

N° ordre :

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DE PAU ET DES PAYS DE L'ADOUR

Ecole doctorale des Sciences exactes et de leurs applications

par **Magalie STAUFFERT**

pour obtenir le grade de

Docteur

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

Dynamique des communautés microbiennes en réponse à une contamination pétrolière dans des sédiments bioturbés

Soutenue publiquement le 14 décembre 2011, devant le jury composé de :

Pierre Peyret (Pr, UMR-CNRS 6023, Université Blaise Pascal)	Rapporteur
Olivier Pringault (CR, UMR-CNRS 5119, IRD Sète)	Rapporteur
Pierre Caumette (Pr, UMR-CNRS 5254, UPPA)	Président
Frédéric Coulon (Lecturer, Université de Cranfield, UK)	Examineur
Philippe Cuny (MC, Université de Marseille)	Membre invité
Ronan Jézequel (Dr, Cedre, Brest)	Membre invité
Robert Duran (Pr, UMR-CNRS 5254, UPPA)	Directeur de thèse
Cristiana Cravo-Laureau (MC, UMR-CNRS 5254, UPPA, Pau)	Co-directrice de thèse

Remerciements

Ces travaux ont été réalisés au sein de l'Equipe Environnement et Microbiologie de l'Institut Pluridisciplinaire de Recherche sur 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 ce laboratoire.

Je tiens également à remercier les rapporteurs Pierre Peyret, Professeur à l'université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, et Olivier Pringault, Chargé de recherche à l'IRD de l'université de Montpellier, pour avoir accepté d'apporter leur jugement sur ce travail. Je remercie également le Professeur Pierre Caumette et les Docteurs Frédéric Coulon, Philippe Cuny et Ronan Jézéquel d'avoir accepté de faire partie du jury.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet ANR DHYVA dont je tiens à remercier toutes les personnes impliquées sans qui ce projet n'aurait pu se faire : David Amouroux, Brice Bouyssiere, Christine Cagnon, Philippe Cuny, Franck Gilbert, Lionel Huang, Ronan Jézéquel, Fatima Mahdaoui, François-Xavier Merlin, Cécile Milton et Georges Stora. Merci à vous pour votre investissement dans ce projet et pour toutes nos discussions !

J'adresse également un grand merci à NORMANDIE APPÂTS qui nous a gracieusement fourni les Nereis utilisés pour l'expérimentation réalisée au Cedre et en particulier à son dirigeant Monsieur Michel LOPUSZANSKI pour son soutien de nos travaux de recherche.

Mes sincères remerciements vont également à mes deux directeurs de thèse, le Professeur Robert Duran et le Docteur Cristiana Cravo-Laureau. Je vous remercie de votre disponibilité, la confiance et la liberté que vous m'avez accordé pendant ces quatre années. Vous avez également su me recadrer quand il le fallait. Cristiana, merci de m'avoir éveillé au monde merveilleux de l'anaérobiose, je ne pourrai plus m'en passer !! J'ai également beaucoup apprécié nos discussions, autant personnelles que scientifiques, ainsi que ta franchise. Tu as toujours été à mon écoute et attentive à la progression de mon travail. Merci pour ces quatre années, j'ai eu beaucoup de chances !!

Merci bien sûr au Professeur Philippe Bertin, mon premier Maître Jedi, à qui je dois sûrement cette thèse, vous m'avez toujours supporté.

Je fais un clin d'œil aux « anciens », Isa, Ludo, Lionel, Sandrine, Marion, vous m'avez beaucoup aidé dans mes débuts au labo, j'ai tant appris à vos côtés. Aujourd'hui ça y est, c'est moi qui quitte le navire !

Romano, dit le barbu (l'ancien, l'ours, l'homme des cavernes, etc...), ce fut un plaisir de partager ton bureau (malgré la petite gousse d'ail du matin et les blagues salaces), tu laisses un grand vide au labo.....

JulieT. tu as toute mon amitié, malheureusement on a été en décalage pendant la thèse et maintenant..... c'est trop tard pour un verre !!!!!

Merci au couple Cruchodet-Colin (devrait-on dire cruchôdet ?) pour ces petites soirées fort sympathiques et votre peps. Votre amitié est précieuse. Même si je suis loin maintenant, je ne t'ai pas oublié cher ex-collègue de bureau..... Encore merci à vous !!!

Un grand merci bien sûr à Yannick (déjà, ils sont vachement sympa les colin !!!), tu sais toujours trouver les bons mots, bien souvent tu as été d'un grand réconfort. Je te souhaite le meilleur!!!

Je ne ferai pas la même erreur deux fois, donc un special Merci au Bigourdan belge. Ça n'a pas été facile mais tu as été là pour moi même du grand Nord. Dank u well !!

Je tiens à remercier également tous les membres du laboratoire (ne cherchez pas il n'y a pas d'ordre logique !!!) :

