dans les canaux remplis de gel et la détection par fluorescence induite par laser (LIF) à une échelle miniaturisée (Figure 33).

L'analyse des ARN totaux des échantillons extraits a été réalisée sur 1 µL d'échantillon avant et après avoir été traité à la DNase afin de vérifier que ce traitement n'avait pas endommagé les ARN. Le protocole décrit par le fournisseur a été suivi.



Figure 33 : Schéma descriptif de la procédure d'analyse de la qualité et de la concentration des échantillons d'ARN extraits par l'utilisation d'une puce (A) RNA 6000 Nano LabChips et d'un bioanalyseur (B) Agilent 2100 (Agilent Technologies), consistant en une analyse d'électrophorèse en micro-capillaire (C).

L'inspection visuelle des profils d'électrophorèse révèle de la dégradation des ARN lors d'une diminution de l'intensité du signal pour les deux bandes ribosomal en conjonction avec l'apparition et l'augmentation du signal de bandes de tailles inférieures. Puis, la qualité d'un échantillon d'ARN (état de dégradation) a pu être renseignée quantitativement par la valeur de son RIN. Ce dernier va de 1 pour un ARN totalement dégradé à 10 pour un ARN non dégradé. Un RIN d'environ 7-8 est très satisfaisant pour des échantillons d'ARN issus de sédiments. La concentration en ARN total a également été déterminée, variant de ~50 à 130 ng/μL suivant les échantillons.

5.2.3. Quantification au marquage fluorescent SYBR Green

La concentration en ADN des échantillons extraits a été déterminée à partir d'1 μL d'échantillon avec le kit *Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit* (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur. La lecture de la fluorescence a été réalisée avec l'appareil Stratagène® Mx 3005P™ QPCR System. La quantification des échantillons a été réalisée à l'aide du logiciel Mx Pro™ –Mx 3005P QPCR Software version 4.01, en utilisant une gamme étalon d'un ADN standard du kit. La concentration en ADN total estimée variait entre ~150 à 270 ng/μL, suivant les échantillons considérés.

5.3. Transcription inverse des ARN

Avant l'utilisation des ARN pour la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc), les échantillons (50 μL) sont traités à la DNase afin d'éliminer d'éventuelles traces d'ADN, selon les recommandations du fournisseur (Turbo DNA-free™, Ambion). L'élimination totale de l'ADN est vérifiée par une amplification PCR (voir § 5.4) sur l'ARN traité avec les amorces ciblant le gène de l'ARNr 16S. L'absence d'amplification atteste de l'efficacité du traitement.

La synthèse d'un brin d'ADN complémentaire à partir d'un brin matrice d'ARN est permise grâce à une transcriptase inverse réalisant la transcription inverse. La réaction (au volume final de 20 μL) a été réalisée sur 10 à 60 ng d'ARN par échantillon à partir d'hexamères aléatoires (200 ng par réaction, Roche) et de la *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase* (M-MLV, Invitrogen by Life Technology) en présence de 40 U de RNase OUT (Invitrogen by Life Technology). Le matériel et les solutions utilisés étaient certifiés sans DNases et RNases ou préalablement traités au DEPC (voir § 5.1). Le protocole décrit par le fournisseur du kit de transcription inverse a été suivi. Les ADNc produits ont été directement utilisés pour une réaction

de PCR de vérification de la transcription inverse (ciblant le gène de l'ARNr 16S, amorces 63F et 1387R ; Table 1), puis conservés à -80°C .

5.4. Réactions de polymérisation en chaîne (PCR), en temps final

La PCR est une méthode permettant d'obtenir rapidement une quantité importante d'un segment précis d'ADN contenu dans une matrice complexe d'ADN génomique ou d'ADN complémentaire. Elle repose sur la synthèse enzymatique d'ADN à partir de deux amorces de polarité opposée encadrant le fragment à amplifier (Saiki *et al.*, 1985; Mullis *et al.*, 1986).

5.4.1. Amplification par PCR

Les réactions de PCR sur les échantillons d'ADN et d'ADNc (dilués au $1/100^{\text{ème}}$ et au $1/10^{\text{ème}}$ respectivement) ont été réalisées dans un volume final de 25 μL contenant 0.2 μM de chacune des deux amorces utilisées (Table 1), 12.5 μL d'AmpliTaq Gold® 360 Master Mix à 2X et de l'eau MilliQ qsp 25 μL .

La réaction d'amplification a été réalisée dans un thermocycleur automatisé (PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJ Research) et commence par une étape de dénaturation de l'ADN de 10 minutes à 95°C , permettant également d'activer l'ADN polymérase utilisée. Un cycle de trois étapes est ensuite répété 35 fois et se compose des étapes suivantes : la dénaturation de l'ADN (45 secondes à 95°C), l'hybridation des amorces (45 secondes à la température d'hybridation définit en prenant en compte le T_m des amorces considérées, Table 1) et l'élongation, au cours de laquelle le brin complémentaire est synthétisé (45 secondes/kb du segment d'ADN à amplifier, à 72°C). Une dernière étape d'élongation de 10 minutes est réalisée. La qualité et la spécificité de l'amplification a ensuite été vérifiée par migration sur gel d'agarose des produits de PCR (voir§ 5.2.1).

Table 1 : Différents couples d'amorces utilisés pour les amplifications par PCR. La séquence en rouge correspond à l'adaptateur illumina rajouté à la séquence de l'amorce pour la réalisation du séquençage MiSeq.

Gènes ciblés	Amorces	Séquence (5'-3')	Températures d'hybridation (°C)	Tailles des amplicons (pb)	Technique	Références
ARNr 16S						
<i>Bacteria</i>	63F	CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC	58	1324	PCR en temps final	Marchesi et al., 1998
	1387R	GGG CGG WGT GTA ACA AGG C				
	338F	CTC CTA CGG GAG GCA GCA GT	60	180	PCR en temps réel	Muyzer et al., 1993
	518R	GTA TTA CCG CGG CTG CTG				
	27Fmod	AGRGTTTGATCMTGGCTCAG	53	511	Pyrosequençage 454	Modifié d'après Ludwig et al., 1993 Modifié d'après Ruff-Roberts et al., 1994
519Rmodbio	GTNTTACNGCGGCKGCTG					
<i>dsrB</i>						
	dsrp2060F	CTTTCCTACACGACGCTCTCCGATCTCA ACATCGTYCAYACCCAGGG	60/54	377	PCR en temps réel/MiSeq	Geets et al., 2006 Wagner et al., 1998
	dsr 4R	GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGTG TAGCAGTTACCGCA				
Insert du vecteur de clonage pCR®-2.1-TOPO®						
	M13F	GTA AAA CGA CGG CCA G	54	1677 (16S) 2132 (dsrAB)	PCR en temps final	TOPO TA Cloning® Kit (Invitrogen)
	M13R	CAG GAA ACA GCT ATG AC				

5.4.2. Purification des produits de PCR

Les produits PCR ont été purifiés à l'aide du kit commercial *GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), selon les recommandations du fournisseur. Cette purification a pour but de séparer les fragments d'ADN amplifiés du milieu réactionnel de la PCR (protéines, sels, dNTPs résiduels) ainsi que de l'excès d'amorces non utilisées. La qualité et la taille des produits de PCR purifiés ont été vérifiées par électrophorèse sur gel (voir § 5.2.1) en suivant les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus.

5.5. Quantification par PCR en temps réel

La PCR quantitative (Q-PCR ou PCR en temps réel) est une méthode qui est maintenant largement utilisée en écologie microbienne afin de quantifier l'abondance et l'expression de marqueurs taxonomiques et fonctionnels dans l'environnement. C'est une méthode rapide, précise et applicable aux échantillons naturels (Smith and Osborn, 2009). Elle est basée sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent (SYBR Green) dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. Le nombre de cycle (Ct), à partir duquel le signal de fluorescence est stable est une valeur proportionnelle au logarithme de la concentration en ADN cible. Pour calibrer la PCR, une gamme étalon d'ADN standard est utilisée. Lorsque la Q-PCR est couplée au préalable à une réaction de transcription inverse, elle peut être utilisée pour quantifier l'expression des gènes (RT-Q-PCR).

5.5.1.1. Standard pour la quantification de l'ADN

$$NNNNNNNNNN = \frac{6.023 \times 10^{NN*} (\text{copies } NNN) \times \text{concentration de standard (g. } \mu NN)}{MM (\text{g. } NNN)}$$

* : *Nombre d'Avogadro.*

Ces solutions ont constituées les solutions mères afin de constituer les gammes étalons pour l'amplification en temps réelle des gènes de l'ARNr 16S bactérien et *dsrB*, allant de 10^7 à 10^3 et de 10^5 à 10^2 copies/ μ L respectivement.

5.5.1.2. Standard pour la quantification de l'ADNc

Pour la génération du standard d'ADNc pour la quantification des transcrits des gènes de l'ARNr 16S et *dsrB*, une amplification PCR a été réalisée sur les plasmides portant les gènes d'intérêt, avec les amorces M13F/M13R (Table 1). Le milieu réactionnel d'un volume final de 50 μ L, contenait 10 ng de plasmides, 2.5 U de Taq'Ozyme (Ozyme), 1 X du tampon de réaction de l'enzyme (Ozyme), 0.2 μ M de chaque amorce, 200 μ M de dNTP, 0.2 mg/mL de BSA et de l'eau MilliQ traitée au DEPC qsp 50 μ L. La réaction d'amplification a été réalisée dans un thermocycleur automatisé (PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJ Research) selon le programme décrit § 5.4.1, mais avec une première étape de dénaturation à 95°C raccourcie à 5 minutes. Les amplifications ont été vérifiées par migration sur gel d'agarose (§5.2.1). Ensuite, une transcription in vitro a été réalisée à partir de 0.1 à 0.2 μ g des fragments du gène de l'ARNr 16S et du gène *dsrAB* amplifiés. Le kit *Megascript*[®] kit de chez Mobio a été utilisé, selon les recommandations du fournisseur. Les solutions d'ARN obtenues ont été nettoyées de toute trace d'ADN par un traitement à la DNAase *TurboDNA-free*TM (Ambion) selon les recommandations du fournisseur. Les ARN ont été purifiés au phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 :24 :1, v : v : v ; Sigma), précipités à l'isopropanol (Sigma-Aldrich) et resuspendus dans 50 μ L d'eau MilliQ traitée au DEPC. Les concentrations en transcrits ont été déterminées à l'aide du kit *Quant-iT*TM *RiboGreen*[®] *RNA Assay Kit* (Invitrogen) (§5.2.3) et exprimées en nombre de copies. Une transcription inverse a été réalisée sur les ARN selon la procédure décrite au §5.3. Ces solutions ont constituées les solutions mères afin de constituer les gammes étalons pour la quantification des transcrits des gènes de l'ARNr 16S bactérien et *dsrB*, allant de 10^8 à 10^5 et de 10^4 à 10^1 copies/ μ L respectivement.

5.5.2. Amplification en temps réel

Les réactions de PCR en temps réel sur les échantillons d'ADN et d'ADNc (dilués au 1/100^{ème} et au 1/10^{ème} pour l'amplification de *dsrB* à partir des échantillons d'ADNc) ont été réalisées dans un volume final de 10 μ L contenant 0.4 μ M de chacune des deux amorces utilisées (338F/518R pour le gène de l'ARNr 16S et dsrp2060F/dsr4R pour le gène *dsrB* ; Table 1), 1 X du mélange réactionnel du kit *LightCycler*[®] 480 *SYBR Green I Master* (Roche Applied Science) et de l'eau du même kit (qsp 10 μ L).

Les amplifications ont été réalisées à l'aide de l'appareil Roch LightCycler 480 Real time PCR system d'après le programme suivant : les échantillons sont dénaturés à 95 °C pendant 5 minutes, puis un cycle de trois étapes a été répété 40 fois et se compose des étapes suivantes : dénaturation pendant 15 secondes à 95 °C, hybridation pendant 15 secondes à 60 °C et élongation pendant 20 secondes à 72 °C. Enfin, les courbes de fusion sont réalisées d'après le programme suivant : 5 secondes à 95 °C puis 1 minute à 64 °C et augmentation de la température à 0.11 °C/s jusqu'à atteindre 97 °C.

5.5.3. Analyse de la PCR en temps réel

La spécificité des amplifications a en premier lieu été vérifiée par l'analyse des courbes de fusion et par électrophorèse en gel d'agarose. Les résultats obtenus par Q-PCR ont été analysés à l'aide du logiciel LightCycler 480 Software. Les concentrations d'ADN et de transcrits exprimées en nombre de copies par μL ont été obtenues par l'analyse en quantification absolue. Les concentrations ont ensuite été rapportées à la quantité de sédiment sec utilisée pour l'extraction de chaque échantillon. Les taux d'expression du gène de l'ARNr 16S et du gène *dsrB* ont été estimés à partir du calcul du rapport du nombre de copies du gène sur le nombre de copies des transcrits.

5.6. Analyses moléculaires de la diversité

Depuis l'introduction des technologies de séquençage de nouvelle génération, une évolution rapide des technologies a pu être observée, motivée par la croissance rapide des applications et des développements dans la caractérisation des communautés microbiennes complexes. La caractérisation de la diversité de communautés microbiennes via le séquençage d'amplicons tels que les gènes de l'ARNr 16S, devient une méthode de choix et dépasse actuellement les méthodes de séquençage traditionnelles (de type Sanger), et potentiellement même les techniques d'empreintes moléculaires. Ces dernières années, l'évolution des techniques de séquençage *de novo* a offert une réduction substantielle des coûts, un nombre de bases séquencées continuellement croissant (technologie MiSeq de Illumina : 35-40 pb en 2008, 2×150 pb en 2011 et 2×300 pb aujourd'hui), un séquençage ultra-rapide et des analyses multiplex de communautés microbiennes.

5.6.1. Analyse de la diversité bactérienne et intérêt pour les micro-organismes sulfato-réducteurs

5.6.1.1. Pyroséquençage et technique du 454 (Roche)

Principe de la technique :

La technique de pyroséquençage a été publiée pour la première fois en 1998 alors que le principe a été décrit en 1985 (Ahmadian *et al.*, 2006). Il s'agit d'une méthode permettant d'analyser la synthèse d'ADN cible en temps réel. On parle de séquençage « SBS » : par synthèse d'ADN (Ronaghi *et al.*, 1998). Le principe de base de la méthode consiste à hybrider une amorce à l'ADN cible (amplifié par PCR), puis à ajouter séquentiellement et dans l'ordre une base à partir de l'extrémité 3' de l'amorce. Chaque base est marquée par un fluorophore différent dont le signal est mesuré par bioluminescence à condition que la base complémentaire de la cible soit incorporée. La séquence est déduite en fonction de l'ordre d'incorporation des nucléotides sur l'ADN complémentaire de la cible néo-synthétisée. Quatre enzymes sont nécessaires pour la réaction : une ADN polymérase, une ATP sulfurylase, une luciférase et une apyrase. Le mélange réactionnel contient, par ailleurs, les substrats de ces différentes enzymes : adénosine phosphosulfate (APS), D-luciférine, l'amorce de séquence (complémentaire de l'ADN cible). Les nucléotides alphathio-dATP (dATP- α S), dCTP, dGTP, dTTP sont ajoutés de manière cyclique un par un, toujours dans le même ordre et successivement. Une caméra CCD mesure le signal de bioluminescence produit (Figure 34). La limitation de cette technique a été pendant longtemps le nombre limité de bases séquencées (en moyenne, 60 bp pour l'automate commercialisé par Biotage et en moyenne 106 pb sur l'automate 454 commercialisé par Roche, voire, dans certains cas, jusqu'à 200 pb (Gharizadeh *et al.*, 2002), dans les début de l'automatisation totale de cette méthode. Cette limitation est liée à l'inhibition progressive de l'apyrase par l'accumulation de déoxymononucléotide phosphate (dNMP) et de son produit intermédiaire le déoxydinucléotide phosphate (dNDP) ou l'élimination incomplète des nucléotides résiduels après lavage (Mashayekhi and Ronaghi, 2007). L'arrivée d'automates, tel que le 454 permettant le séquençage massif parallèle, a permis le développement de cette technique à une échelle bien plus grande (Lamoril *et al.*, 2008).

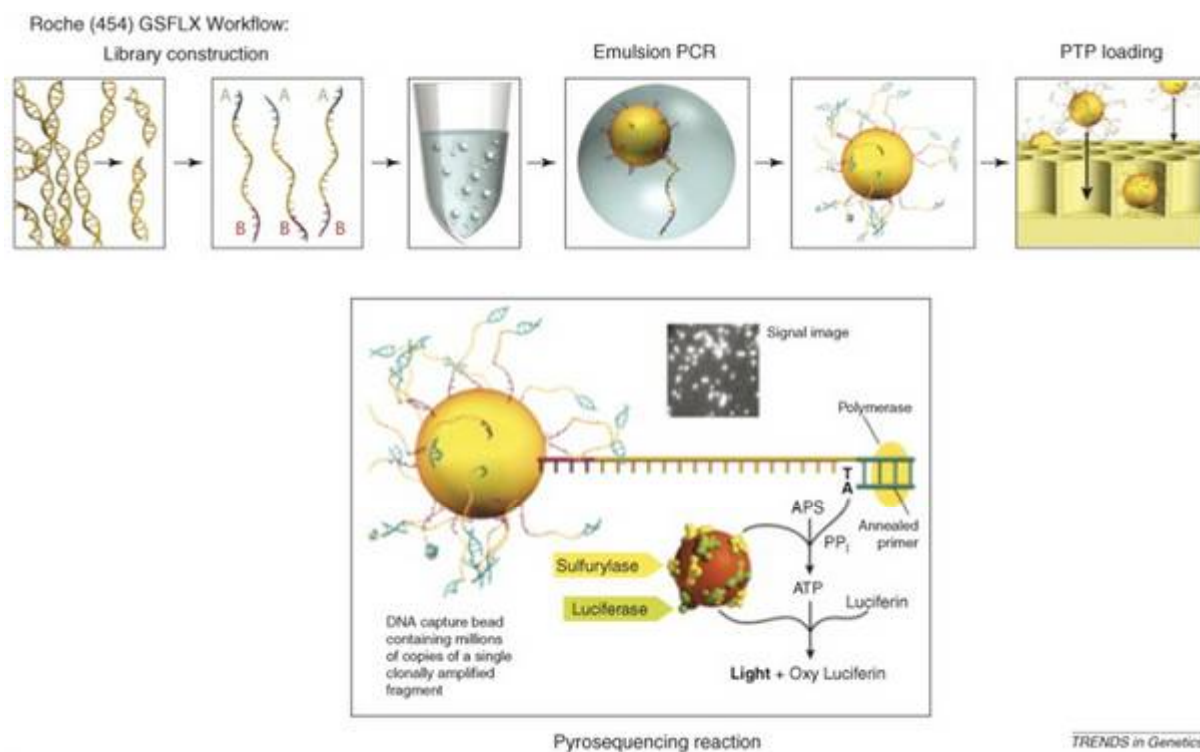


Figure 34 : Schéma descriptif du principe de la technologie Roche 454-Pyroséquençage (Mardis, 2008). Le pyroséquençage est une méthode de séquençage par synthèse qui est basé sur la détection de pyrophosphate (PPi) libéré lors de la synthèse d'ADN en utilisant une cascade de réactions enzymatiques et des modules de détection de lumière visible, tels que photodiodes, des tubes photomultiplicateurs, ou un dispositif à couplage de charge (CCD) caméra.

Procédure expérimentale :

Une analyse de la diversité bactérienne au cours des incubations en bioréacteurs a été entreprise par le séquençage des amplicons du gène de l'ARNr 16S. Les analyses ont été réalisées à partir de l'ADN extrait aux jours 0 (mélange de 3 échantillons d'extraits pour le jour 0), 5.4 (1 échantillon par réacteur en conditions oxiques et anoxiques) et 15 (1 échantillon par réacteur) soit un total de 48 échantillons d'ADN. L'analyse a également été réalisée sur les communautés « métaboliquement actives », à partir de l'ADNc provenant de l'extraction d'ARN aux temps 0 (mélange de 3 échantillons d'extraits pour le jour 0), 5-5.4-7 (1 échantillon par réacteur en conditions oxiques et anoxiques), et 8-10-11-15 (1 échantillon par réacteur) soit un total de 165 échantillons d'ADNc.

Environ 0.4 µg d'ADN et 0.02 µg d'ADNc (par échantillon) ont été envoyés au laboratoire Molecular Research DNA (MR DNA, Texas, USA) pour l'analyse d'amplicons en pyroséquençage 454, réalisée selon la procédure décrite par S.E. Dowd et ses collaborateurs (2008). Les amorces universelles ciblant le gène de l'ARNr 16S bactérien 27Fmod et 519Rmodbio ont été utilisés (Table 1), ciblant les régions variables V1-V3. Une seule étape de PCR a été réalisée avec le milieu réactionnel *HotStarTaq plus Kit Master Mix* (Qiagen, Valencia, CA), dans les conditions suivantes : 94 °C pendant 3 minutes, puis 28 cycles constitués des étapes

suivantes : 30 secondes à 94 °C, puis 40 secondes à 53 °C et 1 minute à 72 °C, et une étape d'élongation finale à 72 °C pendant 5 minutes. Tous les produits d'amplification des différents échantillons ont été mélangés (les séquences spécifiques de chaque échantillon sont identifiables grâce à l'introduction d'un adaptateur spécifique à l'extrémité des fragments d'ADN ou d'ADNc pour chaque échantillon) à des concentrations égales avant de les purifier en utilisant des billes *Agencourt Ampure* (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA). L'appareillage et les réactifs de titane Roche 454 FLX ont été utilisés pour effectuer le séquençage suivant les directives du fabricant. Un total de 1 731 723 séquences brutes a été obtenu.

5.6.1.2. Séquençage MiSeq (Illumina)

Principe de la technique :

Introduit en 2006, le séquençage MiSeq utilisant le Genome Analyzer d'Illumina est également basé sur le concept de séquençage par synthèse tel que le pyroséquençage 454 de Roche. Cette technique de séquençage permet la synthèse de dizaines de millions de fragments d'ADN amplifiés simultanément (Figure 35). Le principe de base de la méthode consiste tout d'abord à amplifier des séquences d'ADN cibles avec des amorces spécifiques contenant des adaptateurs. Les fragments sont alors fixés à la surface d'une cellule d'écoulement de verre, en utilisant une station micro-fluidique Illumina. Chaque cellule d'écoulement est divisée en huit voies séparées, et les surfaces intérieures où se fixent aléatoirement les fragments d'ADN comportent également les oligos complémentaires aux adaptateurs ligés sur les fragments. L'hybridation de l'oligo de l'extrémité libre des fragments d'ADN à un oligo complémentaire de la cellule d'écoulement a lieu par le chauffage actif puis le refroidissement du système (formation d'un pont ; Figure 35). L'ajout d'une polymérase isotherme et de ses réactifs initie l'amplification des fragments dans une zone discrète ou «cluster» sur la surface des cellules d'écoulement, formant des clusters de séquences identiques. La cellule d'écoulement est ensuite placée dans une cassette fluidique dans le séquenceur. Le séquençage par synthèse se déroule par cycles successifs d'incorporation d'un nucléotide à la fois. A chaque cycle, la polymérase et les quatre nucléotides marqués de façon différentielle avec un fluorophore sont ajoutés. L'extrémité 3' OH des nucléotides étant inactivé chimiquement, une seule base est constituée par cycle. Les nucléotides non fixés sont éliminés par lavage. La fluorescence est mesurée (enregistrement d'image) afin d'identifier le nucléotide incorporé dans chaque groupe (« cluster »). Ensuite, une étape chimique enlève le groupement fluorescent et débloque l'extrémité 3' afin de réaliser un nouveau cycle d'incorporation de la base suivante (voir <http://www.youtube.com/watch?v=HMyCqWhwB8E> pour une animation décrivant cette méthode de séquençage).

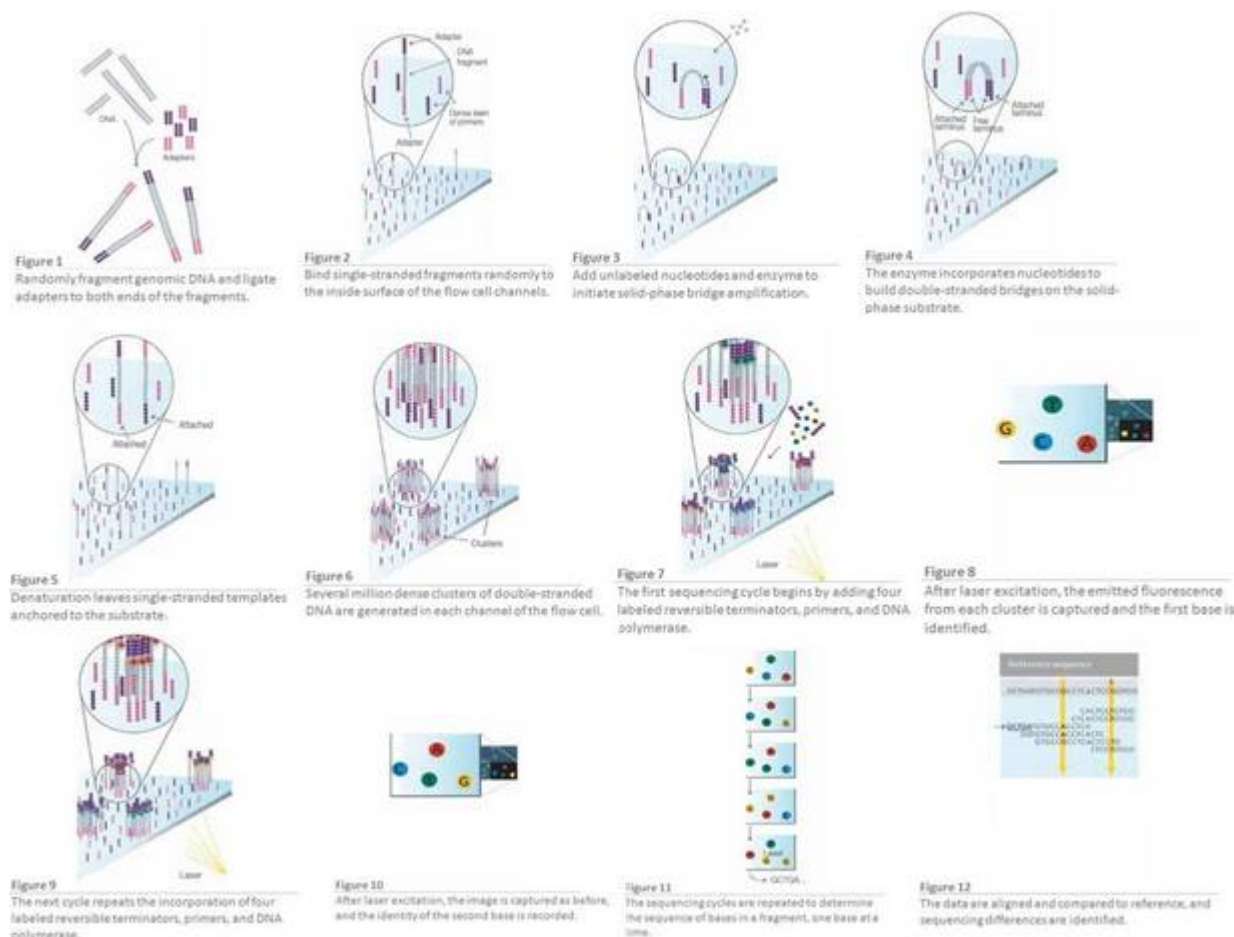


Figure 35 : Schéma descriptif du principe de la technologie Illumina (Illumina®). Le séquençage MiSeq utilise une méthode de séquençage par synthèse qui est basée sur la mesure de fluorescence associée à un nucléotide spécifique incorporé au cours de la synthèse de la séquence d'ADN.

Procédure expérimentale :

La diversité des micro-organismes sulfato-réducteurs a également été investie par le séquençage des amplicons du gène *dsrB*, à partir de l'ADNc des échantillons de l'ARN extrait à 0 (mélange de 3 échantillons d'extraits pour le jour 0), 5.4-7 (1 échantillon par réacteur en conditions oxygènes et anoxiques) et 8-10-11-15 (1 échantillon par réacteur) jours d'incubations en bioréacteurs, soit 147 échantillons d'ADNc.

Les amplicons ont été séquencés en utilisant la technologie MiSeq 250-paired-end (Illumina). La première PCR a été réalisée avec les amorces décrites dans la Table 1, contenant des adaptateurs Illumina, selon les conditions de PCR décrites précédemment (§ 5.4.1). Les multiplexes ont été réalisés en utilisant des index de séquences qui ont été ajoutés aux amorces anti-sens lors de la seconde PCR avec 12 cycles ciblant les séquences des adaptateurs. Les produits de PCR ont été purifiés et chargés dans la cartouche illumina MiSeq selon les instructions du fabricant. Après séquençage, la qualité a été vérifiée en utilisant le logiciel PhiX : chaque séquence a été affiliée à son échantillon en utilisant l'index qui avait été intégré. Le

logiciel MOTHUR a été utilisé afin de définir les contigs des séquences R1 et R2 ; un total de 11 062 400 séquences a été obtenu.

5.6.2. Traitement des données de séquençage haut-débit

5.6.2.1. Traitement des données de 454

Le logiciel en libre accès QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) a été utilisé pour le traitement des données brutes de séquençage des amplicons du gène de l'ARNr 16S bactériens (Caporaso *et al.*, 2010), en suivant l'approche décrite par le tutorial sur le traitement des données de 454. Le nettoyage des données brutes a tout d'abord été effectué (Quince *et al.*, 2009) par le débruitage des données et par l'élimination des séquences de longueur inférieure à 450 pb, contenant des erreurs au niveau des amorces ou des homopolymères. A cette étape environ 3% des séquences ont été éliminées, aboutissant à 1 693 189 séquences restantes. Les séquences ont été alignées sur une longueur de séquence de 400 pb.

La définition des OTU a été effectuée selon la méthode Usearch (Edgar, 2010), en définissant des séquences de référence au seuil de similarité soit de 0,95 soit de 0,97. L'affectation de la taxonomie a été réalisée en comparant les séquences de référence à une base de données de séquences connues des gènes de l'ARNr 16S, the Ribosomal Database Project (RDP) database. Après la définition des OTU, les chimères ont été éliminées ce qui a conduit à l'élimination d'environ 7% des séquences pour obtenir 1 568 794 séquences restantes. Les abondances des OTU ont été normalisées au nombre minimal de séquences observées par échantillon (soit 3102 séquences pour les données ADN et 3104 séquences pour les données ADNc, par échantillon). Cette normalisation a été réalisée avec le paquet vegan (Oksanen *et al.* (2013) ; Version: 2.0-10) sur le logiciel R.

5.6.2.2. Traitement des données de MiSeq

Le logiciel en libre accès MOTHUR, développé par Dr. Patrick Schloss et Sarah Westcott (the National Science Foundation and the Sloan Foundation, depuis 2007 à aujourd'hui ; Department of Microbiology & Immunology at The University of Michigan), a été utilisé, via la plateforme de calcul genotoul, pour le traitement des données brutes de séquençage des amplicons du gène *dsrB*.

L'approche utilisée pour le nettoyage des données brutes du séquençage des amplicons du gène *dsrB* est celle décrite par le tutorial sur le traitement des données générées par une plateforme MiSeq d'Illumina (http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP ; page consultée fin août 2014) rapporté par Kozich *et al.* (2013). Suite à l'élimination des séquences ambiguës, trop

courtes, trop longues, ou contenant des homopolymères, des séquences ne s'alignant pas avec la base de données et des séquences chimériques (méthode Uchime), 9 159 791 séquences restantes ont été obtenues, correspondant à une perte d'environ 17 % des séquences.

Les séquences récupérées ont alors été traduites par l'outil FrameBot de RDP's functional gene and repository, qui les a alignées à une base de données de références récupérées de la base de données de FunGene de RDP pour détecter et corriger les erreurs de décalage du cadre de lecture et éliminer les séquences courtes et/ou présentant un mauvais alignement (Zelege *et al.*, 2013). Cette étape a conduit à l'élimination d'environ 1% des séquences pour aboutir à 9 040 328 séquences nettoyées.

Un sous-échantillonnage des données nettoyées a été réalisé afin de réduire le jeu de données à un nombre égal de séquences par échantillon, correspondant dans le cas présent à 5383 séquences par échantillon. La réalisation du sous-échantillonnage a été effectuée avant la création de la matrice car cette dernière étape demande un grand espace de stockage dont nous ne disposons pas et un temps de traitement trop long (de l'ordre de plusieurs semaines). La définition des OTU à partir des séquences nucléiques a été effectuée selon la méthode *furthest-neighbor* (« le voisin le plus proche ») de mothur, au seuil de similarité de 0,90 (Colin *et al.*, 2013). Un blastx des séquences a été réalisé contre des séquences connues de la base de données de NCBI afin d'associer les séquences du gène *dsrB* obtenues à des séquences de la sous-unité DsrB de la Bisulfite réductase d'organismes sulfato-réducteurs connus.

6. Estimation de l'effet de la condition d'incubation sur les communautés microbiennes

6.1. Analyses de la variance

6.1.1. Modèles linéaires mixtes des effets des paramètres

Les effets des différents paramètres : le traitement (communauté « *Pétrole* », « *Pétrole + hersage* » et « *Pétrole + organismes bioturbateurs* »), la condition d'incubation (conditions oscillantes, d'oxie ou d'anoxie permanentes) et le temps, ainsi que toutes les interactions parmi ces trois facteurs, sur les différentes variables mesurées (les taux d'expression des gènes étudiés, les rapports de biodégradation, les indices de recouvrement, les indices de diversité univariés), ont été testés par deux analyses de variance multifactorielles. Un modèle linéaire mixte a d'abord

été réalisé avec les effets du traitement, de la condition et du temps (et leurs interactions) comme facteurs fixes et un facteur aléatoire permettant de prendre en compte l'effet des mesures répétées au cours du temps, c'est-à-dire le caractère non indépendant des différents prélèvements au sein des bioréacteurs (fonction lme dans R, paquet nlme). Un second modèle linéaire a été réalisé en testant les mêmes paramètres en facteurs fixes mais sans la prise en compte du facteur aléatoire (fonction lm dans R). Pour tester l'effet du facteur aléatoire, une analyse de la variance (anova) n'a montrée aucune différence significative entre ces deux modèles, ainsi le modèle linéaire sans mesure répétée a été choisi. La transformation logarithmique de la variable numérique a parfois été nécessaire afin que les résidus suivent une répartition normale. Des anova et des tests Tukey's HSD (Honest Significant Difference) ont été réalisés suite à la mise en place des modèles linéaires, afin de comparer entre elles les différentes modalités des différents facteurs et de mettre en évidence les différences significatives.

6.1.2. Modèle multivarié de l'effet des paramètres : PerMANOVA

La PerMANOVA (Permutational Multivariate Analysis of Variance) est une analyse multivariée des variances par permutations qui utilise des matrices de distance (test non paramétrique). C'est une alternative robuste au test paramétrique MANOVA et aux méthodes d'ordination pour décrire comment les variations observées peuvent être attribuées aux différents paramètres, dans notre cas : le traitement, la condition et le temps (Legendre and Anderson, 1999). La méthode, basée sur le principe des tests de permutations, calcule la probabilité d'obtenir une valeur égale ou supérieure à la valeur observée d'un test statistique sous une hypothèse nulle donnée en recalculant la statistique du test après réarrangement (permutations) des observations (Anderson, 2001). Le test statistique utilisé est essentiellement un F-ratio, calculé comme le ratio de la somme du carré des distances intergroupes divisée par la somme des carrés des distances intra-groupes (Anderson, 2005). Cette analyse a été réalisé avec l'outil PERMANOVA+ version 1.0.6 (Anderson *et al.*, 2008) du logiciel Primer 6 version 6.1.16, permettant de définir en facteurs fixe le traitement, la condition et le temps, et en facteur aléatoire le facteur bioréacteur.

6.2. Test de corrélation de deux variables : Pearson

Afin de savoir s'il existe une relation entre deux variables, dans notre cas le taux d'expression du gène de l'ARNr16S et le rapport de la concentration en phénanthrène sur la concentration en diméthylphénanthrène, un diagramme de corrélation a été établi, c'est à dire un diagramme croisant les modalités des variables à corrélérer. Afin de corrélérer une efficacité de

dégradation du phénanthrène par rapport à l'activité bactérienne, la valeur de la différence du rapport de dégradation à l'instant t par rapport à l'instant $t-1$ a été représenté en fonction du taux d'expression du gène de l'ARNr 16S. L'ensemble des points ayant pu s'ajuster à une droite de valeur de pente positive a mis en évidence une relation positive entre la biodégradation du phénanthrène et l'activité bactérienne confirmée par le test de Pearson (commande `cor.test` sur R, paquet `stats`).

6.3. Indices pour la quantification de la biodiversité

La quantification de la biodiversité d'une communauté en écologie se fait généralement en construisant un nombre, appelé indice de biodiversité, qui augmente avec celle-ci. La valeur de ce nombre peut ne pas avoir de sens en soit mais la comparaison de ce nombre entre différentes communautés doit nous permettre de savoir laquelle abrite la plus grande diversité.

6.3.1. Estimation de l'indice de recouvrement (C, coverage value)

Afin d'estimer si l'approche technique mise en place utilise une profondeur d'analyse suffisante pour couvrir la diversité de la communauté étudiée, l'indice de recouvrement a été estimé pour chaque échantillon analysé en pyroséquençage 454 et en MiSeq. Cet indice fait l'estimation de la probabilité que la prochaine lecture corresponde à un OTU ayant déjà été identifié. Il a été calculé à l'aide du logiciel `mothur` (commande `summary.single`), indice *coverage*, qui s'appuie sur l'équation définie par Good (1953) :

$$N = \frac{N_N}{N} \quad \text{avec } N_N \text{ le nombre d'OTU représentés une seule fois dans un échantillon de } N \text{ séquences.}$$

Ainsi, plus l'indice est proche de 1, plus la banque de séquences identifiées pour un échantillon est représentatif de la diversité de cet échantillon.

6.3.2. Estimation de la diversité

Les indices de diversité permettent d'avoir rapidement, en un seul chiffre, une évaluation de la biodiversité de la communauté. Il en existe de plusieurs types et leur utilisation multiple est en général recommandée pour une bonne interprétation. Les indices utilisés dans cette étude sont la richesse spécifique, les indices de Shannon et de Bray-Curtis.

6.3.2.1. Diversité spécifique ou richesse spécifique

La richesse spécifique (S) est l'indice de biodiversité le plus simple, il rend compte du nombre d'OTU identifiés au sein d'un échantillon, ne prenant pas en compte l'abondance spécifique des différents OTU. Par conséquent cet indice est très dépendant du pouvoir résolutif des techniques employées. Il a été calculé à l'aide du logiciel *mothur* (commande *summary.single*), indice *sobs* (richesse observée).

6.3.2.2. Diversité α

L'indice de *Shannon* (H') est l'indice de diversité alpha communément utilisé pour caractériser la diversité des taxons d'une communauté microbienne. Il prend en compte l'abondance et la répartition homogène entre les taxons présents et se calcule d'après la formule suivante :

$$H' = - \sum N(i) \ln N(i) \quad \text{où } i \text{ varie entre 1 et } S \text{ (richesse spécifique) et } p(i) = \text{la proportion de séquences appartenant au } i^{\text{ème}} \text{ OTU, estimée par } n(i)/N \text{ avec } n(i) \text{ le nombre de séquences du } i^{\text{ème}} \text{ OTU et } N \text{ le nombre de total de séquences de l'échantillon.}$$

La valeur de H' vaut 0 si une seule espèce est présente et prend la valeur maximale $\ln(S)$ lorsque S espèces sont présentes et qu'elles sont équitablement réparties : $p(i) = 1/S$. Il a été calculé à l'aide du logiciel *mothur* (commande *summary.single*), indice *shannon*.

6.3.2.3. Diversité β .

Les indices de diversité décrits précédemment, étant des descripteurs univariés des communautés, ne suffisent pas à décrire des modifications de profils de diversité complexes. En effet, tous ces indices présentent la même faiblesse de ne pas prendre en compte l'identité des organismes dans une communauté. Ainsi, il a déjà pu être observé d'importantes modifications de la structure des communautés par des analyses multivariées de la diversité alors que les indices de diversité ne montraient aucune différence (Hartmann and Widmer, 2006).

L'indice de Bray-Curtis a été utilisé lors des calculs des matrices de distance pour les analyses multivariées. C'est une méthode robuste et fiable couramment appliquée pour exprimer des relations en matière d'écologie du fait notamment que la valeur de l'indice n'est pas affecté par des ajouts ou suppressions d'OTU qui ne sont pas présents dans les deux échantillons comparés ni par l'ajout d'un nouvel échantillon. Elle tient compte de l'abondance des différentes espèces et est calculé comme suit :

$$N_{ij} = 100 M - \frac{\sum_{j=1}^N y_{ij}}{\sum_{j=1}^N (N_{ij})} N$$

Où y_{ij} représente l'abondance de l'espèce i (T-RF) dans l'échantillon j .
De la même manière y_{ik} représente l'abondance de cette même espèce dans l'échantillon k .

Des échantillons identiques aurons une similarité de 100% alors que des échantillons radicalement différents, 0%.

6.4. Analyse Multidimensionnelle non-métrique (NMDS)

Pour les raisons décrites précédemment, en plus de la comparaison des descripteurs univariés des communautés, tels que la diversité, la description de la façon dont les espèces constitutives varient d'une communauté à l'autre constitue une information cruciale pour la compréhension de la réponse écologique des communautés aux conditions environnantes.

Un outil communément utilisé à ces fins est l'analyse multidimensionnelle non-métrique, ou NMDS. La NMDS permet, à partir d'une matrice symétrique contenant des rangs de distances entre objets (dissimilarités), d'obtenir une représentation de ces objets dans un espace réduit à n dimensions, généralement deux ou trois, de sorte qu'ils puissent être visualisés et interprétés. Son objectif principal est de représenter, de façon aussi fidèle que possible, les relations entre des objets situés dans un espace à n dimensions et la proximité entre les objets reflétant leur similarité. Les distances utilisées sont celles de Bray-Curtis. Contrairement à d'autres techniques de coordination qui reposent sur des distances euclidiennes, telles que l'Analyse en Composante Principale (ACP), la NMDS utilise les ordres de rang, et ainsi est une technique extrêmement flexible qui peut accueillir une variété de différents types de données.

Un coefficient de "stress" (Stress de Kruskal) est généré. Il indique le degré de contrainte imposé lors de la réduction dimensionnelle et permet de savoir si la représentation est fidèle ou non. Une valeur de stress inférieure à 0,1 décrit une représentation excellente ; un stress entre 0.1 et 0.25, une représentation satisfaisante ; entre 0.25 et 0.5, probablement aléatoire ; et supérieure à 0.5, une représentation de qualité médiocre.

La NMDS n'est pas une projection au sens classique, mais une recherche de placement optimal sous contrainte de dimension et est considérée comme une technique robuste. Les logiciels Primer 6 version 6.1.16 et R (fonction *metaMDS*, paquet « *vegan* ») ont été utilisés.

6.5. Analyse de « co-occurrence » : utilisation d'un modèle probabiliste

Une question fondamentale en écologie microbienne est de savoir si les communautés sont des assemblages aléatoires ou, à défaut, s'il y a des règles qui déterminent les combinaisons de taxons qui peuvent être présents simultanément. Pour les systèmes microbiens, en particulier, la question de savoir si les groupes taxonomiques présentent des différences dans l'organisation de la communauté reste en suspens mais elle est essentielle pour notre compréhension de la structure et de la fonction de la communauté.

Historiquement, l'analyse de présence simultanée des espèces nécessite l'utilisation de données générées aléatoirement. Une matrice exprimée en présence-absence des taxons observés est comparée avec des matrices aléatoires pour déterminer si la matrice observée a une structure, soit un excès ou un déficit d'espèces positivement ou négativement associés les unes aux autres. Les algorithmes informatiques utilisés pour générer matrices aléatoires peuvent parfois produire des erreurs de type I et de type II (lorsque l'algorithme de génération aléatoire de données produit un ensemble biaisé de toutes les matrices possibles ; voir Veech (2013)) en raison du processus de génération aléatoire de données lui-même. Le modèle probabiliste a alors été mis au point. Ne dépendant pas d'une matrice de données générée aléatoirement, il a un taux d'erreur très faible de type I et correspond à un modèle puissant du fait d'un faible taux d'erreur de type II. Le modèle probabiliste de Veech (2013) a été utilisé avec le logiciel R (fonction *cooccur*, paquet « cooccur ») afin de tester la significativité statistique des profils de répartitions par paires des espèces. Le modèle donne la probabilité que deux espèces soient présentes simultanément à une fréquence inférieure (ou supérieure) à la fréquence observée si les deux espèces avaient été distribuées, indépendamment l'une de l'autre parmi un ensemble de sites. Le modèle permet de classer les associations d'espèces comme négatives (la présence d'une espèce exclue la présence de l'autre), positives (les deux espèces sont généralement présentes simultanément) ou aléatoires (la présence d'une espèce ne garantit pas la présence ou l'absence de l'autre).

Chapitre III :

***Effet structurant de différentes conditions
d'oxygénation sur une communauté microbienne
hydrocarbonoclaste de sédiments intertidaux***

Chapitre III : Effet structurant de différentes conditions d'oxygénation sur une communauté microbienne hydrocarbonoclaste de sédiments intertidaux

1. Introduction

L'étude du comportement des communautés bactériennes naturelles soumises à des conditions oscillantes anoxie/oxygène constitue un intérêt pour mieux comprendre l'influence des paramètres physico-chimiques sur les communautés microbiennes et sur des processus écologiques majeurs dans le fonctionnement des écosystèmes. En effet, les oscillations anoxie/oxygène sont largement répandues dans les environnements marins. On les trouve au niveau des interfaces eau/sédiments susceptibles d'être perturbées par les courants d'eau, les marées ou encore les activités de bioturbation (Kristensen, 2000).