Claire et Flo merci pour votre bonne humeur, les coups de folies et de colère, les repas et la pause café avec vous c'est du bonheur ! Merci également pour votre aide « technique » je vous en suis très reconnaissante (et mes bébés aussi !!!). Jérôme, merci pour le temps que tu m'as consacré lors de mes « prises de têtes / de conscience », nos conversations m'ont énormément apporté, il faut dire que tu es une mine d'information. Tu sais aussi ajouter du piquant aux pauses cafés !!; Régis, c'est toujours un plaisir de discuter, toi aussi tu as toujours quelque chose à raconter ; Steph, (la reine du poker) on est bien entre fille dans le bureau, non ? Merci de rendre « mes derniers instants » si agréables ; Béatrice merci pour tes conseils qui m'ont bien aidé à mes débuts ; Magali, mon homonyme, ta joie de vivre est une véritable bouffée d'air pur, la pause café (et chocolat ?) c'est quand tu veux ; Marisol, merci pour tous ces fous rires, j'ai également été ravie de te doubler en TP de Bio Mol ; Rémy, merci pour ta bonne humeur et ton humour ; Viviane, un peu de sang neuf au labo ça fait du bien ; Christine, vos conseils et remarques m'ont toujours été très utiles ; Pierre, merci d'avoir été là pour répondre à mes questions et m'aiguiller ; Philippe Goulas, merci pour les enseignements dont vous m'avez confié la tâche, je rajouterai que c'était très sympathique de vous avoir comme voisin de bureau ; Anthony ; tu respirez le dynamisme et la bonne humeur, ne change rien et merci pour ça ; Julie, des personnes aussi franches que toi il devrait y en avoir plus, bonne chance pour la suite !!! Michel Magot, merci pour la « passation » des TD de bio cell et pour nos rares mais sympathiques conversations ; merci à toi Fonfec (« la disparue ») pour nos discussions de filles, tu me feras toujours autant rire ; Tom, le V pour victoire c'est dans 1 an ½, pas avant !!!! Heureuse d'avoir croisé ton chemin ! Maryse, merci pour ta fougue et ton dynamisme ; Laurent (l'optimisme personnifié), j'ai apprécié nos conversations autour d'un café ; Solange, votre compagnie est toujours un plaisir ; Marie-Jo, Yvette, Christelle, merci à vous pour toute l'aide que vous m'avez apporté.

Une bise également pour les gens de passage mais non moins sympathiques, Amel, Hilda, Miguel (El Predator !!), Elcia, Magalie (avec un prénom comme celui-là ça ne pouvait que passer !). Mais également à tous les stagiaires que j'ai vu passer M2, M1, BTS, IUT (et il y a du monde !), votre compagnie a toujours été agréable. Une petite pensée aussi pour Lucie et Anistelle, mes premiers padawans ! Bonne chance aussi et bon courage aux « ptits » derniers, Johanne, Fanny, Arantxa et Fabien. Vous verrez c'est que du bonheur !!!

Merci aussi à toi Paul, depuis que tu es là je me sens moins seule pour la pause clope (et surtout moins vieille ! trentenaire en force !!!). Il n'y a qu'une chose à dire : décidément Régis choisit bien ses post doc ! Michäel si tu nous écoutes.....

Une pensée également pour mes amis de mon « ancienne vie strasbourgeoise », Bertrand, Sandro, Djura, Vanessa, Héléna, Danae, Guillaume, Guix, Tom et ex collègues de galère Big Mac

J'en oublie presque l'essentiel, mes bébés !!! Ils m'ont procurés tant de réjouissance pendant ces quatre années. Je vous salue également oh grand séquenceur et vénéré thermocycleur, nous avons vécu tant de moments ensemble. Merci aussi à Hediste (Nereis) diversicolor pour avoir tournicoté mes neurones pendant tout ce temps, ce fut un régal, heureuse d'avoir croisé ton chemin vaillant polychaete !!!

Oh un grand, grand merci à ma ptite famille, M'man, Audrey, Alain, Greg et Karen, et le dernier venu, Christian, pour tout le réconfort apporté ! Vous seuls savez à quel point la route fut longue.....Evidemment je ne pouvais pas t'oublier Brigitte, sans toi je ne serais sans doute pas là !

De tendres remerciements à tous ceux qui ne sont plus là aujourd'hui (Papa, Daniel, Philippe, Eric, Paulette et Françoise), je suis sûre que vous auriez adoré.....

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	3
SOMMAIRE	5
LISTE DES ABBREVIATIONS	11
GLOSSAIRE.....	13
LISTE DES FIGURES	15
LISTE DES TABLES ET TABLEAUX	21
INTRODUCTION GENERALE.....	25
CHAPITRE I: SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	31
1. L'ENVIRONNEMENT MARIN : LIEU D'UNE ACTIVITÉ MICROBIENNE IMPORTANTE.....	31
1.1. <i>Minéralisation de la matière organique (MO)</i>	<i>31</i>
1.2. <i>Groupes microbiens majeurs dans les sédiments côtiers.....</i>	<i>33</i>
1.2.1. Les micro-organismes dénitrifiants.....	34
1.2.1.1. Ecologie des micro-organismes dénitrifiants.....	34
1.2.1.2. Processus de dénitrification et marqueur moléculaire associé.....	35
1.2.1.3. Effet de l'O ₂ sur la dénitrification.....	36
1.2.2. Les microorganismes sulfato-réducteurs (MSR).....	36
1.2.2.1. Ecologie des MSR	37
1.2.2.2. Réduction dissimilatrice des sulfates et marqueur moléculaire associé.....	37
1.2.2.3. Tolérance / respiration de l'oxygène par les MSR	38
1.2.3. Les archées méthanogènes	39
1.2.3.1. Ecologie des méthanogènes.....	39
1.2.3.2. Méthanogénèse et marqueur moléculaire.....	41
1.2.3.3. Effet de l'oxygène moléculaire	42
1.2.4. Interactions entre les MSR et les archées.....	42
2. LES VASIERES, UN MILIEU AUX FONCTIONS ECOLOGIQUES MULTIPLES	43
2.1. <i>Les vasières</i>	<i>44</i>
2.2. <i>Importance de la bioturbation dans les processus de l'écosystème marin.....</i>	<i>46</i>
2.2.1. Le concept de bioturbation.....	46
2.2.2. Principales actions des organismes bioturbateurs	46
2.2.3. Conséquences de la bioturbation.....	48
2.2.3.1. Modifications physiques	48
2.2.3.2. Modifications biogéochimiques	48
2.2.3.3. Modifications biologiques : effet sur les communautés microbiennes.....	50
3. RE-HABILITATION DES MILIEUX MARINS : BIODEGRADATION DES COMPOSES PETROLIERS PAR LES MICRO-ORGANISMES	55
3.1. <i>Origines et composition des pétroles</i>	<i>55</i>
3.1.1. Contaminations pétrolières des environnements marins.....	55
3.1.2. Composition des pétroles.....	56
3.2. <i>Origines des hydrocarbures en milieu marin</i>	<i>57</i>
3.3. <i>Devenir des hydrocarbures en milieu marin</i>	<i>57</i>
3.3.2. Biodégradation des hydrocarbures.....	58
3.3.2.1. Biodégradation aérobie des hydrocarbures.....	59
3.3.2.2. Biodégradation anaérobie des hydrocarbures	62
3.3.3. Facteurs affectant la biodégradation	67
4. LIEN ENTRE DIVERSITÉ ET FONCTION D'UN ECOSYSTEME	70
4.1. <i>Diversité microbienne.....</i>	<i>70</i>

4.2. Perturbation de la structure des communautés microbiennes.....	74
4.2.1. Définition.....	74
4.2.2. Facteurs modifiant la structure des communautés.....	75
4.2.3. Effet d'une « perturbation » sur la structure des communautés.....	76
5. DYNAMIQUE ET DIVERSITE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS LES ENVIRONNEMENTS CONTAMINES AUX HYDROCARBURES.....	78
5.1. Reconstitution d'un environnement miniature.....	79
5.2. Dynamique des communautés microbiennes.....	80
5.3. Dynamique et diversité des communautés anaérobies.....	83
5.3.1. Etudes liées directement au processus de dégradation des hydrocarbures.....	84
5.3.2. Les communautés microbiennes anaérobies.....	84
5.3.2.1. Communauté sulfato-réductrice.....	84
5.3.2.2. Communauté dénitrifiante.....	85
5.3.2.3. Communauté méthanogène.....	86
5.4. Impact de la bioturbation sur les micro-organismes dans un environnement contaminé aux hydrocarbures.....	86
CHAPITRE II: PROCEDURES EXPERIMENTALES.....	93
1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL.....	93
1.1. Site de prélèvement.....	93
1.2. Expérimentation en microcosmes.....	94
1.2.1. Mise en place du dispositif expérimental.....	94
1.2.2. Stratégie d'échantillonnage.....	98
2. TECHNIQUES MOLECULAIRES.....	99
2.1. Extraction des acides nucléiques.....	99
2.1.1. Extraction des acides nucléiques totaux des sédiments issus des microcosmes (0-2 cm).....	99
2.1.1.1. Extraction de l'ADN génomique total.....	99
2.1.1.2. Extraction de l'ARN total.....	99
2.1.3. Extraction de l'ADN génomique total des cultures d'enrichissement et des souches bactériennes.....	100
2.2. Contrôle de la qualité, de la taille et évaluation de la concentration des acides nucléiques par électrophorèse.....	100
2.3. Réactions de polymérisation en chaîne et purifications.....	101
2.3.2. La polymérisation en chaîne (PCR).....	101
2.3.2. La rétrotranscription <i>in vitro</i> des ARNs.....	103
2.3.3. Purification des produits PCR.....	103
2.4. Analyses moléculaires de la diversité.....	103
2.4.1. Analyse du polymorphisme de longueur des fragments terminaux de restriction (Terminal-Restriction Fragments Length-Polymorphism – TRFLP).....	104
2.4.1.1. Principe.....	104
2.4.1.2. Protocole expérimental.....	104
2.4.2. Conception de banques de gènes.....	106
2.4.2.1. Principe du clonage et du séquençage.....	106
2.4.2.2. Protocole expérimental du clonage.....	106
2.4.2.3. Séquençage.....	108
2.5. Quantification par PCR en temps réel.....	108
2.5.1. Principe de la quantification par PCR en temps réel.....	108
2.5.2. Génération d'un standard externe pour la quantification par PCR en temps réel.....	108
2.5.3. Amplification en temps réel.....	109
3. TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE.....	110
3.1. Milieux de culture.....	110
3.1.1. Milieux de culture aérobie.....	110
3.1.1.1. Milieu minimum.....	110
3.1.1.2. Milieux riches.....	111
3.1.1. Milieux de culture anaérobie.....	111
3.1.1.1. Milieu minimum.....	111
3.1.1.2. Milieux minimum supplémentés.....	112