Ces différents processus et activités génèrent une importante hétérogénéité au niveau de la colonne sédimentaire qui constitue un milieu fonctionnel particulier. Les oscillations anoxie/oxygène qui y règnent, impactent le devenir de la matière organique (Wakeham and Canuel, 2006), des polluants et des communautés bactériennes. Ainsi, la prise en compte de ces oscillations est primordiale pour la compréhension du devenir des polluants dans de tels environnements naturels. Cependant, peu d'attention a été portée à ces facteurs environnementaux et leur rôle sur l'assemblage des communautés dans l'élimination de polluants dans les environnements côtiers. Seules les études précédemment réalisées par I. Vitte et ses collaborateurs (2011, 2013) ont décrit les communautés bactériennes d'une boue chroniquement contaminée, impliquées dans la dégradation des hydrocarbures en conditions d'oscillations contrôlées : anoxie/oxygène. L'oxygène a été montré comme étant un facteur important à l'origine d'une modification de la structure des communautés bactériennes (basée sur l'analyse des gènes et transcrits de l'ARNr 16S en T-RFLP). Suite à cette modification, la dynamique des communautés a montré une succession bactérienne corrélée à l'évolution des taux de dégradation des HAP aboutissant à des capacités de dégradations similaires en condition oscillantes et d'oxygène permanente. Ces études antérieures ont apporté des résultats prometteurs qui ont mérité d'être approfondis par la réalisation de triplicatas expérimentaux et par la caractérisation plus approfondie de communautés microbiennes d'environnements côtiers soumis à l'action des courants, des marées et des macro-organismes bioturbateurs.

Dans ce contexte, l'objectif de l'étude est de suivre la dynamique et la composition de la communauté bactérienne de sédiments intertidaux pollués, par sa caractérisation à l'aide d'outil de séquençage haut débit (454-pyrosequencing). La caractérisation des réponses écologiques de la communauté bactérienne aux conditions oscillantes anoxie/oxie a été comparée avec des conditions d'oxie ou d'anoxie permanentes. L'évaluation de l'assemblage bactérien au sein de ces communautés fournira une meilleure compréhension des facteurs qui influent sur leur dynamique et leur rôle dans la dégradation des hydrocarbures.

2. Effet structurant de différentes conditions d'oxygénation sur une communauté microbienne hydrocarbonoclaste de sédiments intertidaux

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article en préparation, pour soumission sous le titre :

Structuring effect of different oxygenation conditions on hydrocarbonoclastic microbial community

Abstract

Anoxic/oxic oscillations due to tidal cycles and macrofauna activity constitute a major parameter governing the organization of microbial communities inhabiting coastal sediments. Therefore, it is crucial to take into account these environmental conditions in order to understand the role of microorganisms in determining the fate of hydrocarbon compounds in these particular ecosystems. In order to characterize the effect of anoxic/oxic oscillating conditions, a hydrocarbonoclastic microbial community from intertidal sediments was exposed to these conditions (15 days of incubation in anoxic conditions with two aerated periods of one-day on days 7 and 10) and crude oil in a bioreactor experiment. Ecological responses were followed and compared with either permanent oxic and anoxic conditions.

In-depth characterization of the bacterial communities by high-throughput 16S rRNA gene and transcripts sequencing gave the opportunity to describe the microbial structure and composition and allow a better understanding of bacterial organization under the different conditions of oxygenation. The oxygen appeared as the main factor influencing the bacterial communities resulting on the global and the metabolically active bacterial communities' structuration according to the oxygenation conditions. However, the three conditions shared approximately 32% of OTUs (corresponding on more than 70% of total sequences per conditions) showing the potential of many microbes to tolerate the different oxygenation conditions. Interestingly, some of them are more abundant in oscillating conditions following the periods of aeration than in permanent anoxic or oxic conditions. These observations pointed out that some microorganisms were adapted and/or were able to respond to dynamic environmental conditions and this probably plays a role in hydrocarbons degradation. Microbial communities under oscillating conditions and permanent oxic conditions were able to degrade alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons but in a different manner.

Keywords: coastal ecosystems, anoxic/oxic oscillations, high-throughput 16S sequencing, hydrocarbons degradation capacities.

2.1. Introduction

Coastal environments, in particular intertidal ecosystems are of special relevance due to their remarkable heterogeneity, housing abundant and diverse microbial communities that drive many ecosystems processes. Over time and space, microbial identities and relative abundances varies in these ecosystems (Fuhrman *et al.*, 2006; Martiny *et al.*, 2006; Gilbert *et al.*, 2012; Hanson *et al.*, 2012), and also in response to biotic (Bertics and Ziebis, 2009) and abiotic perturbations (Allison and Martiny, 2008). Indeed, tidal cycles and the macrofauna organisms activities consisting in foraging, burrowing and ventilation, modify daily the environmental conditions, owing to variations of the oxygen diffusion which generate oscillations between anoxic and oxic states (Aller, 1994; Brune *et al.*, 2000). Consequently, spatially and temporally oxidized microhabitats are often formed next to reduced sediments zones, facilitating the coupling of redox reactions (Bertics and Ziebis, 2009). These conditions, constitute a major parameter governing the organization of microbial communities and their role in the mineralization of organic compounds in coastal sediments (Kogure and Wada, 2005). The way in which such environmental conditions affects the microbial communities and their implication in the ecosystem functioning remains nowadays a major question for microbial ecologists (Reed and Martiny, 2013).

Actually, the coastal and shelf areas present the highest threat scores due to an interface localization, receiving pollutions from the sea and from the land, and their intensive exploitation (Halpern *et al.*, 2008; Nogales *et al.*, 2011). Among the wide variety of pollutants threatening these areas, crude oil derived-compounds constitute the most typical. The damaging effects of hydrocarbons on the environment and human health coupled with new societal pressures make it an urgent priority to understand the processes determining their fate. Many studies have highlighted the key role of microorganisms in the hydrocarbon degradation (Head *et al.*, 2006; Prince *et al.*, 2010; Kimes *et al.*, 2013) and the processes involved have been widely described (Timmis *et al.*, 2010; McGenity, 2014). However, most of these studies restrained themselves to biodegradation capacities under oxic or anoxic conditions (Perez-Pantoja *et al.*, 2010; Widdel *et al.*, 2010), or were interested on the influence of the burrowing macroorganisms on the fate of hydrocarbons (Gilbert *et al.*, 1996; Grossi *et al.*, 2002), without consider directly the effects of oscillating conditions on microbial communities and their activities. Currently, just few studies have described the hydrocarbons degradation capacities in anoxic/oxic oscillating conditions. Most of them were only interested in the degradation efficiency (Löser *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2009) and provided little attention on microbial communities' responses (Vitte *et al.*, 2011; Vitte

et al., 2013). Consequently, knowledge of how anoxic/oxic oscillations may affect the microbial communities and in turn hydrocarbon degradation is scarce.

In this study, an experimental approach in bioreactors was set up in order to insure to test the ecological responses, in controlled experiments, of the microbial community to anoxic/oxic oscillating conditions, excluding environmental complexity (Cravo-Laureau and Duran, 2014). An hydrocarbon-degrading microbial community from intertidal sediments was submitted to anoxic/oxic oscillating conditions or to permanent oxic or anoxic conditions. The comparative characterization of the bacterial assemblage under these conditions of incubations will provide a better understanding of factors that affect its dynamics and role in the degradation of hydrocarbons in environments subjected to oscillating conditions.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Polluted coastal sediments sample

Intertidal sediments were collected at the tidal basin Aber-Benoît, (Tréglonou, France, 48° 33'12.40''N; 4° 32'8.69''W). A hydrocarbon-degrading microbial community was obtained exposing sediments to oil (24 ± 4 mg/g of Oural petroleum during nine months in mesocosms recreating tidal cycles (Stauffert *et al.*, 2013). When the biodegradation capacity was observed by quantification of the hydrocarbons content, 2400 cm³ of surface sediments (up to six centimeters depth) were collected. Until the beginning of the experiment, sediments were maintained in natural seawater in the dark at 6 °C, bubbling surface water with filtered air (PTFE filters of 0.20 µm pores size, Fisher Scientific).

2.2.2. Slurry preparation

Slurry was obtained by homogenization of 20 % (w/v) sediments with natural filtered sea water (MFTM filter of 0.45 µm pores size, Millipore), containing 0.2 g/L NH₄Cl, 24 mM NaHCO₃, 3.2 mM potassium phosphate buffer (Sambrook and Russell, 2001) and 1 mL/L V7 vitamin (Pfennig *et al.*, 1981), at pH 7.2.

2.2.3. Bioreactors systems and experiment set up

The slurry (1.8 L) was distributed in nine bioreactors (with a working volume of two liters) to apply the three following conditions in triplicate: anoxic/oxic oscillating conditions, permanent oxic and permanent anoxic conditions. The incubations were carried out during fifteen days in batch conditions, with stirring (250 r.p.m., Stuart SS20), at dark and at room temperature (ranging from 17 to 24 °C, InPro6800 sensors, Mettler Toledo International Inc.).

Bioreactors were maintained during five days, under oxic or anoxic conditions (for the permanent anoxic and the oscillating conditions) for a microbial community stabilization period, before addition of crude oil and starting anoxic/oxic oscillations for the oscillating conditions. At the day 5, Oural petroleum was added with a concentration of 21.2 ± 5.7 mg/g of dry weight sediments. This crude oil used is a mix of light oil with less light oil from Russian regions which contains 59.9% of saturated and 24.8% of aromatic hydrocarbons, 10.2% of resins and 5.1% of asphaltenes. Anoxic/oxic oscillations consisted in an alternation between anoxic periods and periods of aeration of one-day duration which occurred on days 7 and 10. Aeration periods were produce by injection of filtered air (Acro® 37 TF Vent Device with 0.2 µm PTFE Membrane, Life Sciences) using air pumps (flow rate of 70 L/h, Rena air 50) into the gas and aqueous phases, generating bubbling of the last one. Permanent oxic conditions were produced in the same way. Periods of anoxic conditions were achieved by stopping aeration, sealingly closing the system and creating a slight overpressure with nitrogen gas. The process was the same to achieve the permanent anoxic conditions.

During experiment, physical-chemical parameters were followed (two measures per day, M300 ISM multipar transmitters, Mettler Toledo International Inc.): dissolved oxygen, temperature (InPro6800 sensors, Mettler Toledo International Inc.), pH and redox potential (InPro 4260i/SG/225 sensors, Mettler Toledo International Inc.).

2.2.4. Sample collection

Samples were collected with a sterile syringe (TERUMO Corporation), connected to bioreactors by a Norprene tube, for chemical and biological analyses. Samplings at intermediate times were done before a switchover. The sampling system was purged before each sampling.

For chemical analysis, 10 mL samples were collected from each reactor along the incubation at 5.4 (10 hours after oil addition), 7, 8, 10, 11 and 15 days of incubation. Samples were stored in amber glass bottles with polytetrafluoroethylene stopper (WHEATON) at -20°C.

For biomolecular analyses 1.5 mL of slurry were collected and immediately mixed with 190 μ L of rRNA stabilizing solution, to preserve rRNA transcripts integrity. The rRNA stabilizing solution was made by mixing 5 mL of phenol with 5 mL of 1 M acetate buffer pH 5.5 (adjusted with acetic acid). The two phases were separated by centrifugation at 4000 g during 3 minutes. The phenolic phase was then added to 95 mL of pure ethanol. Samples with rRNA stabilizing solution were homogenized and centrifuged at 10,000 g for 5 minutes at 4 °C (Jouan MR 1812). The supernatant was then removed and Eppendorfs containing pellets were introduced immediately in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Samples were collected from each reactor at days 0, 5 (before oil addition), 5.4 (10 hours after oil addition), 7, 8, 10, 11 and 15.

2.2.5. Hydrocarbon analysis

For chemical analyses, slurry samples were first filtered in glass microfiber filters (grade GF/F, 0.7 μ m pore size, Whatman) to extract separately petroleum compounds from sediments samples and PAHs in aqueous samples using adapted methods for each matrix.

For sediments analyses, the dry weight of sediments was estimated for each sample. Glass filters were dried at room temperature during 24 hours, under a fume hood. The dry sediments were then spiked with internal standards: 100 μ L of a solution of perdeuterated eicosane (*n*-C₂₀d₄₂) at 1000 μ g/mL, and 100 μ L of a solution containing five perdeuterated PAHs (210 μ g/ μ L of d8-naphtalene, 110 μ g/ μ L of d10-biphenyl, 210 μ g/ μ L of d10-phenanthrene, 40 μ g/L of d12-chrysene and 40 μ g/ μ L of d12-benzo(a)pyrene; Sigmaaldrich, USA). The extractions of hydrocarbons were performed using Dionex™ ASE™ 350 Accelerated Solvent Extractor system (Thermo Scientific™). This automated sequential solvent extraction system realized two cycles of five minutes of extraction per sample, with dichloromethane solvent at elevated temperature (100 °C) and pressure (1600 Psi). In order to avoid aqueous traces in organic extracts, they were been gone through sodium sulphate anhydrous (activated during 4 hours at 400 °C). Then, they were concentrated to 2 mL using a Syncore (Büchi, Germany) and stored in gas chromatography vials.

The extracts samples were analysed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The GC was an HP 6890N (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) equipped with a split/splitless injector (Splitless time: 1 min, flow 50 mL/min). The injector temperature was maintained at 300 °C. The interface temperature was 300°C. The GC temperature gradient was: from 50 °C (1 min) to 300 °C (20 min) at 5 °C/min. The carrier gas was Helium at a constant flow of 1 ml/min. The capillary column used was a HP-5 MS (HP, Palo

Alto, USA): 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 μ m film thickness. The GC was coupled to an HP 5973 Mass Selective Detector (MSD) (Electronic Impact: 70 eV, voltage: 1200 V). *n*-alkanes and PAH semi-quantifications were performed using Single Ion Monitoring mode with the most representative fragment (saturates) or the molecular ion (PAH) of each compound at a minimum of 1.4 cycles/s.

For aqueous samples analyses, the five perdeuterated PAHs used as internal standards were dissolved in methanol to spike them in samples at the final concentration of 100 ng/L. The extraction of PAHs was performed by the Stir Bar Sorptive Extraction protocol. This method of extraction consists in sorption of PAHs from the sample on a magnetic stirring bar coated with a polymer (PolyDimethylSiloxane, PDMS; also called TWISTER, GERSTEL, Germany) by stirring the sample at 900 rpm with the bar during 2 hours, in the dark. Then, the bar were recovered and analysed by SBSE-GC/MS. The PAHs thermic desorption from the PDMS phase was performed into the Thermal Desorption Unit (TDU) by heating the bar at 50 °C during 30 seconds and increasing to 300 °C at 115 °C per minute and maintaining this temperature during 6 minutes. The released PAHs molecules were concentrated in the Cooled Injection System (CIS) maintained at -50 °C by liquid nitrogen. Molecules were injected into the GC/MS system by a quickly increase of the temperature to 300 °C at 12 °C/s for 10 min then to 310 °C at 0.5 °C/s for 1 min. The GC/MS system and program used to analyse the PAHs content were the same than those used for sediments analysis.

The chromatograms obtained by GC/MS were interpreted using the Chemstation software. The total petroleum hydrocarbons and the target molecules of *n*-alkanes and PAHs were quantified relatively to the perdeuterated eicosane and PAHs (internal standards) using calibration curves of OURAL crude oil (from 0.05 to 5 mg/mL), of *n*-alkanes (TRPH Standard from 0.5 to 50 μ g/mL, Ultra Scientific, Florida) and of PAHs (CUS-9306 from 0.25 to 25 μ g/mL, LGS Standards, France), respectively. Alkanes and PAHs biodegradation indexes were then calculated.

2.2.6. Total DNA and RNA co-extraction

Genomic deoxyribonucleic acids (DNAs) and genomic ribonucleic acid (RNAs) were co-extracted using the commercial RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit (MoBio Laboratories). Extractions were performed according to the manufacturer's instructions until the step of total nucleic acids suspension in 100 μ L of SR5 buffer (supplied in the kit) after precipitation with ethanol 70 %. The separation and purification of DNAs and RNAs were

performed with the commercial Allprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) following the manufacturer's recommendations. Genomic RNAs and DNAs were separately eluted in 100 μ L of free DNase/RNase sterilized MilliQ water. RNA extracts were treated with Turbo DNA free kit (Ambion, Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions to ensure total elimination of DNA. DNA total elimination from RNA extracts was checked by negative 16S rRNA PCR amplification on the extracts. The quality and the size of DNAs and RNAs obtained were verified by electrophoresis on 1 % agarose gel. RNAs quality and concentration was also invested by micro-capillary electrophoresis using RNA 6000 Nano LabChips kit and an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). RNA Integrity Numbers (RIN) between 7 and 8.5 were obtained for the RNAs extracts corresponding in good quality of RNAs. The DNAs and RNAs extracts were aliquoted and stored at -80 °C.

2.2.7. Reverse transcription of rRNA

The synthesis of a complementary DNA strand (cDNA) from an RNA template strand was performed by reverse transcriptase. Equipment and solutions used were certified RNase and DNase free or previously treated with DEPC. The reaction (final volume of 20 μ L) was carried out from 10 to 60 ng of RNA per sample adding 40 U of RNase OUT (Invitrogen by Life Technology), 0.5 mM of dNTPs, 10 ng/ μ L of random hexamers (Roche), 0.01 M DTT, 1 X enzyme buffer and 200 U of the Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV, Invitrogen by Life Technology), following suppliers' advices. The cDNA products were then used directly in a PCR reaction or stored at - 80 °C.

2.2.8. Quantitative-PCR amplification of DNA and cDNA

DNA and cDNA were amplified using primers 338F (5'-CTCCTAC GGGAGGCAGCAGT-5') and 518R (5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3') targeting bacterial 16S rRNA (Muyzer et al, 1993). LightCycler® 480 SYBER GREEN I Master was used to set up 10 μ L reactions containing 5 μ L of 2 X MasterMix, 0.4 μ M of each primer, 2.5 μ L of 1/100th diluted DNA or cDNA extracts and water qsp final volume (water furnished in the kit). Quantitative Polymerase chain reaction (Q-PCR) was performed with the Roch LightCycler 480 Real Time PCR system. The cycling program was as follows: 95 °C for 5 minutes followed by 40 cycles with denaturation step at 95 °C for 15 seconds, hybridization step at 60 °C for 15 seconds and elongation step at 72 °C for 20 seconds. At the end of the program, an increase of the temperature from 64 °C to 97 °C provided the melting curves, informing on the amplification

quality. The LightCycler 480 Software was used to analyze the fluorescence measurements. 16S rRNA copies number per μL from DNA or cDNA amplifications were quantified relatively to calibration curves (from 10^7 to 10^4 copies or from 10^8 to 10^5 copies, respectively).

2.2.9. DNA and cDNA 16S rRNA gene sequencing

High-throughput sequencing analyses, targeting bacterial 16S rRNA, were performed from DNA at days 0 (mix from 3 extract samples for day 0), 5.4 (under oxic and anoxic conditions) and 15, and from cDNA at days 0 (mix from 3 extract samples for day 0), 5, 5.4, 7 (under oxic and anoxic conditions), and 8, 10, 11, 15. Approximately 0.4 μg of DNA and 0.1 μg of cDNA (per core sample) were sent to Molecular Research DNA laboratory (MR DNA, Texas, USA). Amplicon 454-pyrosequencing was performed following process originally described by Dowd *et al.* (2008). The 16S universal bacterial primers 27Fmod (5'-AGRGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 519Rmodbio (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3') were used, targeting V1-V3 variable regions. A single-step PCR using HotStarTaq Plus Master Mix Kit (Qiagen, Valencia, CA) were used under the following conditions: 94 °C for 3 minutes, followed by 28 cycles of 94 °C for 30 seconds, 53 °C for 40 seconds and 72 °C for 1 minute, after which a final elongation step at 72 °C for 5 minutes was performed. All amplicon products from different samples were mixed in equal concentrations before to purify them using Agencourt Ampure beads (Agencourt Bioscience Corporation, MA, USA). Roche 454 FLX titanium instruments and reagents were used to perform the sequencing following manufacturer's guidelines.

2.2.10. Sequence read analysis

The open source software QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) was used for sequence read analysis of the bacterial 16S rRNA gene sequences (Caporaso *et al.*, 2010). From the raw sequencing output, data cleaning was initially performed (Quince *et al.*, 2009) by denoising of the data and by eliminating chimera and sequences with length under 450 bp, with mistakes in primers sequences or with homopolymers. Sequences reads were aligned on a sequence length of 400 bp. The data OTU picking was carried out according to the Usearch method (Edgar, 2010) defining reference sequences at the similarity threshold of 0.97. The taxonomy assignment was performed comparing reference sequences to a reference database of known 16S rRNA genes, the Ribosomal Database Project (RDP) database. Results of the number of times an OTU is found in each sample were tabulates and the taxonomic predictions were

added for each OTU. The OTUs abundances for each sample were rarefied to the same number corresponding to the minimum read number observed between samples. This normalization of the OTUs abundances data per sample was performed with the package *vegan* (*Oksanen et al., 2013 ; Version: 2.0-10*) on R software.

2.2.11. Statistical analysis

The effects of the incubation conditions (oscillating, permanent oxic or permanent anoxic conditions), time and interactions among these factors, on the variability of the measured variables: expression rates of the studied genes, biodegradation ratios, the coverage values and univariate diversity indexes (richness and Shannon's diversity; indexes which were estimated with R and Mothur software), were tested by two multifactorial analysis of variance. A linear mixed model was first performed with the effects of the community origin, the condition and the time (and their interactions) as fixed factors and a random factor to take into account the effect of repeated measurements over time, that is to say, the non-independent nature of the various samples in bioreactors (*lme* function in R package *nlme*). A second linear model was conducted by testing the same factors as fixed factors but without taking into account the random factor (*lm* function in R). To test the effect of the random factor, analysis of variance (ANOVA) has shown no significant difference between these two models, the linear model without repeated measurement was chosen. The logarithmic transformation of the numeric variable was sometimes necessary so that the residuals follow a normal distribution. ANOVA and Tukey's HSD tests (Honest Significant Difference) were carried out following the performing of linear models to compare between each other the different modalities of the various factors and highlight significant differences.

Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) tested significance among the experimental factors: conditions and time as fixed factors and the random factor to take into account the effect of repeated measurements over time, with 16S rRNA sequencing data (based on dissimilarity matrix of the Bray-Curtis distances between samples).

Community composition of bacteria under the different conditions of incubations, consisted of 16S rRNA sequencing data, was analysed using non-metric multidimensional scaling (nMDS) implemented in Primer 6 (version 6.1.16). For nMDS ordinations, the Bray-Curtis distance measure was used to generate dissimilarity matrices. Confidence ellipses, included in ordinations, were based on cluster analyses (Primer 6 software; version 6.1.16).

2.3. Results and discussion

2.3.1. Oxygenation and redox status during incubations

Our experimental approach consisted in the incubation of sediments in bioreactors under anoxic/oxic oscillating conditions compared to permanent oxic or anoxic conditions. In the incubations under oscillating conditions, the conditions were anoxic (O_2 saturation at 0%) at the beginning of the experiment and until the day 7, with a redox potential decreasing progressively to reach -287 ± 55 mV as well as in incubations under permanent anoxic conditions (Figure 36). The aeration of one-day duration on days 7 and 10 consisted to injecting filtered air to flush the liquid phase and the headspace. During these periods, the liquid phase was oxidized as evidenced by an increase of the redox potentials. They reached to -19.3 ± 50.1 mV at the end of the first oscillations period and to 15.1 ± 45.0 mV at the end of the second period. The dissolved oxygen in the liquid phase was 50.8 ± 10.9 % and 78.3 ± 4.5 % of the oxygen saturation respectively at the end of the first and the second periods. The oxygen saturation didn't reach the oxygen saturation values of the incubations under permanent oxic conditions at the same times. On days 8 and 11 of incubation under permanent oxic conditions, the oxygen saturation was respectively 90.1 ± 1.3 % and 91.9 ± 0.8 %. These values correspond to the highest point, reached after 4 days of aeration.

In oscillating conditions, periods of aeration changed the redox status of the slurry, influencing availability of electrons acceptors that should require fundamental changes in microbial metabolic lifestyles (DeAngelis *et al.*, 2010). During anoxic periods, the redox potentials ranged to -200 mV from -400 mV corresponding to redox values overlapping the values ensuring a maximal sulfate-reduction (Eh from -100 mV to -300 mV) and methanogenesis (Eh < -300 mV) metabolic activities (Jørgensen, 2000). Following the oxygen input, the redox status was equivalent to those of suboxic conditions, with redox potentials between -100 mV and +100 mV corresponding to optimal redox values for denitrification, Mn(IV) reduction and Fe(III) reduction metabolisms. The presence of dissolved dioxygen (O_2 saturation between 50 and 80 %) may suggest that this electron acceptor may be used by the heterotrophic aerobic prokaryotes. The changes in redox status under oscillating conditions generate an alternation in the availability of oxidants and reductants which is comparable with what's occurred in redox discontinuing layers or oxic/anoxic interfaces in coastal sediments. The close proximity between oxidized and reduced sediments areas have been shown to support increased microbial activity (Fenchel and Finlay, 2008).

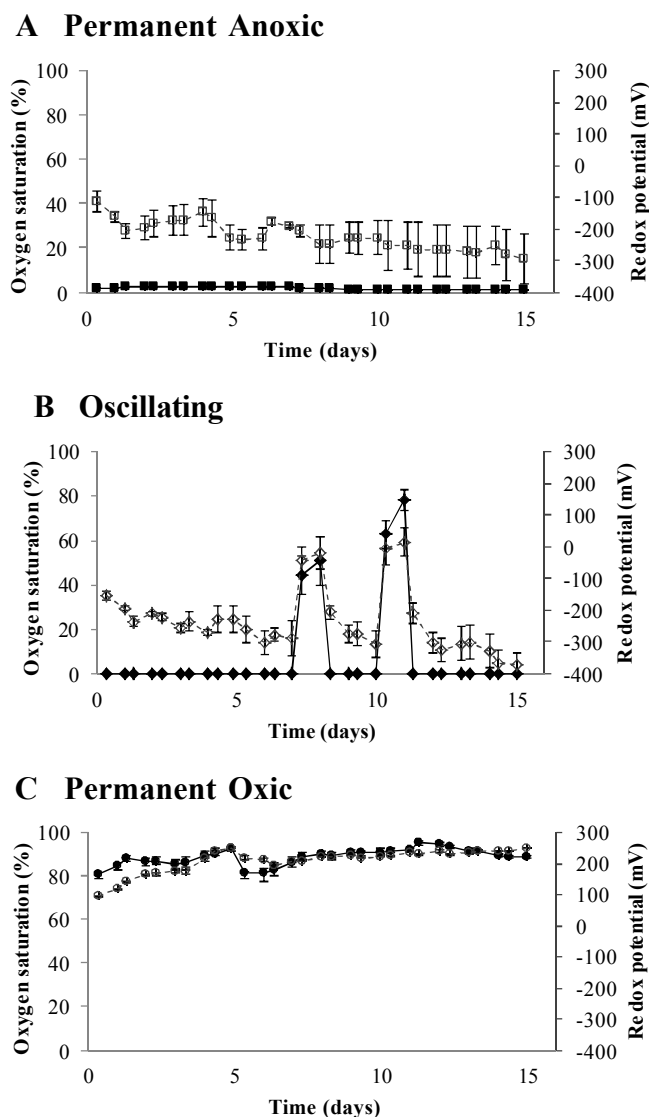


Figure 36: Oxygenation and redox status during incubations in bioreactors under the different conditions. Oxygen saturation (%; filled circles connected by a solid black line) and redox potential (mV; open circles connected by a dotted grey line) measurements during incubations under permanent anoxic (A), oscillating (B) or permanent oxic (C) conditions.

2.3.2. Hydrocarbon biodegradation capacity

It is recognized that hydrocarbons have globally low aqueous solubility and high affinity for adsorption to sediments organic matter. Moreover, the aqueous solubility of hydrocarbons decreases with increasing molecular weight and for the same numbers of carbons, aliphatic compounds are less soluble than aromatics ones (Zhu *et al.*, 2001). The determination of the PAHs content in the aqueous phase for the different conditions showed that the low molecular weight C8-C15 aromatic fraction represents at least 90% of total PAHs detected. In oscillating and permanent oxic conditions, the PAHs removal was about $83.0 \pm 9.5 \%$ and $98.2 \pm 1.3 \%$ respectively, at the end of the incubation compared to the concentration 10 hours after oil addition. As in permanent anoxic conditions, the concentration of this lighter fraction remained

stable, its removal in other conditions must be due to either activity of aerobic bacteria or volatilization after the air supply, as anoxic conditions are permitted by closed system. Indeed, in environmental opened conditions, these low molecular weight hydrocarbons are rapidly eliminated by evaporation, from hours to few days or biodegraded due to their higher bioavailability in the aqueous phase (Harayama *et al.*, 1999; Johnsen *et al.*, 2005).

Therefore, in order to assess the biodegradation capacities in the different conditions of incubation, the fate of petroleum hydrocarbons adsorbed on the sediments fraction has been focused. Despite the high proportion of the saturated and aromatic hydrocarbons, it must be noticed that *n*-alkanes and PAHs represent only 6.2 % and 0.8 % of this crude oil. The theoretical biodegradability of this Oural oil was determined following the methodology described by the International Maritime Organization (IMO, 2004) and reaches only 48.3 % of the oil. Thus, the focus was made on the chemical composition of the fraction mostly biodegradable (*n*-alkanes and PAHs biodegradable at 85 % and 90 % respectively) resolved by GC-MS, estimating biodegradation indexes (IMO, 2004).

With the assumption that linear alkanes are more sensitive to microbial degradation than alkylated ones (McKenna and Kallio, 1971), the *n*-C₁₇/pristane (Figure 37) and the *n*-C₁₈/phytane ratio (data not shown) were monitored in order to assess the alkane biodegradation capacities (Sauer and Boehm, 1991; Singh *et al.*, 2014). As the responses of the both ratio were comparable, only results of the *n*-C₁₇/pristane are discussed. The ratio significantly varied according to the condition (*p*-value < 0.01) and the time (*p*-value < 0.001). The ratio increased to day 10 for the permanent anoxic conditions. This is probably due to progressive homogenization of the crude oil added to the slurry which contained already degraded oil (so with a lower ratio). As a result, the diminution of the ratio could even be underestimated for the oscillating and permanent oxic conditions. It was reduced significantly at day 8 for the permanent oxic conditions and at day 11 for the oscillating conditions (*p*-values < 0.05). Despite the ratio decrease which began earlier in the permanent oxic conditions than in oscillating conditions, biodegradation kinetics appeared different. Indeed, the ratio from the oscillating conditions was significantly lower than those in oxic conditions at day 11 (*p*-value < 0.001), although they were equivalent 10 hours after oil addition. This observation pointed out that a biodegradation process occurred during the incubations and that it was more efficient in oscillating conditions than permanent oxic conditions. Abril *et al.* (2010) obtained similar results for organic matter depletion in an estuarine fluid mud. They showed that an anoxic period preceding an oxic period promotes the biodegradation and oscillations maximized the availability of some oxidant and the tight coupling between metabolisms. The progressive depletion of the *n*-C₁₇/pristane ratio under

oscillating conditions suggests a co-stimulation of aerobic and anaerobic metabolisms for the biodegradation of alkanes.

Considering the PAHs biodegradation, it is well known that biodegradation of aromatics compounds decrease with the alkylation degree. Thus, a ratio between a parent PAH (phenanthrene) and alkylated PAH (methyl phenanthrene) was calculated in order to assess the biodegradation kinetics according to the different conditions (Michel and Hayes, 1999; Elango *et al.*, 2014). Variations of the phenanthrene/dimethylphenanthrene ratio were observed during experiment under oscillating and permanent oxidic conditions (Figure 37). The ratio significantly varied according to the condition ($p\text{-value} < 0.001$) and time ($p\text{-value} < 0.01$) and the variation was different during the time between conditions ($p\text{-value} < 0.01$). As it was observed with $n\text{-C}_{17}$ /pristane ratio, the phenanthrene/dimethylphenanthrene ratio increased to day 10 for the permanent anoxic conditions due to a progressive homogenization of crude oil. In permanent oxidic conditions, the ratio decreased significantly 2 days after oil addition ($p\text{-values} < 0.01$) and reached the minimum value at day 8 (significantly different from day 5.4, $p\text{-value} < 0.001$), while the ratio was significantly higher in oscillating conditions. Then in permanent oxidic condition, the ratio increased slightly to the end of the experiment probably as a result of the dimethylphenanthrene degradation. At day 11 in oscillating conditions, the ratio became equivalent to those of the permanent oxidic conditions and the ratios were significantly different between days 7 and 15 ($p\text{-value} < 0.05$). After the 2 periods of 1 day in oscillating conditions, the phenanthrene biodegradation efficiency was equivalent to the biodegradation after 2 days aeration in permanent oxidic condition (equivalent ratio values). The previous anoxic periods did not have an effect on the phenanthrene degradation, since the ratio diminution slope of the oxidic conditions between days 5.4 and 7 (-0.20 ± 0.02) was equivalent to those during aeration periods in the oscillating conditions (-0.18 ± 0.09 and -0.19 ± 0.11 between days 7 and 8, 10 and 11 respectively). The phenanthrene biodegradation was effective during aeration period as it could be observed by Vitte *et al.* (2011) for lighter PAHs (2 or 3 rings), depending on the activity of aerobic metabolisms.

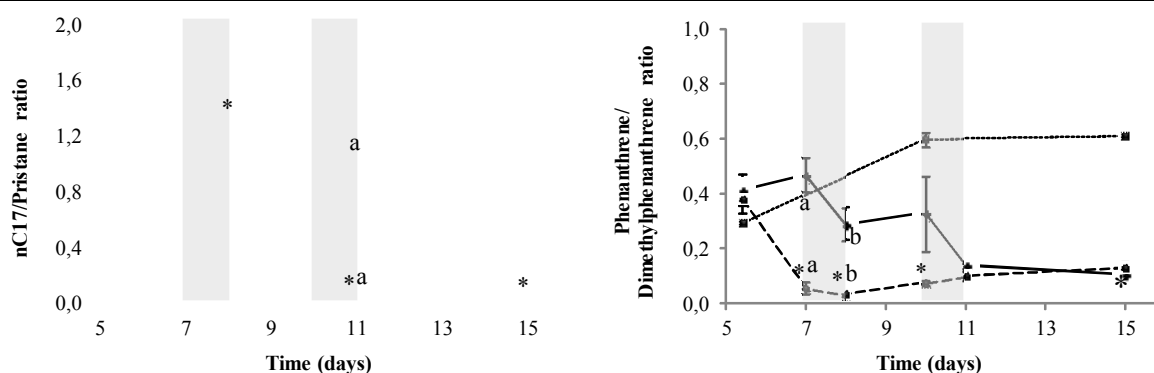


Figure 37: Following of biodegradation ratio : nC17/Pristane (left) and Phenanthrene/Dimethylphenanthrene (right), in order to assess to hydrocarbons biodegradation capabilities during the incubations under oscillating conditions (filled diamonds connected by a solid black line), permanent oxic (filled circles connected by a large dotted black line) or anoxic conditions (filled squares connected by a short dotted black line). The two *shaded periods* correspond to the aerated periods of the oscillating conditions. Stars show a significant difference according to Tukey HSD test (p -value < 0.05) compared to the value at 10 hours after oil addition (day 5) from the considered conditions. The lowercases show a significant difference (p -value < 0.05) between the different conditions with the same letter at the considered time.

2.3.3. Bacterial activity during incubation: correlation with the phenanthrene degradation linked to oxygen addition

The bacterial community activity was followed during experiment estimating the expression rate of the 16S rRNA gene (copy number of transcripts per copy number of gene reported per weight of dry sediments) by QPCR and RT-QPCR analyses (Figure 38, A). Modifications of the expression rate belong the incubation was effective in permanent oxic conditions (p -value < 0.01). An increase was observed 10 hours after the oil addition (p -value < 0.05), corresponding probably to a *priming effect* with the stimulation of bacteria able to use hydrocarbons as carbon source (Foster, 1962; Greenwood *et al.*, 2009). The rate remained at the same level than before addition of oil, from the day 7 to the end of the incubation, where it was higher than those of the permanent anoxic conditions (p -value < 0.05). The expression rate increase also under oscillating conditions (p -value < 0.01) during the periods of aeration, to reach an higher value at day 15 than in permanent anoxic conditions (p -value < 0.01). The significant increase of the expression rate at the day 11 (p -value < 0.01) highlighted a stimulation of the bacterial activity by aeration periods. After a period of anoxia, aerobic metabolisms which were in dormancy could be stimulated by oxygen input. Indeed, Abril *et al.* (2010) obtained results consistent with this observation since they showed that O₂ consumption rates were always significantly higher after an anoxic period. The bacterial community responded to the oscillating conditions pointing out some autochthonous bacteria which keep on these environmental conditions (may be staying in an inactive state during anoxic periods) which are stimulated with oxygen input, constituting more favorable conditions.

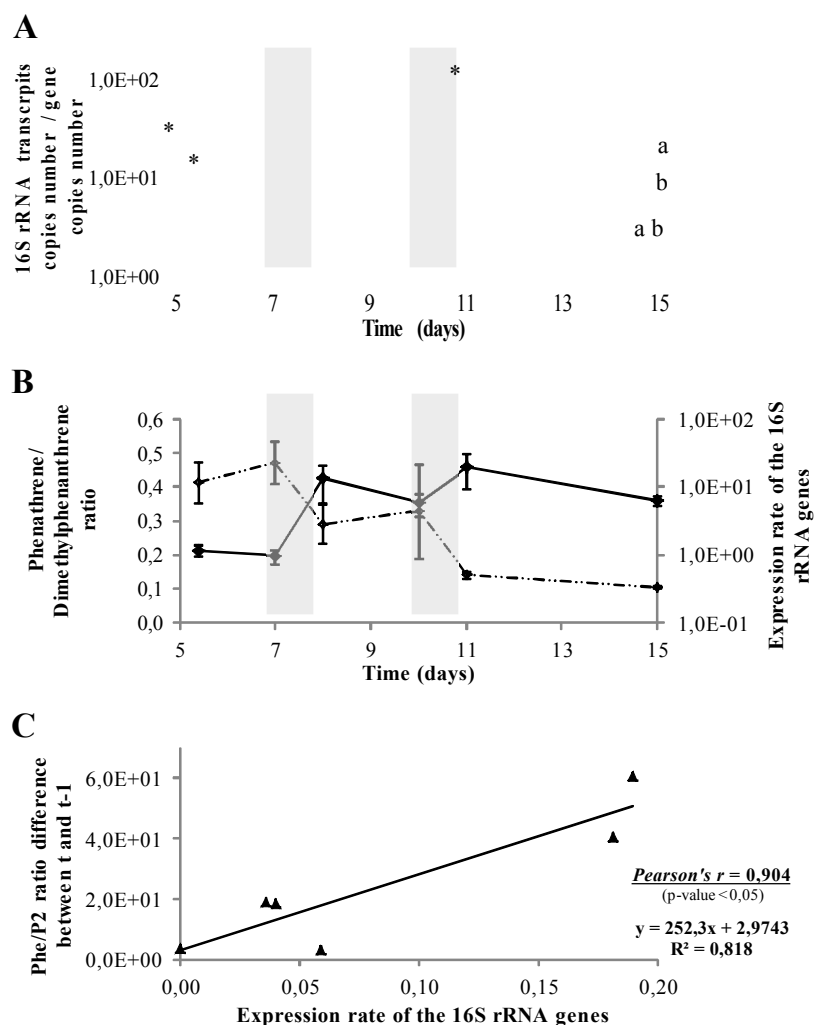


Figure 38 : Correlation between the 16s rRNA gene expression rate and the phenanthrene degradation linked to oxygen addition. The two shaded periods correspond to the aerated periods of the oscillating conditions. **A.** Expression rate of the 16s rRNA gene during incubation under oscillating conditions (filled diamonds connected by a solid black line), permanent oxic (filled circles connected by a large dotted black line) or anoxic conditions (filled squares connected by a short dotted black line). Stars show a significant difference according to Tukey HSD test (p-value < 0.05) compared to the value at 5 days, before oil addition from the considered conditions. The lowercases show a significant difference (p-value < 0.05) between the different conditions with the same letter at the considered time. **B.** Phenanthrene/Dimethylphenanthrene ratio (dotted black line) and 16s rRNA gene expression rate (solid black line) under oscillating conditions. **C.** Pearson's correlation straight line between diminution of the Phenanthrene/Dimethylphenanthrene ratio and the expression rate.

This increase of the 16S rRNA expression rate coincided with the phenanthrene biodegradation during aeration periods (Figure 38, B). Their correlation (Figure 38; Pearson correlation index $r = 0.904$, p-value < 0.05) suggests a major role of aerobic bacteria in the phenanthrene biodegradation under oscillating conditions. Also, Vitte *et al.* (2013) highlighted that a short period of aeration, after anoxic periods, provided a great efficiency for PAH removal and suggested involvement of dioxygenases after oxygen addition since RHD gene transcripts were produced during the anoxic periods. They suggested that in oscillating anoxic/oxic conditions, the continuous transcription of RHD genes during the anoxic periods could explain the acceleration of the biodegradation of PAH after oxygen addition, enabling the potential

activities of dioxygenases. Dioxygenases activities and bacteria stimulation after oxygen input could interact for an efficient PAHs degradation in oxic periods.

2.3.4. Bacterial communities analysis

2.3.4.1. Influence of oxygenation conditions on richness and diversity

For the characterization of the abundance, diversity and organization dynamics of microorganisms from a polluted ecosystem subjected to oscillating conditions, in response to change of the oxygenation conditions, 16S rRNA gene and transcript were sequenced. The Good's coverage values equal or higher than 0.90 for bacterial 16SrRNA gene and transcript sequencing data suggested that the 3K average number of reads per assay allowed to assess efficiently the bacterial diversity of the metabolically active (sequencing data from 16S rRNA transcripts) as well as the total (sequencing data from 16S rRNA genes) bacterial communities during incubations in bioreactors experiment (Table 2). The richness and the α -diversity (Shannon diversity index) significantly varied with the condition (p-value < 0.001), the time (p-value < 0.005 and < 0.05 respectively) and the variation was different during the time between conditions (p-value < 0.001). The incubations operated under permanent anoxic or oxic conditions exhibited a higher (p-value < 0.001) bacterial richness (more than 400 OTUs) and diversity (more than 3.6 or 4.0 respectively) than under oscillating conditions after the first period of aeration (less than 250 OTUs and a Shannon diversity index lower than 2.5). Oxygen input could generate a disturbance in bacterial community, with changes in their relative abundances, dormant states of the less adapted or resistant community members, or death of microorganisms (Rykiel, 1985). This selection will benefit the microorganisms the most adapted or favored by the new conditions, showing the sensitivity of the community (Shade *et al.*, 2012).

Table 2: General statistics, observed richness and diversity estimated based on 97% OTU clusters from bacterial (454-pyrosequencing) 16S rRNA sequencing data.

Condition	Type	Time (days)	Bacterial 16S rRNA sequencing						
			Number of total sequences before normalisation	Number of total sequences after normalisation	Richness	Shannon diversity index	Good's coverage	Unclassified sequences (at phylum level; %)	Unclassified sequences (at genus level; %)
Permanent anoxic:	ADN	0	5936	3104	800	5,93	0,89	14,37	76,10
	ADNc	0	8754	3102	853	5,88	0,86	11,32	79,34
	ADN	15	8960 ± 505	3104	457 ± 22	3,66 ± 0,11	0,93 ± 0,00	4,98 ± 0,60	79,80 ± 2,28
	ADNc	8	8011 ± 942	3102	588 ± 70	4,55 ± 0,33	0,89 ± 0,01	6,31 ± 1,19	69,74 ± 3,59
		10	6940 ± 576	3102	503 ± 68	4,25 ± 0,30	0,92 ± 0,01	6,14 ± 0,97	69,36 ± 4,98
Oscillating:		11	6499 ± 963	3102	459 ± 47	4,16 ± 0,37	0,94 ± 0,00	5,27 ± 1,17	62,60 ± 5,13
		15	6234 ± 97	3102	435 ± 38	3,82 ± 0,25	0,92 ± 0,01	4,42 ± 0,51	55,48 ± 5,39
	ADN	5,4	7452 ± 408	3104	600 ± 9	4,52 ± 0,01	0,91 ± 0,00	8,11 ± 0,44	79,51 ± 2,88
		15	14180 ± 2701	3104	255 ± 65	2,39 ± 0,67	0,96 ± 0,01	2,48 ± 1,41	31,96 ± 12,7
	ADNc	5	4485 ± 386	3102	588 ± 36	4,84 ± 0,25	0,92 ± 0,01	6,50 ± 0,79	72,38 ± 4,65
Permanent oxic:		5,4	6097 ± 352	3102	535 ± 28	4,41 ± 0,17	0,92 ± 0,00	8,25 ± 2,45	74,52 ± 4,09
		7	5737 ± 667	3102	506 ± 46	4,33 ± 0,25	0,93 ± 0,01	5,46 ± 1,17	72,97 ± 3,36
		8	8829 ± 142	3102	177 ± 8	1,81 ± 0,16	0,95 ± 0,02	0,78 ± 0,27	36,57 ± 13,4
		10	8112 ± 397	3102	203 ± 11	1,95 ± 0,25	0,94 ± 0,03	0,74 ± 0,20	31,42 ± 13,5
		11	8063 ± 310	3102	193 ± 11	2,20 ± 0,19	0,97 ± 0,00	0,61 ± 0,05	32,14 ± 11,8
		15	7988 ± 793	3102	229 ± 45	2,31 ± 0,56	0,96 ± 0,01	1,33 ± 0,15	23,34 ± 7,73
Permanent oxic:	ADN	5,4	6224 ± 359	3104	532 ± 12	4,96 ± 0,06	0,92 ± 0,00	3,33 ± 0,09	70,92 ± 1,97
		15	4558 ± 680	3104	543 ± 18	5,12 ± 0,04	0,93 ± 0,01	5,85 ± 0,82	66,30 ± 2,46
	ADNc	5	4587 ± 329	3102	405 ± 11	4,04 ± 0,13	0,93 ± 0,01	1,55 ± 0,39	84,97 ± 0,12
		5,4	4301 ± 274	3102	406 ± 13	4,11 ± 0,03	0,94 ± 0,01	1,54 ± 0,16	78,44 ± 0,42
		7	4006 ± 98	3102	456 ± 10	4,46 ± 0,12	0,93 ± 0,01	2,96 ± 0,64	67,71 ± 2,36
		8	3811 ± 174	3102	466 ± 10	4,49 ± 0,04	0,91 ± 0,01	4,64 ± 1,03	66,25 ± 2,11
		10	4581 ± 477	3102	555 ± 29	4,79 ± 0,08	0,91 ± 0,01	4,82 ± 0,70	67,26 ± 0,89
		11	3642 ± 139	3102	494 ± 15	4,73 ± 0,10	0,93 ± 0,01	4,76 ± 0,50	71,04 ± 1,27
		15	3776 ± 276	3102	573 ± 22	5,14 ± 0,05	0,92 ± 0,01	9,40 ± 1,98	71,99 ± 2,4

2.3.4.2. Influence of oxygenation conditions on structure and composition of bacterial communities

Comparison of the structures of the total (data not shown) and the metabolically active (Figure 38) bacterial communities under the different incubation conditions, showed a structuration of the bacterial communities according to incubation conditions (Permanova, p -value < 0.0005). A modification of the bacterial community structure of the oscillating conditions was observed after 8 days of incubation, corresponding to the end of the first period of aeration. The bacterial communities of the first 7 days of incubation were grouped in a separate cluster (similarity over 30%) with bacterial communities of the permanent anoxic conditions, showing more similar structure to the bacterial community at t0, clustering at a similarity over 20%. Structure modification of the bacterial communities in permanent oxic conditions occurred in the 5 first days of the incubation (distinct cluster to communities at t0; similarity over 20%). Apart from these major structure changes of bacterial communities of permanent oxic and oscillating conditions after oxygen input, any changes could be observed over time, as it was observed according to the hydrocarbons degradation by Vitte et al. (2011) in a similar experiment. Consequently, oxygen supply appeared as the main factor influencing the structure of the bacterial communities, which is consistent with Vitte *et al.* (2013) studies using the same incubation approaches.