3.2. Préparation des cultures d'enrichissement.....	113
3.2.1. A partir des sédiments issus des microcosmes.....	113
3.2.1.1. Cultures d'enrichissement aérobies.....	113
3.2.1.2. Cultures d'enrichissement anaérobies.....	114
3.3. Isolement de souches pures.....	114
3.3.1. Isolement de souches aérobies.....	114
3.3.1.1. En milieu solide sélectif.....	114
3.3.1.2. En milieu riche solide.....	114
3.3.2. Isolement de souches anérobies.....	115
3.3.3. Contrôle de la pureté d'une souche et conservation.....	115
3.4. Identification des souches.....	115
3.5. Criblage des souches.....	116
3.5.1. Par profil génotypique : RFLP.....	116
3.5.2. Sur la base d'une activité.....	116
3.5.2.1. Criblage à l'INT des souches hydrocarbonoclastes.....	116
3.5.2.2. Criblage des bactéries dénitrifiantes.....	117
4. TECHNIQUES DE DOSAGES CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES.....	118
4.1. Dosage des hydrocarbures.....	118
4.2. Dosage des sulfures.....	119
4.2.1. Principe.....	119
4.2.2. Protocole.....	119
4.3. Dosage des nitrates.....	120
4.3.1. Principe.....	120
4.3.2. Protocole.....	120
5. TRAITEMENT DES RESULTATS.....	120
5.1. Analyse des données T-RFLP.....	120
5.1.1. Obtention de la matrice de données.....	120
5.1.2. Traitement des réplicats.....	121
5.1.3. Pré-traitement des données.....	121
5.2. Analyse phylogénétique des séquences.....	122
5.2.1. Détection des structures chimériques.....	122
5.2.2. Identification et alignement.....	122
5.3. Analyse des données de PCR quantitative.....	122
6. ANALYSES STATISTIQUES.....	123
6.1. ANOVA.....	123
6.2. Test de Mantel.....	123
6.3. Calculs d'indices de diversité (diversité α).....	123
6.4. Calculs d'indices de similarité (distances, diversité β).....	124
6.5. Analyses statistiques des banques de gènes.....	125
6.5.1. Analyse de raréfaction:.....	125
6.5.2. Recouvrement de la banque de clones :.....	125
6.5.3. Comparaison de deux banques de clones (analyse LIBSHUFF) :.....	125
6.5.4. Détermination du nombre d'unités opérationnelles taxonomiques (OTUs).....	125
6.3. Analyses statistiques des données T-RFLP.....	126
6.3.1. Représentation des données.....	126
6.3.1.1. Analyse multivariée.....	126
6.3.1.2. Analyse de classification hiérarchique: dendrogramme.....	127
6.3.2. PerMANOVA.....	127
CHAPITRE III: STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES EN REPONSE A UNE CONTAMINATION PETROLIERE DANS DES SEDIMENTS BIOTURBES.....	131
1. INTRODUCTION.....	131
2. PUBLICATION 1: IMPACT OF CRUDE OIL ON BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE IN BIOTURBATED SEDIMENTS.....	133
2.1. Introduction.....	135
2.2. Materials and methods.....	136

2.2.1. Sampling area.....	136
2.2.2. Microcosms setup	136
2.2.3. Hydrocarbons extraction and analysis.....	137
2.2.4. Vanadium extraction and analysis	139
2.2.5. Reworking activity	139
2.2.6. Total DNA isolation of microbial communities	139
2.2.7. RNA isolation and reverse transcription	140
2.2.8. Amplification of bacterial 16S rRNA gene.....	140
2.2.9. T-RFLP analysis.....	140
2.2.10. Statistical comparison of T-RFLP profiles.....	141
2.2.11. 16S cDNA library construction and analysis	141
2.2.12. Nucleotide sequence accession numbers.....	142
2.3. Results	142
2.3.1. Characterization of the biological reworking activity.....	142
2.3.2. Fate of petroleum compounds	143
2.3.4. Dynamic of total and active bacterial communities.....	145
2.3.5. Metabolic active bacterial communities composition	147
2.4. Discussion	150
2.5. Acknowledgements.....	153
2.6. References.....	153
3. ETUDE DE LA COMMUNAUTE HYDROCARBONOCLASTE ALKB	160
4. RESULTATS COMPLEMENTAIRES DE L'ETUDE : ANALYSE DES INTEGRONS.....	163
5. PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION.....	166
CHAPITRE IV: IMPACT DU PETROLE ET DE LA BIOTURBATION SUR LA COMMUNAUTE ARCHEENNE	173
1. INTRODUCTION.....	173
2. PUBLICATION 2: RESPONSE OF ARCHAEOAL COMMUNITIES TO OIL SPILL IN BIOTURBATED MUDFLAT SEDIMENTS.....	175
2.1. Introduction.....	176
2.2. Materials and methods.....	177
2.2.1. Sampling area and experimental setup.....	177
2.2.2. Total DNA extraction of microbial communities	177
2.2.3. RNA extraction and reverse transcription	178
2.2.4. Amplification of 16S archaeal rRNA and mcr genes.....	178
2.2.5. T-RFLP analysis and statistical comparison of T-RFLP profiles.....	179
2.2.6. Library construction and phylogenetic analysis.....	180
2.2.7. Nucleotide sequences accession numbers.....	180
2.3. Results	180
2.3.1. Dynamics of total and metabolically active archaeal communities.....	181
2.3.2. Composition of metabolically active archaeal communities.....	183
2.3.4. Dynamics of total and metabolically active methanogenic communities.....	185
2.4. Discussions.....	188
2.4.1. Impact of <i>H. diversicolor</i> addition on archaeal community	188
2.4.2. Oil impact on archaeal community	189
2.4.3. Methanogen behaviour in oiled bioturbated sediment.....	190
2.5. Acknowledgements.....	191
2.6. References	191
3. ANALYSE COMPLEMENTAIRE	199
4. PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION.....	200
CHAPITRE V: SUIVI DE LA DYNAMIQUE ET DE L'ABONDANCE DES MICRO-ORGANISMES SULFATO-REDUCTEURS.....	205
1. INTRODUCTION.....	205
2. PUBLICATION 3: DYNAMIC OF SULFATE-REDUCING MICROORGANISMS IN PETROLEUM-CONTAMINATED MARINE SEDIMENT INHABITED BY THE POLYCHAETE <i>HEDISTE DIVERSICOLOR</i>	206