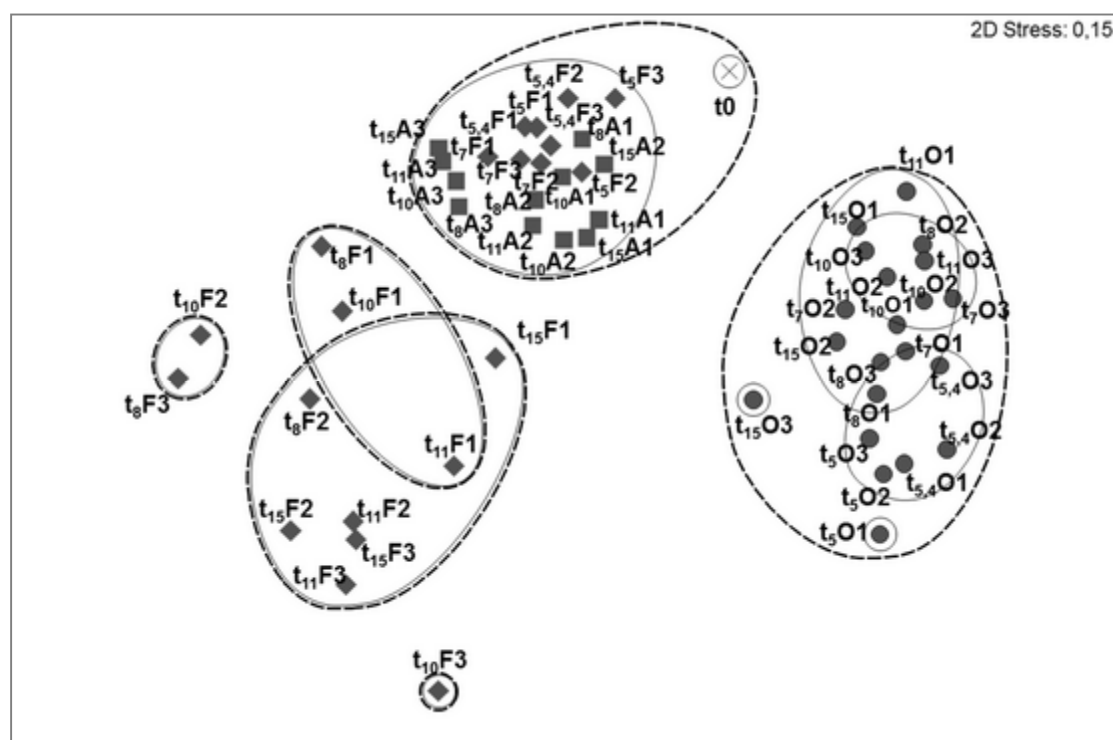


Figure 39 : Comparison of the metabolically active bacterial community structure during bioreactor incubations under oscillating (filled diamonds) and permanent anoxic (filled squares) or oxic (filled circles) conditions. Non parametric Multidimensional Scaling (nMDS) based on pyrosequencing data from 16S rRNA transcripts. Solid and dotted black lines represent 30 and 20% of Bray-Curtis similarity, respectively.

In order to characterize the bacterial responses to the different conditions, the metabolically active bacterial composition was first described at the phylum level. 19 phyla were identified with *Proteobacteria* as the dominant phylum for the three conditions, a phylum mostly represented in marine environments in which numerous *Proteobacteria* species have been identified to use petroleum hydrocarbons (Atlas, 1981; Widdel *et al.*, 2010; Kimes *et al.*, 2013). This phylum with a relative abundance higher than 75% at day 0 reached 44.1 to 61.6% in permanent anoxic conditions and the 7 first days in oscillating conditions (anoxic conditions), 82.9 to 96.2% in permanent oxic conditions and after the first cycle of aeration in the oscillating conditions respectively. Within this phylum, the class of *Gammaproteobacteria* was mostly represented ($53.8 \pm 2.9\%$ in anoxic conditions, $88.8 \pm 2.2\%$ in oscillating conditions and $86.7\% \pm 1.9$ in permanent oxic conditions) followed by *Deltaproteobacteria* ($36.1 \pm 1.8\%$) and *Epsilonproteobacteria* ($8.2 \pm 2.5\%$) in anoxic conditions, by *Epsilonproteobacteria* ($8.0 \pm 2.2\%$) and *Deltaproteobacteria* ($2.6 \pm 0.6\%$) in oscillating conditions and by *Deltaproteobacteria* ($9.0 \pm 1.8\%$) and *Alphaproteobacteria* ($3.1 \pm 0.3\%$) in permanent oxic conditions.

Firmicutes and *Fusobacteria* were the second and the third phyla, respectively, the more represented all along incubations in permanent anoxic ($19.7\text{--}33.1\%$ and $7.7\text{--}13.3\%$ respectively) and oscillating ($19.7\text{--}33.1\%$ and $4.8\text{--}10.7\%$ after first cycle of aeration, $10.7\text{--}13.3\%$ and $0.6\text{--}1.3\%$, respectively) conditions. *Bacteroidetes* phylum ($1.2\text{--}5\%$) was most abundant in permanent oxic conditions.

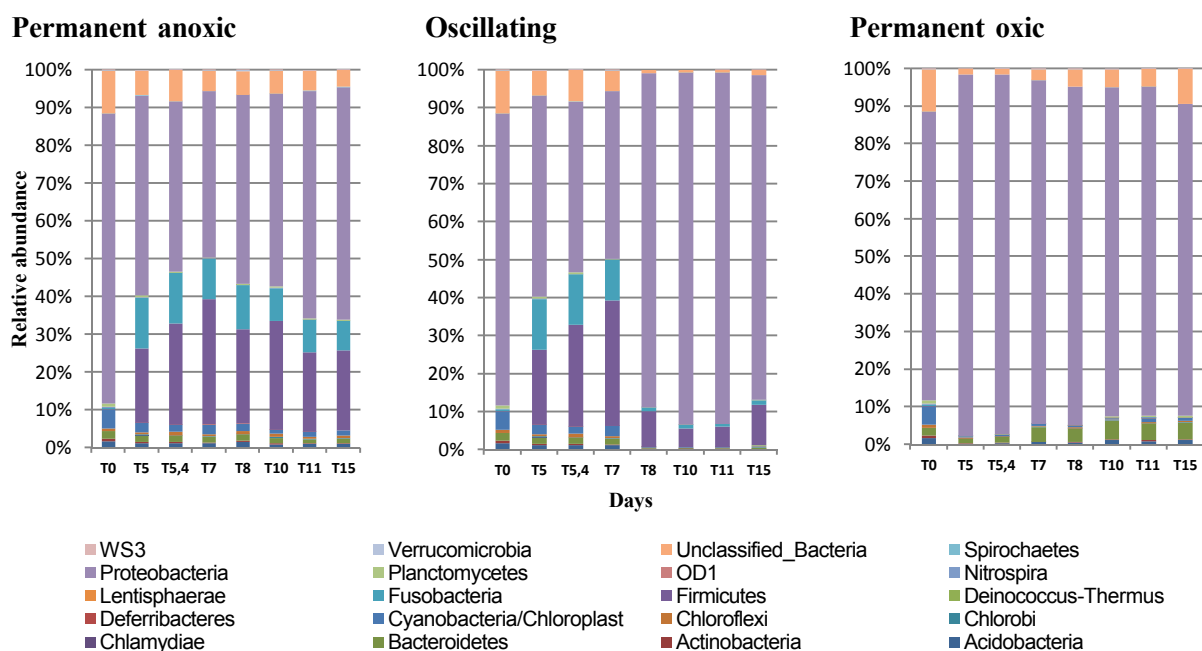


Figure 40 : Relative abundance at phylum level under the different conditions of oxygenation: permanent anoxic (left), oscillating (middle) and permanent oxic (right) conditions.

The similarities and the differences in the composition and the abundances of the metabolically active bacterial species among the OTUs affiliated at the genus level between the different conditions are illustrated by the Venn diagram (Figure 41). Within the three conditions, the number of total OTUs was 5432, with 1736 of them shared by the three conditions, corresponding to 46.2%, 49.2 % or 56.1% of total OTUs of the permanent anoxic, oxic or oscillating conditions respectively. These OTUs correspond predominantly to the dominant OTUs since they gather together respectively 70%, 72.9% and 80.7% of total sequences per conditions. These observations showed the potential of many microbes to tolerate the different oxygenation conditions. The genus mostly represented within these OTUs was *Alcanivorax* (37% of sequences related to the shared OTUs), followed by *Cycloclasticus* (28%), *Arcobacter* (8%), *Desulfosarcina* (6%). For these first three genus, species have been described as aerobic and microaerobic (Vandamme *et al.*, 1991; Dyksterhouse *et al.*, 1995; Yakimov *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2013; Levican *et al.*, 2013) and strictly anaerobic for the last genus (Kuever *et al.*, 2005a). Also, a large number of OTUs are shared between the permanent anoxic and the oscillating conditions (1043 OTUs, being 27.8% and 33.7% of total OTUs in the respective conditions, corresponding to 27.0% and 17.4% of the total sequences in each condition, respectively). The total abundance of the sequences related to these OTUs was widely dominated by sequences related to the genus *Ilyobacter* (76.5% and 87.2% of the sequences for the permanent anoxic and the oscillating conditions, respectively), strictly anaerobic (Brune *et al.*, 2002). Sequences related to the genus *Thiomicrospira* (1.3% and 4.4%) corresponding to sulfur-oxidizing bacteria (Kuenen and Veldkamp, 1972; Sorokin *et al.*, 2006), *Alcanivorax* (0.4% and 5.7%), *Desulfuromonas* (2.0% and 0.3%) related to strictly anaerobic bacteria (Pfennig and Biebl, 1976; Sung *et al.*, 2003), were then identified. Following the periods of aeration in the oscillating conditions, some OTUs shared with the permanent oxic conditions could be identified (1% and 3.1% of the total sequences in these respective conditions). These OTUs are related to the genus *Cycloclasticus*, *Alcanivorax* and *Sulfatobacter* (Sorokin, 1995; Fukui *et al.*, 2014) predominantly, counting for 69% or 63%, 20% or 24% and 4% or 6% of the sequences related to these OTUs for the oscillating or permanent oxic conditions respectively. Few OTUs are also shared between the permanent anoxic and oxic conditions (1% and 2.2% of the total sequences in these respective conditions), mostly related to the genus *Cycloclasticus* and *Vibrio*, constituted by facultative anaerobes (Lucena *et al.*, 2012; Lasa *et al.*, 2014), counting for 18% or 36% and 1% or 21% of the sequences related to these OTUs for the permanent anoxic or oxic conditions respectively.

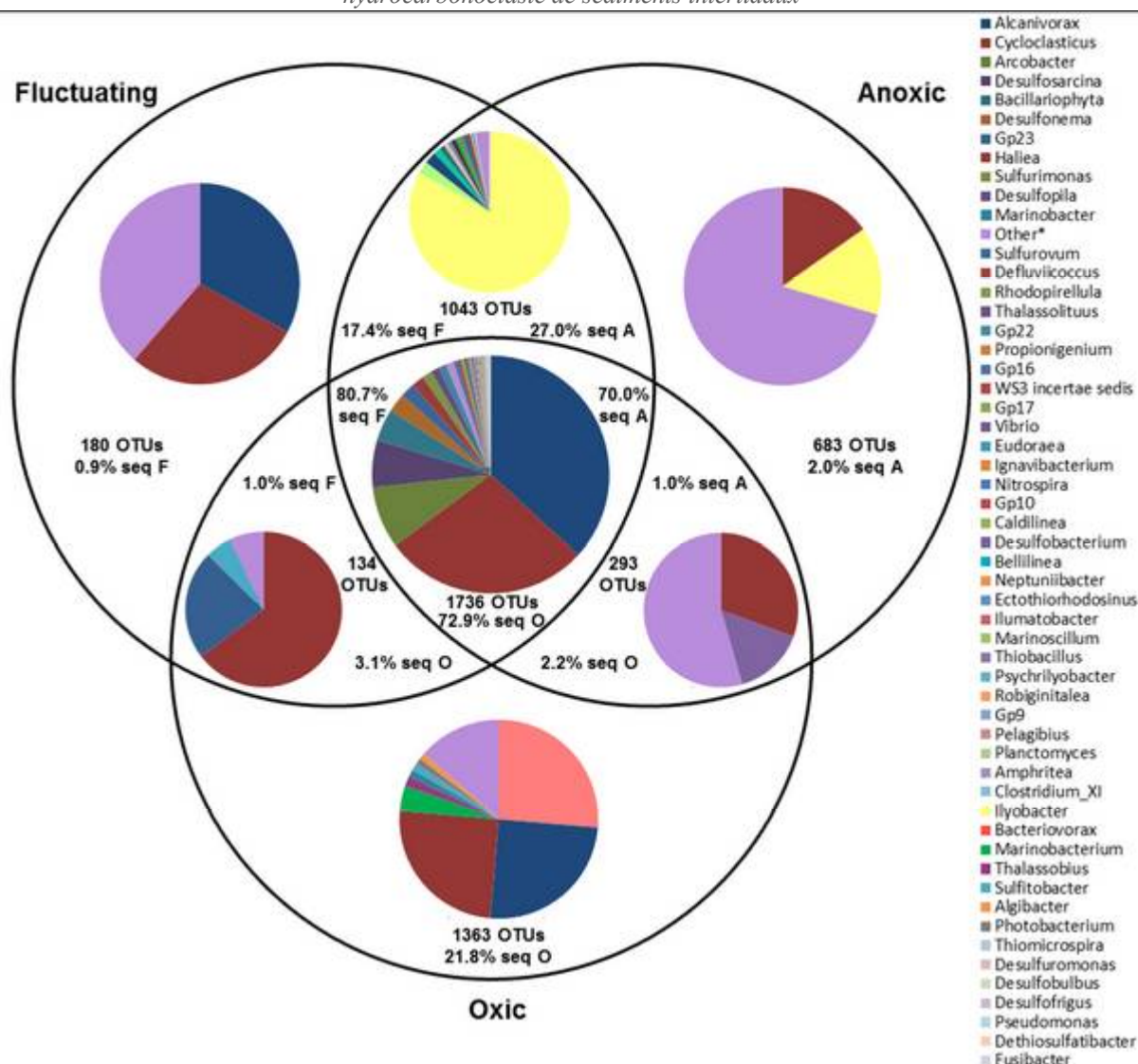


Figure 41 : Venn diagram of the OTUs at 0.97 % similarity, affiliated at genus level, between the different conditions and pie charts of the relative abundance of major genus for each part of the diagram. The other* group gathers together the genus related to rare OTUs that are represented by less than 1% of total sequences per sample, being 31 sequences.

In permanent oxic conditions, specific OTUs represented 21.8% of sequences and were mostly related to the genus *Bacteriovorax* (26% of the sequences), *Alcanivorax* (25%), *Cycloclasticus* (25%), *Marinobacterium* (4%), *Thalassobius* (2%), *Marinobacter* (1%) and *Sulfitobacter* (1%). The specific OTUs in permanent anoxic conditions corresponded to 2.0% of sequences (rare OTUs) and were related to *Cycloclasticus* (15%) and *Ilyobacter* (14%) for the mostly represented OTUs. Under the oscillating conditions, periods of aerations stimulated some specific OTUs, corresponding to 0.9% of sequences identified in these conditions, related to *Alcanivorax* (33%) and *Cycloclasticus* (28%) not detected in other conditions or times.

The genus *Alcanivorax* and *Cycloclasticus* were mainly represented in the different conditions. These genus include marine bacteria which have been pointed out in several studies

as key agents in the crude oil removal on a global scale (Maruyama *et al.*, 2003; Cappello *et al.*, 2007a; Singh *et al.*, 2014). These microorganisms using alkanes and PAHs compounds respectively, aren't in competition for the substrate, explaining that they are mostly present simultaneously in polluted environments. *Alcanivorax* genus mostly highlighted in seawater or within the intertidal biofilm (Coulon *et al.*, 2012), was also detected as dominant genus in mudflat sediments bioremediation microcosms studies (Röling *et al.*, 2002; Röling *et al.*, 2004). *Cycloclasticus* is recognized as the predominant genus of PAH-degrading bacteria in many marine sediments where it is widely distributed (Staley, 2010). Surprisingly, some OTUs were even detected in anoxic conditions in our systems, and some were specific to permanent anoxic or oscillating conditions although they are known as aerobic bacteria. Interestingly, a strain of this genus proposed as "*Cycloclasticus spirillensis*" was isolated from a marine polychaete burrow in an intertidal mudflat (Chung and King, 2001) suggesting the presence of this genus in part of coastal sediments subjected to reshuffle activities.

But a large majority of OTUs related to *Alcanivorax* and *Cycloclasticus* genus were shared by the three conditions but with relative abundances presenting different dynamics according to the conditions. Indeed, although the more abundant OTUs were shared between the three conditions they were not detected at the same abundances along incubation and between the different conditions (Figure 42). The major part of the sequences corresponding to the OTUs shared between the conditions, being 24.9%, were related to seven OTUs, three affiliated to the *Alcanivorax* genus, one to the *Arcobacter* genus and three to the *Cycloclasticus* genus (Figure 42, A). The genus *Alcanivorax* was mostly represented by 6 OTUs and became the predominantly expressed genus while it could not be detected at the beginning of the incubations within the global and the metabolically active bacterial communities. Interestingly, relative abundances of sequences related to 4 of these OTUs mostly increased following periods of aeration under the oscillating conditions while their relative abundances were low under permanent oxic conditions. The relative abundances of the 2 others OTUs were higher in permanent oxic conditions. In the same way, the genus *Cycloclasticus* were mostly represented by 11 OTUs, most of them presented a relative abundance higher in permanent oxic conditions (6 OTUs). Other OTUs were detected with similar abundances between the different conditions.

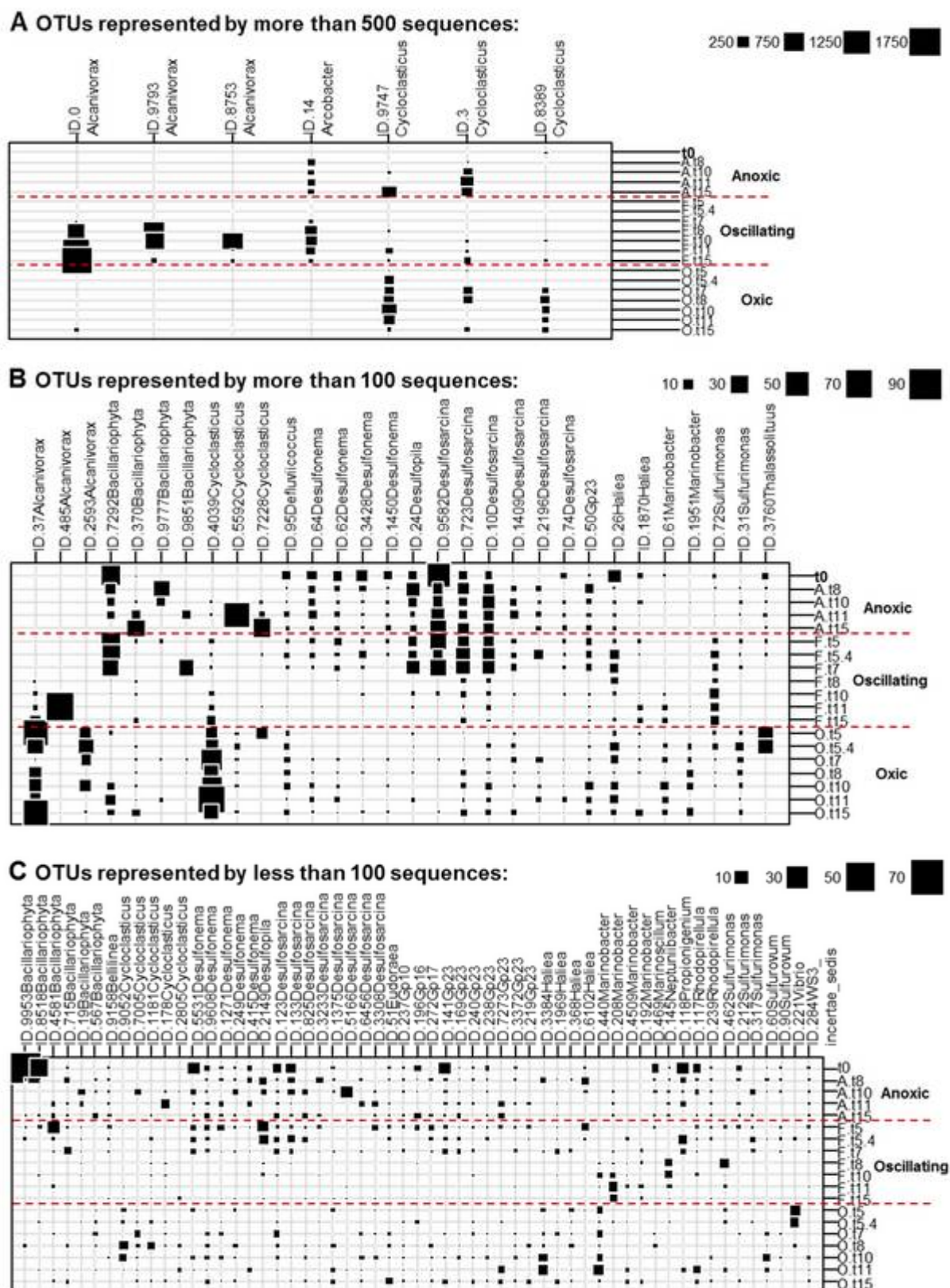


Figure 42: Tables value of OTUs shared between the 3 conditions of incubation. A: OTUs for which the total number of sequences is higher than 500. B: OTUs for which the total number of sequences is between 100 and 500. C: OTUs for which the total number of sequences is lower than 100.

Aerobic metabolisms which could play a major role in determining the fate of hydrocarbons were intensively represented, with the identification of genus for which alkanes and aromatics degraders are known. Genus constituted by facultative anaerobes were also identified among these major OTUs shared between the conditions of incubation, such as the genus *Marinobacter*, *Marinobacterium*, *Vibrio* or *Sulfurimonas*. Moreover, OTUs related to known anaerobic genus were detected. Several OTUs affiliated to genus constituted by sulfate-reducing bacteria were also abundant, as sulfate is abundant in marine sediments, it correspond to a major metabolism in this environment whose its implication in hydrocarbons removal have been highlight and hydrocarbons-degrading SRB have been isolated (Widdel *et al.*, 2010). They correspond to the genus *Desulfonema*, *Desulfopila*, *Desulfosarcina*. Even if, their relative abundances were lower under permanent oxic and oscillating conditions, this OTUs were still detected, except OTU ID.2149 affiliated to *Desulfopila* genus, suggesting their tolerance to oscillating conditions.

Comparative analysis of bacterial communities between the different conditions of incubations indicated that although the sensitivity of the microbial community to anoxic/oxic oscillations observed by a rearrangement of the structure, these particular conditions promote bacterial populations that specifically adapted to these conditions, resulting in communities that are ready for change at any moment. The facultative metabolism, with detection of bacterial genus identified as capable of aerobic respiration as well as anaerobic respiration, could be a metabolic strategy that could explain the adaptation of bacterial populations to oscillating redox conditions. Moreover, intensively represented obligates aerobes and obligates anaerobes suggested that they have to be likely anaerotolerant or aerotolerant respectively. In this case, obligate aerobes that are favoured by episodic occurrence of anoxic conditions and/or obligate anaerobes that are favoured by episodic occurrence of oxygen which could constitute also alternative metabolic strategies for adaptation to anoxic/oxic oscillating conditions. Indeed, obligate aerobes that require episodic (or nearby) occurrence of anoxic conditions does also co-occur in these environments, oxidizing reduced compounds. Then, obligate anaerobes could require episodic occurrence of oxygen in order to regenerate their electron acceptors, such as sulfate-reducers. This cooperation of aerobic and anaerobic metabolisms, with increase of the bacterial activity supported by oscillations between oxidized and reduced conditions, could induce efficient recycling of organic matter resulting in a biodegradation ability in oscillating conditions equal to or greater than those in permanent oxic conditions.

2.4. Conclusion

Intertidal sediments are characterized by anoxic/oxic oscillating conditions those it is crucial to take into account in order to understand the role of microorganisms in determining the fate of hydrocarbon compounds in polluted marine coastal ecosystems. Our results showed a rapid acclimation to changing conditions and pointed out that some microorganisms were adapted and/or were able to respond to dynamic environmental conditions. The presence of diverse bacterial populations with versatile physiological capacities for energy generation under a range of redox potential conditions suggested adaptations capacities to anoxic/oxic oscillating conditions. This apparent functional versatility would allow utilization of rapidly changing resources and would have a significant impact on the biogeochemical cycling and pollutant elimination of these coastal systems.

2.5. References

- Abril G, Commarieu MV, Etcheber H, Deborde J, Deflandre B, Zivadinovic MK *et al* (2010). In vitro simulation of oxic/suboxic diagenesis in an estuarine fluid mud subjected to redox oscillations. *Estuar Coast Shelf Sci* **88**: 279-291.
- Aller RC (1994). Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation. *Chem Geol* **114**: 331-345.
- Allison SD, Martiny JB (2008). Colloquium paper: resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105 Suppl 1**: 11512-11519.
- Atlas RM (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev* **45**: 180-209.
- Baer ML, Ravel J, Chun J, Hill RT, Williams HN (2000). A proposal for the reclassification of *Bdellovibrio stolpii* and *Bdellovibrio starrii* into a new genus, *Bacteriovorax* gen. nov. as *Bacteriovorax stolpii* comb. nov. and *Bacteriovorax starrii* comb. nov., respectively. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**: 219-224.
- Basseres A, Bedborough D, Colcomb K, Domovic D, Girin M, Lee K *et al* (2004). *Bioremediation in marine oil spills*. International Maritime Organization: London.
- Bertics VJ, Ziebis W (2009). Biodiversity of benthic microbial communities in bioturbated coastal sediments is controlled by geochemical microniches. *Isme J* **3**: 1269-1285.
- Brune A, Frenzel P, Cypionka H (2000). Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *Fems Microbiol Rev* **24**: 691-710.
- Brune A, Evers S, Kaim G, Ludwig W, Schink B (2002). *Ilyobacter insuetus* sp. nov., a fermentative bacterium specialized in the degradation of hydroaromatic compounds. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 429-432.
- Cappello S, Denaro R, Genovese M, Giuliano L, Yakimov M (2007). Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on "oil spill bioremediation" in mesocosms. *Microbiol Res* **162**: 185 - 190.
- DeAngelis KM, Silver WL, Thompson AW, Firestone MK (2010). Microbial communities acclimate to recurring changes in soil redox potential status. *Environmental microbiology* **12**: 3137-3149.

- Dyksterhouse SE, Gray JP, Herwig RP, Lara JC, Staley JT (1995). *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *Int J Syst Bacteriol* **116**: 116-123.
- Edgar RC (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460-2461.
- Elango V, Urbano M, Lemelle KR, Pardue JH (2014). Biodegradation of MC252 oil in oil:sand aggregates in a coastal headland beach environment. *Frontiers in microbiology* **5**: 161.
- Fenchel T, Finlay B (2008). Oxygen and the spatial structure of microbial communities. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* **83**: 553-569.
- Foster JW (1962). Hydrocarbons as substrates for microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology* **28**: 241-274.
- Fuhrman JA, Hewson I, Schwalbach MS, Steele JA, Brown MV, Naeem S (2006). Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 13104-13109.
- Fukui Y, Abe M, Kobayashi M, Shimada Y, Saito H, Oikawa H *et al* (2014). *Sulfitobacter porphyrae* sp nov., isolated from the red alga *Porphyra yezoensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**: 438-443.
- Gilbert JA, Steele JA, Caporaso JG, Steinbrueck L, Reeder J, Temperton B *et al* (2012). Defining seasonal marine microbial community dynamics. *Isme J* **6**: 298-308.
- Greenwood PF, Wibrow S, George SJ, Tibbett M (2009). Hydrocarbon biodegradation and soil microbial community response to repeated oil exposure. *Org Geochem* **40**: 293-300.
- Halpern B, Walbridge S, Selkoe K, Kappel C, Micheli F, D'agrosa C *et al* (2008). A global map of human impact on marine ecosystems. *Science* **319**: 948 - 952.
- Hanson CA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Martiny JBH (2012). Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nat Rev Microbiol* **10**: 497-506.
- Harayama S, Kishira H, Kasai Y, Shutsubo K (1999). Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **1**: 63-70.
- Head IM, Jones DM, Roling WF (2006). Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat Rev Microbiol* **4**: 173-182.
- Johnsen AR, Wick LY, Harms H (2005). Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Pollut* **133**: 71-84.
- Jørgensen BB (2000). Bacteria and marine biogeochemistry. In: Schulz HD, Zabel M (eds). *Marine Geochemistry*. Springer Berlin Heidelberg. pp 173-207
- Kimes NE, Callaghan AV, Aktas DF, Smith WL, Sunner J, Golding B *et al* (2013). Metagenomic analysis and metabolite profiling of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico following the Deepwater Horizon oil spill. *Frontiers in microbiology* **4**: 50.
- Kogure K, Wada M (2005). Impacts of macrobenthic bioturbation in marine sediment on bacterial metabolic activity. *Japanese Society of Microbial Ecology* **20**: 191-199.
- Kuenen JG, Veldkamp H (1972). *Thiomicrospira Pelophila*, gen.n., sp. n., a new obligately chemolithotrophic colorless sulfur bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology* **38**: 241-&.
- Kuever J, Rainey FA, Widdel F (2005). *Genus X. Desulfosarcina* Widdel 1981, 382^{VP}. In: Garrity G, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JTE (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. Williams & Wilkins. pp 981-983.
- Lai QL, Wang JN, Gu L, Zheng TL, Shao ZZ (2013). *Alcanivorax marinus* sp nov., isolated from deep-sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 4428-4432.

- Lasa A, Dieguez AL, Romalde JL (2014). *Vibrio cortegadensis* sp nov., isolated from clams. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **105**: 335-341.
- Levican A, Collado L, Figueras MJ (2013). *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Syst Appl Microbiol* **36**: 22-27.
- Lucena T, Ruvira MA, Arahal DR, Macian MC, Pujalte MJ (2012). *Vibrio aestivus* sp nov and *Vibrio quintilis* sp nov., related to *Marisflavi* and *Gazogenes* clades, respectively. *Syst Appl Microbiol* **35**: 427-431.
- Martiny JBH, Bohannan BJM, Brown JH, Colwell RK, Fuhrman JA, Green JL *et al* (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nat Rev Microbiol* **4**: 102-112.
- Maruyama A, Ishiwata H, Kitamura K, Sunamura M, Fujita T, Matsuo M *et al* (2003). Dynamics of microbial Populations and strong selection for *Cyclocasticus pugetii* following the Nakhodka oil spill. *Microb Ecol* **46**: 442-453.
- McGenity TJ (2014). Hydrocarbon biodegradation in intertidal wetland sediments. *Curr Opin Biotechnol* **27**: 46-54.
- McKenna EJ, Kallio RE (1971). Microbial metabolism of the isoprenoid alkane pristane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**: 1552-1554.
- Michel J, Hayes MO (1999). Weathering patterns of oil residues eight years after the Exxon Valdez oil spill. *Marine Pollution Bulletin* **38**: 855-863.
- Nogales B, Lanfranconi MP, Pina-Villalonga JM, Bosch R (2011). Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 275-298.
- Pfennig N, Biebl H (1976). *Desulfuromonas Acetoxidans* gen. nov and sp. nov.: new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium. *Arch Microbiol* **110**: 3-12.
- Prince R, Gramain A, McGenity T (2010). Prokaryotic hydrocarbon degraders. In: Timmis KN, McGenity TJ, Meer JR, De Lorenzo VE (eds). *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. pp 1671 - 1692.
- Quince C, Lanzén A, Curtis TP, Davenport RJ, Hall N, Head IM *et al* (2009). Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature Methods* **6**: 639-641.
- Reed HE, Martiny JB (2013). Microbial composition affects the functioning of estuarine sediments. *ISME J* **7**: 868-879.
- Rykiel EJ (1985). Towards a definition of ecological disturbance. *Aust J Ecol* **10**: 361-365.
- Sauer T, Boehm P: The use of defensible analytical chemical measurements for oil spill natural resource damage assessment. *Proceedings of the International Oil Spill Conference*; March 3-7; San Diego. American Petroleum Institute: 1991.
- Shade A, Peter H, Allison SD, Baho DL, Berga M, Burgmann H *et al* (2012). Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in microbiology* **3**.
- Singh AK, Sherry A, Gray ND, Jones DM, Bowler BF, Head IM (2014). Kinetic parameters for nutrient enhanced crude oil biodegradation in intertidal marine sediments. *Frontiers in microbiology* **5**: 160.
- Sorokin DY (1995). *Sulfitobacter Pontiacus* gen. nov., sp. nov.: a new heterotrophic bacterium from the Black-sea, specialized on sulfite oxidation. *Microbiology* **64**: 295-305.
- Sorokin DY, Tourova TP, Kolganova TV, Spiridonova EM, Berg IA, Muyzer G (2006). *Thiomicrospira halophila* sp nov., a moderately halophilic, obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from hypersaline lakes. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**: 2375-2380.
- Stauffert M, Cravo-Laureau C, Jézéquel R, Barantal S, Cuny P, Gilbert F *et al* (2013). Impact of oil on bacterial community structure in bioturbated sediments. *PloS one* **8**.

Sung Y, Ritalahti KM, Sanford RA, Urbance JW, Flynn SJ, Tiedje JM *et al* (2003). Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp nov. *Applied and environmental microbiology* **69**: 2964-2974.

Timmis KN, McGenity TJ, Meer JR, De Lorenzo V (2010). *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*.

Vandamme P, Falsen E, Rossau R, Hoste B, Segers P, Tytgat R *et al* (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol* **41**: 88-103.

Vitte I, Duran R, Jezequel R, Caumette P, Cravo-Laureau C (2011). Effect of oxic/anoxic switches on bacterial communities and PAH biodegradation in an oil-contaminated sludge. *Environmental science and pollution research international* **18**: 1022-1032.

Vitte I, Duran R, Hernandez-Raquet G, Mounier J, Jezequel R, Bellet V *et al* (2013). Dynamics of metabolically active bacterial communities involved in PAH and toxicity elimination from oil-contaminated sludge during anoxic/oxic oscillations. *Applied microbiology and biotechnology* **97**: 4199-4211.

Widdel F, Knittel K, Galushko A (2010). Anaerobic hydrocarbon-degrading microorganisms: an overview. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*: 1997 - 2021.

Yakimov M, Golyshin P, Lang S, Moore E, Abraham W, Lunsdorf H *et al* (1998). *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 339 - 348.

3. Conclusion du chapitre

Dans cette étude, l'assemblage de la communauté bactérienne active issue d'un sédiment côtier en réponse à des oscillations anoxie/oxie a pu être caractérisé par le séquençage des amplicons ARNr 16S, en comparaison à des conditions d'oxie et d'anoxie permanentes. Parallèlement, les capacités de dégradation des alcanes et des HAP ont pu être mise en évidence et également comparées entre les différentes conditions par l'estimation de rapports de biodégradation.

En premier lieu, un réarrangement des communautés bactériennes actives lié à l'apport d'oxygène a pu être observé, conduisant à une structuration différente des communautés en fonction de la condition d'oxygénation. L'oxygène est apparu comme un facteur forçant déterminant de façon importante la structuration des communautés de cet environnement, jouant un rôle important dans le devenir des polluants. Une réponse semblable à l'apport d'oxygène avait été observée par I. Vitte et ses collaborateurs (2011) lors de l'étude d'une communauté issue d'un environnement très différent. Une communauté bactérienne issue d'un sédiment marin chroniquement pollué aux hydrocarbures aux propriétés très différentes et non influencé par les marées, montrait également une structuration différente en fonction du régime d'oxygénation, le premier cycle d'aération de la condition oscillante conduisant à un réarrangement de la communauté ; ces observations suggérant des profils écologiques en réponses aux conditions oscillantes de l'environnement pouvant être répandus dans différents environnements marins côtiers.

Cependant, la communauté bactérienne autochtone de ce sédiment intertidal a montré une forte capacité d'adaptation à la modification des paramètres environnements, exprimée par des réponses rapides des bactéries actives aux oscillations. En conditions oscillantes anoxie/oxie, une stimulation de l'activité bactérienne a pu être observée, induisant une efficacité de dégradation des alcanes supérieure à celle observée en condition d'oxie permanente et une dégradation du phénanthrène équivalente. Des genres bactériens hydrocarbonoclastes aérobies communément retrouvés dans les environnements marins pollués : les genres *Alcanivorax* et *Cycloclasticus*, semblent également être impliqués de façon majeure en conditions oscillantes, avec le maintien dans un état actif même lors des périodes d'anoxie dont la dernière d'une durée de 3 jours. La détection d'OTU affiliés à ces genres qui semblent même être favorisés par les oscillations (augmentation de l'abondance relative suite à l'apport d'oxygène en condition oscillante et supérieure par rapport à l'abondance en condition d'oxie permanente) éveille un intérêt particulier pour ces OTU dont il serait intéressant de caractériser leur écophysiologie. De même,

parmi les OTU majoritaires, des OTU affiliés à des genres correspondant à des bactéries sulfato-réductrices ont pu être détectés tout au long des incubations sous les différentes conditions d'oxygénation. Ses observations viennent s'ajouter aux différents constats décrits dans différentes études montrant la présence de bactéries sulfato-réductrices dans des zones oxiques de sédiments (Jørgensen, 1977; Sahm *et al.*, 1999) et la tolérance à l'oxygène de différents genres (Muyzer and Stams, 2008).

Chapitre IV :

***Réponses de différentes communautés microbiennes de
sédiments intertidaux aux oscillations anoxie/oxie,
intérêt pour les micro-organismes sulfato-réducteurs***

Chapitre IV : Réponses de différentes communautés microbiennes de sédiments intertidaux aux oscillations anoxie/oxie, intérêt pour les micro-organismes sulfato-réducteurs

1. Introduction

Dans le chapitre précédent, la réponse d'une communauté bactérienne de sédiments intertidaux, soumise à des conditions oscillantes anoxie/oxie a pu être caractérisée en comparaison à des conditions d'oxie et d'anoxie permanentes. Un réarrangement de la structure des communautés bactériennes en fonction de la condition d'oxygénation a souligné la présence de certains micro-organismes adaptés et/ou en mesure de répondre aux conditions environnementales dynamiques et pouvant probablement jouer un rôle dans la dégradation des hydrocarbures. Une réponse semblable ayant été observée précédemment par I. Vitte et ses collaborateurs (2011) au sein d'un autre écosystème côtier, cela peut amener à se demander si des profils écologiques similaires peuvent être observés au sein de communautés différentes d'environnements côtiers lorsqu'elles sont soumises à des conditions oscillantes anoxie/oxie.

De plus, des séquences correspondant à des OTU affiliés à des bactéries sulfato-réductrices ont pu être identifiées pour les différentes conditions d'incubations, représentant une abondance relative non négligeable. Ce groupe métabolique représente effectivement une part importante des communautés microbiennes des sédiments côtiers, impliqué majoritairement dans les processus d'oxydation de la matière organique en conditions anoxiques (Jørgensen, 1977). La dégradation des hydrocarbures dans les conditions de sulfato-réduction a été étudiée en détail au cours des deux dernières décennies (Widdel *et al.*, 2010), et il a été suggéré comme un processus important pour l'élimination des hydrocarbures (Coates *et al.*, 1997; Hayes and Lovley, 2002). Jusque dans les années 90, les MSR étaient considérés comme des organismes anaérobies stricts, cependant, de plus en plus d'études montrent qu'ils sont capables de tolérer l'oxygène (Dilling and Cypionka, 1990; Cypionka, 2000; Dolla *et al.*, 2006; Santana, 2008). Ces organismes peuvent survivre sous des conditions micro-oxiques où ils respireraient l'oxygène ou également le nitrate (Dannenberg *et al.*, 1992), cependant peu d'informations sont disponibles vis-à-vis de leur comportement dans les environnements côtiers en prenant en considération les conditions oscillantes d'oxygénation.

Dans ce contexte, l'étude suivante vise à déchiffrer les réponses écologiques des trois communautés microbiennes différentes de sédiments intertidaux pollués aux hydrocarbures soumises à des conditions oscillantes anoxie/oxie afin d'identifier des profils écologiques globaux de ces environnements. Un intérêt particulier a été porté aux microorganismes sulfato-réducteurs en ciblant le gène fonctionnel *dsrB*, codant pour la sulfide réductase dissimilatrice, une enzyme clé de la respiration anaérobie du sulfate (Leloup *et al.*, 2007). La caractérisation des communautés bactériennes et des MSR actifs, au cours des incubations en bioréacteurs dans des conditions oscillantes anoxie/oxie, a été réalisée par le séquençage haut-débit des transcrits des gènes ciblés. L'étude comparative de l'assemblage de ces communautés en conditions oscillantes anoxie /oxie offre une occasion sans précédent d'obtenir des informations cruciales pour comprendre les paramètres influençant l'organisation des communautés bactériennes et des MSR et l'impact sur les capacités de biodégradation, dans des environnements soumis à ces conditions.

2. Réponses de différentes communautés microbiennes de sédiments intertidaux aux oscillations anoxie/oxie, intérêt pour les micro-organismes sulfato-réducteurs

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article en préparation, pour soumission sous le titre :

Response of different microbial communities from intertidal sediments to anoxic/oxic oscillations, interest for sulfate-reducing micro-organisms

Abstract:

Coastal ecosystems constitute highly particular systems, where anoxic/oxic interface could be modified daily with the action of the current and tides. These conditions impact the dynamics of microbial communities and, as a consequence, on the fate of trapped pollutants. Because the bulk of marine sediments is predominantly anoxic (oxic surface layer not exceeding the first few millimeters) a major influence of anoxic/oxic oscillations on anaerobic communities and metabolisms would be expected. In order to bring global knowledge about the influence of these particular conditions on microbial communities inhabiting these environments and on their oil-degradation capacities, the behavior of 3 different microbial communities (named P, “*Petroleum*”; PB, “*Petroleum + burrowing organisms*”; and PH, “*Petroleum + harrowing*”) from intertidal sediments was investigated during simulation of anoxic/oxic oscillations in crude oil-degrading bioreactors experiment, with a focus on sulfate-reducing micro-organisms communities.

The oxygen addition after anoxic period induced a modification of the metabolically active bacterial communities structures depending on the bacterial composition of the initial communities, revealing different adaptation potentials with consequences on their biodegradation capacities (P=PH>PB). However, the observed response of the three microbial communities showed major OTUs related to specific genus responding to anoxic/oxic oscillations from the different communities. Focusing on SRMs communities, although the proportion of active SRMs suggested different influence of periods of oxygenation, the SRMs structures couldn't be dissociated between the communities “*Petroleum*”, “*Petroleum + burrowing organisms*” and “*Petroleum + harrowing*” and oxygenation conditions, compared to structures under permanent oxic or anoxic conditions.

Keywords: Intertidal ecosystems, different hydrocarbonoclastic communities, anoxic/oxic oscillating conditions, sulfate-reducing microorganisms.

2.1. Introduction

Usually in coastal ecosystems, oxygen rarely penetrates more than a few millimeters in sediments when its transport in sediments depend on molecular diffusion, because it's rapidly consumed due to the high respiration rates at the sediments surface (Brune *et al.*, 2000). However, according to the tide level and the macro-organisms burrowing activities, the water/sediment interface and, a fortiori, the oxic/anoxic interface are daily modified, generating oxic/anoxic oscillating conditions (Aller, 1994; Brune *et al.*, 2000). Consequently, these ecosystems constitute highly particular systems impacting the dynamics of bacterial communities and, as a consequence, on the fate of trapped pollutants (Wakeham and Canuel, 2006), such as petroleum hydrocarbons.

Sulfate-reducing bacteria (SRB) represent a significant part of the microbial communities inhabiting coastal sediments (Cifuentes *et al.*, 2000; de Wit, 2008; Jiang *et al.*, 2009). Indeed, the high concentration of sulfate promotes sulfate reduction metabolisms responsible for most of the organic matter oxidation in anoxic conditions (Jørgensen, 1977). Jørgensen (1982) estimated that about 50% of the deposited material is mineralized via sulfate reduction, which indicates the importance of SRBs for the sulfur and carbon cycles in coastal marine environments. Because of the preponderant role of SRBs in the carbon cycle in the marine environment, hydrocarbon degradation under sulfate-reducing conditions has been studied in detail during the last two decades (Widdel *et al.*, 2010), and it was suggested that it is an important process for hydrocarbon removal (Coates *et al.*, 1997; Hayes and Lovley, 2002). Nevertheless, in these environments, the macro-faunal activities such as foraging, burrowing and ventilation, mixes sediments and enhances oxygen supply in the bulk anaerobic sediments, modifying the distribution of electrons acceptors and increases the surface area for diffusive exchange (Boudreau and Marinelli, 1994). These biological reworking activities influence the microbial community structure (Kogure and Wada, 2005; Satoh *et al.*, 2007; Bertics and Ziebis, 2009), and supply oxygen in anoxic sediments or spatial redistribution of particles leading anoxic sediments particles into the oxic surface of sediments can impact the anaerobic microbial communities, and notably sulfate-reducing micro-organisms. Moreover, burrowing activities also change the physico-chemical condition of sediments, topographic conformation of the water/sediment interface and also the strength of the surface sediments in the upper few centimeters, leading to their destabilization and increasing erodibility (de Deckere *et al.*, 2001) under the action of waves and currents. Consequently, resuspension events which can be followed by deposition events modify spatially and temporally the oxic/anoxic interface, generating anoxic/oxic oscillating conditions for the inhabiting microbial communities.