2.1. Introduction.....	207
2.2. Materials and methods.....	208
2.2.1. Sampling area and experimental setup.....	208
2.2.2. Total DNA extraction of microbial communities from microcosms sediment.....	209
2.2.3. RNA extraction and reverse transcription	209
2.2.4. PCR amplification of <i>dsrAB</i> genes and transcripts.....	209
2.2.5. T-RFLP procedure	210
2.2.6. Treatment of T-RFLP data	210
2.2.7. Quantitative real-time PCR.....	210
2.2.8. Clone library generation and phylogenetic analysis.....	211
2.2.9. Statistical analysis	211
2.3. Results and discussion	212
2.3.1. SRM Abundance.....	212
2.5. Acknowledgements.....	222
2.6. References.....	223
3. PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION.....	231
CHAPITRE VI: REPONSE ET ROLE DES BACTERIES NITRATE-REDUCTRICES DANS LA DEGRADATION DES HYDROCARBURES PETROLIERS.....	235
1. INTRODUCTION.....	235
2. PUBLICATION 4: RESPONSE OF NITRATE-REDUCING BACTERIA TO OIL-POLLUTION IN BIOTURBATED MARINE SEDIMENTS.....	237
2.1. Introduction.....	238
2.2. Materials and methods.....	240
2.2.1. Microcosms set-up.....	240
2.2.2. DNA extraction	240
2.2.3. PCR amplification.....	240
2.2.4. T-RFLP analysis.....	241
2.2.6. Culture media and enrichment procedures.....	241
2.2.7. Quantitative analysis of PAHs.....	242
2.2.8. Chemical analysis and PAHs extraction.....	242
2.2.9. Construction of <i>nirS</i> gene libraries.....	243
2.2.10. Sequencing and phylogenetic analysis.....	243
2.3. Results and discussion	243
2.3.1. Dynamic of denitrifying bacteria based on <i>nirS</i> gene analyses	243
2.3.2. Composition of oil-polluted denitrifying communities.....	245
2.3.3. Characterisation of nitrate-reducing consortia.....	247
2.4. Acknowledgments.....	252
2.6. References.....	253
3. PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION.....	259
CHAPITRE VII: CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	263
1. SYNTHÈSE DES RESULTATS / CONNAISSANCES ACQUISES.....	264
1.1. Réponse des communautés microbiennes soumises à une contamination pétrolière.....	264
1.2. Impact de la bioturbation sur cette réponse.....	265
- Dégradation des hydrocarbures	265
- Réponse globale de la communauté microbienne.....	266
- Dynamique des différents groupes microbiens étudiés.....	268
- Interactions entre les différents groupes fonctionnels	269
1.3. Etude des communautés hydrocarbonoclastes.....	272
1.4. Rôle structurant de la bioturbation (<i>polychaetes H. Diversicolor</i>).....	274
2. PERSPECTIVES.....	275
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	281
ANNEXES.....	321

Sommaire

<i>ANNEXE 1</i> :	321
<i>ANNEXE 2</i>	322

LISTE DES ABBREVIATIONS

ACP / PCA : Analyse en Composante Principale / Principal Component Analysis
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
APS : Adénosine 5'-phosphosulfate
ANOVA : ANalysis Of VAriance
ARISA : Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis
ARN : Acide ribonucléique
ARNr / ARNm : ARN ribosomique / ARN messenger
BCS : Bacterial Community Structure
BET : Bromure d'éthidium
BLAST : Basic Local Alignment Search Tool
Bp / pb : base pair / paire de base
BSR / SRB : Bactéries sulfato-réductrices / Sulfate-reducing bacteria
BTEX : Benzène, Toluène, Ethylbenzène, Xylène
CoA: Coenzyme A
DEPC: Diéthyl pyrocarbonate
DGGE : Denaturing gradient gel electrophoresis
DOTUR: Distance Based OTU and Richness Determination
dNTP : Désoxyribonucléotides triphosphates
ddNTPs : Didésoxyribonucléotides triphosphates
DSR : Dissimilatory Sulfite Reductase
EMBL : European Molecular Biology Laboratory
EMS : Eau de mer synthétique
EPA : Environmental Protection Agency
FAM : 5-carboxy-fluorescéine
GC-MS : Gas chromatograph / mass spectrometer
IPTG : isopropyl-1-thio- β -D-galactoside
HAP / PAH : Hydrocarbure aromatique polycyclique / polycyclic aromatic hydrocarbon
HMN : 2,2,4,4,6,8,8-heptaméthylnonane
INT : Iodo Nitro Tétrazolium chloride
LB : Luria-Bertani Broth
MCR : Méthyl Coenzyme Réductase
MDS : Multidimensionnal Scaling
MO : Matière organique
MOInt : Matière organique intermédiaire

MSR : Micro-organisme Sulfato-réducteur
MVSP : Multi Variate Statistical Package
NCBI: National Center for Biotechnology Information
Nir: Nitrite réductase
OTU : Operational taxonomic unit
PCR : Polymerase chain reaction
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
RT : Reverse-transcription
SPE: Solid Phase Extraction
TBE : Tris-Borate-EDTA
TGGE : Temperature gradient gel electrophoresis
TPH : Total Petroleum Hydrocarbons
T-RF : Terminal-Restriction Fragment
T-RFLP : Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism
UV : Ultraviolet
X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indole- β -D-galactoside

GLOSSAIRE

Biodisponibilité : fraction d'une substance ayant la possibilité d'être absorbée et d'être utilisée par le métabolisme d'un organisme vivant.

Biogène : engendré par des êtres vivants.