Nevertheless, the sulfate-reducing micro-organisms (SRMs) diversity and structure dynamic have been rarely studied in these environments, especially when exposed to oil contamination. Only few studies investigated the behaviour of SRMs in bioturbated sediments after exposition to petroleum (Miralles *et al.*, 2007; Stauffert *et al.*, 2013; Stauffert *et al.*, 2014). Stauffert *et al.* (2013) showed that rRNA 16S sequences related to SRMs were well represented among the total identified sequences from oil-contaminated sediments microbial communities irrespective to the enhanced macro-fauna population. However, Stauffert *et al.* (2014) observed that enhancing the bioturbation activity by the addition of *Hediste diversicolor* resulted in a distinct SRMs community structure. Because of the influence of burrowing organisms on microbial communities is not only due to the anoxic/oxy oscillations generated by their burrowing activities, the direct impact of anoxic/oxy oscillating conditions on SRMs communities have so never been described. Improving the knowledge on dynamic responses of SRMs, from polluted sediments, to anoxic/oxy oscillating conditions will permit a better understanding on the SRMs assemblage and their key roles in hydrocarbons elimination from environments subjected to these conditions.

In this context, this work aims to decipher the ecological responses of three different microbial communities from oil-polluted intertidal sediments to anoxic/oxy oscillating conditions, with a focus on SRM functional group. The characterization of the active bacterial and SRMs communities during bioreactors experiments under anoxic/oxy oscillating conditions were followed by sequencing the 16S rRNA transcripts and the functional gene *dsrB*. The comparative study of their behaviour in anoxic/oxy oscillating conditions offer an unprecedented opportunity to gain crucial information for understanding the parameters driving the organization of bacterial and SRM communities and the impact on the biodegradation capacities, in environments subjected to these conditions.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Hydrocarbonoclastic microbial communities sampling

Mesocosms incubations of intertidal sediments from the tidal basin Aber-Benoît (Tréglonou, 48° 33'12.40''N; 4° 32'8.69''W, in the Brittany region, France) were set up in an automated experimental device recreating tidal cycles (Stauffert *et al.*, 2013). Three different hydrocarbonoclastic microbial communities were obtained exposing these sediments to different treatments. Sediments were either subjected to petroleum (24 ± 4 mg/g of total hydrocarbons, OURAL) or to petroleum with the addition of burrowing organisms (multiplication by 50 of the

initial population corresponding to $1267 \pm 16 \text{ ind.m}^{-2}$, knowing that in natural environments the density of organisms can be from 50 to 5000 ind.m^{-2} (Kristensen, 1988)) or to petroleum combined with harrowing (once a week, up to 6 centimeters depth). The duration of the incubations depended on the hydrocarbons content following by GC-MS analysis. After 5 months of incubation, the biodegradation capacity had been highlighted within the mesocosms subjected to petroleum + harrowing, by a decrease of the biodegradation index: the $n\text{-C}_{17}$ /pristane and the $n\text{-C}_{18}$ /phytane ratio. The surface of sediments impacted by harrowing was collected and stored at 6°C in the dark during 10 days with surface water oxygenated by bubbling with filtered air (0.20µm PTFE filters, Fisher Scientific) before the initiation of the bioreactors experiment. In the same way, sediments from mesocosms subjected to petroleum or to petroleum with the addition of burrowing organisms were taken off after 8 and 9.5 months of incubation, respectively. These three treatments permitted to obtain three microbial communities showing different structures, which were named communities: “*Petroleum*” (P), “*Petroleum + burrowing organisms*” (PB) and “*Petroleum + harrowing*” (PH).

2.2.2. Bioreactor experiments set up and experimental conditions

For each community, bioreactors experiments were set up as described below in batch series of nine bioreactors. A slurry of sediments was made with 20 % (w/v) of mightily stirred sediments in suspension in minimum medium of natural filtered sea water (MFTM filter of 0.45µm pores size, Millipore), at pH 7.2 (Terrisse *et al.*, 2014; *in press*). The slurry was distributed in the nine bioreactors (with a working volume of two liters, in batch conditions with stirring at 250 r.p.m.; Stuart SS20) to apply the three conditions: anoxic/oxic oscillating conditions in comparison to permanent oxic or anoxic conditions, in triplicates. The incubations were carried out during fifteen days in the dark at room temperature (ranging from 17 to 24°C, InPro6800 sensors, Mettler Toledo International Inc.). Incubations in oscillating conditions were performed in anoxic conditions during 15 days with 2 periods of aeration of 1 day at the days 7 and 10, and compared to incubations in permanent oxic or anoxic conditions, performed at the same time. The different conditions were obtained as described by Terrisse *et al.* (*in prep.*). After a period of 5 days for the stabilization of the system, petroleum was added in all the bioreactors at the final concentration about $21.2 \pm 5.7 \text{ mg/g}$ of dry weight sediments.

During experiments, redox potential/pH and dissolved oxygen saturation were measured twice a day (InPro 4260i/SG/225 sensors and InPro6800 sensors, respectively, connected to M300 ISM multipar transmitters; Mettler Toledo International Inc.).

2.2.3. Hydrocarbon analysis

Chemical analysis to estimate the hydrocarbons content were performed on 10 mL of slurry samples from each reactor (biological replicates per condition) along the incubation (at days 5.4 -10 hours after petrol addition-, 10 and 15 for permanent anoxic conditions and at days 5.4, 7, 8, 10, 11 and 15 for permanent oxic and oscillating conditions; sampling rounds at intermediate times were done before a switchover). From sampling time to analysis, the slurry samples were stored at -20 °C, in amber glass bottles with polytetrafluoroethylene stopper (WHEATON).

The samples preparation for chemical analyses of the sediments phase after filtration of the slurry sample (glass microfiber filters 0.7 µm pore size, grade GF/F, Whatman), was performed as described by Terrisse *et al.* (*in prep.*). The extractions of hydrocarbons were performed on the dry sediments samples spiked with 100 µL of a solution containing five perdeuterated PAHs (210 µg/mL of d₈-naphthalene, 210 µg/mL of d₁₀-phenanthrene, 110 µg/mL of d₁₀-biphenyl, 40 µg/mL of d₁₂-benzo(a)pyrene and 40 µg/mL of d₁₂-chrysene,; Sigma-aldrich, USA) and 100 µL of a solution of perdeuterated eicosane (*n*-C₂₀d₄₂) at 1000 µg/mL, as internal standards. The Dionex™ ASE™ 350 Accelerated Solvent Extractor system (Thermo Scientific™) was used, realizing two cycles of extraction with dichloromethane solvent per sample, at elevated pressure (1600 Psi) and temperature (100 °C), during five minutes each. Organic extracts were totally dry going through sodium sulfate anhydrous (activated at 400 °C during 4 hours) before to be concentrated to 2 mL using a Syncore (Büchi, Germany). Samples analyses were performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) as it was described by Terrisse *et al.* (*in prep.*), using an HP 6890N (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) connected to an HP 5973 Mass Selective Detector (MSD). Single Ion Monitoring mode, with the most representative fragment (saturates) or the molecular ion (PAH) of each compound at a minimum of 1.4 cycles/s, was used to perform *n*-Alkanes and PAH semi-quantifications.

Interpretation of the GC/MS chromatograms obtained from samples and calibration range analysis (for *n*-alkanes with TRPH Standard from 0.5 to 50 µg/mL, Ultra Scientific, Florida; for PAHs with CUS-9306 Standard from 0.25 to 25 µg/mL, LGS Standards, France), was done using the Chemstation software in order to quantify *n*-alkanes and PAHs contents relatively to internal standards and to calculate alkanes and PAHs biodegradation indexes.

2.2.4. Total DNA and RNA co-extraction

For the manipulation of biological materials for molecular analyses, only RNase-free certified plasticware was used and all solutions were prepared with sterile diethyl pyrocarbonate

(DEPC)-treated water. A rRNA stabilizing solution was made by mixing 5 mL of 1 M acetate buffer pH 5.5 (adjusted with acetic acid) with 5 mL of phenol. After separation of the two phases by centrifugation during 3 minutes at 4000 g, 95 mL of pure ethanol was added to the phenolic phase. This solution (190 μ L) was added into 1.5 mL of slurry sampling from each reactor (biological replicates per condition) at days 0, 5 (before oil addition), 5.4 (10 hours after oil addition), 7, 8, 10, 11 (at these times, sampling were done before the switchover) and 15 days; then, eliminated from samples with the supernatant by centrifugation at 4 °C for 5 minutes at 10,000 g (Jouan MR 1812). Samples were frozen immediately in liquid nitrogen to be then stored at -80 °C, until extraction.

The extractions were performed with the commercial RNA PowerSoil ® Total RNA Isolation Kit (MoBio Laboratories) according to the manufacturer's instructions until suspension of total nucleic acids in SR5 buffer (100 μ L), after precipitation with ethanol 70 %. The commercial Allprep DNA/RNA Mini Kit (QIAGEN) was then used for the separation and purification of DNAs and RNAs, following the manufacturer's recommendations. Separated elution of genomic DNAs and RNAs molecules was done with DNase/RNase-free sterilized MilliQ water (100 μ L). The quality and the size of DNAs and RNAs extracts were analyzed by electrophoresis on 1 % agarose gel and by micro-capillary electrophoresis (only for RNAs extracts) performed by an Agilent 2100 Bioanalyzer using RNA 6000 Nano LabChips kit (Agilent Technologies). RNAs extracts shown a RNA Integrity Numbers (RIN) between 7 and 8.5, corresponding in good quality of RNAs molecules. The DNAs and RNAs extracts were stored at -80 °C.

2.2.5. Reverse transcription of total RNA

Reverse transcription (RT) was performed on RNA extracts previously treated with Turbo DNA free kit (Ambion, Applied Biosystems) following the manufacturer's advices. The RT reaction (final volume of 20 μ L) was performed with 10 to 60 ng of RNA per sample adding 10 ng/ μ L of random hexamers (Roche), 0.5 mM of dNTPs, 40 U of RNase OUT (Invitrogen by Life Technology), 200 U of the *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase* (M-MLV, Invitrogen by Life Technology), 0.01 M of DTT and 1 X enzyme buffer, according to the manufacturer's recommendations. RT products were used directly for PCR amplifications or stored at -80 °C until further utilization.

2.2.6. Quantitative-PCR amplifications

For quantification of *dsrB* genes and transcripts copy numbers, DNA and cDNA were amplified using the primers dsrp2060F/4R (Wagner *et al.*, 1998; Geets *et al.*, 2006). The DNA and cDNA samples were diluted to $1/100^{\text{th}}$ and to $1/10^{\text{th}}$ respectively, before amplification. Quantitative Polymerase chain reaction (Q-PCR) was performed with the Roch LightCycler 480 Real Time PCR system, using the LightCycler® 480 SYBER GREEN I Master mix, as described by Terrisse *et al.* (*in prep.*). The results obtained by Q-PCR were analyzed using the LightCycler 480 Software with absolute quantification method. DNA concentrations was expressed in copies number per μL of extracts solution, relatively to calibration curves (from 10^5 to 10^1 copies) and then normalized by the amount of dry sediments used for the extraction. The *dsrB* genes expression rates were estimated by calculating the ratio of the number of copies of the transcripts divided by the number of copies of the gene.

2.2.7. Bacterial diversity analysis

An analysis of the bacterial diversity during incubations in bioreactors was undertaken by the sequencing of the 16S rRNA amplicons, from DNA samples extracted at days 0 (mixture of 3 extracts samples), 5.4 and 15, and from cDNA samples extracted at days 0 (mixture of 3 extracts samples), 5, 5.4, 7, 8, 10, 11 and 15. Approximately 0.4 μg of DNA and 0.02 μg of cDNA (per sample) were used for 454-pyrosequencing analysis of amplicons, which were performed by the Molecular Research DNA laboratory (MR DNA, Texas, USA), according to the procedure described by Dowd *et al.* (2008). The variable regions V1-V3 were targeted using 16S universal bacterial primers 27Fmod (5'-AGRGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 519Rmodbio (5'-GTNTTACNGCGGCKGCTG-3'). The equipment and reagents Roche 454 FLX titanium were used to perform sequencing following the manufacturer's instructions.

The open source software QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) was used following the approach described by the tutorial on data processing 454 for the raw data processing (Caporaso *et al.*, 2010). The raw data cleaning was first performed (Quince *et al.*, 2009) by denoising of the data and by elimination of chimeras and sequences of length less than 450 bp, containing errors in the primers or homopolymers. The sequences reads were aligned with a sequence length of 400 bp. The data OTU picking was performed according to the method Usearch (Edgar, 2010), by setting reference sequences at the similarity threshold of 0.97. The allocation of the Taxonomy was performed by comparing the reference sequence to a database of known sequences of 16S rRNA genes, the Ribosomal Database Project (RDP) database. The

OTUs abundances per samples were normalized to the same number between samples (either 3102 sequences corresponding to the minimum read number observed between samples). This standardization was carried out with the vegan package (Oksanen *et al.* (2013); Version : 2.0-10) on the software R.

2.2.8. Functional gene *dsrB* diversity analysis

The diversity of sulfate-reducing micro-organisms was also investigated by sequencing of *dsrB* gene amplicons from cDNA samples obtained from days 0 (mixture of 3 extract samples), 5, 7, 8, 10, 11 and 15 during bioreactors incubations under oscillating, permanent oxic and anoxic conditions. A first PCR was performed with the primers dsrp2060F (Geets *et al.*, 2006) and dsr4R (Wagner *et al.*, 1998), containing Illumina adapters. The amplification reaction was performed in an automated thermocycler (PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJ Research) with the following program: 95 °C for 10 minutes, followed by 35 cycles at 95 °C for 45 seconds, 54 °C for 45 seconds and 72 °C for 1 minute, and a final step at 72 °C for 5 minutes. These amplicons were then sequenced using the 250-MiSeq paired-end (Illumina) technology by the genomic platform *Genotoul* (Toulouse, France). Multiplexes were performed using index sequences which were added to the antisense primer in the second PCR with 12 cycles targeting sequences of the adapters. The PCR products were purified and loaded in the MiSeq Illumina cartridge according to the manufacturer's instructions. After sequencing, the quality was checked using PhiX software: each sequence was affiliated to the sample using the index sequence.

The Mothur open source software was used, via *Genotoul* platform computing (Toulouse, France), for the raw data processing. The approach used in the treatment of sequence reads was described by the tutorial of processing data generated by a MiSeq Illumina platform (http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP, page accessed in late August 2014) reported by Kozich *et al.* (2013). The retrieved sequences, were then translated by the RDP's functional gene and repository FrameBot tool, aligned to SRM's (bi)sulphite reductase reference sequences retrieved from the FunGene references database of RDP, to detect and correct the frameshift errors and eliminate short sequences and/or having a bad alignment, as processed by Zeleke *et al.* (2013). The data OTU picking was performed from final quality nucleotide sequences subsampled at the same number of sequence reads per samples (corresponding to the minimum read number observed between samples), according to the method described by Kozich *et al.* (2013), at the similarity threshold of 0.90 (Kjeldsen *et al.*, 2007), in Mothur. BLASTx analyses

were performed against SRM's sulfite reductase reference sequences from NCBI database. The OTUs abundances per samples were rarefy to 3102 sequences per samples, using the vegan package (Oksanen *et al.* (2013); Version : 2.0-10) on the software R.

2.2.9. Statistical analysis

The effects of the community origin (community "*Petroleum*", "*Petroleum + harrowing*" and "*Petroleum + burrowing organisms*"), the incubation conditions (oscillating, permanent oxic or permanent anoxic conditions) and time and all interactions among these three factors, on the variability of the measured variables: expression rates of the studied genes, biodegradation ratios, the coverage values and univariate diversity indexes (richness and Shannon's diversity; indexes which were estimated with R and Mothur software), were tested by two multifactorial analysis of variance. A linear mixed model was first performed with the effects of the community origin, the condition and the time (and their interactions) as fixed factors and a random factor to take into account the effect of repeated measurements over time, that is to say, the non-independent nature of the various samples in bioreactors (lme function in R package nlme). A second linear model was conducted by testing the same factors as fixed factors but without taking into account the random factor (lm function in R). To test the effect of the random factor, analysis of variance (ANOVA) has shown no significant difference between these two models, the linear model without repeated measurement was chosen. The logarithmic transformation of the numeric variable was sometimes necessary so that the residuals follow a normal distribution. ANOVA and Tukey's HSD tests (Honest Significant Difference) were carried out following the performing of linear models to compare between each other the different modalities of the various factors and highlight significant differences.

Community composition of active bacteria and SRMs from the different communities under the different conditions of incubations, consisted of 16S rRNA and *dsrB* sequencing data, was analysed using non-metric multidimensional scaling (nMDS) implemented in Primer 6 (version 6.1.16) and Mothur software. For all nMDS ordinations, the Bray-Curtis distance measure was used to generate dissimilarity matrices. Confidence ellipses, included in ordinations, were based on cluster analyses (Primer 6 software; version 6.1.16).

The pairwise co-occurrence patterns from the major OTUs (represented by more than 1% of total number of sequences per samples) from the three bacterial communities under anoxic/oxic oscillations was calculated with the R package *cooccur*. This function classified the OTUs pairs as having positive, negative, and random associations, applying the probabilistic

model of species co-occurrence described by Veech (2013). Results were represented in a co-occurrence matrix.

2.3. Results and discussion

2.3.1. Structural responses of the different bacterial communities under different conditions of oxygenation

The structural response to different oxygenation conditions of incubation, of three bacterial communities with different structures, was first investigated by pyrosequencing analysis based on 16S rRNA transcripts. A structuration of the bacterial communities according to incubation conditions (oxic, anoxic and oscillating) was observed; without the possibility to make out separately the three communities (Figure 43). Irrespective to the initial community, oxygen input induced a rearrangement of active bacterial community structures. The ensuing stress for the bacteria led to the selection of the more adapted bacteria as it was observed previously (Vitte *et al.*, 2011; Vitte *et al.*, 2013). The structural rearrangement occurring within a bacterial community exposed to different conditions appears more important than the structural difference between the three communities subjected to the same oxygenation conditions. However, at the end of incubation in oscillating conditions, different structural organizations were observed according to the initial communities: “*Petroleum*”, “*Petroleum + burrowing organisms*” and “*Petroleum + harrowing*”, which suggested different rearrangements of these communities in response to anoxic/oxic oscillations.

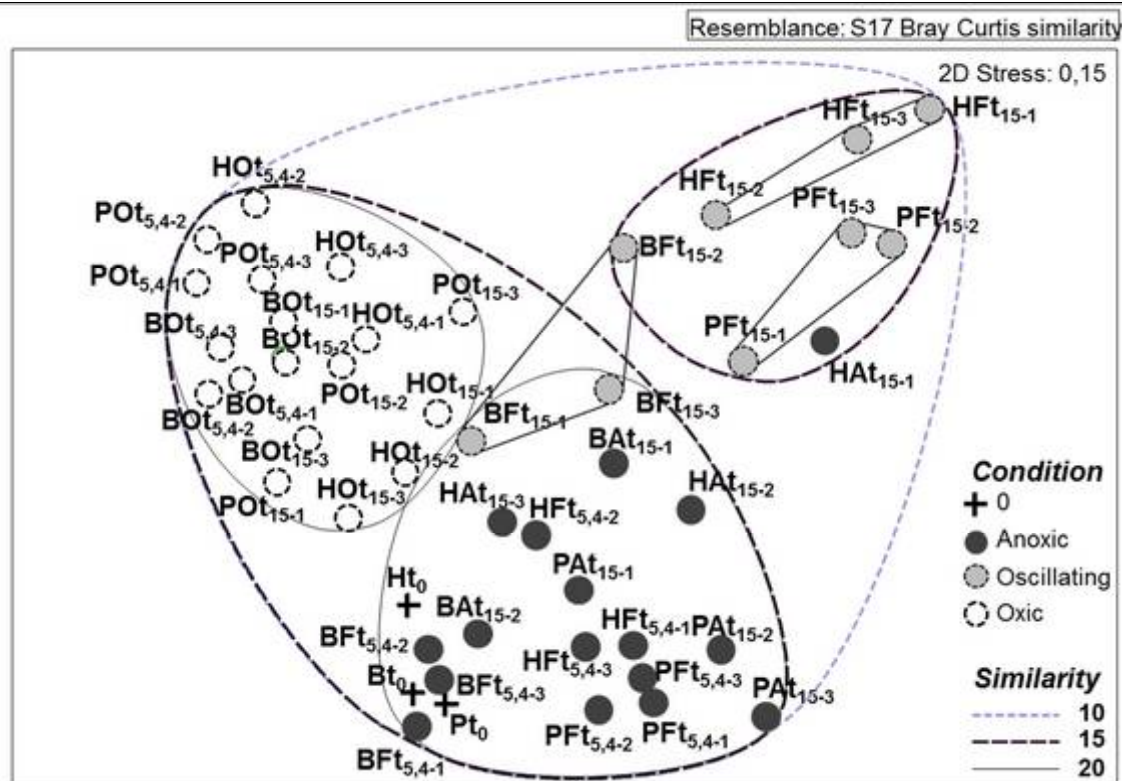


Figure 43 : Comparison of the structure of the three metabolically active bacterial communities: “*Petroleum*”, “*Petroleum + Harrowing*” and “*Petroleum + Burrowing organisms*” during bioreactors incubations under oscillating (grey symbols), permanent anoxic (filled black symbols) or oxic (white symbols with black dotted surrounding) conditions. Non parametric Multidimensional Scaling (nMDS) based on pyrosequencing data from 16S rRNA transcripts. Confidence ellipses, included in ordination, were based on cluster analyses using Bray-Curtis distance measures: solid, long dotted and short dotted lines represent 20, 15 and 10% of similarity, respectively.

2.3.2. Different structural responses of the metabolically active bacterial communities under anoxic/oxic oscillating conditions and influence on the hydrocarbon-degradation capacities

When the structure of the 3 metabolically active bacterial communities were compared during the oscillating conditions (Figure 44), different structures were observed according to the initial communities “*Petroleum*”, “*Petroleum + burrowing organisms*” and “*Petroleum + harrowing*”, with rearrangements during incubations.

The first period of aeration modified their structure while the second only impacted the structure of the community “*Petroleum*”. These observations suggested that the community “*Petroleum*” was less adapted to the oscillating conditions than the two other communities, probably due to the different microbial composition between the three communities that may correspond to different capacities in response to a perturbation. Indeed, a disturbance causes generally a different response depending on the composition and capabilities of the microbial community (Allison and Martiny, 2008; Nogales *et al.*, 2011). An adapted community can show

resistance to disturbance leading to relative maintenance of its structure, dependent on the intensity of the disturbance (Degens *et al.*, 2001; Philippot *et al.*, 2008).

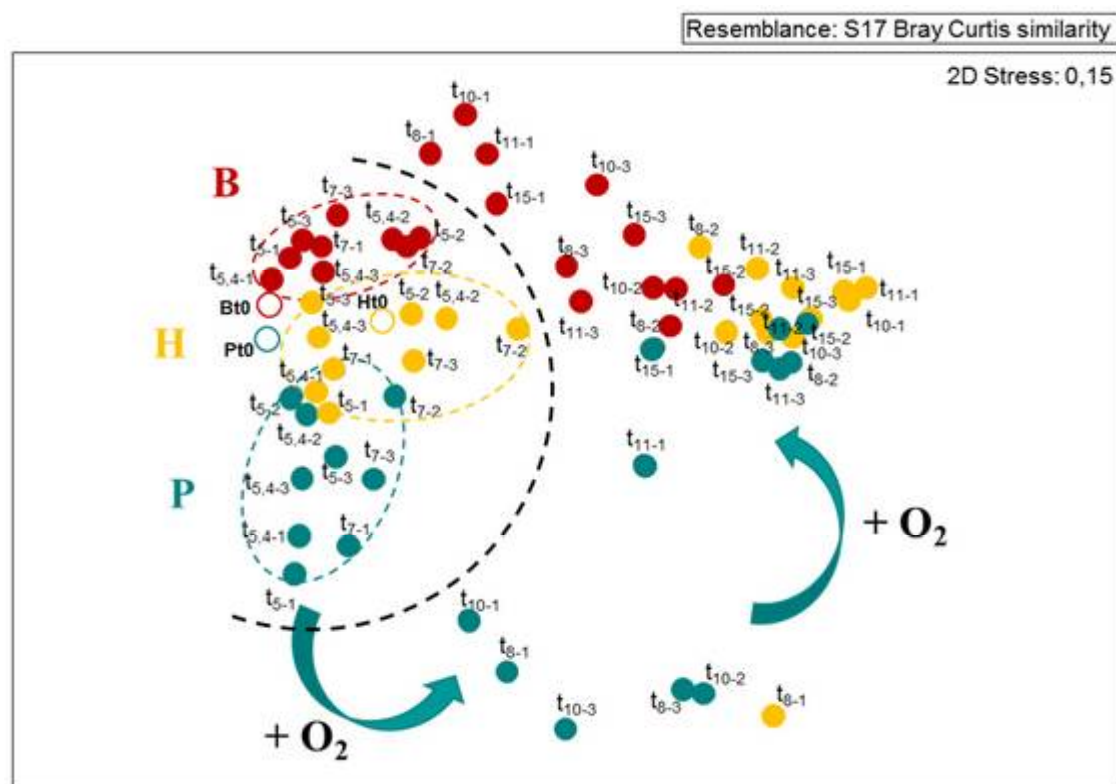


Figure 44: Comparison of the structure of the three metabolically active bacterial communities: “Petroleum” (green circles), “Petroleum + Harrowing” (yellow circles) and “Petroleum + Burrowing organisms” (red circles) during bioreactor incubations under anoxic/oxic oscillating conditions. Non parametric Multidimensional Scaling (nMDS) based on pyrosequencing data from 16S rRNA transcripts. Green arrows shows the periods of aeration.

In order to estimate whether the different structures induced different hydrocarbons biodegradation efficiencies, the hydrocarbons-degradation capacities of the three communities was investigated under anoxic/oxic conditions. From the determination of the chemical composition of the mostly biodegradable fraction (*n*-alkanes and PAHs) resolved by GC-MS, some biodegradation indexes were calculated (Figure 45).

With the assumption that linear alkanes are more sensitive to microbial degradation than alkylated alkanes (McKenna and Kallio, 1971), the *n*-C₁₇/pristane ratio were calculated (Figure 45) in order to assess the alkane biodegradation capacities (Sauer and Boehm, 1991; Singh *et al.*, 2014). The ratio significantly varied with the time (*p*-value < 0.05) but not between the communities. It was reduced significantly at day 11 for the communities “Petroleum” and “Petroleum + harrowing” (*p*-values < 0.05) while the ratio did not decrease significantly for the community “Petroleum + burrowing organisms”. The “Petroleum” and “Petroleum + burrowing organisms” communities showed similar alkane degradation kinetics with a *n*-C₁₇/pristane ratio decreasing progressively during incubation independently of the anoxic or oxic periods.

Differently, during “*Petroleum* + *harrowing*” incubations, the n -C₁₇/pristane ratio mostly decreased during the first period of aeration showing major implication of aerobic metabolisms in alkanes biodegradation within this community.

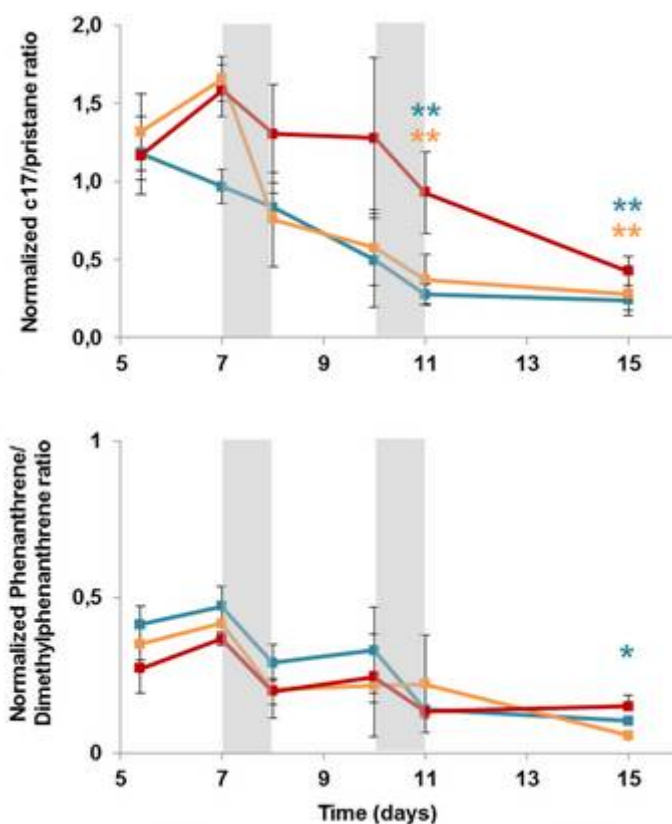


Figure 45: The ratio: n -C₁₇/Pristane and Phenanthrene/Dimethylphenanthrene were followed in order to assess the hydrocarbons-biodegradation capacities during the incubations under oscillating conditions. The ratio are compared between the communities “*Petroleum*” (green lines), “*Petroleum* + *burrowing organisms*” (red lines) and “*Petroleum* + *harrowing*” (yellow lines). The two shaded periods correspond to the aerated periods. Star show a significant difference according to Tukey HSD test (p-value < 0.05) compared to the value at 10 hours after oil addition (day 5) from the considered community.

PAHs biodegradation indexes were calculated considering that the alkylated compounds are considered less biodegradable than the parent compounds (Michel and Hayes, 1999; Elango *et al.*, 2014). The phenanthrene/dimethylphenanthrene ratio (Figure 45) shown similar degradation kinetics between the three incubations under anoxic/oxic oscillating conditions although the ratio decrease was only significant for the “*Petroleum*” community (p-value < 0.05) at the end of the incubation. The phenanthrene degradation was effective during the aeration periods, suggesting that oxygen input generate a rapid phenanthrene-biodegradation response, suggesting involvement of aerobic bacteria probably via dioxygenases activities in the phenanthrene short-term biodegradation under oscillating conditions, as it was previously proposed by Vitte *et al.* (2013).

2.3.3. Different microbial compositions explaining the different ecological responses to anoxic/oxic oscillations

In order to characterize and compare the bacterial responses to anoxic/oxic oscillations, the metabolically active bacterial composition of each bacterial community was determined along incubations in these conditions by 16S rRNA transcripts sequencing. With Good's coverage values higher than 0.80, the diversity of the metabolically active bacteria was efficiently assessed during incubations in bioreactors experiment with the 3K average number of reads per assay. The richness and the α -diversity (Shannon diversity index) significantly varied with the time (p-value < 0.05) for the three communities without significant differences between them. The first period of aeration generated a disturbance in bacterial communities which resulted in a decrease of the diversity indexes, from 3.0 ± 0.5 to 1.5 ± 0.2 , from 3.8 ± 0.2 to 1.2 ± 0.4 and from 4.0 ± 0.2 to 2.7 ± 0.3 , for the communities "*Petroleum*", "*Petroleum + harrowing*" and "*Petroleum + burrowing organisms*" respectively, showing a selection of the most adapted bacteria to the conditions.

An important proportion of sequence reads identified corresponded to unclassified sequences at the genus level: 50 %, 45 % and 64 % of the sequences identified during incubations under oscillating conditions for the communities "*Petroleum*", "*Petroleum + harrowing*" and "*Petroleum + burrowing organisms*" respectively, highlighted the high microbial diversity in coastal marine sediments that still to be explored. Focusing on the OTUs relative abundances that were affiliated to identified genus (Figure 46), different bacterial composition of the 3 communities were observed at the beginning of the experiment, corresponding to anoxic conditions before performing aeration cycles. During this period, the community "*Petroleum*" was mostly represented by sequences affiliated to the *Ilyobacter* genus (up to 50 % of affiliated sequences), corresponding to strictly anaerobic bacteria previously observed in marine sediments (Brune *et al.*, 2002) but its implication in hydrocarbons degradation has not been demonstrated. This genus was also detected in the community "*Petroleum + harrowing*" but in lower abundance (less than 10 % of the affiliated sequences). The genus *Desulfosarcina* was detected in the 3 communities, in which some key alkane-degraders were highlighted (Kleindienst *et al.*, 2014). Others genus related to sulfate-reducing bacteria were detected within the community "*Petroleum + burrowing organisms*" such as *Desulfonema* and *Desulfopila*, among majors genus identified within the communities before performing anoxic/oxic cycles. These different bacterial compositions between the "*Petroleum*", "*Petroleum + harrowing*", "*Petroleum + burrowing organisms*" communities were maintained until the day 7 of the incubations before oxygenation oscillations.

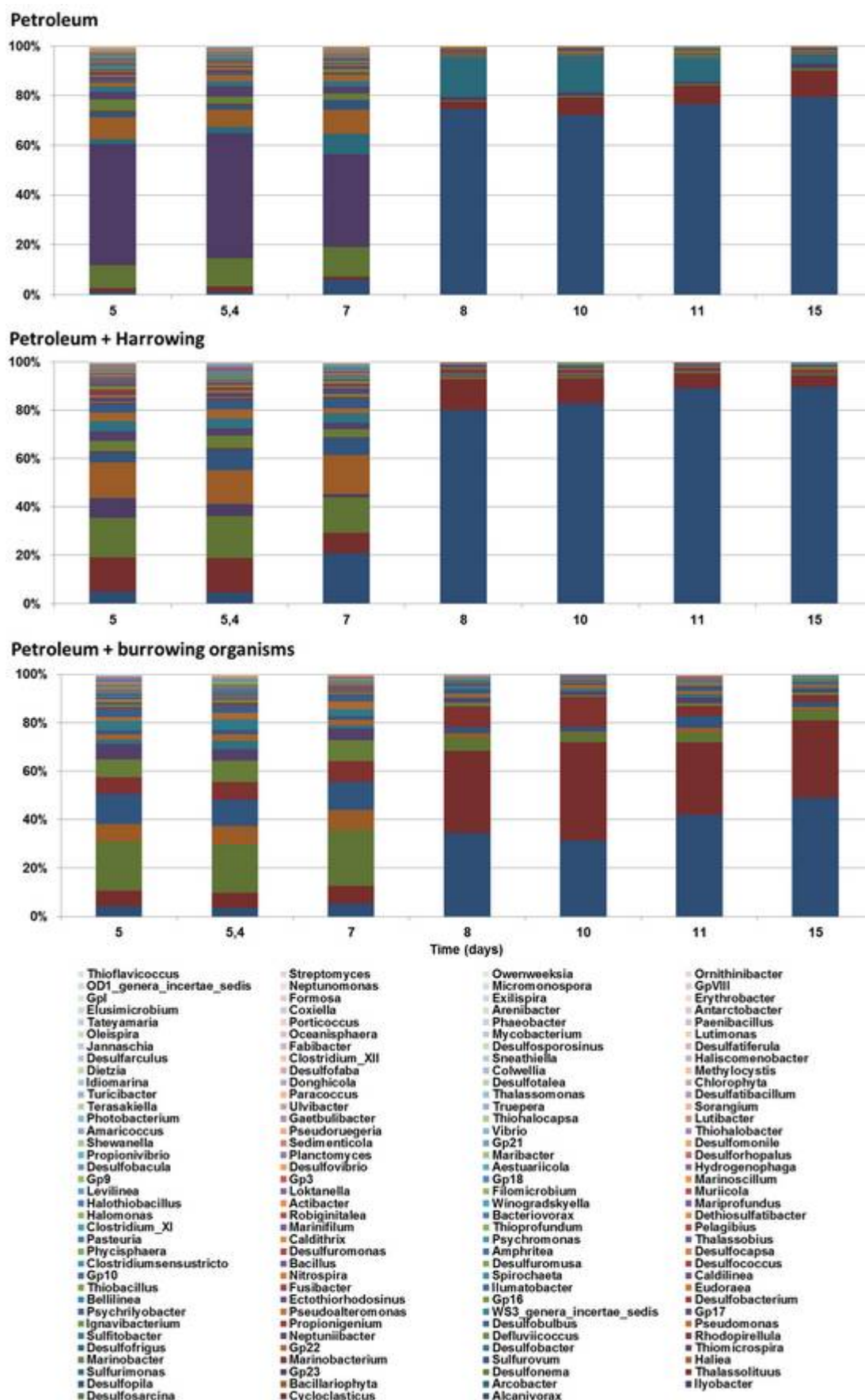


Figure 46: Relative abundance at genus level of the sequences reads affiliated at this level, for the communities “Petroleum”, “Petroleum + harrowing” and “Petroleum + burrowing organisms” subjected to anoxic/oxy oscillating conditions.

The oxygen input modified dramatically the composition of the 3 communities. An increase of the relative abundances of sequences related to *Alcanivorax* genus was observed; from less than 5 % of sequences affiliated at genus level at the day 5 for the 3 community to up to 45 %, 80 % and 90 % at the end of incubations for the communities “*Petroleum + burrowing organisms*”, “*Petroleum*” and “*Petroleum + harrowing*” respectively. Also the relative abundance of sequences related to *Cycloclasticus* genus, increased predominantly for the community “*Petroleum + burrowing organisms*” to represent up to 20 % of the sequences. Sequences related to *Arcobacter* genus were also detected with a higher relative abundance after oxygen input for the “*Petroleum*” community. Isaac *et al.* (2013) isolated consortia of indigenous marine bacteria with the capability to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from polluted sediment samples, including bacteria affiliated to the genus *Arcobacter*, but the direct implication of members of this genus in hydrocarbons degradation has not been yet evidenced.

The higher abundance of sequences related to *Alcanivorax* genus, whose members are known as obligate alkane degraders (Harayama *et al.*, 2004), for the communities “*Petroleum*” and “*Petroleum + harrowing*” than for the communities “*Petroleum + burrowing organisms*” coinciding with a higher *n*-C₁₇/pristane ratio decrease, suggested an implication of this genus in alkanes removal from the systems.

Moreover, the strictly aerobic *Alcanivorax* spp., which degrade straight-chain and branched alkanes (Harayama *et al.*, 2004; Kostka *et al.*, 2011), and *Cycloclasticus* spp., which degrade PAHs (Harayama *et al.*, 2004; McKew *et al.*, 2007; Teira *et al.*, 2007) were largely described as key degraders in oil-contaminated marine ecosystems, with the large increase in their abundance following an oil-spill (Röling *et al.*, 2002; Röling *et al.*, 2004; Staley, 2010; Coulon *et al.*, 2012; McGenity *et al.*, 2012). However, almost all the studies, have been highlighted their implication in hydrocarbons degradation under oxic conditions. Here, a large increase of the relative abundance of sequences related to these genus was observed after the aerated period (occurring after 7 days in anoxic conditions), and these high relative abundances remained stable until the end of experiments despite the two periods of anoxia. These observations, which were done for the three different bacterial communities, suggest that these genus can play a major role in coastal sediments, being stimulated by reoxydation events due to sediments resuspension or bioirrigation/ventilation of macrofaunal burrows (favoring aerobic processes; Berthe-Corti and Höpner (2005)), not only being restricted to the intertidal biofilms (Coulon *et al.*, 2012) and/or to the oxic surface of sediments.

2.3.4. Co-occurrence analyses to assess to the global organization of the main OTUs within the microbial network under anoxic/oxy oscillating conditions

The global organization of the bacterial community network under oscillating conditions was investigated by comparing the presence/absence patterns of the majors OTUs (represented by more than 1% of total sequences number per sample) from the communities “*Petroleum*”, “*Petroleum + harrowing*” and “*Petroleum + burrowing organisms*”, when they are subjected to anoxic/oxy conditions. A co-occurrence analyze was performed to highlight the OTUs pairs having positive, negative, and random associations (Veech, 2013) during incubations under anoxic/oxy oscillating conditions (Figure 47). From 77 OTUs analyzed, giving 2926 OTUs pair combinations, 110 pairs (3.76 %) were removed from the analysis because expected co-occurrence was lower than 1 and 2816 pairs were analyzed. The most part of associations were identified as random associations (2507 pair combinations), however non negligible part of associations was identified as positives (195) or negatives (111) associations (non-random associations corresponding to 10.9% of analyzed associations). Positives associations highlighted that OTUs related to sulfate-reducing bacteria occurred significantly together during incubations. In the same way, OTUs related to denitrifying bacteria shown positives associations. However, negative associations between OTUs related sulfate-reducing bacteria and OTUs related to denitrifying bacteria shown that when the conditions during incubations in anoxic/oxy oscillations are more favorable for a metabolic group, they are unfavorable to the other one. Also, it was recognized that the denitrification process is inhibited in the presence of sulfate in excess and especially sulfides in an amount of 0.3 mM (Sørensen *et al.*, 1980).

Anoxic/oxy oscillations generated oscillating changes of the redox status of the slurry, influencing availability of electrons acceptors, which can lead to fundamental changes in microbial metabolic lifestyles (DeAngelis *et al.*, 2010). Temporally oscillations between reduced and oxidized states of the sediments have been shown to result in a stronger coupling of the nitrification and denitrification processes in suboxic redox potential (Svensson and Leonardson, 1996; Stief and de Beer, 2002; Gilbert *et al.*, 2003; Laverock *et al.*, 2011), and also the sulfate-reducing process supplying oxidized compounds in lower redox potential (Bertics and Ziebis, 2010). In anoxic periods, the redox potentials being between -200 and -400 mV (Figure 48), conditions are more favorable for sulfate-reduction metabolisms (Jørgensen, 2000). While reoxydation of the slurry by the oxygen input, with redox potentials between -100 mV and +100 mV, redox conditions are optimal for denitrification metabolisms, observed by increasing abundances related to denitrifying bacteria at periods of aeration while abundance of sequences

related to sulfate-reducing bacteria decreased, for communities “*Petroleum*” and “*Petroleum* + *harrowing*” and a higher relative abundance of sequences related to sulfate-reducing bacteria was observed for “*Petroleum* + *burrowing organisms*” community.



Figure 47: Co-occurrence matrix of the major OTUs (represented by more than 1% of the total sequences per samples) from the three bacterial communities: “*Petroleum*”, “*Petroleum* + *burrowing organisms*” and “*Petroleum* + *harrowing*”, in anoxic/oxic oscillating conditions.

2.3.5. SRM communities dynamics in anoxic/oxy oscillating conditions

Several major metabolically active OTUs related to SRMs were identified among the “*Petroleum*”, “*Petroleum + harrowing*” and “*Petroleum + burrowing organisms*” metabolically active bacterial communities under anoxic/oxy oscillating conditions (Figure 46 and Figure 47), corresponding on 8%, 8% and 18% of total bacterial identified sequences respectively. As this anaerobic functional group was mostly involved in the biogeochemical transformations of carbon and sulfur in costal sediments its dynamics under anoxic/oxy conditions was investigated and compared between the three communities. The gene *dsrB*, coding for a subunit of the sulfite reductase involved in the dissimilarity reduction in oxidized sulfur species, was followed during incubations under oscillating conditions as this enzyme constitute a good target of this functional group, mostly used in the investigation of SRMs diversity in coastal sediments (Wagner *et al.*, 1998; Bahr *et al.*, 2005; Leloup *et al.*, 2005; Leloup *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2009; Giloteaux *et al.*, 2010; Stauffert *et al.*, 2014).

2.3.5.1. Activity comparison of SRM communities from the three microbial communities under oscillating conditions

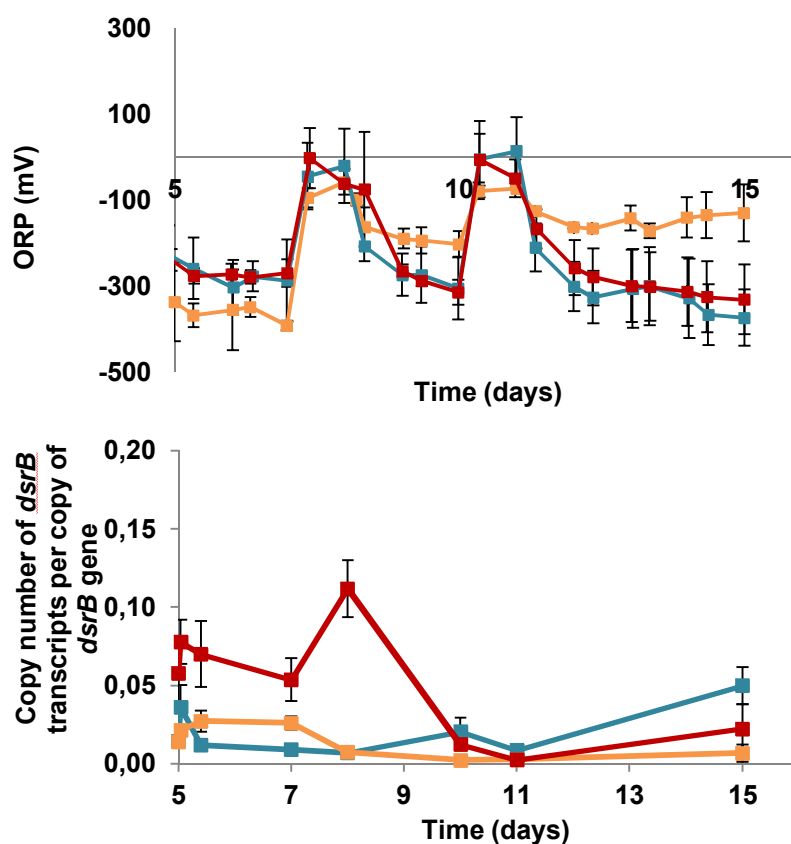


Figure 48: Redox potentials values and copy number of *dsrB* transcripts (during incubations of the communities “*Petroleum*” (green line), “*Petroleum + harrowing*” (yellow line) and “*Petroleum + burrowing organisms*” (red line) under anoxic/oxy oscillating conditions.

The influence of anoxic/oxic oscillations on the proportion of actives SRMs compared to global SRMs community was first examined by estimating the copy number of *dsrB* transcripts per copy of *dsrB* gene by quantitative PCR. The proportion of actives SRMs was lower after the first cycle of aeration for the community “*Petroleum*” and at the second cycle for the community “*Petroleum + burrowing organisms*”, while it remained stable for the community “*Petroleum + harrowing*” along incubations. Anoxic/oxic oscillations appeared to not affect in the same way the sulfate-reducing microorganisms from the 3 communities. While the activity of SRMs community wasn’t affected by oscillations for the “*Petroleum + harrowing*” community, the activity of some SRMs from “*Petroleum*” and “*Petroleum + burrowing organisms*” communities appeared inhibited by oxygen input.

2.3.5.2. Structure comparison of SRM communities from the three microbial communities during incubations

The SRMs actives communities structures for the three communities under anoxic/oxic oscillating conditions were examined by MiSeq sequencing of *dsrB* amplicons, and compared to those in permanent anoxic or oxic conditions in order to determine whether the impact of oxygen input on the actives SRMs abundance was also accompanied by a modification of the SRM communities structure, which explained different tolerance of SMRs to anoxic/oxic oscillations. With Good’s coverage values average at 0.82 ± 0.04 , the diversity of active SRMs was efficiently assessed during incubations in bioreactors experiment with the 3K average number of reads per assay. The estimation of the Bray-Curtis dissimilarity between the SMRs communities during incubations under the different conditions oxygenation couldn’t permit to dissociate samples between either community, condition or time. Unlike global metabolically active bacterial communities, the SRMs communities presented similar structure suggesting a stability of these microbial communities.

Until 1990, the MSRs were considered strict anaerobic organisms, since, studies of exposure of pure cultures of BSR to oxygen have shown that some of these micro-organisms were still viable after a few hours or even days exposure (Fukui and Takii, 1990; Kjeldsen *et al.*, 2004). More and more studies show that they are able to tolerate oxygen (Dilling and Cypionka, 1990; Cypionka, 2000; Dolla *et al.*, 2006; Santana, 2008).

2.3.5.3. Composition of SRMs community from the three communities under oscillating conditions

The composition of the active SRMs communities along anoxic/oxic oscillations was then characterized for the three communities, in order to identify the active SRMs assemblage under changing conditions. 97% of *dsrB* sequences reads identified were related to *dsrB* sequences related to SRMs belonged to the *Deltaproteobacteria* with a dominance of the *Desulfobacteraceae* (78%) and *Desulfobulbaceae* (13%). The diversity observed within the bioreactors experiments was consistent with several *in situ* studies whose previously shown that most of the commonly mesophilic SRB found in coastal habitats belonged to the *Deltaproteobacteria* with members of the *Desulfobacteraceae* and *Desulfobulbaceae*, which were often reported as the dominant SRB. Thus, they were highly suspected to be largely involved in the biogeochemical transformations of carbon and sulfur (Leloup *et al.*, 2005; Musmann *et al.*, 2005; Leloup *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2009).

However, an important proportion (83 %) of sequence reads sharing less than 95% amino acid sequence similarity with their closest relatives. The focus was made on the relative abundances of OTUs (threshold: 95% similarity in *dsrB* amino acid sequence), during anoxic/oxic oscillating incubations of the three communities: “*Petroleum*”, “*Petroleum + harrowing*” and “*Petroleum + burrowing organisms*” (Figure 49), allowing the affiliation at the genus level. To decipher ecophysiology of active SRMs during anoxic/oxic oscillating incubations will allow a better understanding of their key roles in coastal sediments ecosystems and involvement in hydrocarbons removal.

The relative abundances were show without performing the average between the biological replicates as along incubation it could be observed that bioreactors showed a different composition compared to other replicates. This was the case for the second replicate for the “*Petroleum*” community and the first one for “*Petroleum + harrowing*” community, these incubations globally showed different redox potentials during incubations than the incubations of the two other replicates from the same condition, up to a difference about 100 mV.

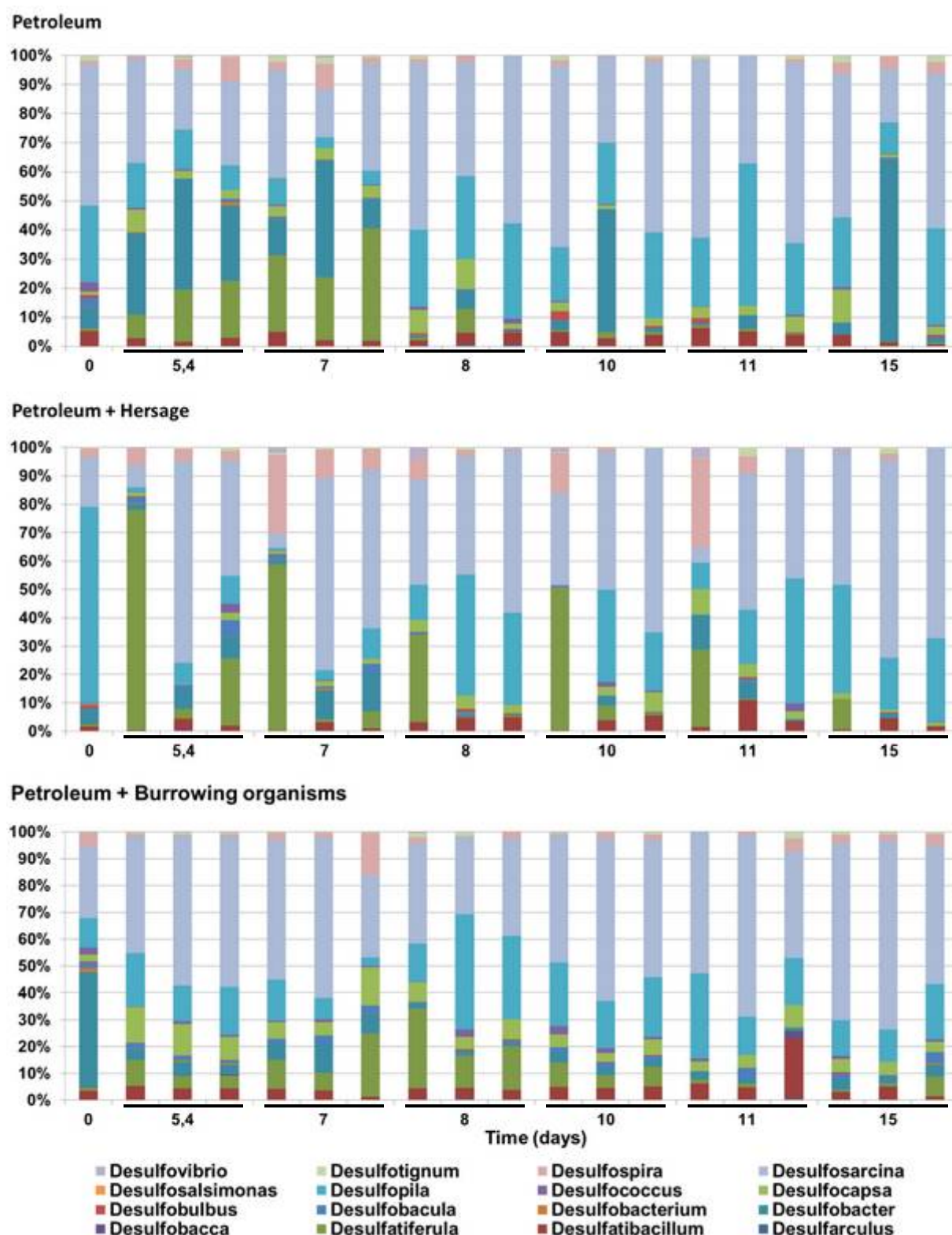


Figure 49 : Relative abundances during anoxic/oxic oscillating conditions of the three communities: “*Petroleum*”, “*Petroleum + harrowing*” and “*Petroleum + burrowing organisms*”, of OTUs whose the *dsrB* amino acid sequence shared more than 95% similarity with their closest relatives.

Different compositions were observed between the initial communities. Sequences related to *Desulfosarcina* were dominant for the community “*Petroleum*” and also observed in lower abundances for other communities. This genus became globally the most abundant along

incubations. *Desulfosarcina/Desulfococcus* constitutes a cluster of widespread marine SRMs whose utilization of short-chain hydrocarbons has been shown for isolated strains affiliated to this cluster (Kniemeyer *et al.*, 2007; Kleindienst *et al.*, 2014), but *Desulfosarcina* tolerance to oxygen has not been yet investigated. Dilling and Cypionka (1990) highlighted the capacity of *Desulfococcus multivorans* for oxygen respiration, and several related sequences have been detected in sediment oxic zone (Minz *et al.*, 1999)

The *Desulfopila* genus represented the most abundant genus within the initial active SRM community for “Petroleum + harrowing” also detected in other communities and which shown higher abundances during incubations becoming the second most abundant genus. *Desulfopila* members were reported to be active and present at rather high proportions in coastal sediments (Suzuki *et al.*, 2007; Gittel *et al.*, 2010). This genus are constituted by species characterized as strictly anaerobic (Suzuki *et al.*, 2007). However, its detection in an active state in presence of oxygen suggested more versatility of this genus than expected.

The genus *Desulfobacter* and *Desulfatiferula* were highlighted when the redox potential decreased up to about -400 mV. The genus *Desulfatiferula* contains members that had been described as able to degrade unsaturated aliphatic hydrocarbons (n-alkenes) (Cravo-Laureau *et al.*, 2004; Cravo-Laureau *et al.*, 2007).

Comparative analysis of SRMs communities between the different communities under anoxic/oxic oscillating conditions indicated that these particular conditions promote SRMs populations that tolerated these conditions. With identified members of the genus detected here known as hydrocarbons-degraders, these genus could play a role in the fate of pollutants in coastal ecosystems naturally subjected to anoxic/oxic oscillating conditions. The view that sulfate reducers are strictly anaerobic, changed with the demonstration of the occurrence of sulfate reduction in oxic environments and with the demonstration of oxygen tolerance of several strains (Muyzer and Stams, 2008) but several knowledge are needed to decipher their ecological implication in the complex ecosystems that are coastal environments.

2.4. Conclusion

The comparative study presented here, consisting to characterize the behavior of different microbial communities subjected to anoxic/oxic conditions after oil addition with a focus on SRMs communities. Microbial assemblage responding to anoxic/oxic oscillations could be highlighted and pointed out that some microorganisms were adapted and/or were able to respond

to dynamic environmental conditions inhabiting intertidal sediments. These observations allow to bring global view of the ecological microbial responses and factors governing the bacterial communities organization and consequently in their implication in determining the fate of petroleum pollutants in these environments.

2.5. References

- Aller, R.C. (1994) Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation. *Chemical Geology* **114**: 331-345.
- Allison, S.D., and Martiny, J.B. (2008) Colloquium paper: resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105 Suppl 1**: 11512-11519.
- Bahr, M., Crump, B.C., Klepac-Ceraj, V., Teske, A., Sogin, M.L., and Hobbie, J.E. (2005) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in a New England salt marsh. *Environ Microbiol* **7**: 1175-1185.
- Berthe-Corti, L., and Höpner, T. (2005) Geo-biological aspects of coastal oil pollution. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **219**: 171-189.
- Bertics, V.J., and Ziebis, W. (2009) Biodiversity of benthic microbial communities in bioturbated coastal sediments is controlled by geochemical microniches. *Isme Journal* **3**: 1269-1285.
- Bertics, V.J., and Ziebis, W. (2010) Bioturbation and the role of microniches for sulfate reduction in coastal marine sediments. *Environ Microbiol* **12**: 3022-3034.
- Boudreau, B.P., and Marinelli, R.L. (1994) A modelling study of discontinuous biological irrigation. *Journal of Marine Research* **52**: 947-968.
- Brune, A., Frenzel, P., and Cypionka, H. (2000) Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *Fems Microbiology Reviews* **24**: 691-710.
- Brune, A., Evers, S., Kaim, G., Ludwig, W., and Schink, B. (2002) *Ilyobacter insuetus* sp nov., a fermentative bacterium specialized in the degradation of hydroaromatic compounds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 429-432.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K. *et al.* (2010) *QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data*: Nat Methods. 2010 May;7(5):335-6. doi: 10.1038/nmeth.f.303. Epub 2010 Apr 11.
- Cifuentes, A., Anton, J., Benlloch, S., Donnelly, A., Herbert, R.A., and Rodriguez-Valera, F. (2000) Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1715-1719.
- Coates, J.D., Woodward, J., Allen, J., Philp, P., and Lovley, D.R. (1997) Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3589-3593.
- Coulon, F., Chronopolou, P.-M., Fahy, A., Paise, S., Goni-Urriza, M., Peperzak, L. *et al.* (2012) Central role of dynamic tidal biofilms dominated by aerobic hydrocarbonoclastic bacteria and diatoms in the biodegradation of hydrocarbons in coastal mudflats. *Appl Environ Microbiol* **78**: 3638 - 3648.
- Cypionka, H. (2000) Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annual Review of Microbiology* **54**: 827-848.
- de Wit, R. (2008) Microbial diversity in the Bassin d'Arcachon coastal lagoon (SW France). *Hydrobiologia* **611**: 5-15.

- DeAngelis, K.M., Silver, W.L., Thompson, A.W., and Firestone, M.K.** (2010) Microbial communities acclimate to recurring changes in soil redox potential status. *Environ Microbiol* **12**: 3137-3149.
- Degens, B.P., Schipper, L.A., Sparling, G.P., and Duncan, L.C.** (2001) Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 1143-1153.
- Dilling, W., and Cypionka, H.** (1990) Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *Fems Microbiology Letters* **71**: 123-127.
- Dolla, A., Fournier, M., and Dermoun, Z.** (2006) Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Biotechnology* **126**: 87-100.
- Dowd, S., Callaway, T., Wolcott, R., Sun, Y., McKeehan, T., Hagevoort, R., and Edrington, T.** (2008) Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology* **8**: 125.
- Edgar, R.C.** (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460-2461.
- Elango, V., Urbano, M., Lemelle, K.R., and Pardue, J.H.** (2014) Biodegradation of MC252 oil in oil:sand aggregates in a coastal headland beach environment. *Front Microbiol* **5**: 161.
- Fukui, M., and Takii, S.** (1990) Survival of sulfate-reducing bacteria in oxic surface sediment of a seawater lake. *FEMS Microbiol Ecol* **73**: 317-322.
- Geets, J., Borremans, B., Diels, L., Springael, D., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., and Vanbroekhoven, K.** (2006) DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* **66**: 194-205.
- Gilbert, F., Aller, R.C., and Hulth, S.** (2003) The influence of macrofaunal burrow spacing and diffusive scaling on sedimentary nitrification and denitrification: An experimental simulation and model approach. *Journal of Marine Research* **61**: 101-125.
- Giloteaux, L., Goñi-Urriza, M., and Duran, R.** (2010) Nested PCR and New Primers for Analysis of Sulfate-Reducing Bacteria in Low-Cell-Biomass Environments. *Appl Environ Microbiol* **76**: 2856-2865.
- Gittel, A., Seidel, M., Kuever, J., Galushko, A.S., Cypionka, H., and Konneke, M.** (2010) *Desulfopila inferna* sp nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from the subsurface of a tidal sand-flat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 1626-1630.
- Harayama, S., Kasai, Y., and Hara, A.** (2004) Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 205 - 214.
- Hayes, L.A., and Lovley, D.R.** (2002) Specific 16S rDNA sequences associated with naphthalene degradation under sulfate-reducing conditions in harbor sediments. *Microb Ecol* **43**: 134-145.
- Jiang, L., Zheng, Y., Peng, X., Zhou, H., Zhang, C., Xiao, X., and Wang, F.** (2009) Vertical distribution and diversity of sulfate-reducing prokaryotes in the Pearl River estuarine sediments, Southern China. *FEMS Microbiol Ecol* **70**: 93-106.
- Jørgensen, B.B.** (1977) The sulphur cycle of a coastal marine sediment. *Limnol Oceanogr* **22**: 814-832.
- Jørgensen, B.B.** (1982) Mineralization of organic-matter in the sea bed -The role of sulfate reduction. *Nature* **296**: 643-645.
- Jørgensen, B.B.** (2000) Bacteria and marine biogeochemistry. In *Marine Geochemistry*. Schulz, H.D., and Zabel, M. (eds): Springer Berlin Heidelberg, pp. 173-207
- Kjeldsen, K.U., Joulain, C., and Ingvorsen, K.** (2004) Oxygen tolerance of sulfate-reducing bacteria in activated sludge. *Environmental Science & Technology* **38**: 2038-2043.

- Kjeldsen, K.U., Loy, A., Jakobsen, T.F., Thomsen, T.R., Wagner, M., and Ingvorsen, K. (2007) Diversity of sulfate-reducing bacteria from an extreme hypersaline sediment, Great Salt Lake (Utah). *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 287-298.
- Kleindienst, S., Herbst, F.A., Stagars, M., von Netzer, F., von Bergen, M., Seifert, J. *et al.* (2014) Diverse sulfate-reducing bacteria of the Desulfosarcina/Desulfococcus clade are the key alkane degraders at marine seeps. *Isme Journal* **8**: 2029-2044.
- Kniemeyer, O., Musat, F., Sievert, S.M., Knittel, K., Wilkes, H., Blumenberg, M. *et al.* (2007) Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature* **449**: 898-U810.
- Kogure, K., and Wada, M. (2005) Impacts of macrobenthic bioturbation in marine sediment on bacterial metabolic activity. *Japanese Society of Microbial Ecology* **20**: 191-199.
- Kostka, J.E., Prakash, O., Overholt, W.A., Green, S.J., Freyer, G., Canion, A. *et al.* (2011) Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Appl Environ Microbiol* **77**: 7962-7974.
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., and Schloss, P.D. (2013) Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*.
- Kristensen, E. (1988) Factors influencing the distribution of nereid polychaetes in Danish coastal waters. *Ophelia* **29**: 127-140.
- Laverock, B., Gilbert, J.A., Tait, K., Osborn, A.M., and Widdicombe, S. (2011) Bioturbation: impact on the marine nitrogen cycle. *Biochemical Society Transactions* **39**: 315-320.
- Leloup, J., Loy, A., Knab, N.J., Borowski, C., Wagner, M., and Jorgensen, B.B. (2007) Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environ Microbiol* **9**: 131-142.
- Leloup, J., Petit, F., Boust, D., Deloffre, J., Bally, G., Clarisse, O., and Quillet, L. (2005) Dynamics of sulfate-reducing microorganisms (dsrAB genes) in two contrasting mudflats of the Seine estuary (France). *Microb Ecol* **50**: 307-314.
- McGenity, T., Folwell, B., McKew, B., and Sanni, G. (2012) Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquatic Biosystems* **8**: 10.
- McKenna, E.J., and Kallio, R.E. (1971) Microbial metabolism of the isoprenoid alkane pristane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**: 1552-1554.
- McKew, B.A., Coulon, F., Yakimov, M.M., Denaro, R., Genovese, M., Smith, C.J. *et al.* (2007) Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environ Microbiol* **9**: 1562-1571.
- Michel, J., and Hayes, M.O. (1999) Weathering patterns of oil residues eight years after the Exxon Valdez oil spill. *Marine Pollution Bulletin* **38**: 855-863.
- Musmann, M., Ishii, K., Rabus, R., and Amann, R. (2005) Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. *Environ Microbiol* **7**: 405-418.
- Nogales, B., Lanfranchi, M.P., Pina-Villalonga, J.M., and Bosch, R. (2011) Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 275-298.
- Oksanen, J., Blanchet, G.F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B. *et al.* (2013) vegan: Community Ecology Package. Ordination methods, diversity analysis and other functions for community and vegetation ecologists.

- Philippot, L., Cregut, M., Cheneby, D., Bressan, M., Dequiet, S., Martin-Laurent, F. et al.** (2008) Effect of primary mild stresses on resilience and resistance of the nitrate reducer community to a subsequent severe stress. *FEMS Microbiol Lett* **285**: 51-57.
- Quince, C., Lanzén, A., Curtis, T.P., Davenport, R.J., Hall, N., Head, I.M. et al.** (2009) Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature Methods* **6**: 639-641.
- Santana, M.** (2008) Presence and expression of terminal oxygen reductases in strictly anaerobic sulfate-reducing bacteria isolated from salt-marsh sediments. *Anaerobe* **14**: 145-156.
- Satoh, H., Nakamura, Y., and Okabe, S.** (2007) Influences of infaunal burrows on the community structure and activity of ammonia-oxidizing bacteria in intertidal sediments. *Appl Environ Microbiol* **73**: 1341-1348.
- Sauer, T., and Boehm, P.** (1991) The use of defensible analytical chemical measurements for oil spill natural resource damage assessment. In *Proceedings of the International Oil Spill Conference*. San Diego: American Petroleum Institute, p. 363.
- Singh, A.K., Sherry, A., Gray, N.D., Jones, D.M., Bowler, B.F., and Head, I.M.** (2014) Kinetic parameters for nutrient enhanced crude oil biodegradation in intertidal marine sediments. *Front Microbiol* **5**: 160.
- Stauffert, M., Cravo-Laureau, C., and Duran, R.** (2014) Dynamic of sulphate-reducing microorganisms in petroleum-contaminated marine sediments inhabited by the polychaete *Hediste diversicolor*. *Environ Sci Pollut Res Int* **27**: 27.
- Stauffert, M., Cravo-Laureau, C., Jézéquel, R., Barantal, S., Cuny, P., Gilbert, F. et al.** (2013a) Impact of oil on bacterial community structure in bioturbated sediments. *PLoS One* **8**.
- Stauffert, M., Cravo-Laureau, C., Jezequel, R., Barantal, S., Cuny, P., Gilbert, F. et al.** (2013b) Impact of oil on bacterial community structure in bioturbated sediments. *PLoS One* **8**: e65347.
- Stief, P., and de Beer, D.** (2002) Bioturbation effects of *Chironomus riparius* on the benthic N-cycle as measured using microsensors and microbiological assays. *Aquatic Microbial Ecology* **27**: 175-185.
- Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A., and Ueki, K.** (2007) *Desulfopila aestuarii* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, rod-like, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 520-526.
- Svensson, J.M., and Leonardson, L.** (1996) Effects of bioturbation by tube-dwelling chironomid larvae on oxygen uptake and denitrification in eutrophic lake sediments. *Freshwater Biology* **35**: 289-300.
- Teira, E., Lekunberri, I., Gasol, J., Nieto-Cid, M., Alvarez-Salgado, X., and Figueiras, F.** (2007) Dynamics of the hydrocarbon-degrading *Cycloclasticus* bacteria during mesocosmsimulated oil spills. *Environ Microbiol* **9**: 2551 - 2562.
- Veech, J.A.** (2013) A probabilistic model for analysing species co-occurrence. *Global Ecology and Biogeography* **22**: 252-260.
- Vitte, I., Duran, R., Jezequel, R., Caumette, P., and Cravo-Laureau, C.** (2011) Effect of oxic/anoxic switches on bacterial communities and PAH biodegradation in an oil-contaminated sludge. *Environ Sci Pollut Res Int* **18**: 1022-1032.
- Vitte, I., Duran, R., Hernandez-Raquet, G., Mounier, J., Jezequel, R., Bellet, V. et al.** (2013) Dynamics of metabolically active bacterial communities involved in PAH and toxicity elimination from oil-contaminated sludge during anoxic/oxic oscillations. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 4199-4211.
- Wagner, M., Roger, A.J., Flax, J.L., Brusseau, G.A., and Stahl, D.A.** (1998) Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration. *Journal of Bacteriology* **180**: 2975-2982.
- Wakeham, S., and Canuel, E.** (2006) Degradation and Preservation of Organic Matter in Marine Sediments. In *Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA*. Volkman, J. (ed): Springer Berlin Heidelberg, pp. 295-321.

Widdel, F., Knittel, K., and Galushko, A. (2010) Anaerobic hydrocarbon-degrading microorganisms: an overview. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*: 1997 - 2021.

Zelege, J., Sheng, Q., Wang, J.G., Huang, M.Y., Xia, F., Wu, J.H., and Quan, Z.X. (2013) Effects of *Spartina alterniflora* invasion on the communities of methanogens and sulfate-reducing bacteria in estuarine marsh sediments. *Front Microbiol* **4**.

3. Conclusion du chapitre

Dans cette étude, l'assemblage des communautés bactériennes actives et des MSR ont été comparés entre différentes communautés microbiennes issues de sédiments côtiers, lorsqu'elles sont soumises à des oscillations anoxie/oxygène. Parallèlement, les capacités de dégradation des alcanes et des HAP ont pu être mises en évidence et également comparées par l'estimation de rapports de biodégradation.

En premier lieu, un réarrangement de la structure des communautés bactériennes en fonction de la condition d'oxygénation sans pouvoir distinguer de structures dissociées entre les différentes communautés : "*Petroleum*", "*Petroleum + harrowing*" and "*Petroleum + burrowing organisms*" a mis en évidence la pression de sélection majeure de l'oxygène sur les communautés bactériennes. Malgré une composition différente des communautés hydrocarbonoclastes de sédiments côtiers, une réponse globale similaire à l'ajout d'oxygène est observée : une diminution de la diversité liée à l'augmentation de l'abondance relative de certains genres retrouvés dans les 3 communautés. Tout de même, certaines spécificités de réponses propres aux différentes communautés microbiennes initiales ont été observées, suggérant différents potentiels d'adaptations et/ou de réponses aux oscillations, induisant des cinétiques de dégradation distinctes entre alcanes et HAP.

Contrairement aux communautés bactériennes, les communautés de MSR ont montré une structuration stable dans le temps entre les différentes communautés initiales soumises aux différents régimes d'oxygénation. La réponse observée de cette communauté suggère sa stabilité face aux conditions environnementales dynamiques des écosystèmes côtiers. Différents consortia ont pu être obtenus à partir des trois communautés microbiennes en conditions oscillantes, suite à 6 repiquages successifs avec des fractions aromatiques ou saturés du pétrole Oural comme unique source de carbone. Ainsi, suite aux oscillations anoxie/oxygène, des communautés en conditions de sulfato-réduction ont pu se maintenir, suggérant leur capacité de dégradation au sein du système. Ceci donnera également la possibilité de tester ces consortia sous conditions oscillantes anoxie/oxygène afin d'identifier des acteurs majeurs de l'élimination des hydrocarbures adaptés à ces conditions.

Chapitre V :
Conclusion et perspectives

Chapitre V : Conclusion et perspectives

Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes intéressés aux communautés microbiennes ayant la capacité à dégrader les hydrocarbures afin de développer nos connaissances sur les paramètres environnementaux pouvant influencer leur dynamique et par conséquent le fonctionnement de l'écosystème. La compréhension de l'écologie des communautés microbiennes dans les sites contaminés par les hydrocarbures est indispensable afin d'appréhender les mécanismes de biodégradation. Dans leur contexte réel, ces communautés des sédiments côtiers doivent faire face à certains paramètres environnementaux qui peuvent varier de façon régulière et avoir ainsi un effet direct sur les microorganismes et leurs activités. Comme exemple, les oscillations oxie/anoxie dues aux marées et aux activités de bioturbation de la macrofaune, constituent un paramètre environnemental majeur, largement répandus et constituant un système fonctionnel très particulier.

Afin de développer nos connaissances sur les assemblages microbiens procaryotes dans ces systèmes, l'objectif de ce travail a été d'aborder la réponse écologique de trois communautés microbiennes aux capacités de dégradation similaires, aux oscillations anoxie/oxie.

Dans cette perspective, nous avons entrepris une étude en bioréacteur afin de comparer ces trois communautés face aux variations de régimes d'oxygénation. La mise en place d'un système d'incubation dans des conditions discontinues permet le contrôle des principales variables physiques et chimiques en réduisant la complexité du système d'étude afin de décrypter les réponses écologiques induites spécifiquement sous l'influence des paramètres testés. Pour chaque communauté étudiée : « *Petroleum* », « *Petroleum + harrowing* » et « *Petroleum + burrowing organisms* », l'exposition aux oscillations anoxie/oxie a été réalisée en triplicatas et en comparaison avec des conditions d'anoxie et d'oxie permanent également en triplicatas, constituant une expérimentation permettant d'effectuer des analyses statistiques robustes des ensembles de données. A partir de ces expérimentations, les dynamiques des communautés microbiennes ont pu être décrites afin de dégager des profils écologiques globaux se mettant en place dans les communautés microbiennes autochtones soumises à ces conditions oscillantes d'oxygénation. La dynamique des communautés bactériennes et des communautés de microorganismes sulfato-réducteurs a été suivie par des approches moléculaires de séquençage haut-débit, au niveau transcriptionnel au cours des incubations dans les différentes conditions. Ainsi, les communautés actives dans ces conditions ont été ciblées afin d'identifier les populations pouvant être les acteurs majeurs dans les processus d'élimination du polluant dans les environnements caractérisés par des conditions oscillantes anoxie/oxie. En parallèle, des

analyses chimiques (GC-MS) ont permis de déterminer la biodégradation des n-alcanes et des HAP au cours des incubations.

En premiers lieu, un réarrangement des communautés bactériennes actives lié à l'apport d'oxygène, a pu être observé, conduisant à une structuration différente des communautés en fonction de la condition d'oxygénation. Cette modification de structure en réponse à l'oxygène a pu être observée pour les trois communautés de sédiments côtiers. A cette modification, est liée une diminution de la diversité accompagnée de l'augmentation de l'abondance des genres *Alcanivorax*, *Arcobacter*, *Cycloclasticus*, principalement, qui sont également actifs pendant les périodes d'anoxie. Ainsi, l'oxygène est apparu comme un facteur forçant influençant de façon importante la structuration des communautés de cet environnement, jouant un rôle important dans le devenir des polluants. En effet, en conditions oscillantes, de capacités de dégradation équivalentes ou supérieures à l'oxie ont pu être observées. Ainsi des structures des communautés bactériennes différentes ont montré des capacités de dégradation similaires. Ceci nous amène à se questionner sur l'identité des acteurs de la dégradation : communautés procaryotes majoritaires, rôle des communautés minoritaires, communautés spécifiques ou communes aux différentes communautés étudiées ?

Ceci met également en évidence la capacité d'acclimatation rapide aux conditions changeantes de ces communautés bactériennes avec la présence de micro-organismes adaptés et/ou en mesure de répondre aux conditions environnementales dynamiques, par des capacités d'anaéro/aéro tolérances ou de versatilités métaboliques. De plus, la stabilité de la structure des communautés de MSR métaboliquement actifs vient appuyer ces observations mettant en évidence des populations de MSR métaboliquement actifs abondants au sein des différentes communautés soumises à différents régimes d'oxygénation. Les populations de MSR des différentes communautés étudiées montrent une composition similaire sous les différentes conditions d'incubations. Ces populations sont dominées par les familles *Desulfobacteraceae* et *Desulfobulbaceae*, familles dominantes en sédiments côtiers (Colin *et al.*, 2013), au sein desquelles des micro-organismes dégradant les hydrocarbures ont pu être identifiés dans la littérature (Vandecasteele, 2005 ; Cravo-Laureau *et al.*, 2007 ; Savage *et al.*, 2010; Widdel *et al.*, 2010 ; Kleindienst *et al.*, 2014). Différentes hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer la stabilité de la structures de cette population active : la présence de micro-niches anoxiques, la tolérance de certains micro-organismes à l'O₂ (possession d'enzymes de détoxification), voir la respiration de l'O₂, des souches ayant été décrites dans la littérature (Dilling and Cypionka, 1990).

Ces observations suggèrent des profils écologiques en réponses aux conditions oscillantes de l'environnement pouvant être répandus dans différents environnements marins côtiers, mis en évidence par l'identification de relations de présence simultanée ou d'exclusion de populations, liées aux conditions d'oscillations redox de leur environnement. En effet, des profils de co-occurrence au sein des bactéries sulfato-réductrices et des bactéries dénitrifiantes ont été mis en évidence, avec exclusion de l'un de ces groupes par l'autre du fait de spécificités métaboliques propres à chacun des groupes.

Enfin, la mise en évidence de différentes populations présentes dans les différentes conditions d'oxygénation et de potentiel redox suggère une versatilité physiologique développée chez les micro-organismes présents dans ces environnements, suggérant un moyen adaptatif pour l'utilisation optimale des ressources énergétiques disponibles.

Le séquençage haut-débit des gènes et des transcrits de l'ARNr 16S archées a également été réalisé. Les données, actuellement en cours d'analyse devraient venir compléter les données obtenues pour les communautés bactériennes. En ciblant d'autres groupes fonctionnels, en plus des micro-organismes sulfato-réducteurs, tels que les micro-organismes dénitrifiants et les méthanogènes, il serait possible d'avoir une image plus globale et plus fine de l'assemblage des communautés microbiennes procaryotes. La poursuite d'analyses de co-occurrence en combinant les données taxonomiques pourraient permettre de caractériser les réseaux microbiens et les interactions microbiennes jouant un rôle dans le fonctionnement de ces écosystèmes. L'identification d'une « core » communauté et des interactions gouvernant l'assemblage des populations la constituant, fournirait des informations cruciales sur l'organisation des communautés dégradantes des systèmes côtiers pollués soumis à des conditions oscillantes anoxie/oxie.

Des approches de méta-génomique et méta-transcriptomique comparative des trois communautés, combinées aux données taxonomiques déjà obtenues, permettraient de mettre en évidence les réseaux microbiens mis en place lors d'une contamination pétrolière dans les environnements soumis aux fluctuations d'oxygénation. A partir de ces méta-génomes et métatranscriptomes, les principaux métabolismes de la « core » communauté hydrocarbonoclaste permettant de se maintenir dans des régimes d'oxygénation oscillants pourraient être identifiés, afin de caractériser les interactions fonctionnelles, l'organisation des fonctions métaboliques entre les taxons constituant la communauté microbienne.

Le couplage des différentes données récoltées pour la caractérisation de la dynamique du réseau microbien des différentes communautés soumises à des conditions oscillantes anoxie/oxie constitue une étape préliminaire vers la modélisation des mécanismes microbiens lors de fluctuations redox dans les sédiments pollués. Cette capacité à comprendre puis prédire l'organisation, la dynamique et le fonctionnement du réseau microbien de sédiments marins pollués aux hydrocarbures constitue un pas à plus long terme vers l'élaboration de moyens pour la gestion des activités microbiennes lors des marées noires.

Annexe

Effect of physical sediments reworking on hydrocarbon degradation and bacterial community structure in marine coastal sediments

Robert Duran^{1,6} · Patricia Bonin² · Ronan Jezequel³ · Karine Dubosc³ · Claire Gassie¹ · Fanny Terrisse¹ · Justine Abella¹ · Christine Cagnon¹ · Cecile Militon² · Valérie Michotey² · Franck Gilbert^{4,5} · Philippe Cuny² · Cristiana Cravo-Laureau¹

Received: 22 November 2014 / Accepted: 12 March 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract The present study aimed to examine whether the physical reworking of sediments by harrowing would be suitable for favouring the hydrocarbon degradation in coastal marine sediments. Mudflat sediments were maintained in mesocosms under conditions as closer as possible to those prevailing in natural environments with tidal cycles. Sediments were contaminated with Ural blend crude oil, and in half of them, harrowing treatment was applied in order to mimic physical reworking of surface sediments. Hydrocarbon distribution within the sediment and its removal was followed during 286 days. The harrowing treatment allowed hydrocarbon compounds to penetrate the first 6 cm of the sediments, and biodegradation indexes (such as n -C₁₈/phytane) indicated that biodegradation started 90 days before that observed in

untreated control mesocosms. However, the harrowing treatment had a severe impact on benthic organisms reducing drastically the macrofaunal abundance and diversity. In the harrowing-treated mesocosms, the bacterial abundance, determined by 16S rRNA gene Q-PCR, was slightly increased; and terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analyses of 16S rRNA genes showed distinct and specific bacterial community structure. Co-occurrence network and canonical correspondence analyses (CCA) based on T-RFLP data indicated the main correlations between bacterial operational taxonomic units (OTUs) as well as the associations between OTUs and hydrocarbon compound contents further supported by clustered correlation (ClusCor) analysis. The analyses highlighted the OTUs constituting the network structural bases involved in hydrocarbon degradation. Negative correlations indicated the possible shifts in bacterial communities that occurred during the ecological succession.

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Robert Duran
Robert.duran@univ-pau.fr

¹ Equipe Environnement et Microbiologie, MELODY Group, Université de Pau et des Pays de l'Adour, IPREM UMR CNRS 5254, BP 1155, 64013 Pau Cedex, France

² Aix Marseille Université, CNRS, IRD, MIO UM 110, 13288 Marseille, France

³ Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les pollutions accidentelles des Eaux, 715 rue Alain Colas, CS 41836 Brest, France

⁴ Université de Toulouse; INP, UPS; EcoLab (Laboratoire écologie fonctionnelle et environnement), 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

⁵ CNRS; EcoLab, 31062 Toulouse, France

⁶ Université de Pau et des Pays de l'Adour, Bâtiment IBEAS, BP 1155, 64013 Pau Cedex, France

Keywords Bacteria · Bioremediation · Oil pollution · Harrowing · Mesocosms · T-RFLP · Co-occurrence network · Community structure

Introduction

Oil spills are spectacular accidents threatening marine ecosystems as evidenced by the recent *Deepwater Horizon* (Gulf Mexico, 2010) disaster with approximately 700 Ktons of crude oil released. But, since the *Deepwater Horizon* catastrophe, the *Cedre* (Centre de documentation, de recherche et d'expérimentations sur les pollutions accidentelles des eaux; <http://www.cedre.fr/>), French institution in charge of the response to accidental water pollution, has recorded 22 less publicised marine accidents over the world. Oil spills are

estimated to release more than 1.3 million tons of hydrocarbons per year in the sea, revealing the extent of the threat. Appropriate responses, which effectiveness is depending on the pollutant type (crude oil, heavy fuel oil, diesel...), must be implemented according to the environment (sea, beaches, mudflats...) in order to mitigate the ecological impact. Most cleaning methods are well adapted to sandy and rocky beaches, but they are very difficult to transpose for cleaning complex ecosystems characterised by fine, sandy-muddy sediments such as mudflats and estuarine areas, which are highly productive areas. In such areas, physical removal is impossible and oil spills are thus difficult to control (Duran and Goñi-Urriza 2010). Biological treatments attempting to manage microorganisms, main actors in hydrocarbon biodegradation (McGenity 2014; Timmis et al. 2010), have been developed and appears to be friendly adapted methods for such areas. Bio-stimulation and bio-augmentation strategies aim to enhance the microbial activities by adding nutrients and hydrocarbon-degrading micro-organism, respectively (Goni-Urriza et al. 2013). Alternative bioremediation approaches should take into account the characteristic conditions constraining the ecosystem functioning and thus use them as advantages, particularly the oxic/anoxic oscillations due to tide and sediment reworking by burrowing organisms (Cravo-Laureau and Duran 2014). The bioturbation affects the sediment matrix and the inhabiting microbial communities both via burrow construction modifying the physical structure of sediments and via ventilation modifying the chemical parameters, oxygen supply and nutrients availability (Adamek and Marsalek 2013; Kristensen et al. 2012). We recently demonstrated that applying anoxic/oxic oscillations to oiled sediments resulted in the acceleration of hydrocarbon degradation when restoring oxic conditions after an anoxic period (Vitte et al. 2013; Vitte et al. 2011). Similarly, increasing the bioturbation activity by the addition of burrowing organisms such as *Hediste diversicolor* did not affect the hydrocarbon degradation (Stauffert et al. 2013) modifying the bacteria and archaea communities' structures (Cravo-Laureau and Duran 2014; Stauffert et al. 2014), suggesting functional redundancy in hydrocarbon degradation. We hypothesised that physical sediments reworking such as harrowing will affect the microbial community structure in oil-contaminated sediments, which would be a strategy to manage microbial communities' structures and activities for, at the applied point of view, increasing hydrocarbon degradation in contaminated areas. At the academic point of view, the controlled modification of microbial communities' structures is an opportunity to gain information to decipher the rules of microbial assemblages in oil-contaminated sediments (Cravo-Laureau and Duran 2014; Morales and Holben 2011).

In the present study, mudflat sediments maintained under tidal cycles in order to ensure conditions close to those prevailing in the natural environment, were contaminated by

crude oil and subjected or not to a harrowing treatment. The effects of this physical treatment on hydrocarbon degradation and on microbial communities' structure were compared to those observed in oiled sediments without harrowing treatment, used as control.

Materials and methods

Sampling and experimental setup

Field site and experimental devices have been previously described (Stauffert et al. 2013). Muddy-sand sediments were collected at the tidal basin Aber-Benoît (Treglonou, Brittany (France), 48° 33' 12.40" N; 4° 32' 8.69" W). In order to maintain the sediment structure, sediments were collected carefully with a core collector and then transferred over geotextile membrane on mesocosm-boxes (65 cm×50 cm×41 cm; approximately 30 L of sediment). Six mesocosm-boxes were set up at room temperature and connected with a device supplying natural sand-filtered and UV-treated seawater from the Oceanopolis aquarium (Brest, France). Tidal cycles (rise/fall 12 h—6 h high tide and 6 h low tide) were simulated using a water level control consisting of an up and down drainage system. Seawater was renewed at each tidal cycle (20 L of water per box). At high tide, the water level was maintained at about 5 cm above the sediment surface using a faucet ballcock. In order to determine the effect of harrowing treatment on oiled sediments, two conditions were applied in triplicate ($N=6$) as follows: (i) control condition (C) corresponding to oil-contaminated sediments and (ii) harrowing treatment (H) corresponding to oil-contaminated sediments in which harrowing by a rake was performed twice a week. In order to ensure a uniform contamination of sediments, the upper 2-cm layer of each mesocosm was sampled, pooled, mixed with crude oil (final concentration 24 ± 4 mg/g of wet sediment) and homogenised. This mixture was spread over the sediment surface (2-cm layer). The oil used for the experimentation was the Russian export blend crude oil (REBCO), an Ural type crude oil, distilled at 110 °C to eliminate the more volatile hydrocarbon compounds. This oil contained approximately 60 % of saturated hydrocarbons (including 6.2 % alkanes and 53.7 % unresolved complex mixture), 25 % of aromatic compounds (including 0.8 % polyaromatic hydrocarbons (PAHs) and 24 % unresolved complex mixture), 10 % of resins and 5 % of asphaltenes. The major metals are nickel (50 mg/kg) and vanadium (100 mg/kg). The tidal cycle was initiated 2 h after reloading sediments.

Sediment subsamples were collected after 63, 151 and 286 days of incubation for chemical and molecular analyses. Four core samples (0–10 cm; falcon tube, 10 mL) were collected from each mesocosm: one for chemical analyses (triplicate conditions), and three for molecular analyses (sampling

replicates $\times$ triplicate conditions: nine replicates per condition at each sampling time). The subsamples were collected 10 min after reaching the low tide. The sampling hole was loaded with a plastic tube in order to maintain the sediment's structure. Samples were immediately frozen in liquid nitrogen after sampling and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analyses. The effect of the harrowing on sediment reworking was estimated by using fluorescent particulate tracers (luminophores) as previously described (Stauffert et al. 2013). A suspension of 100 g of orange luminophores (63–125 μm) was homogeneously spread over the sediment surface of each mesocosm 1 h after reloading the sediments surface. At the end of the experiment, two cores samples were collected (PVC corers; diameter 10 cm, length 20 cm) and sliced into 1-cm-thick sediment layers for the analysis of the macrobenthic community densities and reworking activity (bioturbation).

Macrobenthic communities' densities and bioturbation

Each 1-cm-thick layer obtained from each corer sampled at the end of the experiment was fixed with 4 % formaldehyde. The sediments were first sieved with a 500- μm mesh in order to retain macroorganisms and then with a 44- μm mesh to collect the sediment fraction containing the luminophores particles. Each sediment layer retained on the 500- μm mesh was preserved in 70 % alcohol. The macroorganisms were identified to the major taxonomic level possible and counted using a stereomicroscope at magnification $\times 40$ (Duport et al. 2007). Each sediment layer retained on the 44- μm mesh was freeze-dried, gently crushed to powder, homogenised and luminophores were counted using a microplate reader (Biotek Synergy Mx; Majdi et al. 2014) at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 450/585 nm. This resulted in a particulate tracer distribution profile over depth, for each sediment core. The sediment reworking (i.e. production of a biodiffusion-like coefficient Db describing particle transport in the whole sedimentary column) was quantified as previously described (Stauffert et al. 2013).

Chemical analyses

Prior to analyses, each sediment core was divided into two layers (0–6 and 6–10 cm). Each layer was then split for the determination of moisture content ($50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 24 h), and for chemical analyses (total petroleum hydrocarbon, TPH, concentrations and alkanes/aromatics distributions).

Sediment samples were extracted with 30 mL methylene chloride at $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 2000 psi for 14 min in a Dionex ASE 350 accelerated solvent extractor. Extractions of sediment were performed twice for each sample. The organic extracts were dried over Na_2SO_4 (activated at $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 4 h) and concentrated to approximately 2 mL using a Syncore (Büchi, Germany). Extracts were fractionated using a solid phase extraction (SPE) cartridge (silica/cyanopropyl ($\text{SiO}_2/\text{C3-CN}$;

1.0/0.5 g, 6 mL; Interchim, France) (Alzaga et al. 2004). Saturated and aromatic fractions were eluted simultaneously with 8 mL of methylene chloride/pentane (80:20, v/v) and concentrated to approximately 2 mL.

Extracts were injected in a gas chromatography Agilent 6890N equipped with a split/splitless injector (splitless time 1 min, flow 50 mL/min) coupled to an Agilent 5975 mass selective detector (MSD) (electronic impact 70 eV, voltage 1200 V). The injector temperature was maintained at $300\text{ }^{\circ}\text{C}$. The interface temperature was $300\text{ }^{\circ}\text{C}$. The GC/MS temperature gradient was from $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min) to $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ (20 min) at $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The carrier gas was helium at a constant flow of 1 mL/min. The capillary column used was an HP-5 MS 30 m $\times$ 0.25 mm ID $\times$ 0.25 μm film thickness.

TPH contents were analysed according to the standard NF EN ISO 9377-2 protocol using the GCMS in Scan mode. Different concentrations of the oil were diluted with methylene chloride and used to calibrate the Scan mode response and then to quantify the TPH extracted from the sediment samples.

n-alkanes and PAHs semi-quantifications were performed using Single Ion Monitoring (SIM) mode with the most representative fragment (saturates) or the molecular ion (PAHs) of each compound at a minimum of 1.4 cycles/s. *n*-alkane and PAH degradation was followed with respect to $17\alpha(\text{H})$, $21\beta(\text{H})$ -hopane ($m/z=191$) used as a conserved internal biomarker during the analysis (Prince et al. 1994).