Bioremédiation : Elle consiste en la décontamination de milieux pollués au moyen de techniques issues de l'activité d'organismes vivants. Les techniques de bioremédiation peuvent consister à augmenter la biodégradation ou la biotransformation de polluant, en inoculant des microorganismes spécifiques (bioaugmentation) ou en stimulant l'activité de populations microbiennes indigènes (biostimulation) par apport de nutriments et par ajustement des conditions de milieu (potentiel d'oxydo-réduction, humidité). L'atténuation naturelle en fait également partie.

Bioturbation : correspond aux déplacements de matériel particulaire (i.e. remaniement sédimentaire) et dissous (i.e. bio-irrigation) dans et à la surface des sédiments, induis par l'activité des organismes benthiques

Consortium : en écologie microbienne, un consortium représente plusieurs espèces ou populations de microorganismes se développant de façon coordonnée et complémentaire.

Diagénèse : ensemble des processus physico-chimiques et biochimiques par lesquels les sédiments sont transformés en roche sédimentaire. Ces transformations ont généralement lieu à faible profondeur, donc dans des conditions de pression et de température peu élevées. Ces transformations engagent des processus variés, notamment la compaction, la déshydratation, la dissolution, la cimentation. Cet ensemble de réactions conduit à la formation d'un mélange de polymères de structure hautement complexe appelé kérogène. Sa transformation par catagénèse aboutira à la formation de pétrole.

Métaboliquement active (communauté bactérienne) : tout au long de ce travail est considérée comme métaboliquement active toute population bactérienne dont les transcrits du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S ont pu être détectés par RT-PCR.

Phylogénie : étude des origines évolutives d'un groupe d'êtres vivants, établie sur la comparaison de la structure moléculaire des ADN, qui permet d'établir le degré de parenté génétique de deux lignées d'êtres vivants.

Pollution : introduction dans l'environnement (air, eau, sol) de substances portant atteinte à la santé humaine et aux écosystèmes.

Résilience : En écologie microbienne, la résilience d'une communauté microbienne est caractérisée par le fait que celle-ci va retrouver son état initial après s'être modifiée suite à un changement environnemental.

Résistance : En écologie microbienne, la résistance d'une communauté microbienne est caractérisée par le fait que celle-ci ne va pas être modifiée suite à un changement environnemental.

Respiration aérobie/anaérobie : La respiration correspond aux réactions cataboliques qui utilisent des composés organiques et inorganiques comme donneurs et accepteurs d'électrons. Elle est dite aérobie lorsque l'accepteur final d'électron est l'oxygène et anaérobie lorsque l'accepteur final est une autre molécule oxydée. Les accepteurs finaux d'électrons peuvent dans le cas d'une respiration anaérobie être notamment le sulfate, le soufre, les nitrates ou encore le CO₂.

Sédiment : dépôt d'origine détritique, chimique et organique résultant de l'altération des roches, de la précipitation de matières dissoutes ou en suspension dans l'eau.

Toxicité : propriété d'une substance qui peut empoisonner un organisme vivant.

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

- Figure I-1:** Réactions de minéralisation de la matière organique et profil rédox dans le sédiment marin. $\Delta G_0'$: variation d'enthalpie libre exprimé en kJ /mol CH₂O (d'après Park & Jaffé, 1996 et Kristensen, 2000)..... 32
- Figure I-2 :** Modèle conceptuel simplifié de la répartition des principaux acteurs microbiens de la dégradation de la matière organique au sein du sédiment. (MO : Matière organique ; MO INT : Matière organique intermédiaire). 34
- Figure I-3 :** Représentation schématique de la localisation des différentes enzymes impliquées dans le processus de dénitrification par rapport à la membrane cytoplasmique. Nar : Nitrate réductase ; Nap : Nitrate réductase liée à la membrane ; Nir : Nitrite réductase ; Nor : Oxyde nitrique réductase, Nos : Oxyde nitreux réductase. Les noms de gènes en italique codent pour les sous-unités catalytiques. Les composés dissous sont représentés en bleu et les produits gazeux en orange. Les chiffres romains correspondent à la valence de l'azote dans chaque molécule azotée (Wallenstein et al., 2006). 35
- Figure I-4:** Schéma simplifié de la voie dissimilatrice de la sulfato-réduction (Singleton, 1993). 38
- Figure I-5:** Dégradation anaérobie de la matière organique en méthane. (Madigan and Martinko, 2007)..... 40
- Figure I-6:** (A) Métabolisme énergétique chez les méthanogènes (Thauer, 1998) ; (B) Voie de méthanogenèse basée sur la réduction de CO₂ dépendant du H₂ (Reeve et al., 1997). 41
- Figure I-7:** Représentation schématique des différentes zones d'une vase..... 45
- Figure I-8:** Distribution de l'oxygène dans des sédiments bioturbés. (A) Contrôle sans organisme (résolution : 570 x 570 lm); (B) *C. nerieta* (résolution : 610 x 610 lm); (C) et (D) *N. diversicolor* (résolution : 500 x 500 lm and 790 x 790 lm); (E) *N. virens* (résolution : 770 x 770 lm). (Pischedda et al., 2008)..... 49
- Figure I-9 :** Devenir des bactéries ingérées par les invertébrés aquatiques au sein de l'intestin (d'après Harris, 1993). Dès leur ingestion, les bactéries peuvent être lysées et absorbées (1), certaines peuvent être pathogènes pour l'hôte et coloniser les muqueuses intestinales (2). Les bactéries pouvant survivre à cette étape vont transiter dans l'intestin (3), jusqu'à la région postérieure où elles peuvent proliférer (incubation) (4). Cette production bactérienne, ou leurs produits, peuvent ensuite être utilisés par l'hôte (5). Enfin, selon les capacités de survie des bactéries ingérées, elles seront excrétées avec les matières fécales (6). 51
- Figure I-10 :** Illustration simplifiée des connaissances acquises sur les cycles biogéochimiques dans un sédiment bioturbé (A) en comparaison à un sédiment non bioturbé (B). 53
- Figure I-11 :** Abondance moyenne des composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans un pétrole brut (Bertrand et al., 1989). 56
- Figure I-12:** Processus intervenant dans le devenir des hydrocarbures pétroliers dans la colonne d'eau et les sédiments. (ITOPF ; <http://www.itopf.com/information-services/publications/technical-reports/>) 58