Bacterial community analyses

The sediment cores were separated in two horizons (0–6 and 6–10 cm). The PowerSoil DNA isolation kit (MoBio Laboratories) was used for metagenomic DNA extraction following the manufacturer's recommendations. Briefly, sediments were centrifuged at 5000g for 15 min, to remove the water phase and the initial step of horizontal vortexing was performed for 30 min. DNA was eluted in 100 μL water and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

The primer couple 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAA GTC-3'), 1387R (5'-GGGCGWGTGTAACAAGGC-3'), specific for bacteria (Marchesi et al. 1998), was used to amplify the 16S rRNA gene. The forward primer was labelled at the 5' end with phosphoramidite fluorochrome carboxyfluorescein (FAM). The PCR conditions were as previously described (Duran et al. 2008). Briefly: initial denaturation ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min) followed by 35 cycles of denaturation ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 45 s), annealing ($58\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 45 s), and extension ($72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 60 s) and a terminal extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min. The reaction mixture (25 μL final volume) contained 12.5 μL of Amplitaq Gold 360 Master Mix 2x (Life Technologies), 0.2 μM of each primer and 1 μL of DNA template. PCR products were visualised by agarose gel electrophoresis and purified with the PCR purification kit (GE Healthcare).

The purified 16S rRNA amplified fragments were digested by 3.5 U of *AluI* (Takara) at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ in a final volume of 10 μL

for 3 h. Then, digested products (1 μ L) were mixed with deionised formamide (10 μ L) and 0.25 μ L of internal size standard (GS-500 Rox, Applied Biosystems). Fluorescently labelled fragments were separated and detected with an ABI Prism 3130XL capillary sequencer (Applied Biosystems) run in Genetic Analyser version 3.1. Injection was performed electrokinetically at 1.2 kV for 23 s, and the runs at 15 kV were completed within 20 min. Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) profiles were analysed using GENEMAPPER version 4.1 software (Applied Biosystems). Only terminal fragments whose size ranged from 35 to 500 bp and whose height was greater than 20 fluorescence units were considered for analysis. T-RFLP profiles were aligned by identifying and grouping homologous fragments and normalised by calculating relative abundances of each terminal-restriction fragment (T-RFs) from height fluorescence intensity, using T-REX software (Culman et al. 2009). Shannon and Evenness indexes were calculated from T-RFLP patterns using the MVSP software (Multi-Variate Statistical Package 3.12d, Kovach Computing Services, 1985–2001, UK).

Bacterial abundance

The bacterial abundance was assessed by the determination of 16S rRNA gene copy numbers. It was performed by real time PCR with Sso Advanced SYBR Green Supermix using a CFX96 Real Time System (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, 170 CA, USA). The primer set GML5F-Uni516R (Michotey et al. 2012) was used. The real time PCR cycles consisted of a denaturation step of 5 s, a hybridization step of 20 s at 56 °C with an elongation step of 40 s. Gene abundance in mesocosm DNA samples was determined in relation with a calibration standard corresponding to dilution of plasmids harbouring Gammaproteobacterial SSU rRNA gene fragment (from 9.10^6 to 9.10^3 copies). The resulting conditions lead to a Q-PCR efficiency of 97.1 % ($R^2=0.994$). At the end of the PCR reaction, the specificity of the amplification was checked from the first derivative of their melting curves.

Statistics and multivariate analyses

Data statistical analyses were performed with STATISTICA software, version 5.5 (StatSoft, USA). The analysis of variance (ANOVA) was performed in order to investigate the effects of treatments on bacterial abundances and TPH content. The comparisons of the biodiffusion coefficients (Queiros, #23) and of the macroorganisms' densities were performed to assess differences between the experimental conditions by means of the non-parametric Kruskal-Wallis one-way analysis of variance by ranks (Kruskal and Wallis 1952).

Bacterial communities' comparisons

In order to compare bacterial communities (T-RFLP patterns data) according to treatment and time, two dimension non-metric multidimensional scaling ordination (NMDS) based on Bray–Curtis distances was performed using the function metaMDS from the “Vegan” package in R (Oksanen et al. 2011). The significant differences between groups were tested with an analysis of similarities (ANOSIM) performed with Primer 6 software (Primer E, Plymouth, UK).

In order to determine the relationships between bacterial communities (T-RFLP patterns data) and environmental parameters (hydrocarbon concentrations and bacterial abundance), a canonical correspondence analysis (CCA) was carried out using MVSP software (Multi-Variate Statistical Package 3.12d, Kovach Computing Services, 1985–2001, UK). Clustered correlation (ClusCor) analysis was described previously (Weinstein et al. 1997). A programme for making clustered correlation is available (<http://discover.nci.nih.gov.gate1.inist.fr>).

Co-occurrence network for detecting microbial interactions

In order to determine the bacterial co-occurrence and mutual-exclusion relationships, a bacterial network was built by a Cytoscape plugin CoNet 1.0b6 (Co-occurrence Network inference; <http://psbweb05.psb.ugent.be/conet/>; Faust et al. 2012). The input matrix consisted of T-RFLP data from all the samples (triplicates of both treatments and horizons). The analysis was performed with two correlation methods (Spearman and Pearson), edge scores for the randomization with 1000 bootstraps iterations. The resulting networks were merged applying Fichers' Z *P* value threshold 0.05 and Bonferroni multiple-test corrections. The co-occurrence bacterial network was visualised with Cytoscape (Smoot et al. 2011).

Results and discussion

Harrowing effect on macrobenthic communities' densities and bioturbation

Because the volume of sediments required for the analyses is rather large (about 1.2 L per core), the structure and the densities of macroorganisms as well as the luminophores distribution with depth were only determined at the end of the experiment (286 days). Although there is no significant statistical difference (chi-square=2.4; $p=0.1213$), the harrowing treatment had a negative effect on the macrofauna community, by decreasing both the number of individuals and the species richness in comparison to controls (Table 1). This could be

Table 1 Species composition, mean densities of macrobenthic organisms (ind.m⁻²) and biodiffusion coefficients (Db, cm² y⁻¹) observed in the cores (n=2 or 3) sampled at the end of the experiment (286 days) in the (C) control (oil-contaminated sediments) and in the (H) harrowing (harrowed oil-contaminated sediments) treatments

Treatments	C			H	
	Core 1	Core 2	Core 3	Core 1	Core 2
Species					
<i>Hydrobia ulvae</i>	11	6	11	0	0
<i>Streblospio shrubsolii</i>	0	0	3	0	0
<i>Cirratulus cirratus</i>	2	0	2	0	0
<i>Oligochaeta</i> sp1	51	45	22	24	14
<i>Oligochaeta</i> sp2	0	0	1	0	0
<i>Oligochaeta</i> sp3	18	30	1	26	13
<i>Hediste diversicolor</i>	10	14	2	2	7
<i>Cirratulus</i> sp.	1	0	0	0	0
<i>Terebellidae</i> ind.	0	0	0	1	0
<i>Spionidae</i> sp.	1	0	1	0	0
<i>Heteromastus filiformis</i>	1	0	1	0	0
Total (ind.core ⁻¹)	92	95	45	53	34
Mean density (ind.m ⁻²)	11,384.30			6403.60	
Db (cm ² y ⁻¹)	4.53±1.4			4.13±0.93	

explained by the direct killing of individuals and by the destruction of the macrofaunal habitats due to the mechanical effect of harrowing. This is further supported by the absence in the harrowed sediments of *Hydrobia ulvae* (Gastropoda) and *Cirratulus cirratus* (Polychaeta) individuals, which sediment reworking and mobility traits correspond to surficial modifiers with limited movements' capacities (Queiros et al. 2013). These species are therefore most likely sensitive to perturbations of the sediment surface. By contrast, no significant difference (chi-square=0.02; $p=0.8845$) in the sediment mixing intensity between control (4.53 ± 1.4 cm² y⁻¹; mean±SD, $n=3$; Table 1) and harrowed treatments (4.13 ± 0.93 cm² y⁻¹; mean±SD, $n=3$; Table 1) was observable. The luminophore distribution, however, indicated that the harrowing treatment resulted in the greater homogenization of the first 4 cm of the surface sediments in comparison to controls (Fig. 1).

Harrowing effect on hydrocarbon degradation

The mechanical mixing of the surface sediments induced the hydrocarbon compounds to be introduced deeper in the sediments in comparison to the untreated control (ANOVA $p=0.05$) as shown by the distribution of total petroleum hydrocarbon (TPH) (Fig. 1). But more than 70 % of TPH were retained within the first 6 cm depth all along the experiment although the TPH proportion increased with time on the

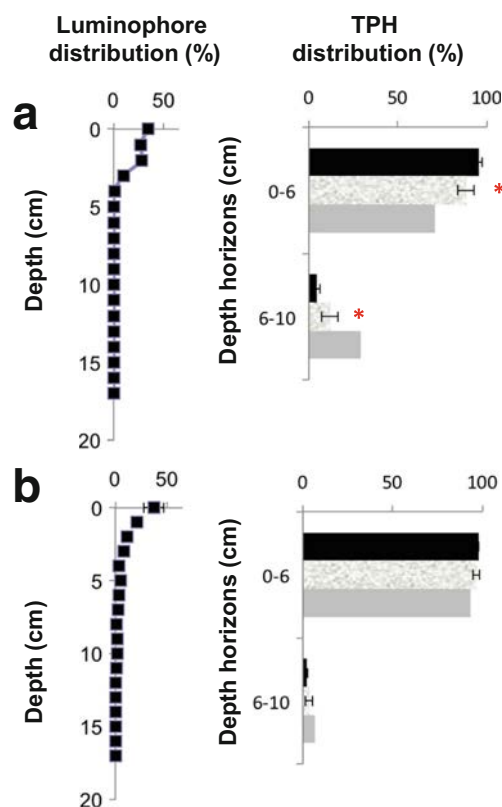


Fig. 1 Effect of the harrowing treatment (a) compared to the control (b) on sediment reworking (luminophore distribution) and total petroleum distribution (TPH). Luminophore distribution was determined at the end of the experiment (286 days). TPH distribution was determined at 63 days (black), 151 days (white) and 286 days (grey). Error bars indicate the standard error ($n=3$). Asterisk show significant differences between treatments (ANOVA $p=0.05$)

deeper horizon (6–10 cm, Fig. 1a). We thus considered the horizons 0–6 and 6–10 cm for further study.

The hopane units, normalisation using the 17 α (H),21 β (H)-hopane as internal standard (Prince et al. 1994), which serve as proxy to estimate petroleum biodegradation in the environment was used to follow the hydrocarbon degradation (Fig. 2a). At the end of the experimentation (286 days), the hydrocarbon (*n*-alkanes and PAHs) biodegradation reached 80 % in both harrowing and control conditions (Fig. 2a). Obviously, the degradation started faster in the harrowing condition with 50 % hydrocarbon degradation at 63 days whilst at the same incubation time the degradation was 23 % in the control without harrowing (Fig. 2a; ANOVA $p=0.05$). Similarly, the decrease of the *n*-C₁₈/phytane ratio (Fig. 2b) indicated a faster biodegradation in the harrowing condition than in the control but the highest difference was observed at day 151 (ANOVA $p=0.05$). Interestingly, at 63 days, the biodegradation of PAHs was similar to that of *n*-alkanes (65 %) in the harrowing condition whilst it was estimated to 49 % for *n*-alkanes and 37 % for PAHs in the control condition (data not shown). However, at day 286, the biodegradation of *n*-alkanes reaching 91 % was higher than that of PAHs estimated at

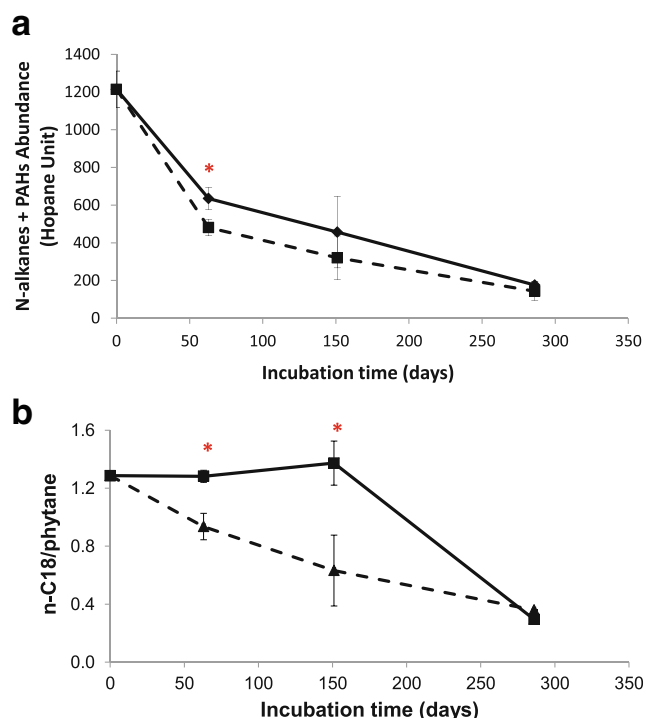


Fig. 2 Biodegradation of hydrocarbon compounds indicated by hopane (a) and phytane (b) biomarkers during the incubation under harrowing (dashed line) and control (full line) conditions on the 0–6 cm horizon. The hydrocarbon content was determined at 63, 151 and 286 days. The Error bars indicate standard deviation ($n=3$). Asterisk show significant differences between treatments (ANOVA $p=0.05$)

68 %. This observation indicated that harrowing, by homogenising the surface of sediments, facilitated the hydrocarbon biodegradation probably enabling the sediments' oxygenation and thus the oxygen attack of molecules, the first step of the aerobic hydrocarbon catabolism. We previously demonstrated in a bioreactor study that oxygenation was a critical step in hydrocarbon biodegradation (Vitte et al. 2013; Vitte et al. 2011), which is consistent with the aerobic biodegradation pathways so far described (Cerniglia 1992; McGenitty 2014; Timmis et al. 2010). However, the harrowing treatment not only had a negative effect on the macrofauna, by decreasing the number of individuals from 77.3 ± 28.0 to 43.5 ± 13.4 ind.core⁻¹ in control and harrowed sediments, respectively, but also by reducing the species richness from 10 (control) to 4 (harrowing) at the end of experiment. This was probably due to the mechanical effect of harrowing by direct killing of individuals and by the destruction of the macrofaunal habitats.

Harrowing effect on bacterial community structure in oiled sediments

In order to determine the effect of the harrowing treatment on oil-degrading bacterial communities, microbiological analyses were performed at the latest stages of incubation (151

and 286 days) when the biodegradation of *n*-alkanes+PAHs was over 55 % in all conditions (Fig. 2a) but at distinct levels according to *n*-C₁₈/phytane ratio as for the 151 days (Fig. 2b; ANOVA $p=0.05$) allowing the comparison of contrasted situations. First, the bacterial abundances were determined by estimating the 16S rRNA gene copy numbers by Q-PCR. At the beginning of the experiment, the bacterial abundance was estimated to $6.5 \cdot 10^{10} \pm 5 \cdot 10^9$ 16S rRNA gene copies per gram of sediment for the 0–6 cm horizon. At 151 days, the bacterial abundance was found below $4 \cdot 10^{10}$ 16S rRNA gene copies per gram of sediment for each condition (0–6 cm horizon; Fig. 3) showing the effect of crude oil on bacterial growth. The bacterial abundance remained stable for the control condition whilst it reached the initial level for the harrowing condition at the end of the experiment (286 days; Fig. 3a). This observation suggested that the harrowing favoured bacterial growth probably by increasing the oxygenation in the 0–6 cm horizon of the sediment. The effect of physical perturbation in marine sediments has been previously discussed (Widdicombe and Austen 2001), and the increase of diffusive oxygen uptake rate after harrowing demonstrated (Soltwedel et al. 2008). It is important to notice that in the 6–10 cm horizon, the bacterial abundance remained stable around $4 \cdot 10^{10}$ 16S rRNA gene copies per gram of sediment until the end of experiment in the control condition (Fig. 3b) whereas it was found lower in the harrowing condition increasing slightly at 286 days (Fig. 3a). These observations indicated that harrowing influenced the bacterial communities not only at the surface (0–6 cm) of sediments but also at lower depth (6–10 cm horizon), disturbing probably bacterial populations living in anaerobic zones by introducing both hydrocarbon

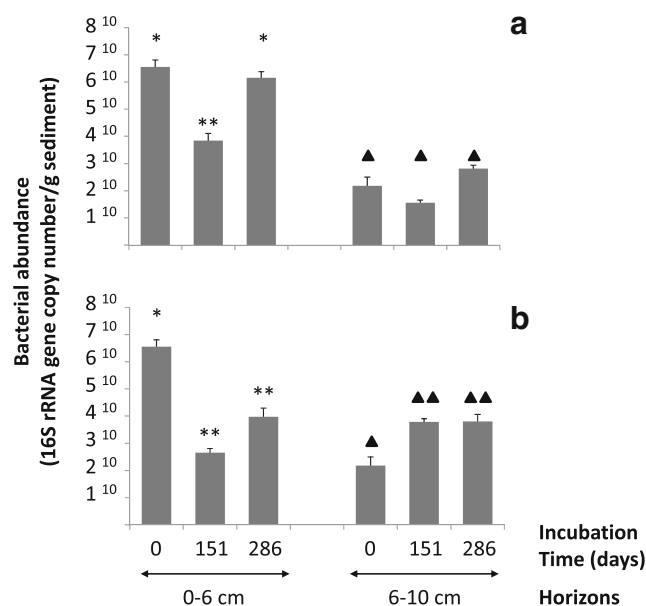


Fig. 3 Bacterial abundances in harrowed (a) and control (b) sediments. Error bars indicate the standard error ($n=3$). Symbols refer to homogenous groups according to ANOVA test

compounds and oxygen in deeper horizons whilst modifying the sediment structure as previously shown (Widdicombe and Austen 2001).

The bacterial community structures were then determined by T-RFLP based on 16S rRNA genes analysis. The T-RFLP patterns showed an average of 26.5 ± 1.7 T-RFs (terminal restriction fragments; or operational taxonomic units (OTUs)). The Shannon and Evenness were almost similar (no significant differences) in all conditions with average 2.94 ± 0.2 and 0.7 ± 0.1 respectively.

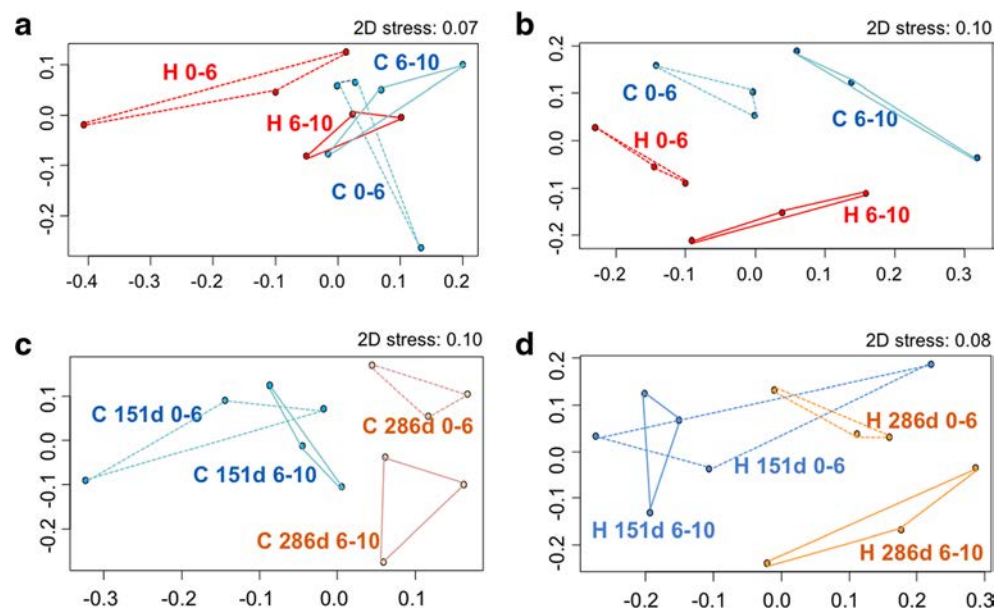
The bacterial communities' structures from the different treatments were compared by NMDS. At 151 days, the bacterial communities' structures were similar except those from the first 0–6-cm horizon in the harrowing treatment that grouped apart (Fig. 4a; $R=0.1$, $p=0.12$) showing the effect of the harrowing treatment whereas the bacterial communities' structures were found different at 286 days (Fig. 4b; $R=0.65$, $p=0.002$) indicating that each treatment and each horizon was characterised by a specific bacterial community. Thus, considering the 0–6 cm horizon where biodegradation occurred, this observation suggested that the bacterial communities of the harrowing treatment at 286 days were distinct to those from the control treatment although the biodegradation rates were found similar. We have reported comparable observation with sediments in which bioturbation reworking was enhanced by the addition of *H. diversicolor* (Cravo-Laureau and Duran 2014; Stauffert et al. 2013). Such observation also indicated that the mechanical reworking by harrowing imposed a selection above the presence of oil, resulting in a distinct bacterial community structure. It is thus likely that the harrowing was a stronger driver for the bacterial community than oil, because the effect of oil was hidden by the harrowing effect. In response to environmental perturbations,

the bacterial communities may be resistant, resilient or functionally redundant (Allison and Martiny 2008; Yachi and Loreau 1999). The results reported here could be explained either by the fact that the specific degraders group was not affected or by functional redundancy in hydrocarbon degradation. The manipulation of bacterial community structure and composition, for instance by harrowing as reported here, will provide the opportunity to decipher the mechanisms underlying functional redundancy by combining in depth characterisation of bacterial composition, by high throughput sequencing, with the analysis of appropriate genes involved in hydrocarbon degradation.

The observed changes in the bacterial T-RFLP fingerprints in the harrowed mesocosms may be also explained in part by an indirect effect as harrowing modified the structure of the macrobenthic community and the density of macroorganisms (Table 1). Indeed, previous studies demonstrated that the absence/presence of specific macroorganisms like polychaetes may influence the bacterial communities' structure not only in uncontaminated sediments (Pischedda et al. 2011) but also in oil-contaminated sediments (Cuny et al. 2007; Stauffert et al. 2013). Differences in mechanical and biological mixing in the sediments may have also induced different environmental conditions for bacterial communities.

Additionally, NMDS analyses showed a clear temporal shift of bacterial community structure between 151 and 286 days in control treatment (Fig. 4c; $R=0.44$, $p=0.003$) and harrowing treatment (Fig. 4d; $R=0.47$, $p=0.004$), which resulted to the separation of the bacterial communities of the surface (0–6 cm) from those of the deeper horizon (6–10 cm) without affecting the bacterial abundance (Fig. 3b). This observation is in accordance with ecological succession theory that hypothesises a succession of microorganisms following

Fig. 4 Comparison of bacterial community structures by non-metric multidimensional scaling (NMDS) analyses based on T-RFLP 16S rRNA gene patterns. **a** and **b** effect of treatment: comparisons of bacterial community structures at 151 (**a**) and 286 (**b**) days from harrowing treatment (*H*, red) and control (*C*, blue) for the horizons 0–6 cm (dashed lines) and 6–10 cm (full lines). **c** and **d** temporal shifts: bacterial community structure shifts between 151 (blue) and 286 (orange) days in sediments from control (**c**) and harrowing (**d**) treatments. Analyses were performed in triplicates, which are linked by lines



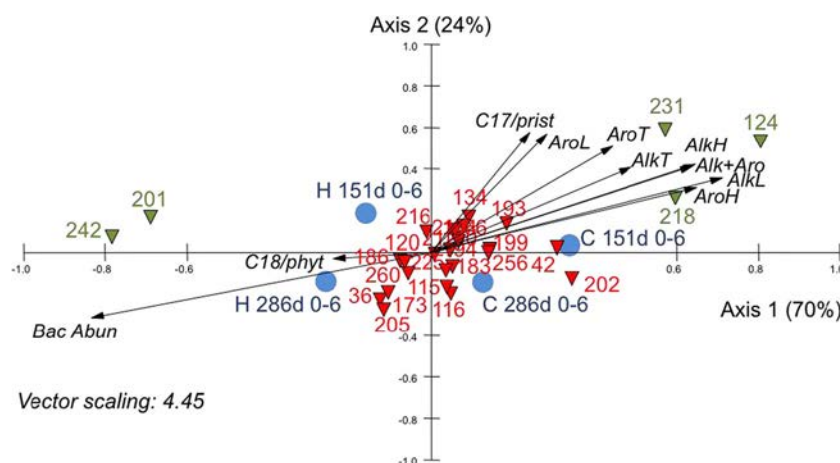


Fig. 5 Canonical correspondence analysis (CCA) correlating bacterial populations (triangles, T-RFLP OTUs) and communities (blue circles, T-RFLP patterns) with the hydrocarbon content (*Alk* and *Aro*, see below), biodegradation indexes (*C17/prist* and *C18/phyt*) and bacterial abundance (*Bac Abun*). The analysis is based on mean of triplicate samples for T-RFLP profiles, bacterial abundance and hydrocarbon contents. The specific OTUs (T-RFs from T-RFLP profiles) are indicated in green and the common OTUs in red. Blue circles show the bacterial communities in harrowed (*H*) and control (*C*) sediments at 151 (*151d*) and 286 (*286d*)

days for the horizon 0–6 cm (*0–6*). Hydrocarbon content: *AlkT* total alkane compounds, *AlkL* light molecular weight alkanes (<20 C atoms), *AlkH* high molecular weight alkanes (>20 C atoms), *AroT* total polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *AroL* light molecular weight PAHs (<3 benzene rings), *AroH* high molecular weight PAHs (>3 benzene rings), *Alk+ Aro* total of alkanes and PAHs compounds. Biodegradation indexes correspond to the ratio of *n*-C17 alkane/pristane (*C17/prist*) and *n*-C18 alkane/phytane (*C18/phyt*). The bacterial abundance (*Bac Abun*) corresponds to 16S rRNA gene copy numbers assessed by Q-PCR

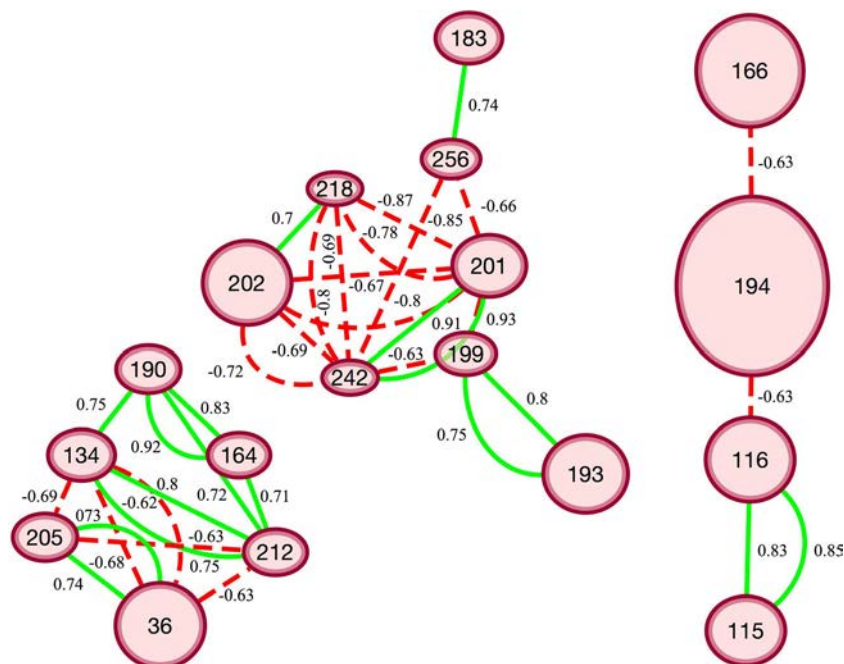
the succession of metabolites during the degradation (Head et al. 2006). Such modifications have been observed in sediments from different habitats including highly saline (Bordenave et al. 2004a; Bordenave et al. 2004b) and marine (Chronopoulou et al. 2013; Coulon et al. 2012) ecosystems contaminated by crude oil. However, it is important to notice that the bacterial community structures of the sediments surface (0–6 cm) at 286 days were still slightly related to those at

151 days in the harrowing-treated mesocosms (Fig. 4d), endorsing that the harrowing was strongly affecting the bacterial communities.

Bacterial assemblage in oiled sediments

In order to determine the bacterial populations (OTUs) associated with the degradation capacities, we performed

Fig. 6 Co-occurrence bacterial network showing the relationships between the OTUs. The network was inferred from T-RFLP patterns applying Pearson (straight lines) and Spearman (curved lines) correlations with 1000 bootstrap iterations, Fichers'Z *P* value threshold 0.05 and Bonferroni multiple-test corrections. The positive correlations are indicated by green lines and mutual exclusions by red dashed lines. Node circles correspond to OTUs, the size is proportional to the relative abundances considering all T-RFLP profiles. Numbers at the edge correspond to correlation weight



canonical correspondence analyses (CCA) correlating T-RFLP patterns with the hydrocarbon content, degradation indexes and bacterial abundance. The objective being to observe the correlations between OTUs and hydrocarbons, the CCA was performed with the samples in which biodegradation occurred, i.e. the 0–6 cm horizon of both treatments (Fig. 5). The CCA, explaining 94 % of the data distribution, showed that hydrocarbon content and bacterial abundances were in opposite directions along the axis 1 (70 % of the distribution), indicating that the presence of hydrocarbons probably limited the bacterial growth. Another explanation could be that more degradation occurred where bacteria were more abundant. Three OTUs (124, 218 and 231) were associated with high hydrocarbon content; they determine the specificity of the control bacterial community (C 151d 0–6) at 151 days when the biodegradation was low in the control mesocosms (Fig. 2), as indicated by the correlation with the n -C₁₇/pristane ratio in the CCA. These three OTUs may be tolerant to the presence of crude oil but their role in the biodegradation must be limited. In contrast, two OTUs (201 and 242) were associated with high bacterial abundance, explaining the difference of the harrowing-treated communities at 286 days (H 286d 0–6). It is likely that these two OTUs became predominant once the negative effect of hydrocarbon was attenuated; they probably play a minor role in hydrocarbon degradation. These observations are in accordance with previous studies demonstrating that some populations in hydrocarbon-degrading consortia play an auxiliary role in the bacterial community such as utilising metabolites (Dastgheib et al. 2012; Hii et al. 2009), increasing the bioavailability of the molecules (Kanaly et al. 2002), surfactant production (Ranchou-Peyruse et al. 2004) and syntrophic interactions (Hirschler-Réa et al. 2012; Kleinstuber et al. 2008).

In the CCA, most OTUs were grouped in the centre (red in Fig. 5), suggesting that they play a pivotal role in the bacterial community organisation. In order to test the hypothesis that the central OTUs in the CCA constitute the framework of the bacterial assemblage in oiled sediments, we conducted a co-occurrence network analysis. Because the objective was to determine the correlations between OTUs in oiled sediments, all the data set (both treatments and horizons) was included in the analysis in order to exclude the relationships that may occur in non-degrading conditions. Interestingly, the co-occurrence network analysis confirmed that most of these OTUs had a pivotal role in the microbial assemblage (Fig. 6), revealing three sub-networks.

The first sub-network formed by the most abundant OTUs (194, 166) shows mutual exclusion with no positive relation with other OTUs. It is likely that these OTUs, although dominant, did not play a crucial role in the bacterial community as indicated by the CCA (Fig. 5). The second sub-network was formed by four couples (183/256, 193/199, 218/202 and 201/242) with strong positive correlations (Pearson > 0.7; p value <

0.05). These couples excluded each other, suggesting ecological succession since negative associations are considered as structural shifts (Faust et al. 2012). Among them, it is important to notice that the couple formed by OTUs 201 and 242 were found in the harrowing treatment at 286 days as highlighted in the CCA (Fig. 5). Furthermore, these couples showed different correlation with hydrocarbon compounds as revealed by the clustered correlation (ClusCor) analysis (Fig. 7), suggesting different degradation capacities and thus supporting the ecological succession. The couples 183/256 and 201/242 showed no or weak correlation ($-0.17 < \text{Pearson} < 0.2$) and even exclusion (Pearson < -0.3) with hydrocarbon compounds, respectively. In contrast, the couple 193/199

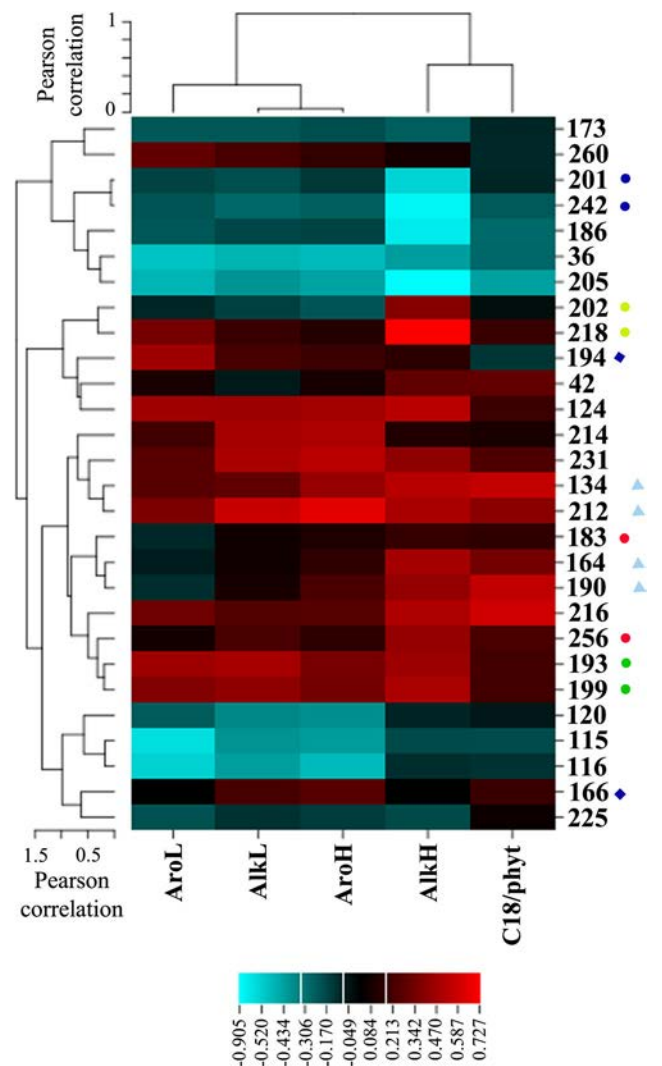


Fig. 7 Clustered correlation (*ClusCor*) between T-RFLP OTUs and chemical data. Colour legend shows Pearson correlation, *red* indicating high positive correlation and *blue* high negative correlation (exclusion). Clustering was performed applying Pearson correlation and complete linkage as cluster method. Abbreviations of the environmental parameters are those indicated in Fig. 5. *Diamonds* indicate OTUs of the sub-network 1, *coloured circles* the different OTUs couples of the sub-network 2 and *triangles* the OTUs of the sub-network 3

showed correlation with all hydrocarbons (Pearson > 0.47) whereas the couple 218/202 was strongly correlated to high molecular weight (MW) alkanes (Pearson > 0.7) and low MW aromatic compounds ($0.47 < \text{Pearson} < 0.58$; Fig. 7).

The co-occurrence network analysis did not found correlations for OTUs 124 and 231, which were associated to the hydrocarbon content in the CCA and the ClusCor analysis (Figs. 5 and 7). This observation confirms their limited role in the bacterial assemblage. It is likely that these OTUs were present transiently in the mesocosms. The third sub-network showed the central role of four OTUs (134, 164, 190 and 212) ensuring most associations, supported by positive Pearson correlations (> 0.7 ; p value < 0.05), constituting thus the network structural bases. The ClusCor analysis showed that the OTUs 212 and 134 were correlated with all types of hydrocarbon compounds whilst OTUs 164 and 190 were correlated with high MW alkanes and excluded low MW aromatics (Fig. 7). Noteworthy, the OTU 36 was associated with the OTU 205 but showed mutual exclusion with OTUs 134 and 212, major OTUs in the frame of the network, the OTUs 36 and 205 showing mutual exclusion with hydrocarbon compounds (Fig. 7). This observation is in accordance with the NMDS and CCA analyses (Figs. 4 and 5), suggesting that this negative association may correspond to a structural shift due to the effect of petroleum. The bacterial community modification has been demonstrated in many cases after petroleum contamination and resulting in ecological succession (Bordenave et al. 2004a; Bordenave et al. 2007; Head et al. 2006; Païssé et al. 2008). Similar modifications have been also reported for other perturbations such as biotic reworking activity by polychaetes (Christensen et al. 2002; Gilbert et al. 1996; Grossi et al. 2002; Stauffert et al. 2013), crustaceans (Bertics and Ziebis 2009), meiofauna (Louati et al. 2013) and natural perturbations (Paerl et al. 2002). Although the network was constructed with low-resolution fingerprinting method comparing to high throughput sequencing methods, it demonstrates the complex interactions between bacteria that constitute bacterial communities. Further studies are required to decipher the bacterial interactions and their role in hydrocarbon degradation. The in-depth characterisation of microbial communities by high throughput sequencing technology is a promising approach (Cravo-Laureau and Duran 2014) to describe microbial assemblage that may provide useful information to manage microbial degradation capacities.

Conclusion

The control of bacterial assemblages and activities is the major challenge for the implementation of biological processes for mitigating the effect of pollutants. Several approaches including bio-stimulation and bio-augmentation have been developed to favour and enhance bacterial activities involved in

biodegradation (Goni-Urriza et al. 2013). In this study, we demonstrated that the mechanical sediment reworking by harrowing favoured the initiation of bacterial hydrocarbon degradation activities. However, the intensive harrowing treatment performed in this study, applied twice a week, had a damaging effect on the macrofauna that may be deleterious for the whole ecosystem functioning. The usefulness of such harrowing treatment should thus be carefully examined before to envisage applying it for bioremediation processes. But overall, the harrowing treatment resulted in a distinct bacterial assemblage than that observed in the control. At the academic point of view, studying the modification of bacterial communities is a useful way to understand the assemblage rules driving bacterial communities' organisation; harrowing is an easy way to manipulate bacterial communities.

Acknowledgments We acknowledge the support of the French programme ANR DECAPAGE (project ANR-CESA-2011-006 01). We would like to thank all partners of the DECAPAGE project and MELODY group for their useful discussions. We acknowledge the Regional Platform for Environmental Microbiology PREMICE supported by the Aquitaine Regional Government Council (France) and the urban community of Pau-Pyrénées (France). We thank the Direction Générale de l'Armement (Edgar) and the Aquitaine Regional Government Council (France) for financial support to JA. We acknowledge B. Bouyssiere, S. Guasco, M.S. Goñi-Urriza and J. Gury for technical assistance during sampling campaign.

References

- Adamek Z, Marsalek B (2013) Bioturbation of sediments by benthic macroinvertebrates and fish and its implication for pond ecosystems: a review. *Aquacult Int* 21:1–17
- Allison SD, Martiny JBH (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:11512–11519
- Alzaga R, Montuori P, Ortiz L, Bayona JM, Albaigés J (2004) Fast solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry procedure for oil fingerprinting: application to the prestige oil spill. *J Chromatogr* 1025:133–138
- Bertics VJ, Ziebis W (2009) Biodiversity of benthic microbial communities in bioturbated coastal sediments is controlled by geochemical microniches. *ISME J* 3:1269–1285
- Bordenave S, Fourçans A, Blanchard S, Goni-Urriza MS, Caumette P, Duran R (2004a) Structure and functional analyses of bacterial communities changes in microbial mats following petroleum exposure. *Ophelia* 58:195–203
- Bordenave S, Jézéquel R, Fourçans A, Budzinski H, Merlin FX, Fourel T, Goñi-Urriza M, Guyoneaud R, Grimaud R, Caumette P, Duran R (2004b) Degradation of the “Erika” oil. *Aquat Living Resour* 17: 261–267
- Bordenave S, Goñi-Urriza MS, Caumette P, Duran R (2007) Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Appl Environ Microbiol* 73:6089–6097
- Cemiglia CE (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3:351–368
- Christensen M, Banta GT, Andersen O (2002) Effects of the polychaetes *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina* on the fate and distribution of pyrene in sediments. *Mar Ecol Prog Ser* 237:159–172

- Chronopoulou PM, Fahy A, Coulon F, Paissé S, Goñi-Urriza M, Acuña Alvarez L, McKew BA, Lawson T, Timmis KN, Duran R, Underwood GJC, McGenity TJ (2013) Impact of a simulated oil spill on benthic phototrophs and nitrogen-fixing bacteria in mudflat mesocosms. *Environ Microbiol* 15:242–252
- Coulon F, Chronopoulou P-M, Fahy A, Sandrine P, Goñi-Urriza M, Peperzak L, Acuña Alvarez L, McKew BA, Brussaard CPD, Underwood GJC, Timmis KN, Duran R, McGenity TJ (2012) Central role of dynamic tidal biofilms dominated by aerobic hydrocarbonoclastic bacteria and diatoms in the biodegradation of hydrocarbons in coastal mudflats. *Appl Environ Microbiol* 78:3638–3648
- Cravo-Laureau C, Duran R (2014) Marine coastal sediments microbial hydrocarbon degradation processes: contribution of experimental ecology in the omics'era. *Front Microbiol* 5:39
- Culman SW, Bukowski R, Gauch HG, Cadillo-Quiroz H, Buckley DH (2009) T-REX: Software for the processing and analysis of T-RFLP data. *BMC Bioinformatics* 10
- Cuny P, Miralles G, Cornet-Barthaux V, Acquaviva M, Stora G, Grossi V, Gilbert F (2007) Influence of bioturbation by the polychaete *Nereis diversicolor* on the structure of bacterial communities in oil contaminated coastal sediments. *Mar Pollut Bull* 54:452–459
- Dastgheib SMM, Amoozegar MA, Khajeh K, Shavandi M, Ventosa A (2012) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a halophilic microbial consortium. *Appl Microbiol Biotechnol* 95:789–798
- Duport E, Gilbert F, Poggiale JC, Dedieu K, Rabouille C, Stora G (2007) Benthic macrofauna and sediment reworking quantification in contrasted environments in the Thau Lagoon. *Estuar Coast Shelf Sci* 72:522–533
- Duran R, Goñi-Urriza MS (2010) Impact of pollution on microbial mats. In: Timmis K (ed) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer Berlin Heidelberg, pp 2339–2348. doi:10.1007/978-3-540-77587-4_170
- Duran R, Ranchou-Peyruse M, Menuet V, Monperrus M, Bareille G, Goñi MS, Salvado JC, Amouroux D, Guyoneaud R, Donard OFX, Caumette P (2008) Mercury methylation by a microbial community from sediments of the Adour estuary (Bay of Biscay, France). *Environ Pollut* 156:951–958
- Faust K, Sathirapongsasuti JF, Izard J, Segata N, Gevers D, Raes J, Huttenhower C (2012) Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS Comp Biol* 8
- Gilbert F, Stora G, Bertrand JC (1996) In situ bioturbation and hydrocarbon fate in an experimental contaminated Mediterranean coastal ecosystem. *Chemosphere* 33:1449–1458
- Goni-Urriza M, Cravo-Laureau C, Duran R (2013) Microbial bioremediation of aquatic environments. In: Féraud J, Blaise C (eds) *Encyclopedia of aquatic ecotoxicology*, vol 2. Springer, Berlin, pp 709–720
- Grossi V, Massias D, Stora G, Bertrand JC (2002) Burial, exportation and degradation of acyclic petroleum hydrocarbons following a simulated oil spill in bioturbated Mediterranean coastal sediments. *Chemosphere* 48:947–954
- Head IM, Jones DM, Røling WF (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat Rev Microbiol* 4:173–182
- Hii YS, Law AT, Shazili NAM, Abdul-Rashid MK, Lee CW (2009) Biodegradation of Tapis blended crude oil in marine sediment by a consortium of symbiotic bacteria. *Int Biodeterior Biodegrad* 63:142–150
- Hirschler-Réa A, Cravo-Laureau C, Casalot L, Matheron R (2012) Methanogenic octadecene degradation by syntrophic enrichment culture from brackish sediments. *Curr Microbiol* 65:561–567
- Kanally RA, Harayama S, Watanabe K (2002) *Rhodanobacter* sp strain BPC1 in a benzo a pyrene-mineralizing bacterial consortium. *Appl Environ Microbiol* 68:5826–5833
- Kleinstuber S, Schleinitz KM, Breitfeld J, Harms H, Richnow HH, Vogt C (2008) Molecular characterization of bacterial communities mineralizing benzene under sulfate-reducing conditions. *FEMS Microbiol Ecol* 66:143–157
- Kristensen E, Penha-Lopes G, Delefosse M, Valdemarsen T, Quintana CO, Banta GT (2012) What is bioturbation? The need for a precise definition for fauna in aquatic sciences. *Mar Ecol Prog Ser* 446:285–302
- Kruskal WH, Wallis WA (1952) Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc* 47:583–621
- Louati H, Ben Said O, Soltani A, Got P, Mahmoudi E, Cravo-Laureau C, Duran R, Aissa P, Pringault O (2013) The roles of biological interactions and pollutant contamination in shaping microbial benthic community structure. *Chemosphere* 93:2535–2546
- Majdi N, Bardon L, Gilbert F (2014) Quantification of sediment reworking by the Asiatic clam *Corbicula fluminea* Muller, 1774. *Hydrobiologia* 732:85–92
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Wade WG (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64:795–799
- McGenity TJ (2014) Hydrocarbon biodegradation in intertidal wetland sediments. *Curr Opin Biotechnol* 27:46–54
- Michotey V, Guasco S, Boeuf D, Morezzi N, Durieux B, Charpy L, Bonin P (2012) Spatio-temporal diversity of free-living and particle-attached prokaryotes in the tropical lagoon of Ahe atoll (Tuamotu Archipelago) and its surrounding oceanic waters. *Mar Pollut Bull* 65:525–537
- Morales SE, Holben WE (2011) Linking bacterial identities and ecosystem processes: can 'omic' analyses be more than the sum of their parts? *FEMS Microbiol Ecol* 75:2–16
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Henry M, Stevens H, Wagner H (2011) *vegan: Community ecology package*. R package version 2.0-2. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Paerl HW, Dyble J, Twomey L, Pinckney JL, Nelson J, Kerkhof L (2002) Characterizing man-made and natural modifications of microbial diversity and activity in coastal ecosystems. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:487–507
- Paissé S, Coulon F, Goñi-Urriza M, Peperzak L, McGenity TJ, Duran R (2008) Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment. *FEMS Microbiol Ecol* 66:295–305
- Pischedda L, Milton C, Gilbert F, Cuny P (2011) Characterization of specificity of bacterial community structure within the burrow environment of the marine polychaete *Hediste* (*Nereis*) *diversicolor*. *Res Microbiol* 162:1033–1042
- Prince RC, Elmendorf DL, Lute JR, Hsu CS, Haith CE, Senius JD, Dechert GJ, Douglas GS, Butler EL (1994) 17-Alpha(H),21-beta(H)-hopane as a conserved internal marker for estimating the biodegradation of crude-oil. *Environ Sci Technol* 28:142–145
- Queiros AM, Birchenough SNR, Bremner J, Godbold JA, Parker RE, Romero-Ramirez A, Reiss H, Solan M, Somerfield PJ, Van Colen C, Van Hoey G, Widdicombe S (2013) A bioturbation classification of European marine infaunal invertebrates. *Ecol Evol* 3:3958–3985
- Ranchou-Peyruse A, Moppert X, Hourcade E, Hernandez-Raquet G, Caumette P, Guyoneaud R (2004) Characterization of brackish anaerobic bacteria involved in hydrocarbon degradation: a combination of molecular and culture-based approaches. *Ophelia* 58:255–262
- Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang PL, Ideker T (2011) Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* 27:431–432
- Soltwedel T, Lansard B, Gilbert F, Hasemann C, Bell E, Sablotny B, Eagle M, Kershaw P, Rabouille C (2008) An "Integrated Sediment Disturber" (ISD) to study the impact of repeated physical perturbations on sediment geochemistry and the small benthic biota. *Limnol Oceanogr Methods* 6:307–318

- Stauffer M, Cravo-Laureau C, Jézéquel R, Barantal S, Cuny P, Gilbert F, Cagnon C, Milton C, Amouroux D, Mahdaoui F, Bouyssié B, Stora G, Merlin FX, Duran R (2013) Impact of oil on bacterial community structure in bioturbated sediments. *PLoS ONE* 8
- Stauffer M, Duran R, Gassie C, Cravo-Laureau C (2014) Response of archaeal communities to oil spill in bioturbated mudflat sediments. *Microb Ecol* 67:108–119
- Timmis KN, McGenity TJ, Meer JR, Lorenzo V (2010) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer, Berlin
- Vitte I, Duran R, Jézéquel R, Caumette P, Cravo-Laureau C (2011) Effect of oxic/anoxic switches on bacterial communities and PAH biodegradation in an oil-contaminated sludge. *Environ Sci Pollut Res* 18: 1022–1032
- Vitte I, Duran R, Hernandez-Raquet G, Mounier J, Jézéquel R, Bellet V, Balaguer P, Caumette P, Cravo-Laureau C (2013) Dynamics of metabolically active bacterial communities involved in PAH and toxicity elimination from oil-contaminated sludge during anoxic/oxic oscillations. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:4199–4211
- Weinstein JN, Myers TG, O'Connor PM, Friend SH, Fornace AJ, Kohn KW, Fojo T, Bates SE, Rubinstein LV, Anderson NL, Buolamwini JK, vanOsdol WW, Monks AP, Scudiero DA, Sausville EA, Zaharevitz DW, Bunow B, Viswanadhan VN, Johnson GS, Wittes RE, Paull KD (1997) An information-intensive approach to the molecular pharmacology of cancer. *Science* 275:343–349
- Widdicombe S, Austen MC (2001) The interaction between physical disturbance and organic enrichment: an important element in structuring benthic communities. *Limnol Oceanogr* 46:1720–1733
- Yachi S, Loreau M (1999) Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: the insurance hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1463–1468

***Références
bibliographiques***

A

- Abed, R.M., Musat, N., Musat, F., and Mussmann, M.** (2011) Structure of microbial communities and hydrocarbon-dependent sulfate reduction in the anoxic layer of a polluted microbial mat. *Mar Pollut Bull* **62**: 539-546.
- Abril, G., Commarieu, M.V., Etcheber, H., Deborde, J., Deflandre, B., Zivadinovic, M.K. et al.** (2010) In vitro simulation of oxic/suboxic diagenesis in an estuarine fluid mud subjected to redox oscillations. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **88**: 279-291.
- Aeckersberg, F., Bak, F., and Widdel, F.** (1991) Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology* **156**: 5-14.
- Ahmadian, A., Ehn, M., and Hober, S.** (2006) Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clin Chim Acta* **363**: 83-94.
- Aller, R.C.** (1994) Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation. *Chemical Geology* **114**: 331-345.
- Aller, R.C.** (1998) Mobile deltaic and continental shelf muds as suboxic, fluidized bed reactors. *Marine Chemistry* **61**: 143-155.
- Aller, R.C., and Yingst, J.Y.** (1985) Effects of the marine deposit-feeders *Heteromastus-Filiformis* (Polychaeta), *Macoma-Balthica* (Bivalvia), and *Tellina-Texana* (Bilvalvia) on averaged sedimentary solute transport, reaction-rates, and microbial distributions. *Journal of Marine Research* **43**: 615-645.
- Aller, R.C., and Aller, J.Y.** (1998) The effect of biogenic irrigation intensity and solute exchange on diagenetic reaction rates in marine sediments. *Journal of Marine Research* **56**: 905-936.
- Allison, S.D., and Martiny, J.B.** (2008) Colloquium paper: resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105 Suppl 1**: 11512-11519.
- Alongi, D.M.** (1994) The role of bacteria in nutrient recycling in tropical mangrove and other coastal benthic ecosystems. *Hydrobiologia* **285**: 19-32.
- Alperin, M.J., Albert, D.B., and Martens, C.S.** (1994) Seasonal-variations in production and consumption rates of dissolved organic-carbon in an organic-rich coastal sediment. *Geochimica Et Cosmochimica Acta* **58**: 4909-4930.
- Anderson, M.J.** (2001) A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* **26**: 32-46.
- Anderson, M.J., Gorley, R.N., and Clarke, K.R.** (2008) *PERMANOVA+ for PRIMER: guide to software and statistical methods*: Plymouth, U.K. PRIMER-E Ltd.
- Atlas, R.M.** (1981) Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews* **45**: 180-209.
- ATSDR** (1995) Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. In. U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, P.H.S., Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ed). Atlanta, Georgia
- Audiffren, C., Cayol, J.L., Joulain, C., Casalot, L., Thomas, P., Garcia, J.L., and Ollivier, B.** (2003) *Desulfonauticus submarinus* gen. nov., sp nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 1585-1590.

B

- Baek, S.-H., Yin, C.-R., and Lee, S.-T.** (2001) Aerobic nitrate respiration by a newly isolated phenol-degrading bacterium, *Alcaligenes* strain P5. *Biotechnology Letters* **23**: 627-630.
- Bahr, M., Crump, B.C., Klepac-Ceraj, V., Teske, A., Sogin, M.L., and Hobbie, J.E.** (2005) Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in a New England salt marsh. *Environ Microbiol* **7**: 1175-1185.
- Barott, K.L., Rodriguez-Mueller, B., Youle, M., Marhaver, K.L., Vermeij, M.J., Smith, J.E., and Rohwer, F.L.** (2012) Microbial to reef scale interactions between the reef-building coral *Montastraea annularis* and benthic algae. *Proc Biol Sci* **279**: 1655-1664.
- Bastviken, D.** (2004) Degradation of dissolved organic matter in oxic and anoxic lake water. *Limnology and Oceanography* **49**: 109-116.
- Bauer, J.E., Cai, W.-J., Raymond, P.A., Bianchi, T.S., Hopkinson, C.S., and Regnier, P.A.G.** (2013) The changing carbon cycle of the coastal ocean. *Nature* **504**: 61-70.
- Beck, M.W., Heck, K.L., Able, K.W., Childers, D.L., Eggleston, D.B., Gillanders, B.M. et al.** (2001) The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *Bioscience* **51**: 633-641.
- Bell, T., Newman, J.A., Silverman, B.W., Turner, S.L., and Lilley, A.K.** (2005) The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* **436**: 1157-1160.
- Beller, H.R., Kane, S.R., Legler, T.C., McKelvie, J.R., Lollar, B.S., Pearson, F. et al.** (2008) Comparative assessments of benzene, toluene, and xylene natural attenuation by quantitative polymerase chain reaction analysis of a catabolic gene, signature metabolites, and compound-specific isotope analysis. *Environ Sci Technol* **42**: 6065-6072.
- Beloqui, A., Pita, M., Polaina, J., Martinez-Arias, A., Golyshina, O.V., Zumarraga, M. et al.** (2006) Novel polyphenol oxidase mined from a metagenome expression library of bovine rumen: biochemical properties, structural analysis, and phylogenetic relationships. *J Biol Chem* **281**: 22933-22942.
- Belyakova, E.V., Rozanova, E.P., Borzenkov, I.A., Tourova, T.P., Pusheva, M.A., Lysenko, A.M., and Kolganova, T.V.** (2006) The new facultatively chemolithoautotrophic, moderately halophilic, sulfate-reducing bacterium *Desulfovermiculus halophilus* gen. nov., sp nov., isolated from an oil field. *Microbiology* **75**: 161-171.
- Bengtsson, J.** (1998) Which species? What kind of diversity? Which ecosystem function? Some problems in studies of relations between biodiversity and ecosystem function. *Applied Soil Ecology* **10**: 191-199.
- Berthe-Corti, L., and Höpner, T.** (2005) Geo-biological aspects of coastal oil pollution. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **219**: 171-189.
- Berthe-Corti, L., and Nachtkamp, M.** (2010) Bacterial Communities in Hydrocarbon-Contaminated Marine Coastal Environments. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K. (ed): Springer Berlin Heidelberg, pp. 2349-2359.
- Bertics, V.J., and Ziebis, W.** (2009) Biodiversity of benthic microbial communities in bioturbated coastal sediments is controlled by geochemical microniches. *Isme Journal* **3**: 1269-1285.
- Bertics, V.J., and Ziebis, W.** (2010) Bioturbation and the role of microniches for sulfate reduction in coastal marine sediments. *Environ Microbiol* **12**: 3022-3034.
- Biebl, H., and Pfennig, N.** (1977) Growth of sulfate-reducing bacteria with sulfur as electron-acceptor. *Archives of Microbiology* **112**: 115-117.
- Blanchard, G.F., Guarini, J.M., Orvain, F., and Sauriau, P.G.** (2001) Dynamic behaviour of benthic microalgal biomass in intertidal mudflats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **264**: 85-100.

- Bohne-Kjersem, A., Skadsheim, A., Goksoyr, A., and Grosvik, B.E.** (2009) Candidate biomarker discovery in plasma of juvenile cod (*Gadus morhua*) exposed to crude North Sea oil, alkyl phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Marine Environmental Research* **68**: 268-277.
- Bonin, P., Cravo-Laureau, C., Michotey, V., and Hirschler-Réa, A.** (2004) The anaerobic hydrocarbon biodegrading bacteria: An overview. *Ophelia* **58**: 243-254.
- Bordenave, S., Goni-Urriza, M.S., Caumette, P., and Duran, R.** (2007) Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6089-6097.
- Bordenave, S., Jézéquel, R., Fourçans, A., Budzinski, H., Merlin, F.X., Fourel, T. et al.** (2004) Degradation of the “Erika” oil. *Aquatic Living Resources* **17**: 261-267.
- Boudreau, B.P., and Marinelli, R.L.** (1994) A modelling study of discontinuous biological irrigation. *Journal of Marine Research* **52**: 947-968.
- Braker, G., Fesefeldt, A., and Witzel, K.P.** (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3769-3775.
- Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A.H., and Tiedje, J.M.** (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific northwest marine sediment communities. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2096-2104.
- Brion, D., and Pelletier, É.** (2005) Modelling PAHs adsorption and sequestration in freshwater and marine sediments. *Chemosphere* **61**: 867-876.
- Brioukhanov, A.L., and Netrusov, A.I.** (2007) Aerotolerance of strictly anaerobic microorganisms and factors of defense against oxidative stress: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **43**: 567-582.
- Brito, E.M.S., Guyoneaud, R., Goñi-Urriza, M., Ranchou-Peyruse, A., Verbaere, A., Crapez, M.A.C. et al.** (2006) Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in Microbiology* **157**: 752-762.
- Brune, A., Frenzel, P., and Cypionka, H.** (2000) Life at the oxic-anoxic interface: microbial activities and adaptations. *Fems Microbiology Reviews* **24**: 691-710.
- Brune, A., Evers, S., Kaim, G., Ludwig, W., and Schink, B.** (2002) *Ilyobacter insuetus* sp nov., a fermentative bacterium specialized in the degradation of hydroaromatic compounds. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 429-432.
- Button, D.K., Robertson, B.R., McIntosh, D., and Jüttner, F.** (1992) Interactions between marine bacteria and dissolved-phase and beached hydrocarbons after the Exxon Valdez oil spill. *Appl Environ Microbiol* **58**: 243-251.

C

- Callaghan, A.V., Davidova, I.A., Savage-Ashlock, K., Parisi, V.A., Gieg, L.M., Suflita, J.M. et al.** (2010) Diversity of benzyl- and alkylsuccinate synthase genes in hydrocarbon-impacted environments and enrichment cultures. *Environ Sci Technol* **44**: 7287-7294.
- Canfield, D.E.** (1994) Factors influencing organic-carbon preservation in marine-sediments. *Chemical Geology* **114**: 315-329.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K. et al.** (2010) *QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data*: Nat Methods. 2010 May;7(5):335-6. doi: 10.1038/nmeth.f.303. Epub 2010 Apr 11.

- Cappello, S., Denaro, R., Genovese, M., Giuliano, L., and Yakimov, M.** (2007a) Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on "oil spill bioremediation" in mesocosms. *Microbiol Res* **162**: 185 - 190.
- Cappello, S., Caruso, G., Zampino, D., Monticelli, L.S., Maimone, G., Denaro, R. et al.** (2007b) Microbial community dynamics during assays of harbour oil spill bioremediation: a microscale simulation study. *J Appl Microbiol* **102**: 184-194.
- Caradec, S., Grossi, V., Gilbert, F., Guigue, C., and Goutx, M.** (2004) Influence of various redox conditions on the degradation of microalgal triacylglycerols and fatty acids in marine sediments. *Organic Geochemistry* **35**: 277-287.
- Castro, H.F., Williams, N.H., and Ogram, A.** (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **31**: 1-9.
- Cerniglia, C.E.** (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**: 351-368.
- Chaffron, S., Rehrauer, H., Pernthaler, J., and von Mering, C.** (2010) A global network of coexisting microbes from environmental and whole-genome sequence data. *Genome Research* **20**: 947-959.
- Chao, W.L., and Hsu, S.F.** (2004) Response of the soil bacterial community to the addition of toluene and toluene-degrading bacteria. *Soil Biology and Biochemistry* **36**: 479-487.
- Chen, C.T.A., and Borges, A.V.** (2009) Reconciling opposing views on carbon cycling in the coastal ocean: Continental shelves as sinks and near-shore ecosystems as sources of atmospheric CO₂. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **56**: 578-590.
- Childress, J.J., Gluck, D.L., Carney, R.S., and Gowing, M.M.** (1989) Benthopelagic biomass distribution and oxygen-consumption in a deep-sea benthic boundary-layer dominated by gelatinous organisms. *Limnology and Oceanography* **34**: 913-930.
- Christensen, M., Banta, G.T., and Andersen, O.** (2002) Effects of the polychaetes *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina* on the fate and distribution of pyrene in sediments. *Marine Ecology Progress Series* **237**: 159-172.
- Chung, W.K., and King, G.M.** (2001) Isolation, characterization, and polyaromatic hydrocarbon degradation potential of aerobic bacteria from marine macrofaunal burrow sediments and description of *Lutibacterium anuloderans* gen. nov., sp. nov., and *Cycloclasticus spirillensus* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5585-5592.
- Churchill, S.A., Harper, J.P., and Churchill, P.F.** (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.
- Cifuentes, A., Anton, J., Benloch, S., Donnelly, A., Herbert, R.A., and Rodriguez-Valera, F.** (2000) Prokaryotic diversity in *Zostera noltii*-colonized marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1715-1719.
- Clay, E.** (1967) *Literature Survey of the common fauna of estuaries*. Brixham, Devon: I.C.I. Marine Research Station.
- Coates, J.D., Anderson, R.T., Woodward, J.C., Phillips, E.J.P., and Lovley, D.R.** (1996) Anaerobic hydrocarbon degradation in petroleum-contaminated harbor sediments under sulfate-reducing and artificially imposed iron-reducing conditions. *Environmental Science & Technology* **30**: 2784-2789.
- Coates, J.D., Woodward, J., Allen, J., Philp, P., and Lovley, D.R.** (1997) Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3589-3593.
- Coates, J.D., Chakraborty, R., Lack, J.G., O'Connor, S.M., Cole, K.A., Bender, K.S., and Achenbach, L.A.** (2001) Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature* **411**: 1039-1043.
- Cohen, Y., Jorgensen, B.B., Padan, E., and Shilo, M.** (1975) Sulfide-dependent anoxygenic photosynthesis in *Cyanobacterium Oscillatoria-Limnetica*. *Nature* **257**: 489-492.

- Colin, Y., Goni-Urriza, M., Caumette, P., and Guyoneaud, R.** (2013) Combination of high throughput cultivation and *dsrA* sequencing for assessment of sulfate-reducing bacteria diversity in sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **83**: 26-37.
- Coulon, F., Chronopolou, P.-M., Fahy, A., Paise, S., Goni-Urriza, M., Peperzak, L. et al.** (2012) Central role of dynamic tidal biofilms dominated by aerobic hydrocarbonoclastic bacteria and diatoms in the biodegradation of hydrocarbons in coastal mudflats. *Appl Environ Microbiol* **78**: 3638 - 3648.
- Coulter, E.D., and Kurtz, D.M.** (2001) A role for rubredoxin in oxidative stress protection in *Desulfovibrio vulgaris*: Catalytic electron transfer to rubrerythrin and two-iron superoxide reductase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **394**: 76-86.
- Coyne, M.S., Arunakumari, A., Averill, B.A., and Tiedje, J.M.** (1989) Immunological identification and distribution of dissimilatory heme cd1 and nonheme copper nitrite reductases in denitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* **55**: 2924-2931.
- Cravo-Laureau, C., and Duran, R.** (2014) Marine coastal sediments microbial hydrocarbon degradation processes: contribution of experimental ecology in the omics'era. *Front Microbiol* **5**: 39.
- Cravo-Laureau, C., Matheron, R., Joulain, C., Cayol, J.L., and Hirschler-Rea, A.** (2004) *Desulfatibacillum alkenivorans* sp. nov., a novel n-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium, and emended description of the genus *Desulfatibacillum*. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**: 1639-1642.
- Cravo-Laureau, C., Labat, C., Joulain, C., Matheron, R., and Hirschler-Rea, A.** (2007) *Desulfatiferula olefinivorans* gen. nov., sp. nov., a long-chain n-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 2699-2702.
- Cravo-Laureau, C., Hernandez-Raquet, G., Vitte, I., Jezequel, R., Belet, V., Godon, J.J. et al.** (2011) Role of environmental fluctuations and microbial diversity in degradation of hydrocarbons in contaminated sludge. *Research in Microbiology* **162**: 888-895.
- Cui, Z., Lai, Q., Dong, C., and Shao, Z.** (2008) Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* **10**: 2138-2149.
- Cuny, P., Miralles, G., Cornet-Barthaux, V., Acquaviva, M., Stora, G., Grossi, V., and Gilbert, F.** (2007) Influence of bioturbation by the polychaete *Nereis diversicolor* on the structure of bacterial communities in oil contaminated coastal sediments. *Mar Pollut Bull* **54**: 452 - 459.
- Cypionka, H.** (1994) Novel metabolic capacities of sulfate-reducing bacteria, and their activities in microbial mats. In *Microbial Mats*. Stal, L., and Caumette, P. (eds): Springer Berlin Heidelberg, pp. 367-376.
- Cypionka, H.** (2000) Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. *Annual Review of Microbiology* **54**: 827-848.
- Cypionka, H., Widdel, F., and Pfennig, N.** (1985) Survival of sulfate-reducing bacteria after oxygen stress, and growth in sulfate-free oxygen-sulfide gradients. *FEMS Microbiol Ecol* **31**: 39-45.

D

- Dade, W.B., Davis, J.D., Nichols, P.D., Nowell, A.R.M., Thistle, D., Trexler, M.B., and White, D.C.** (1990) Effects of bacterial exopolymer adhesion on the entrainment of sand. *Geomicrobiology Journal* **8**: 1-16.
- Dalsgaard, T., and Bak, F.** (1994) Nitrate reduction in a sulfate-reducing bacterium, *Desulfovibrio-Desulfuricans*, isolated from rice paddy soil - Sulfide inhibition, kinetics, and regulation. *Appl Environ Microbiol* **60**: 291-297.
- Dannenberg, S., Kroder, M., Dilling, W., and Cypionka, H.** (1992) Oxidation of H₂, organic-compounds and inorganic sulfur-compounds coupled to reduction of O₂ or nitrate by sulfate-reducing bacteria. *Archives of Microbiology* **158**: 93-99.

- Davidov, Y., Friedjung, A., and Jurkevitch, E.** (2006) Structure analysis of a soil community of predatory bacteria using culture-dependent and culture-independent methods reveals a hitherto undetected diversity of Bdellovibrio- and-like organisms. *Environ Microbiol* **8**: 1667-1673.
- de Deckere, E., Tolhurst, T.J., and de Brouwer, J.F.C.** (2001) Destabilization of cohesive intertidal sediments by infauna. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **53**: 665-669.
- de Wit, R.** (2008) Microbial diversity in the Bassin d'Arcachon coastal lagoon (SW France). *Hydrobiologia* **611**: 5-15.
- De Wit, R., Stal, L.J., Lomstein, B.A., Herbert, R.A., Van Gernerden, H., Viaroli, P. et al.** (2001) ROBUST: The Role of BUffering capacities in STabilising coastal lagoon ecosystems. *Continental Shelf Research* **21**: 2021-2041.
- DeAngelis, K.M., Silver, W.L., Thompson, A.W., and Firestone, M.K.** (2010) Microbial communities acclimate to recurring changes in soil redox potential status. *Environ Microbiol* **12**: 3137-3149.
- Decho, A.W.** (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* **20**: 1257-1273.
- Decho, A.W., and Moriarty, D.J.W.** (1990) Bacterial exopolymer utilization by a Harpacticoid copepod - A methodology and results. *Limnology and Oceanography* **35**: 1039-1049.
- Degens, B.P., Schipper, L.A., Sparling, G.P., and Duncan, L.C.** (2001) Is the microbial community in a soil with reduced catabolic diversity less resistant to stress or disturbance? *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 1143-1153.
- Dell'Anno, A., Beolchini, F., Rocchetti, L., Luna, G.M., and Danovaro, R.** (2012) High bacterial biodiversity increases degradation performance of hydrocarbons during bioremediation of contaminated harbor marine sediments. *Environ Pollut* **167**: 85-92.
- DeLong, E.F.** (2009) The microbial ocean from genomes to biomes. *Nature* **459**: 200-206.
- Desai, C., and Madamwar, D.** (2007) Extraction of inhibitor-free metagenomic DNA from polluted sediments, compatible with molecular diversity analysis using adsorption and ion-exchange treatments. *Bioresour Technol* **98**: 761-768.
- Desai, C., Pathak, H., and Madamwar, D.** (2010) Advances in molecular and "-omics" technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. *Bioresour Technol* **101**: 1558-1569.
- Desai, C., Parikh, R.Y., Vaishnav, T., Shouche, Y.S., and Madamwar, D.** (2009) Tracking the influence of long-term chromium pollution on soil bacterial community structures by comparative analyses of 16S rRNA gene phylotypes. *Research in Microbiology* **160**: 1-9.
- Dilling, W., and Cypionka, H.** (1990) Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *Fems Microbiology Letters* **71**: 123-127.
- Dolla, A., Fournier, M., and Dermoun, Z.** (2006) Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Biotechnology* **126**: 87-100.
- dos Santos, H.F., Cury, J.C., do Carmo, F.L., dos Santos, A.L., Tiedje, J., van Elsas, J.D. et al.** (2011) Mangrove Bacterial Diversity and the Impact of Oil Contamination Revealed by Pyrosequencing: Bacterial Proxies for Oil Pollution. *PLoS One* **6**.
- Dowd, S., Callaway, T., Wolcott, R., Sun, Y., McKeehan, T., Hagevoort, R., and Edrington, T.** (2008) Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology* **8**: 125.
- Doyle, E., Muckian, L., Hickey, A.M., and Clipson, N.** (2008) Chapter 2 - Microbial PAH Degradation. In *Advances in Applied Microbiology*. Allen I. Laskin, S.S., and Geoffrey, M.G. (eds): Academic Press, pp. 27-66.

Dutta, T.K., and Harayama, S. (2000) Fate of crude oil by the combination of photooxidation and biodegradation. *Environmental Science & Technology* **34**: 1500-1505.

Dyksterhouse, S.E., Gray, J.P., Herwig, R.P., Lara, J.C., and Staley, J.T. (1995) *Cycloclasticus pugetii* gen. nov., sp. nov., an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium from marine sediments. *Int J Syst Bacteriol*: 116-123.

E

Edgar, R.C. (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460-2461.

Edwards, E.A., and Grbic-Galic, D. (1994) Anaerobic degradation of toluene and o-xylene by a methanogenic consortium. *Appl Environ Microbiol* **60**: 313-322.

Eggleton, J., and Thomas, K.V. (2004) A review of factors affecting the release and bioavailability of contaminants during sediment disturbance events. *Environment International* **30**: 973-980.

Elango, V., Urbano, M., Lemelle, K.R., and Pardue, J.H. (2014) Biodegradation of MC252 oil in oil:sand aggregates in a coastal headland beach environment. *Front Microbiol* **5**: 161.

Evans, F.F., Rosado, A.S., Sebastian, G.V., Casella, R., Machado, P., Holmstrom, C. et al. (2004) Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiol Ecol* **49**: 295-305.

F

Fahy, A., and McKew, B. (2010) Microcosms. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K. (ed): Springer Berlin Heidelberg, pp. 3523-3527.

Fenchel, T., and Finlay, B. (2008) Oxygen and the spatial structure of microbial communities. *Biol Rev Camb Philos Soc* **83**: 553-569.

Fenchel, T.M. (1999) Mud, microbes, and mineralization - Invitational ONR lecture (Reprinted from *Developments in Industrial Microbiology*, vol 21, pg 1-10, 1980). *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **22**: 439-448.

Ferrer, M., Golyshina, O.V., Chernikova, T.N., Khachane, A.N., Reyes-Duarte, D., Santos, V.A. et al. (2005) Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environ Microbiol* **7**: 1996-2010.

Fish, J.A., Chai, B., Wang, Q., Sun, Y., Brown, C.T., Tiedje, J.M., and Cole, J.R. (2013) FunGene: the functional gene pipeline and repository. *Front Microbiol* **4**: 291.

Fisher, J.B., Lick, W.J., McCall, P.L., and Robbins, J.A. (1980) Vertical mixing of lake-sediments by tubificid oligochaetes. *Journal of Geophysical Research-Oceans and Atmospheres* **85**: 3997-4006.

Foster, J.W. (1962) Hydrocarbons as substrates for microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology* **28**: 241-274.

Francois, F., Poggiale, J.C., Durbec, J.P., and Stora, G. (1997) A new approach for the modelling of sediment reworking induced by a macrobenthic community. *Acta Biotheoretica* **45**: 295-319.

Francois, F., Dalegre, K., Gilbert, F., and Stora, G. (1999) Specific variability within functional groups. Study of the sediment reworking of two Veneridae bivalves, *Ruditapes decussatus* and *Venerupis aurea*. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* **322**: 339-345.

- Fuhrman, J.A.** (2009) Microbial community structure and its functional implications. *Nature* **459**: 193-199.
- Fuhrman, J.A., and Hagström, Å.** (2008) Bacterial and archaeal community structure and its patterns. . In *Microbial ecology of the oceans*. Kirchman, D.L. (ed). New York: John Wiley & sons Inc., pp. 45-90.
- Fuhrman, J.A., and Steele, J.A.** (2008) Community structure of marine bacterioplankton: patterns, networks, and relationships to function. *Aquatic Microbial Ecology* **53**: 69-81.
- Fuhrman, J.A., Hewson, I., Schwalbach, M.S., Steele, J.A., Brown, M.V., and Naeem, S.** (2006) Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 13104-13109.
- Fukui, M., and Takii, S.** (1990) Survival of sulfate-reducing bacteria in oxic surface sediment of a seawater lake. *FEMS Microbiol Ecol* **73**: 317-322.
- Fukui, Y., Abe, M., Kobayashi, M., Shimada, Y., Saito, H., Oikawa, H. et al.** (2014) Sulfitobacter porphyrae sp nov., isolated from the red alga Porphyra yezoensis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**: 438-443.

G

- Galaktionov, O.S., Meysman, F.J.R., and Middelburg, J.J.** (2003) Bio-irrigation induced by Arenicola Marina: classical assumptions vs. numerical modeling. *Berichte – Forschungszentrum Terramare* **12**: 59-62.
- Gao, H., Schreiber, F., Collins, G., Jensen, M.M., Kostka, J.E., Lavik, G. et al.** (2009) Aerobic denitrification in permeable Wadden Sea sediments. *ISME J* **4**: 417-426.
- Gardner, L.R., Sharma, P., and Moore, W.S.** (1987) A regeneration model for the effect of bioturbation by fiddler crabs on 210Pb profiles in salt marsh sediments. *Journal of Environmental Radioactivity* **5**: 25-36.
- Garrett, R.M., Rothenburger, S.J., and Prince, R.C.** (2003) Biodegradation of fuel oil under laboratory and Arctic marine conditions. *Spill Science & Technology Bulletin* **8**: 297-302.
- Gattuso, J.P., Frankignoulle, M., and Wollast, R.** (1998) Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 405-434.
- Geets, J., Borremans, B., Diels, L., Springael, D., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., and Vanbroekhoven, K.** (2006) DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *J Microbiol Methods* **66**: 194-205.
- Gerino, M., Aller, R.C., Lee, C., Cochran, J.K., Aller, J.Y., Green, M.A., and Hirschberg, D.** (1998) Comparison of different tracers and methods used to quantify bioturbation during a spring bloom: 234-thorium, luminophores and chlorophyll a. *Estuarine Coastal and Shelf Science* **46**: 531-547.
- Gerino, M., Stora, G., Francois-Carcaillet, F., Gilbert, F., Poggiale, J.C., Mermillod-Blondin, F. et al.** (2003) Macro-invertebrate functional groups in freshwater and marine sediments: A common mechanistic classification. *Vie Et Milieu-Life and Environment* **53**: 221-231.
- Gharizadeh, B., Nordström, T., Ahmadian, A., Ronaghi, M., and Nyrén, P.** (2002) Long-read pyrosequencing using pure 2'-deoxyadenosine-5'-o'-(1-thiotriphosphate) Sp-isomer. *Analytical Biochemistry* **301**: 82-90.
- Gilbert, F., Stora, G., and Bertrand, J.C.** (1996) In situ bioturbation and hydrocarbon fate in an experimental contaminated Mediterranean coastal ecosystem. *Chemosphere* **33**: 1449-1458.
- Gilbert, F., Aller, R.C., and Hulth, S.** (2003) The influence of macrofaunal burrow spacing and diffusive scaling on sedimentary nitrification and denitrification: An experimental simulation and model approach. *Journal of Marine Research* **61**: 101-125.

- Gilbert, F., Hulth, S., Grossi, V., Poggiale, J.C., Desrosiers, G., Rosenberg, R. et al.** (2007) Sediment reworking by marine benthic species from the Gullmar Fjord (Western Sweden): Importance of faunal biovolume. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **348**: 133-144.
- Gilbert, J.A., Steele, J.A., Caporaso, J.G., Steinbrueck, L., Reeder, J., Temperton, B. et al.** (2012) Defining seasonal marine microbial community dynamics. *Isme Journal* **6**: 298-308.
- Giloteaux, L., Goñi-Urriza, M., and Duran, R.** (2010) Nested PCR and New Primers for Analysis of Sulfate-Reducing Bacteria in Low-Cell-Biomass Environments. *Appl Environ Microbiol* **76**: 2856-2865.
- Girvan, M.S., Campbell, C.D., Killham, K., Prosser, J.I., and Glover, L.A.** (2005) Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ Microbiol* **7**: 301-313.
- Gittel, A., Seidel, M., Kuever, J., Galushko, A.S., Cypionka, H., and Konneke, M.** (2010) *Desulfopila inferna* sp nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from the subsurface of a tidal sand-flat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 1626-1630.
- Glenn, T.C.** (2011) Field guide to next-generation DNA sequencers. *Molecular Ecology Resources* **11**: 759-769.
- Gogou, A., Bouloubassi, I., and Stephanou, E.G.** (2000) Marine organic geochemistry of the Eastern Mediterranean: 1. Aliphatic and polyaromatic hydrocarbons in Cretan Sea surficial sediments. *Marine Chemistry* **68**: 265-282.
- Good, I.J.** (1953) The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika* **40**: 237-264.
- Grabowski, R.C., Droppo, I.G., and Wharton, G.** (2011) Erodibility of cohesive sediment: The importance of sediment properties. *Earth-Science Reviews* **105**: 101-120.
- Graf, G., and Rosenberg, R.** (1997) Bioresuspension and biodeposition: A review. *Journal of Marine Systems* **11**: 269-278.
- Greene, E.A., Kay, J.G., Jaber, K., Stehmeier, L.G., and Voordouw, G.** (2000) Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5282-5289.
- Greenwood, P.F., Wibrow, S., George, S.J., and Tibbett, M.** (2009) Hydrocarbon biodegradation and soil microbial community response to repeated oil exposure. *Organic Geochemistry* **40**: 293-300.
- Grossi, V., Massias, D., Stora, G., and Bertrand, J.** (2002) Burial, exportation and degradation of acyclic petroleum hydrocarbons following a simulated oil spill in bioturbated Mediterranean coastal sediments. *Chemosphere* **48**: 947 - 954.

H

- Hales, B.A., Edwards, C., Ritchie, D.A., Hall, G., Pickup, R.W., and Saunders, J.R.** (1996) Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* **62**: 668-675.
- Hallin, S., and Lindgren, P.E.** (1999) PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1652-1657.
- Halpern, B., Walbridge, S., Selkoe, K., Kappel, C., Micheli, F., D'agrosa, C. et al.** (2008) A global map of human impact on marine ecosystems. *Science* **319**: 948 - 952.
- Halpern, B.S., Selkoe, K.A., Micheli, F., and Kappel, C.V.** (2007) Evaluating and ranking the vulnerability of global marine ecosystems to anthropogenic threats. *Conservation Biology* **21**: 1301-1315.

- Hansen, K., King, G.M., and Kristensen, E.** (1996) Impact of the soft shell clam *Mya arenaria* on sulfate reduction in an intertidal sediment. *Aquatic Microbial Ecology* **10**: 181-194.
- Hansen, S.K., Rainey, P.B., Haagenensen, J.A.J., and Molin, S.** (2007) Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature* **445**: 533-536.
- Hanson, C.A., Fuhrman, J.A., Horner-Devine, M.C., and Martiny, J.B.H.** (2012) Beyond biogeographic patterns: processes shaping the microbial landscape. *Nature Reviews Microbiology* **10**: 497-506.
- Harayama, S., Kasai, Y., and Hara, A.** (2004) Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Curr Opin Biotechnol* **15**: 205 - 214.
- Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y., and Shutsubo, K.** (1999) Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **1**: 63-70.
- Harms, H., Smith, K., and Wick, L.** (2010) Microorganism-hydrophobic compound interactions. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*: 1479 - 1490.
- Hartmann, M., and Widmer, F.** (2006) Community Structure Analyses Are More Sensitive to Differences in Soil Bacterial Communities than Anonymous Diversity Indices. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7804-7812.
- Hattori, S., Kamagata, Y., Hanada, S., and Shoun, H.** (2000) *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**: 1601-1609.
- Hayes, L.A., and Lovley, D.R.** (2002) Specific 16S rDNA sequences associated with naphthalene degradation under sulfate-reducing conditions in harbor sediments. *Microb Ecol* **43**: 134-145.
- Head, I.M., Jones, D.M., and Roling, W.F.** (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat Rev Microbiol* **4**: 173-182.
- Hirasawa, J.S., Sarti, A., Del Aguila, N.K.S., and Varesche, M.B.A.** (2008) Application of molecular techniques to evaluate the methanogenic archaea and anaerobic bacteria in the presence of oxygen with different COD : sulfate ratios in a UASB reactor. *Anaerobe* **14**: 209-218.
- Hirschler-Rea, A., Cravo-Laureau, C., Casalot, L., and Matheron, R.** (2012) Methanogenic octadecene degradation by syntrophic enrichment culture from brackish sediments. *Curr Microbiol* **65**: 561-567.
- Huber, R., Rossnagel, P., Woese, C.R., Rachel, R., Langworthy, T.A., and Stetter, K.O.** (1996) Formation of ammonium from nitrate during chemolithoautotrophic growth of the extremely thermophilic bacterium *Ammonifex degensii* gen nov sp nov. *Systematic and Applied Microbiology* **19**: 40-49.
- Huettel, M., and Gust, G.** (1992) Solute release mechanisms from confined sediment cores in stirred benthic chambers and flume flows. *Marine Ecology Progress Series* **82**: 187-197.

I

- IMO, I.M.O.** (2004) *Bioremediation in marine oil spills : guidance document for decision making and implementation of bioremediation in marine oil spills*. London: IMO.
- Islam, M.S., and Tanaka, M.** (2004) Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin* **48**: 624-649.
- Itoh, T., Suzuki, K., and Nakase, T.** (1998) *Thermocladium modestius* gen. nov., sp. nov., a new genus of rod-shaped, extremely thermophilic crenarchaeote. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 879-887.

J

- Jessup, C.M., Forde, S.E., and Bohannon, B.J.M.** (2005) Microbial Experimental Systems in Ecology. *37*: 273-307.
- Jessup, C.M., Kassen, R., Forde, S.E., Kerr, B., Buckling, A., Rainey, P.B., and Bohannon, B.J.M.** (2004) Big questions, small worlds: microbial model systems in ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 189-197.
- Jeter, R., and Ingraham, J.** (1981) The Denitrifying Prokaryotes. In *The Prokaryotes*. Starr, M., Stolp, H., Trüper, H., Balows, A., and Schlegel, H. (eds): Springer Berlin Heidelberg, pp. 913-925.
- Jiang, L., Zheng, Y., Peng, X., Zhou, H., Zhang, C., Xiao, X., and Wang, F.** (2009) Vertical distribution and diversity of sulfate-reducing prokaryotes in the Pearl River estuarine sediments, Southern China. *FEMS Microbiol Ecol* **70**: 93-106.
- Johnsen, A.R., Wick, L.Y., and Harms, H.** (2005) Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Pollut* **133**: 71-84.
- Johnsen, A.R., Winding, A., Karlson, U., and Roslev, P.** (2002) Linking of microorganisms to phenanthrene metabolism in soil by analysis of (13)C-labeled cell lipids. *Appl Environ Microbiol* **68**: 6106-6113.
- Jørgensen, B.B.** (1982) Ecology of the bacteria of the sulphur cycle with special reference to anoxic-oxic interface environments. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **298**: 543-561.
- Jørgensen, B.B.** (1977) The sulphur cycle of a coastal marine sediment. *Limnol Oceanogr* **22**: 814-832.
- Jørgensen, B.B.** (1982) Mineralization of organic-matter in the sea bed -The role of sulfate reduction. *Nature* **296**: 643-645.
- Jørgensen, B.B.** (1983) Processes at the sediment-water interface. In *The Major Biogeochemical Cycles and their Interactions*. Bolin, B., and Cook, R.B. (eds). New York Wiley, pp. 477-509
- Jørgensen, B.B.** (2000) Bacteria and marine biogeochemistry. In *Marine Geochemistry*. Schulz, H.D., and Zabel, M. (eds): Springer Berlin Heidelberg, pp. 173-207
- Jørgensen, B.B., and Revsbech, N.P.** (1985) Diffusive boundary-layers and the oxygen-uptake of sediments and detritus. *Limnology and Oceanography* **30**: 111-122.
- Juhasz, A.L., Britz, M.L., and Stanley, G.A.** (1997) Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*. *Journal of Applied Microbiology* **83**: 189-198.
- Juniper, S.K.** (1981) Stimulation of bacterial activity by a deposit feeder in two New Zealand intertidal inlets. , 313: . *Bulletin of Marine Science*: 691-701.

K

- Kaksonen, A.H., Spring, S., Schumann, P., Kroppenstedt, R.M., and Puhakka, J.A.** (2007a) *Desulfurispora thermophila* gen. nov., sp nov., a thermophilic, spore-forming sulfate-reducer isolated from a sulfidogenic fluidized-bed reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 1089-1094.
- Kaksonen, A.H., Spring, S., Schumann, P., Kroppenstedt, R.M., and Puhakka, J.A.** (2007b) *Desulfoviregula thermocuniculi* gen. nov., sp. nov., a thermophilic sulfate-reducer isolated from a geothermal underground mine in Japan. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**: 98-102.
- Kaplan, C.W., and Kitts, C.L.** (2004) Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1777-1786.

- Karkhoff-Schweizer, R.R., Huber, D.P., and Voordouw, G.** (1995) Conservation of the genes for dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* and *Archaeoglobus fulgidus* allows their detection by PCR. *Appl Environ Microbiol* **61**: 290-296.
- Kästner, M., Breuer-Jammali, M., and Mahro, B.** (1994) Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl Microbiol Biotechnol* **41**: 267-273.
- Kato, M.T., Field, J.A., and Lettinga, G.** (1993) High tolerance of methanogens in granular sludge to oxygen. *Biotechnology and Bioengineering* **42**: 1360-1366.
- Kiener, A., and Leisinger, T.** (1983) Oxygen sensitivity of methanogenic bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* **4**: 305-312.
- Kimes, N.E., Callaghan, A.V., Aktas, D.F., Smith, W.L., Sunner, J., Golding, B. et al.** (2013) Metagenomic analysis and metabolite profiling of deep-sea sediments from the Gulf of Mexico following the Deepwater Horizon oil spill. *Front Microbiol* **4**: 50.
- Kirby, T.W., Lancaster, J.R., and Fridovich, I.** (1981) Isolation and characterization of the iron-containing superoxide-dismutase of *Methanobacterium bryantii*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **210**: 140-148.
- Kjeldsen, K.U., Joulain, C., and Ingvorsen, K.** (2004) Oxygen tolerance of sulfate-reducing bacteria in activated sludge. *Environmental Science & Technology* **38**: 2038-2043.
- Kjeldsen, K.U., Loy, A., Jakobsen, T.F., Thomsen, T.R., Wagner, M., and Ingvorsen, K.** (2007) Diversity of sulfate-reducing bacteria from an extreme hypersaline sediment, Great Salt Lake (Utah). *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 287-298.
- Klein, M., Friedrich, M., Roger, A.J., Hugenholtz, P., Fishbain, S., Abicht, H. et al.** (2001) Multiple Lateral Transfers of Dissimilatory Sulfite Reductase Genes between Major Lineages of Sulfate-Reducing Prokaryotes. *Journal of Bacteriology* **183**: 6028-6035.
- Kleindienst, S., Herbst, F.A., Stagars, M., von Netzer, F., von Bergen, M., Seifert, J. et al.** (2014) Diverse sulfate-reducing bacteria of the *Desulfosarcina/Desulfococcus* clade are the key alkane degraders at marine seeps. *Isme Journal* **8**: 2029-2044.
- Kloos, K., Munch, J.C., and Schlöter, M.** (2006) A new method for the detection of alkane-monoxygenase homologous genes (alkB) in soils based on PCR-hybridization. *J Microbiol Methods* **66**: 486-496.
- Klouche, N., Basso, O., Lascourreges, J.F., Cayol, J.L., Thomas, P., Fauque, G. et al.** (2009) *Desulfocurvus vexinensis* gen. nov., sp nov., a sulfate-reducing bacterium isolated from a deep subsurface aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**: 3100-3104.
- Kniemeyer, O., Musat, F., Sievert, S.M., Knittel, K., Wilkes, H., Blumenberg, M. et al.** (2007) Anaerobic oxidation of short-chain hydrocarbons by marine sulphate-reducing bacteria. *Nature* **449**: 898-U810.
- Kogure, K., and Wada, M.** (2005) Impacts of macrobenthic bioturbation in marine sediment on bacterial metabolic activity. *Japanese Society of Microbial Ecology* **20**: 191-199.
- Konstantinidis, K.T., and Tiedje, J.M.** (2005) Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 2567-2572.
- Kostka, J.E., Prakash, O., Overholt, W.A., Green, S.J., Freyer, G., Canion, A. et al.** (2011) Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of Mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Appl Environ Microbiol* **77**: 7962-7974.
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., and Schloss, P.D.** (2013) Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*.
- Krekeler, D., Teske, A., and Cypionka, H.** (1998) Strategies of sulfate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat. *FEMS Microbiol Ecol* **25**: 89-96.

- Krekeler, D., Sigalevich, P., Teske, A., Cypionka, H., and Cohen, Y.** (1997) A sulfate-reducing bacterium from the oxic layer of a microbial mat from Solar Lake (Sinai), *Desulfovibrio oxycliniae* sp. nov. *Archives of Microbiology* **167**: 369-375.
- Krieg, N.R., and Hoffman, P.S.** (1986) Microaerophily and oxygen-toxicity. *Annual Review of Microbiology* **40**: 107-130.
- Kristensen, E.** (1988) Factors influencing the distribution of nereid polychaetes in Danish coastal waters. *Ophelia* **29**: 127-140.
- Kristensen, E.** (2000) Organic matter diagenesis at the oxic/anoxic interface in coastal marine sediments, with emphasis on the role of burrowing animals. *Hydrobiologia* **426**: 1-24.
- Kuenen, J.G., and Veldkamp, H.** (1972) *Thiomicrospira Pelophila*, gen.n., sp. n., a new obligately chemolithotrophic colorless sulfur bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology* **38**: 241-&.
- Kuever, J., Rainey, F.A., and Widdel, F.** (2005a) Genus X. *Desulfosarcina* Widdel 1981, 382^{VP}. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Garrity, G., Brenner, D.J., Krieg, N.R., and Staley, J.T.E. (eds): Williams & Wilkins, pp. 981-983.
- Kuever, J., Rainey, F.A., and Widdel, F.** (2005b) Genus III. *Desulfothermus* gen. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., and Garrity, G.M. (eds). New York: Springer, pp. 955-956.
- Kusel, K., and Drake, H.L.** (1995) Effects of environmental parameters on the formation and turnover of acetate by forest soils. *Appl Environ Microbiol* **61**: 3667-3675.