Figure I-13: Métabolismes impliqués dans l'utilisation des hydrocarbures par les micro-organismes. D'après Widdel et Rabbus (2001).....	58
Figure I-14: Voies de dégradation des n-alcanes les plus fréquents (oxydation terminale et subterminale) (Rojo, 2010).....	59
Figure I-15: Voies métaboliques de la dégradation du naphthalène par les bactéries aérobies. D'après Seo et al., 2009	61
Figure I-16 : Voies de dégradation anaérobie des alcanes (Mbadinga et al., 2011).....	64
Figure I-17: Exemples de réactions initiales de dégradation anaérobie d'hydrocarbures aromatiques. D'après Widdel et Rabbus (2001). Addition de fumarate (a,b,c), déshydrogénation (d) et carboxylation (e).	66
Figure I-18 : Facteurs affectant l'efficacité de biodégradation	67
Figure I-19: Rétroactions entre les activités humaines, les changements globaux, et les contrôles biotiques et abiotiques sur les propriétés de l'écosystème (d'après Hooper et al., 2005).	70
Figure I-20: Schéma de travail global pour l'étude de la communauté microbienne. Modifié d'après Watanabe et Hamamura (2003).....	72
Figure I-21 : Représentation schématique des interactions environnement/physiologie microbienne, composition de la communauté et processus de l'écosystème (modifié d'après Schimel et al., 2007). 74	
Figure I-22 : Schéma simplifié des effets des perturbations sur les communautés microbiennes marines (d'après Nogales et al., 2010).	76
Figure I-23 : Observation des changements de la composition d'un pétrole et de l'abondance des organismes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures en fonction du temps suite à une contamination pétrolière (Head et al., 2006).	81
Figure I-24 : Dénitrification et distribution des hydrocarbures dans les sédiments lié à la présence de la macrofaune. L'épaisseur des différentes couches du sédiment et des flèches sont représentatives de l'intensité des processus. HC: hydrocarbures; NIT: nitrification, DEN: dénitrification, SULF: sulfato-réduction (Gilbert et al., 1997b).	87

CHAPITRE II : PROCEDURES EXPERIMENTALES

Figure II-1 : Localisation géographique de l'aber Benoît dans la commune de Treglonou.....	93
Figure II-2: Prélèvement des sédiments vaseux sur le site d'étude	95
Figure II-3: Dispositif expérimental	95
Figure II-4 : Composition type d'un pétrole brut léger de type BAL.	96
Figure II-5 : Polychaete Nereis diversicolor (http://www.univ-lehavre.fr/cybernat/pages/nereidive.htm)	97

Figure II- 6: Vue des microcosmes avant (à gauche) et après (à droite) l'ajout des luminophores oranges.	98
Figure II-7 : Fiole de Widdel utilisée pour la préparation et la distribution des milieux en anoxie... 112	
Figure II-8 : Formules des différents hydrocarbures utilisés dans cette étude pour les cultures d'enrichissement.....	113
Figure II-9 : Observation de précipités rouges dans les puits après ajout d'INT	117
Figure II-10 : Visualisation du changement de pH grâce au virage du BBT (bleu : pH alcalin ; jaune : pH acide).	118

CHAPITRE III : STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES SOUMIS A UNE CONTAMINATION PETROLIERE DANS DES SEDIMENTS BIOTURBES

Figure III-1: Microcosms' box design. Sediments were maintained in such microcosm box and submitted to 12 hours tidal cycles renewing seawater at each tidal cycle.....	137
Figure III-2: Chemical analyses of hydrocarbon content in sediments A) Depth distribution of relative TPH content (%) in BAL and NEREIS+BAL conditions during the 270 days of experiment. The 100% TPH represents the total TPH per sampling time (addition of all depth). B) Total petroleum hydrocarbons (TPH) content (bars) and residual vanadium in extractable phase (curves) during the 270 days of the experiment for the BAL (grey bar and solid curve) and NEREIS+BAL (dotted bar and dotted curve) conditions. C) Concentration of alkanes (white bar) and aromatics (grey bar) during the 270 days of the experiment for the BAL (left) and NERREIS+BAL (right) conditions (SD were calculated for alkane + PAH). Stars show significant difference obtained by Duncan test (p-value<0.05) compared to 2 days value.	144
Figure III-3: Bacterial community structure comparisons based on T-RFLP analyses. Changes in total (A and B) and metabolically active (C and D) bacterial community structures during 270 days for the four conditions. Hierarchical analysis (A and D) was performed using the average similarity between replicates. Clusters were formed under 69.9% and 70.3% threshold. MDS analysis (B and C) was performed from the average of the duplicate from each microcosm box. CTRL, white circle; BAL, black circle; NEREIS, white triangle; NEREIS+BAL, black triangle.	145
Figure III-4: Heatmap with double clustering showing the relationship between microcosm conditions and bacterial phylotypes (phylum level). The microcosm conditions are clustered in the top and bacterial phylotypes are clustered on the left of the heatmap according to their intensity profile similarity. Black corresponds to higher abundance and white to absence of taxa.	148
Figure III-5: Composition en alcanes et HAPs du pétrole dans les huit premiers centimètres des microcosmes, au temps initial et final de l'incubation pour les traitements BAL et NEREIS+BAL..	160
Figure III-6 : Comparaison de la structure des communautés alkB actives à 2 et 270 jours d'incubation. L'analyse en MDS est basée sur les profils T-RFLP des transcrits du gène codant pour AlkB (Hinp1I, Sau96I, Sau3AI). CTRL ○, BAL ●, NEREIS △, NEREIS+BAL ▲.....	161
Figure III-7 : Comparaison des banques intI. Le dendrogramme a été construit par comparaison des séquences protéiques issues des différentes banques réalisées à 3 et 9 mois (90 et 270 jours). BAL : Oil+ et Oil+ bis (réplicat) ; CTRL :Oil-.(Huang et al., 2010)	164