L

- Lai, Q.L., Wang, J.N., Gu, L., Zheng, T.L., and Shao, Z.Z.** (2013) *Alcanivorax marinus* sp nov., isolated from deep-sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**: 4428-4432.
- Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J.C., Bouizegarène, P., and Bogard, M.** (2008) Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* **23**: 260-279.
- Langille, M.G., Zaneveld, J., Caporaso, J.G., McDonald, D., Knights, D., Reyes, J.A. et al.** (2013) Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* **31**: 814-821.
- Lasa, A., Dieguez, A.L., and Romalde, J.L.** (2014) *Vibrio cortegadensis* sp nov., isolated from clams. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* **105**: 335-341.
- Laverock, B., Gilbert, J.A., Tait, K., Osborn, A.M., and Widdicombe, S.** (2011) Bioturbation: impact on the marine nitrogen cycle. *Biochemical Society Transactions* **39**: 315-320.
- Le Hir, P., Monbet, Y., and Orvain, F.** (2007) Sediment erodability in sediment transport modelling: Can we account for biota effects? *Continental Shelf Research* **27**: 1116-1142.
- Leahy, J.G., and Colwell, R.R.** (1990) Microbial-degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* **54**: 305-315.
- Legendre, P., and Anderson, M.J.** (1999) Distance-Based Redundancy Analysis: Testing Multispecies Responses in Multifactorial Ecological Experiments. *Ecological Monographs* **69**: 1-24.
- Leloup, J., Loy, A., Knab, N.J., Borowski, C., Wagner, M., and Jorgensen, B.B.** (2007) Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environ Microbiol* **9**: 131-142.

- Leloup, J., Petit, F., Boust, D., Deloffre, J., Bally, G., Clarisse, O., and Quillet, L.** (2005) Dynamics of sulfate-reducing microorganisms (dsrAB genes) in two contrasting mudflats of the Seine estuary (France). *Microb Ecol* **50**: 307-314.
- Levican, A., Collado, L., and Figueras, M.J.** (2013) *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Syst Appl Microbiol* **36**: 22-27.
- Lin, Q.X., and Mendelssohn, I.A.** (2012) Impacts and Recovery of the Deepwater Horizon Oil Spill on Vegetation Structure and Function of Coastal Salt Marshes in the Northern Gulf of Mexico. *Environmental Science & Technology* **46**: 3737-3743.
- Lipiatou, E., Tolosa, I., Simo, R., Bouloubassi, I., Dachs, J., Marti, S. et al.** (1997) Mass budget and dynamics of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Mediterranean Sea. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* **44**: 881-905.
- Liu, D., Hoynes-O'Connor, A., and Zhang, F.** (2013) Bridging the gap between systems biology and synthetic biology. *Front Microbiol* **4**.
- Liu, Z.Z., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., and Knight, R.** (2008) Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. *Nucleic Acids Research* **36**.
- Lombard, M., Fontecave, M., Touati, D., and Niviere, V.** (2000) Reaction of the desulfoferrodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxide anion - Evidence for a superoxide reductase activity. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 115-121.
- Long, R.A., and Azam, F.** (2001) Antagonistic Interactions among Marine Pelagic Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **67**: 4975-4983.
- Loreau, M., Naeem, S., and Inchausti, P.** (2002) *Biodiversity and Ecosystem Functioning: Synthesis and Perspectives*. New York: Oxford University Press.
- Löser, C., Seidel, H., Zehnsdorf, A., and Stottmeister, U.** (1998) Microbial degradation of hydrocarbons in soil during aerobic/anaerobic changes and under purely aerobic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**: 631-636.
- Lovley, D.R.** (1991) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiological Reviews* **55**: 259-287.
- Lovley, D.R.** (2003) Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nat Rev Microbiol* **1**: 35-44.
- Lovley, D.R., Holmes, D.E., and Nevin, K.P.** (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) Reduction. **49**: 219-286.
- Lovley, D.R., Baedeker, M.J., Lonergan, D.J., Cozzarelli, I.M., Phillips, E.J.P., and Siegel, D.I.** (1989) Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature* **339**: 297-300.
- Lucas, F.S., Bertru, G., and Hofle, M.G.** (2003) Characterization of free-living and attached bacteria in sediments colonized by *Hediste diversicolor*. *Aquatic Microbial Ecology* **32**: 165-174.
- Lucena, T., Ruvira, M.A., Arahall, D.R., Macian, M.C., and Pujalte, M.J.** (2012) *Vibrio aestivus* sp nov and *Vibrio quintilis* sp nov., related to *Marisflavi* and *Gazogenes* clades, respectively. *Systematic and Applied Microbiology* **35**: 427-431.
- Luton, P.E., Wayne, J.M., Sharp, R.J., and Riley, P.W.** (2002) The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* **148**: 3521-3530.

M

- MacNaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y.J., and White, D.C.** (1999) Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3566-3574.

- Mardis, E.R.** (2008) The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends in Genetics* **24**: 133-141.
- Marinelli, R.L., Lovell, C.R., Wakeham, S.G., Ringelberg, D.B., and White, D.C.** (2002) Experimental investigation of the control of bacterial community composition in macrofaunal burrows. *Marine Ecology Progress Series* **235**: 1-13.
- Marshall, A., and Rodgers, R.** (2004) Petroleomics: the next grand challenge for chemical analysis. *Accounts of Chemical Research* **37**: 53 - 59.
- Marshall, A.G., and Rodgers, R.P.** (2008) Petroleomics: chemistry of the underworld. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 18090-18095.
- Martiny, J.B.H., Bohannan, B.J.M., Brown, J.H., Colwell, R.K., Fuhrman, J.A., Green, J.L. et al.** (2006) Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology* **4**: 102-112.
- Maruyama, A., Ishiwata, H., Kitamura, K., Sunamura, M., Fujita, T., Matsuo, M., and Higashihara, T.** (2003) Dynamics of microbial Populations and strong selection for *Cycloclasticus pugetii* following the Nakhodka oil spill. *Microbial Ecology* **46**: 442-453.
- Mashayekhi, F., and Ronaghi, M.** (2007) Analysis of read length limiting factors in Pyrosequencing chemistry. *Analytical Biochemistry* **363**: 275-287.
- McGenity, T., Folwell, B., McKew, B., and Sanni, G.** (2012) Marine crude-oil biodegradation: a central role for interspecies interactions. *Aquatic Biosystems* **8**: 10.
- McGenity, T.J.** (2010) Halophilic Hydrocarbon Degraders. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K. (ed): Springer Berlin Heidelberg, pp. 1939-1951.
- McGenity, T.J.** (2014) Hydrocarbon biodegradation in intertidal wetland sediments. *Curr Opin Biotechnol* **27**: 46-54.
- McGrath, K.C., Thomas-Hall, S.R., Cheng, C.T., Leo, L., Alexa, A., Schmidt, S., and Schenk, P.M.** (2008) Isolation and analysis of mRNA from environmental microbial communities. *J Microbiol Methods* **75**: 172-176.
- McKenna, E.J., and Kallio, R.E.** (1971) Microbial metabolism of the isoprenoid alkane pristane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **68**: 1552-1554.
- McKew, B.A., Coulon, F., Yakimov, M.M., Denaro, R., Genovese, M., Smith, C.J. et al.** (2007) Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria. *Environ Microbiol* **9**: 1562-1571.
- McLusky, D.S.** (1989) The Estuarine Ecosystem. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* **75**: 691-692.
- Medlin, L.K., Williams, D.M., and Sims, P.A.** (1993) The evolution of the diatoms (Bacillariophyta). I. Origin of the group and assessment of the monophyly of its major divisions. *European Journal of Phycology* **28**: 261-275.
- Mehta, A.J.** (1988) Laboratory Studies on Cohesive Sediment Deposition and Erosion. In *Physical Processes in Estuaries*. Dronkers, J., and van Leussen, W. (eds): Springer Berlin Heidelberg, pp. 427-445.
- Mendelssohn, I.A., Andersen, G.L., Baltz, D.M., Caffey, R.H., Carman, K.R., Fleeger, J.W. et al.** (2012) Oil Impacts on Coastal Wetlands: Implications for the Mississippi River Delta Ecosystem after the Deepwater Horizon Oil Spill. *Bioscience* **62**: 562-574.
- Mermillod-Blondin, F., Rosenberg, R., Francois-Carcaillet, F., Norling, K., and Mauclaire, L.** (2004) Influence of bioturbation by three benthic infaunal species on microbial communities and biogeochemical processes in marine sediment. *Aquatic Microbial Ecology* **36**: 271-284.
- Meysman, F.J.R., Middelburg, J.J., and Heip, C.H.R.** (2006) Bioturbation: a fresh look at Darwin's last idea. *Trends in Ecology & Evolution* **21**: 688-695.

- Michaud, E., Desrosiers, G., Mermillod-Blondin, F., Sundby, B., and Stora, G.** (2005) The functional group approach to bioturbation: The effects of biodiffusers and gallery-diffusers of the *Macoma balthica* community on sediment oxygen uptake. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **326**: 77-88.
- Michel, J., and Hayes, M.O.** (1999) Weathering patterns of oil residues eight years after the Exxon Valdez oil spill. *Marine Pollution Bulletin* **38**: 855-863.
- Minz, D., Flax, J.L., Green, S.J., Muyzer, G., Cohen, Y., Wagner, M. et al.** (1999) Diversity of sulfate-reducing bacteria in oxic and anoxic regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes. *Appl Environ Microbiol* **65**: 4666-4671.
- Miralles, G.** (2007) Devenir d'une contamination pétrolière dans des sédiments côtiers infralittoraux et son impact sur les communautés bactériennes. In *Laboratoire de Microbiologie, Géochimie et Ecologie Marines UMR-CNRS 6117*: Université de la Méditerranée Aix-Marseille II, p. 231.
- Miralles, G., Grossi, V., Acquaviva, M., Duran, R., Claude Bertrand, J., and Cuny, P.** (2007) Alkane biodegradation and dynamics of phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria in an anoxic coastal marine sediment artificially contaminated with oil. *Chemosphere* **68**: 1327-1334.
- Montoya, J.M., Pimm, S.L., and Solé, R.V.** (2006) Ecological networks and their fragility. *Nature* **442**: 259-264.
- Moody, J.D., Freeman, J.P., Doerge, D.R., and Cerniglia, C.E.** (2001) Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* sp. strain PYR-1. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1476-1483.
- Morgan, X.C., Tickle, T.L., Sokol, H., Gevers, D., Devaney, K.L., Ward, D.V. et al.** (2012) Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment. *Genome Biol* **13**: 2012-2013.
- Moriarty, D.J.W., Pollard, P.C., Hunt, W.G., Moriarty, C.M., and Wassenberg, T.J.** (1985) Productivity of bacteria and microalgae and the effect of grazing by Holothurians in sediments on a coral-reef flat. *Marine Biology* **85**: 293-300.
- Muegge, B.D., Kuczynski, J., Knights, D., Clemente, J.C., Gonzalez, A., Fontana, L. et al.** (2011) Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and within humans. *Science* **332**: 970-974.
- Mueller, J.G., Devereux, R., Santavy, D.L., Lantz, S.E., Willis, S.G., and Pritchard, P.H.** (1997) Phylogenetic and physiological comparisons of PAH-degrading bacteria from geographically diverse soils. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**: 329-343.
- Muijs, B., and Jonker, M.T.O.** (2010) A closer look at bioaccumulation of petroleum hydrocarbon mixtures in aquatic worms. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**: 1943-1949.
- Muller-Karger, F.E., Varela, R., Thunell, R., Luerksen, R., Hu, C.M., and Walsh, J.J.** (2005) The importance of continental margins in the global carbon cycle. *Geophysical Research Letters* **32**.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H.** (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1**: 263-273.
- Muschenheim, D.K., Kepkay, P.E., and Kranck, K.** (1989) Microbial-growth in turbulent suspension and its relation to marine aggregate formation. *Netherlands Journal of Sea Research* **23**: 283-292.
- Musmann, M., Ishii, K., Rabus, R., and Amann, R.** (2005) Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. *Environ Microbiol* **7**: 405-418.
- Muyzer, G., and Stams, A.J.** (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nat Rev Microbiol* **6**: 441-454.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G.** (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 695-700.

N

- Nicol, G.W., and Schleper, C.** (2006) Ammonia-oxidising Crenarchaeota: important players in the nitrogen cycle? *Trends in Microbiology* **14**: 207-212.
- Nocker, A., Burr, M., and Camper, A.K.** (2007) Genotypic microbial community profiling: A critical technical review. *Microbial Ecology* **54**: 276-289.
- Nogales, B., Lanfranconi, M.P., Pina-Villalonga, J.M., and Bosch, R.** (2011) Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 275-298.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Valett, M.H., Francois-Carcaillet, F., Gaudet, J.P., Lafont, M., and Gibert, J.** (2009) Ecosystem engineering at the sediment-water interface: bioturbation and consumer-substrate interaction. *Oecologia* **161**: 125-138.
- Novais, R.C., and Thorstenson, Y.R.** (2011) The evolution of Pyrosequencing(R) for microbiology: From genes to genomes. *J Microbiol Methods* **86**: 1-7.

O

- Oka, A.R., Phelps, C.D., Zhu, X., Saber, D.L., and Young, L.Y.** (2011) Dual biomarkers of anaerobic hydrocarbon degradation in historically contaminated groundwater. *Environ Sci Technol* **45**: 3407-3414.
- Oksanen, J., Blanchet, G.F., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B. et al.** (2013) vegan: Community Ecology Package. Ordination methods, diversity analysis and other functions for community and vegetation ecologists.
- Oremland, R.S.** (1988) Biogeochemistry of methanogenic bacteria In *Biology of anaerobic microorganisms*. Zehnder, A.J.B. (ed). USA: John Wiley & Sons, pp. 641-705.
- Oude Elferink, S.J., Akkermans-van Vliet, W.M., Bogte, J.J., and Stams, A.J.** (1999) Desulfobacca acetoxidans gen. nov., sp. nov., a novel acetate-degrading sulfate reducer isolated from sulfidogenic granular sludge. *Int J Syst Bacteriol* **2**: 345-350.

P

- Paerl, H.W.** (1997) Primary Productivity and Producers. In *Manual of Environmental Microbiology*. Hurst, C.J., Hudson, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., and Walter, M.V.E. (eds). Washington: American Society of Microbiology, pp. 252-262.
- Paerl, H.W., Pinckney, J.L., and Steppe, T.F.** (2000) Cyanobacterial-bacterial mat consortia: examining the functional unit of microbial survival and growth in extreme environments. *Environ Microbiol* **2**: 11-26.
- Paisse, S., Duran, R., Coulon, F., and Goni-Urriza, M.** (2011) Are alkane hydroxylase genes (alkB) relevant to assess petroleum bioremediation processes in chronically polluted coastal sediments? *Appl Microbiol Biotechnol* **92**: 835 - 844.
- Paisse, S., Goni-Urriza, M., Stalder, T., Budzinski, H., and Duran, R.** (2012) Ring-hydroxylating dioxygenase (RHD) expression in a microbial community during the early response to oil pollution. *FEMS Microbiol Ecol* **80**: 77-86.
- Paisse, S., Coulon, F., Goni-Urriza, M., Peperzak, L., McGenity, T.J., and Duran, R.** (2008) Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment. *FEMS Microbiol Ecol* **66**: 295-305.

- Paterson, D.M., and Black, K.S.** (1999) Water flow, sediment dynamics and benthic biology. *Advances in Ecological Research*, Vol 29 **29**: 155-193.
- Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W. et al.** (2008) Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev* **32**: 927-955.
- Perez-Pantoja, D., Gonzalez, B., and Pieper, D.** (2010) Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*: 799 - 837.
- Petrosino, J.F., Highlander, S., Luna, R.A., Gibbs, R.A., and Versalovic, J.** (2009) Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem* **55**: 856-866.
- Pfennig, N., and Biebl, H.** (1976) *Desulfuromonas Acetoxidans* gen. nov and sp. nov.: new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium. *Archives of Microbiology* **110**: 3-12.
- Pfennig, N., Widdel, F., and Trüper, H.G.** (1981) The dissimilatory sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*. Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A., and Schlegel, H.G. (eds). Berlin: Springer, pp. 926–940.
- Philippot, L., Cregut, M., Cheneby, D., Bressan, M., Dequiet, S., Martin-Laurent, F. et al.** (2008) Effect of primary mild stresses on resilience and resistance of the nitrate reducer community to a subsequent severe stress. *FEMS Microbiol Lett* **285**: 51-57.
- Pischedda, L., Poggiale, J.C., Cuny, P., and Gilbert, F.** (2008) Imaging oxygen distribution in marine sediments. The importance of bioturbation and sediment heterogeneity. *Acta Biotheor* **56**: 123-135.
- Plante, C.J., and Mayer, L.M.** (1994) Distribution and efficiency of bacteriolysis in the gut of Arenicola-Marina and 3 additional deposit feeders. *Marine Ecology Progress Series* **109**: 183-194.
- Plante, C.J., and Mayer, L.M.** (1996) Seasonal variability in the bacteriolytic capacity of the deposit feeder Arenicola marina: Environmental correlates. *Aquatic Microbial Ecology* **11**: 101-109.
- Plante, C.J., Jumars, P.A., and Baross, J.A.** (1989) Rapid bacterial-growth in the hindgut of a marine deposit feeder. *Microbial Ecology* **18**: 29-44.
- Priemé, A., Braker, G., and Tiedje, J.M.** (2002) Diversity of Nitrite Reductase (nirK and nirS) Gene Fragments in Forested Upland and Wetland Soils. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1893-1900.
- Prince, R.** (2010) Eukaryotic hydrocarbon degraders. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N., McGenity, T.J., Meer, J.R., and De Lorenzo, V.E. (eds), pp. 2065 - 2078.
- Prince, R., Gramain, A., and McGenity, T.** (2010) Prokaryotic hydrocarbon degraders. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N., McGenity, T.J., Meer, J.R., and De Lorenzo, V.E. (eds), pp. 1671 - 1692.
- Prince, R.C., Elmendorf, D.L., Lute, J.R., Hsu, C.S., Haith, C.E., Senius, J.D. et al.** (1994) 17-alpha(H),21-beta(H)-hopane as a conserved internal marker for estimating the biodegradation of crude-oil. *Environmental Science & Technology* **28**: 142-145.

Q

- Quince, C., Lanzén, A., Curtis, T.P., Davenport, R.J., Hall, N., Head, I.M. et al.** (2009) Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nature Methods* **6**: 639-641.

R

- Rabus, R., Hansen, T., and Widdel, F.** (2006) Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes. In *The Prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E. (eds): Springer New York, pp. 659-768.
- Radwan, S.S., Sorkhoh, N.A., Felzmann, H., and El-Desouky, A.F.** (1996) Uptake and utilization of n-octacosane and n-nonacosane by *Arthrobacter nicotianae* KCC B35. *J Appl Bacteriol* **80**: 370-374.
- Reddy, C.M., Arey, J.S., Seewald, J.S., Sylva, S.P., Lemkau, K.L., Nelson, R.K. et al.** (2012) Composition and fate of gas and oil released to the water column during the Deepwater Horizon oil spill. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 20229-20234.
- Reed, H.E., and Martiny, J.B.** (2013) Microbial composition affects the functioning of estuarine sediments. *ISME J* **7**: 868-879.
- Revsbech, N.P., Sorensen, J., Blackburn, T.H., and Lomholt, J.P.** (1980) Distribution of oxygen in marine-sediments measured with microelectrodes. *Limnology and Oceanography* **25**: 403-411.
- Ridgway, H.F., Safarik, J., Phipps, D., Carl, P., and Clark, D.** (1990) Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol* **56**: 3565-3575.
- Ritzrau, W., and Graf, G.** (1992) Increase of microbial biomass in the benthic turbidity zone of Kiel Bight after resuspension by a storm event. *Limnology and Oceanography* **37**: 1081-1086.
- Rivas, F.J.** (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed on soils: A short review of chemical oxidation based treatments. *Journal of Hazardous Materials* **138**: 234-251.
- Robbins, J.A., McCall, P.L., Fisher, J.B., and Krezoski, J.R.** (1979) Effect of deposit feeders on migration of CS-137 in lake-sediments. *Earth and Planetary Science Letters* **42**: 277-287.
- Robertson, L., and Kuenen, J.G.** (1984) Aerobic denitrification: a controversy revived. *Archives of Microbiology* **139**: 351-354.
- Rocchetti, L., Beolchini, F., Hallberg, K.B., Johnson, D.B., and Dell'Anno, A.** (2012) Effects of prokaryotic diversity changes on hydrocarbon degradation rates and metal partitioning during bioremediation of contaminated anoxic marine sediments. *Mar Pollut Bull* **64**: 1688-1698.
- Röling, W.F., and van Bodegom, P.M.** (2014) Toward quantitative understanding on microbial community structure and functioning: a modeling-centered approach using degradation of marine oil spills as example. *Front Microbiol* **5**: 125.
- Röling, W.F., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J., and Head, I.M.** (2002) Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5537-5548.
- Röling, W.F.M., Ferrer, M., and Golyshin, P.N.** (2010) Systems approaches to microbial communities and their functioning. *Current Opinion in Biotechnology* **21**: 532-538.
- Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Fratepietro, F., Swannell, R.P.J., Daniel, F., and Head, I.M.** (2004) Bacterial Community Dynamics and Hydrocarbon Degradation during a Field-Scale Evaluation of Bioremediation on a Mudflat Beach Contaminated with Buried Oil. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2603-2613.
- Ronaghi, M., Uhlén, M., and Nyrén, P.** (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* **281**: 363-365.
- Rothermich, M.M., Hayes, L.A., and Lovley, D.R.** (2002) Anaerobic, sulfate-dependent degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum-contaminated harbor sediment. *Environmental Science & Technology* **36**: 4811-4817.

Ruan, Q., Dutta, D., Schwalbach, M.S., Steele, J.A., Fuhrman, J.A., and Sun, F. (2006) Local similarity analysis reveals unique associations among marine bacterioplankton species and environmental factors. *Bioinformatics* **22**: 2532-2538.

Rueter, P., Rabus, R., Wilkes, H., Aeckersberg, F., Rainey, F.A., Jannasch, H.W., and Widdel, F. (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacteria. *Nature* **372**: 455-458.

Rykiel, E.J. (1985) Towards a definition of ecological disturbance. *Australian Journal of Ecology* **10**: 361-365.

S

Sahm, K., MacGregor, B.J., Jorgensen, B.B., and Stahl, D.A. (1999) Sulphate reduction and vertical distribution of sulphate-reducing bacteria quantified by rRNA slot-blot hybridization in a coastal marine sediment. *Environ Microbiol* **1**: 65-74.

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santana, M. (2008) Presence and expression of terminal oxygen reductases in strictly anaerobic sulfate-reducing bacteria isolated from salt-marsh sediments. *Anaerobe* **14**: 145-156.

Satoh, H., Nakamura, Y., and Okabe, S. (2007) Influences of infaunal burrows on the community structure and activity of ammonia-oxidizing bacteria in intertidal sediments. *Appl Environ Microbiol* **73**: 1341-1348.

Sauer, T., and Boehm, P. (1991) The use of defensible analytical chemical measurements for oil spill natural resource damage assessment. In *Proceedings of the International Oil Spill Conference*. San Diego: American Petroleum Institute, p. 363.

Savage, K.N., Krumholz, L.R., Gieg, L.M., Parisi, V.A., Suflita, J.M., Allen, J. et al. (2010) Biodegradation of low-molecular-weight alkanes under mesophilic, sulfate-reducing conditions: metabolic intermediates and community patterns. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 485-495.

Schimel, J., Balser, T.C., and Wallenstein, M. (2007) Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* **88**: 1386-1394.

Schink, B. (1985) Fermentation of acetylene by an obligate anaerobe, *Pelobacter acetylenicus* sp. nov. *Archives of Microbiology* **142**: 295-301.

Sebastiao, P., and Soares, C.G. (1995) Modeling the fate of oil spills at sea. *Spill Science & Technology Bulletin* **2**: 121-131.

Sei, K., Sugimoto, Y., Mori, K., Maki, H., and Kohno, T. (2003) Monitoring of alkane-degrading bacteria in a sea-water microcosm during crude oil degradation by polymerase chain reaction based on alkane-catabolic genes. *Environ Microbiol* **5**: 517-522.

Seo, J.S., Keum, Y.S., and Li, Q.X. (2009) Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int J Environ Res Public Health* **6**: 278-309.

Shade, A., Peter, H., Allison, S.D., Baho, D.L., Berga, M., Burgmann, H. et al. (2012) Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Front Microbiol* **3**.

Sharma, S.L., and Pant, A. (2000) Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by a marine *Rhodococcus*. *Biodegradation* **11**: 289-294.

- Singh, A.K., Sherry, A., Gray, N.D., Jones, D.M., Bowler, B.F., and Head, I.M.** (2014) Kinetic parameters for nutrient enhanced crude oil biodegradation in intertidal marine sediments. *Front Microbiol* **5**: 160.
- Singh, B.K., Nazaries, L., Munro, S., Anderson, I.C., and Campbell, C.D.** (2006) Use of multiplex terminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil microbial community. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7278-7285.
- Skogerson, K., Wohlgemuth, G., Barupal, D.K., and Fiehn, O.** (2011) *The volatile compound BinBase mass spectral database*.
- Smith, C.B., Tolar, B.B., Hollibaugh, J.T., and King, G.M.** (2013) Alkane hydroxylase gene (alkB) phylotype composition and diversity in northern Gulf of Mexico bacterioplankton. *Front Microbiol* **4**.
- Smith, C.J., and Osborn, A.M.** (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. In *FEMS Microbiol Ecol*, pp. 6-20.
- Smith, J.N., Boudreau, B.P., and Noshkin, V.** (1986) Plutonium and ²¹⁰Pb distributions in northeast Atlantic sediments: subsurface anomalies caused by non-local mixing. *Earth and Planetary Science Letters* **81**: 15-28.
- Sørensen, J., Jørgensen, B.B., and Revsbech, N.P.** (1979) A comparison of oxygen, nitrate, and sulfate respiration in coastal marine sediments. *Microb Ecol* **5**: 105-115.
- Sørensen, J., Tiedje, J.M., and Firestone, R.B.** (1980) Inhibition by sulfide of nitric and nitrous oxide reduction by denitrifying *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Environ Microbiol* **39**: 105-108.
- Sorokin, D.Y.** (1995) *Sulfitobacter Pontiacus* gen. nov., sp. nov.: a new heterotrophic bacterium from the Black-sea, specialized on sulfite oxidation. *Microbiology* **64**: 295-305.
- Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Kolganova, T.V., Spiridonova, E.M., Berg, I.A., and Muyzer, G.** (2006) *Thiomicrospira halophila* sp nov., a moderately halophilic, obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from hypersaline lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 2375-2380.
- Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Henstra, A.M., Stams, A.J.M., Galinski, E.A., and Muyzer, G.** (2008) Sulfidogenesis under extremely haloalkaline conditions by *Desulfonatronospira thiodismutans* gen. nov., sp nov., and *Desulfonatronospira delicata* sp nov - a novel lineage of Deltaproteobacteria from hypersaline soda lakes. *Microbiology-Sgm* **154**: 1444-1453.
- Spain, J.C., Pritchard, P.H., and Bourquin, A.W.** (1980) Effects of adaptation on biodegradation rates in sediment/water cores from estuarine and freshwater environments. *Appl Environ Microbiol* **40**: 726-734.
- Spormann, A., and Widdel, F.** (2000) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**: 85-105.
- Staats, M., Braster, M., and Roling, W.F.** (2011) Molecular diversity and distribution of aromatic hydrocarbon-degrading anaerobes across a landfill leachate plume. *Environ Microbiol* **13**: 1216-1227.
- Stahl, D., Fishbain, S., Klein, M., Baker, B., and Wagner, M.** (2002) Origins and diversification of sulfate-respiring microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**: 189-195.
- Stal, L.** (1994) Microbial mats in coastal environments. In *Microbial Mats*. Stal, L., and Caumette, P. (eds): Springer Berlin Heidelberg, pp. 21-32.
- Stal, L.J.** (2010) Microphytobenthos as a biogeomorphological force in intertidal sediment stabilization. *Ecological Engineering* **36**: 236-245.
- Staley, J.T.** (2010) *Cycloclasticus*: a genus of marine polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*: 1781-1786.
- Stauffert, M.** (2011) Dynamique des communautés microbiennes en réponse à une contamination pétrolière dans des sédiments bioturbés. In: Pau: Université de Pau et des pays de l'Adour.

- Stauffert, M., Cravo-Laureau, C., and Duran, R.** (2014) Dynamic of sulphate-reducing microorganisms in petroleum-contaminated marine sediments inhabited by the polychaete *Hediste diversicolor*. *Environ Sci Pollut Res Int* **27**: 27.
- Stauffert, M., Cravo-Laureau, C., Jezequel, R., Barantal, S., Cuny, P., Gilbert, F. et al.** (2013) Impact of oil on bacterial community structure in bioturbated sediments. *PLoS One* **8**.
- Stief, P., and de Beer, D.** (2002) Bioturbation effects of *Chironomus riparius* on the benthic N-cycle as measured using microsensors and microbiological assays. *Aquatic Microbial Ecology* **27**: 175-185.
- Sun, M.Y., Lee, C., and Aller, R.C.** (1993) Anoxic and oxic degradation of ¹⁴C-labeled chloropigments and a ¹⁴C-labeled diatom in Long Island Sound sediments. *Limnology and Oceanography*: 1438-1451.
- Sun, M.Y., Aller, R.C., Lee, C., and Wakeham, S.G.** (2002) Effects of oxygen and redox oscillation on degradation of cel-associated lipids in surficial marine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **66**: 2003-2012.
- Sung, Y., Ritalahti, K.M., Sanford, R.A., Urbance, J.W., Flynn, S.J., Tiedje, J.M., and Löffler, F.E.** (2003) Characterization of two tetrachloroethene-reducing, acetate-oxidizing anaerobic bacteria and their description as *Desulfuromonas michiganensis* sp nov. *Appl Environ Microbiol* **69**: 2964-2974.
- Suzuki, D., Ueki, A., Amaishi, A., and Ueki, K.** (2007) *Desulfopila aestuarii* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, rod-like, sulfate-reducing bacterium isolated from an estuarine sediment in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**: 520-526.
- Svensson, J.M., and Leonardson, L.** (1996) Effects of bioturbation by tube-dwelling chironomid larvae on oxygen uptake and denitrification in eutrophic lake sediments. *Freshwater Biology* **35**: 289-300.
- Swift, M.J., Izac, A.M.N., and van Noordwijk, M.** (2004) Biodiversity and ecosystem services in agricultural landscapes—are we asking the right questions? *Agriculture, Ecosystems & Environment* **104**: 113-134.

T

- Teira, E., Lekunberri, I., Gasol, J., Nieto-Cid, M., Alvarez-Salgado, X., and Figueiras, F.** (2007) Dynamics of the hydrocarbon-degrading *Cycloclasticus* bacteria during mesocosmsimulated oil spills. *Environ Microbiol* **9**: 2551 - 2562.
- Terrisse, F., Duran, R., Vitte, I., and Cravo-Laureau, C.** (2014) Simulation of anoxic/oxic oscillations in crude oil-degrading bioreactors. *In press*. In *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols* Springer.
- Thauer, R.K.** (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology-Uk* **144**: 2377-2406.
- Tholen, A., Pester, M., and Brune, A.** (2007) Simultaneous methanogenesis and oxygen reduction by *Methanobrevibacter cuticularis* at low oxygen fluxes. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 303-312.
- Timmis, K.N., McGenity, T.J., Meer, J.R., and De Lorenzo, V.** (2010) *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*.
- Tissot, B.P.W.D.H.** (1984) *Petroleum formation and occurrence*. Berlin; New York: Springer-Verlag.
- Tobor-Kaplon, M., Bloem, J., Römken, P.F.A.M., and de Ruiter, P.C.** (2006) Functional Stability of Microbial Communities in Contaminated Soils Near a Zinc Smelter (Budel, The Netherlands). *Ecotoxicology* **15**: 187-197.

V

- van Beilen, J., and Funhoff, E.** (2007) Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**: 13 - 21.
- Van Beilen, J., B., Li, Z., Duetz, W., A., Smits, T., H.M., and Witholt, B.** (2003) Diversité des systèmes alcane hydroxylase dans l'environnement. *Oil & Gas Science and Technology - Rev IFP* **58**: 427-440.
- van Beilen, J.B., Smits, T.H., Whyte, L.G., Schorcht, S., Rothlisberger, M., Plaggemeier, T. et al.** (2002) Alkane hydroxylase homologues in Gram-positive strains. *Environ Microbiol* **4**: 676-682.
- van Hamme, J., Singh, A., and Ward, O.** (2003) Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 503 - 549.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., and Deley, J.** (1991) Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**: 88-103.
- Vandecasteele, J.P.** (2005) Biodégradation des hydrocarbures aliphatiques et alycycloques. In *Microbiologie pétrolière*. Technip, I.p. (ed). Paris, pp. 173-239.
- Veech, J.A.** (2013) A probabilistic model for analysing species co-occurrence. *Global Ecology and Biogeography* **22**: 252-260.
- Venosa, A., Campo, P., and Suidan, M.** (2010) Biodegradability of lingering crude oil 19 years after the Exxon Valdez oil spill. *Environ Sci Technol* **44**: 7613 - 7621.
- Venosa, A.D., and Zhu, X.Q.** (2003) Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Science & Technology Bulletin* **8**: 163-178.
- Vieira, P.A., Vieira, R.B., Faria, S., Ribeiro, E.J., and Cardoso, V.L.** (2009) Biodegradation of diesel oil and gasoline contaminated effluent employing intermittent aeration. *J Hazard Mater* **168**: 1366-1372.
- Vilchez-Vargas, R., Junca, H., and Pieper, D.H.** (2010) Metabolic networks, microbial ecology and 'omics' technologies: towards understanding in situ biodegradation processes. *Environ Microbiol* **12**: 3089-3104.
- Vitte, I., Duran, R., Jezequel, R., Caumette, P., and Cravo-Laureau, C.** (2011) Effect of oxic/anoxic switches on bacterial communities and PAH biodegradation in an oil-contaminated sludge. *Environ Sci Pollut Res Int* **18**: 1022-1032.
- Vitte, I., Duran, R., Hernandez-Raquet, G., Mounier, J., Jezequel, R., Bellet, V. et al.** (2013) Dynamics of metabolically active bacterial communities involved in PAH and toxicity elimination from oil-contaminated sludge during anoxic/oxic oscillations. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**: 4199-4211.
- Vokl, P., Huber, R., Drobner, E., Rachel, R., Burggraf, S., Trincone, A., and Stetter, K.O.** (1993) *Pyrobaculum-Aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2918-2926.

W

- Wagner, C., Griesshammer, A., and Drake, H.L.** (1996) Acetogenic capacities and the anaerobic turnover of carbon in a Kansas prairie soil. *Appl Environ Microbiol* **62**: 494-500.
- Wagner, M., Roger, A.J., Flax, J.L., Brusseau, G.A., and Stahl, D.A.** (1998) Phylogeny of Dissimilatory Sulfite Reductases Supports an Early Origin of Sulfate Respiration. *Journal of Bacteriology* **180**: 2975-2982.
- Wainright, S.C.** (1987) Stimulation of heterotrophic microplankton production by resuspended marine-sediments. *Science* **238**: 1710-1712.

- Wainright, S.C.** (1990) Sediment-to-water fluxes of particulate material and microbes by resuspension and their contribution to the planktonic food web. *Marine Ecology Progress Series* **62**: 271-281.
- Wakeham, S., and Canuel, E.** (2006) Degradation and Preservation of Organic Matter in Marine Sediments. In *Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA*. Volkman, J. (ed): Springer Berlin Heidelberg, pp. 295-321.
- Wakeham, S.G., McNichol, A.P., Kostka, J.E., and Pease, T.K.** (2006) Natural-abundance radiocarbon as a tracer of assimilation of petroleum carbon by bacteria in salt marsh sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **70**: 1761-1771.
- Wang, W.-P., Wang, L.-P., and Shao, Z.** (2010) Diversity and abundance of oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (alkB) genes in the subtropical seawater of Xiamen Island. *Microb Ecol* **60**: 429 - 439.
- Wang, Y.F., and Tam, N.F.** (2011) Microbial community dynamics and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in polluted marine sediments in Hong Kong. *Mar Pollut Bull* **63**: 424-430.
- Wasmund, K., Burns, K., Kurtboke, D., and Bourne, D.** (2009) Novel alkane hydroxylase gene (alkB) diversity in sediments associated with hydrocarbon seeps in the Timor Sea, Australia. *Appl Environ Microbiol* **75**: 7391 - 7398.
- Watermann, F., Hillebrand, H., Gerdes, G., Krumbein, W.E., and Sommer, U.** (1999) Competition between benthic cyanobacteria and diatoms as influenced by different grain sizes and temperatures. *Marine Ecology Progress Series* **187**: 77-87.
- Wawrik, B., Mendivelso, M., Parisi, V.A., Sufflita, J.M., Davidova, I.A., Marks, C.R. et al.** (2012) Field and laboratory studies on the bioconversion of coal to methane in the San Juan Basin. *FEMS Microbiol Ecol* **81**: 26-42.
- Wentzel, A., Ellingsen, T.E., Kotlar, H.K., Zotchev, S.B., and Throne-Holst, M.** (2007) Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 1209-1221.
- Whitby, C.** (2010) Microbial Naphthenic Acid Degradation. In *Advances in Applied Microbiology, Vol 70*. Laskin, A.I., Sariaslani, S., and Gadd, G.M. (eds). San Diego: Elsevier Academic Press Inc, pp. 93-125.
- White, H.K., Xu, L., Lima, A.L.C., Eglinton, T.I., and Reddy, C.M.** (2005) Abundance, Composition, and Vertical Transport of PAHs in Marsh Sediments. *Environmental Science & Technology* **39**: 8273-8280.
- Whitehead, A., Dubansky, B., Bodinier, C., Garcia, T.I., Miles, S., Pilley, C. et al.** (2012) Genomic and physiological footprint of the Deepwater Horizon oil spill on resident marsh fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 20298-20302.
- Whyte, L.G., Bourbonniere, L., and Greer, C.W.** (1997) Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3719-3723.
- Widdel, F., and Hansen, T.** (1992) The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H. (eds). New-York: Springer-Verlag, pp. 583-624.
- Widdel, F., and Rabus, R.** (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 259-276.
- Widdel, F., and Musat, F.** (2010) Energetic and Other Quantitative Aspects of Microbial Hydrocarbon Utilization. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K. (ed): Springer Berlin Heidelberg, pp. 729-763.
- Widdel, F., Knittel, K., and Galushko, A.** (2010) Anaerobic hydrocarbon-degrading microorganisms: an overview. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*: 1997 - 2021.
- Winderl, C., Schaefer, S., and Lueders, T.** (2007) Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (bssA) genes as a functional marker. *Environ Microbiol* **9**: 1035-1046.

Wollast, R. (1991) The coastal organic carbon cycles: fluxes, sources and sinks. In *Ocean margin processes in global change*. Martin, J.M., and Wollast, R.e. (eds): Wiley.

Y

Yagi, J.M., Suflita, J.M., Gieg, L.M., DeRito, C.M., Jeon, C.O., and Madsen, E.L. (2010) Subsurface cycling of nitrogen and anaerobic aromatic hydrocarbon biodegradation revealed by nucleic Acid and metabolic biomarkers. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3124-3134.

Yakimov, M., Golyshin, P., Lang, S., Moore, E., Abraham, W., Lunsdorf, H., and Timmis, K. (1998) *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **48**: 339 - 348.

Yakimov, M., Denaro, R., Genovese, M., Cappello, S., D'Auria, G., Chernikova, T. et al. (2005) Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environ Microbiol* **7**: 1426 - 1441.

Yakimov, M.M., Timmis, K.N., and Golyshin, P.N. (2007) Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **18**: 257-266.

Yemashova, N.A., Murygina, V.P., Zhukov, D.V., Zakharyantz, A.A., Gladchenko, M.A., Appanna, V., and Kalyuzhnyi, S.V. (2007) Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **6**: 315-337.

Yingst, J.Y., and Rhoads, D.C. (1980) The role of bioturbation in the enhancement of bacterial growth rates in marine sediments. In *Marine benthic dynamics: 11th Belle W Baruch Symposium in Marine Science*. Tenore, K.R., and Coull, B.C. (eds). Georgetown (SC): The Belle W. Baruch Library in Marine Science, pp. 407-421.

Yuste, L., Corbella, M.E., Turiegano, M.J., Karlson, U., Puyet, A., and Rojo, F. (2000) Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS Microbiol Ecol* **32**: 69-75.

Z

Zaballos, M., Lopez-Lopez, A., Ovreas, L., Bartual, S.G., D'Auria, G., Alba, J.C. et al. (2006) Comparison of prokaryotic diversity at offshore oceanic locations reveals a different microbiota in the Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol Ecol* **56**: 389-405.

Zaneveld, J.R., Lozupone, C., Gordon, J.I., and Knight, R. (2010) Ribosomal RNA diversity predicts genome diversity in gut bacteria and their relatives. *Nucleic Acids Res* **38**: 3869-3879.

Zehnder, A.J.B., and Wuhrmann, K. (1977) Physiology of a Methanobacterium strain AZ. *Archives of Microbiology* **111**: 199-205.

Zehr, J.P., and Ward, B.B. (2002) Nitrogen Cycling in the Ocean: New Perspectives on Processes and Paradigms. *Appl Environ Microbiol* **68**: 1015-1024.

Zeinali, M., Vossoughi, M., and Ardestani, S.K. (2007) Characterization of a moderate thermophilic *Nocardia* species able to grow on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Lett Appl Microbiol* **45**: 622-628.

Zelege, J., Sheng, Q., Wang, J.G., Huang, M.Y., Xia, F., Wu, J.H., and Quan, Z.X. (2013) Effects of *Spartina alterniflora* invasion on the communities of methanogens and sulfate-reducing bacteria in estuarine marsh sediments. *Front Microbiol* **4**.

- Zengler, K., Richnow, H., Rossello-Mora, R., Michaelis, W., and Widdel, F.** (1999) Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* **401**: 266 - 269.
- Zhilina, T.N.** (1972) Dying off of a Methanosarcina on air. *Mikrobiologiya* **41**: 1105-1106.
- Zhu, X., Venosa, A.D., Suidan, M.T., and Lee, K.** (2001) Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands. In. Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency.
- Zverlov, V., Klein, M., Lückner, S., Friedrich, M.W., Kellermann, J., Stahl, D.A. et al.** (2005) Lateral Gene Transfer of Dissimilatory (Bi)Sulfite Reductase Revisited. *Journal of Bacteriology* **187**: 2203-2208.
- Zwolinski, M.D., Harris, R.F., and Hickey, W.J.** (2000) Microbial consortia involved in the anaerobic degradation of hydrocarbons. *Biodegradation* **11**: 141-158.

Résumé

Les écosystèmes côtiers sont des milieux complexes au sein desquels les communautés microbiennes, jouant un rôle majeur dans leur fonctionnement et leur maintien, s'adaptent et sont tolérantes à des conditions environnementales fluctuantes. En effet, au rythme des marées et de l'activité de la macrofaune, des oscillations oxic/anoxie influencent la composition et la dynamique des communautés microbiennes et par conséquent leur implication métabolique.

Afin d'appréhender le devenir du pétrole dans ces écosystèmes, il est donc indispensable d'apporter des connaissances sur l'écologie des microorganismes intervenant dans son élimination, notamment dans des conditions oscillantes anoxie/oxie. Ainsi, ce travail de thèse a eu pour objectif de décrypter l'assemblage de communautés microbiennes hydrocarbonoclastes de sédiments intertidaux soumises à des oscillations anoxie/oxie en présence de pétrole lors d'une expérience en bioréacteurs. Les réponses écologiques des communautés bactériennes globales et de micro-organismes sulfato-réducteurs en conditions oscillantes ont pu être décrites en comparaison avec celles obtenues en conditions d'oxie ou d'anoxie permanentes, par l'analyse des données obtenues par séquençage haut-débit des gènes de l'ARN 16S et *dsrB* au niveau transcriptionnel. Ces études comparatives ont mis en évidence des profils écologiques en réponse aux conditions oscillantes, pouvant être répandus dans différents environnements marins côtiers. En réponse à ces conditions particulières, de nombreux microorganismes semblent avoir le potentiel à tolérer et/ou s'adapter aux différentes conditions d'oxygénation. Cette capacité d'acclimatation rapide des communautés bactériennes aux conditions oscillantes se sont accompagnées de capacités de dégradation équivalentes ou supérieures dans ces conditions par rapport à la condition d'oxie permanente montrant l'influence des oscillations anoxie/oxie sur le devenir du polluant dans les environnements pollués soumis à ces conditions.

Mots clés : Ecosystèmes côtiers, oscillations anoxie/oxie, communautés bactériennes, micro-organismes sulfato-réducteurs, séquençage d'amplicons haut-débit, biodégradation des hydrocarbures.

Abstract

Coastal ecosystems are complex environments in which microbial communities, playing a major role in their functioning and maintain, are tolerant and adapt to changing environmental conditions. Indeed, the tides and the macrofauna's activity generate oxic/anoxic oscillations which influence the composition and dynamics of microbial communities and consequently their metabolic involvement.

To understand the fate of oil in these ecosystems, it is essential to provide knowledge on the ecology of microorganisms involved in these systems, taking into account anoxic/oxic oscillating conditions. Thus, this thesis aimed to decipher the organization of hydrocarbonoclastic microbial communities inhabiting intertidal sediments, when they are subjected to anoxic/oxic oscillations in an experiment in bioreactors with oil addition. Ecological responses of bacterial communities and sulfate-reducing microorganisms in oscillating conditions have been described comparing with those obtained with permanent oxic or anoxic conditions, using high-throughput sequencing analyses of the 16S rRNA and *dsrB* genes at the transcriptional level. These comparative studies have highlighted ecological profiles in response to the oscillating conditions, which can be prevalent in different coastal marine environments. In response to these particular conditions, many organisms seem to have the potential to tolerate and / or adapt to the different conditions of oxygenation. This rapid acclimation capacity of bacterial communities to these changing conditions have been accompanied by equivalent or greater degradation capacity under these conditions compared to the permanent oxic condition, showing the influence of the anoxic/oxic oscillations on the fate of pollutant in environments subjected to these conditions.

Keywords: Coastal ecosystems, anoxic/oxic oscillations, bacterial communities, sulfate-reducing micro-organisms, amplicons high-throughput sequencing, hydrocarbons-biodegradation.