Figure III-8 : Abondance relative du gène intIOPS. Le ratio du nombre de copies des gènes intIOPS/ARNr 16S a été mesuré par PCR quantitative. Chaque donnée est une moyenne de quadruplicatas d'échantillons mesurés en duplicatas. * : valeurs qui sont statistiquement différentes du T0 dans la même condition ($p = 0,0209$ dans les deux cas). # : les deux valeurs considérées sont statistiquement différentes ($p = 0,0209$ dans les deux cas).(Huang et al., 2010) 165

Figure III-9 : Evolution de la température ambiante moyenne mesurée à Brest au cours des 270 jours d'incubation en microcosmes (<http://www.wunderground.com/history>)..... 168

CHAPITRE IV : IMPACT DU PETROLE ET DE LA BIOTURBATION SUR LA COMMUNAUTE ARCHEENNE

Figure IV-1: Comparison of archaeal community structures.

MDS analysis based on T-RFLP profiles (HaeIII and TaqI) from 16S rRNA gene (A) and 16S rRNA transcripts (B) extracted from sediment microcosms sampled at 2, 30, 90, 180 and 270 days of incubation. The clustering was performed from the average similarity between replicates. For (A) the clustering is related to 52% (dotted line) and 67% (solid line). For (B) the clustering is related to 67% (dotted line) and 75% (solid line). CTRL:▲; BAL: ▼ ; NEREIS: ■; NEREIS+BAL: ◆. (C) Archaea OTU distribution (%) was followed by T-RFLP (HaeIII enzyme) based on the analysis of 16S rRNA gene and transcript for BAL and NEREIS+BAL treatments. 182

Figure IV-2: Comparaison of cDNA archaeal libraries.

(A) Hierarchical clustering based on Bray Curtis similarity index calculated with the relative abundances of sequences. A threshold of 97% was applied for the phylogenetic affiliation of sequences. (B) Phylotypes (OTUs) distribution within the five libraries based on the absence/presence of the phylogenetic archaeal groups. Specific OTUs found only in one library are coloured in grey. 184

Figure IV-3: Comparison of methanogenic archaeal community structures

MDS-plot analyses are based on replicate T-RFLP profiles (digested with MspI and Sau96I) from mcrA gene (left) and mcrA transcripts (right) extracted from sediment microcosms sampled at 2, 90, 180 and 270 days of incubation. CTRL:▲; BAL: ▼ ; NEREIS: ■; NEREIS+BAL: ◆ 186

Figure IV-4: Comparison of metabolically active methanogenic archaeal communities during the incubation period for the four conditions (CTRL, BAL, NEREIS and NEREIS+BAL). The methanogenic archaeal OTU distribution (%) was followed by T-RFLP based on the analysis of mcrA transcripts digested with Sau96I enzyme. 187

Figure IV-5 : Suivi temporel de l'abondance des T-RFs assignés aux différents groupes d'archées. Les pourcentages notés entre parenthèse indiquent la somme de l'abondance relative totale de ces T-RFs. 200

CHAPITRE V : SUIVI DE LA DYNAMIQUE ET DE L'ABONDANCE DES MICRO-ORGANISMES SULFATO-REDUCTEURS

Figure V-1: Gene copy numbers per nanogram of DNA of dsrB gene in both BAL (white) and NEREIS+BAL (grey) in comparison with initial value (2 days) during the time (90, 180 and 270 days). Values are mean±s.d. (n=3). Stars show significant difference obtained by Tukey post hoc test of a one-way ANOVA (p -value<0.05) compared to 2 days value. 213

Figure V-2: Non-metric multidimensional scaling analysis of treatment effects on sulfate-reducing microorganisms fingerprinted by T-RFLP of (A) *dsrAB* genes at each sampling time (2, 7, 30, 90, 180 and 270 days) and (B) *dsrAB* transcripts at 2, 90, 180 and 270 days. Ellipses indicate 95% confidence interval for replicates. Stress values (S) are indicated for each analysis. CTRL (circle); BAL (square); NEREIS (lozenge); NEREIS+BAL (triangle)..... 215

Figure V-3: Distribution and abundance of OTUs from T-RFLP fingerprint of BAL and NEREIS+BAL treatment during 180-270 days time. The heatmap to the right indicates the relative abundance of each unique sequence type according to the scale. Most active OTUs were indicated by arrow on the left (180 days) and on the right (270 days) of heatmap. BAL (square); NEREIS+BAL (triangle)..... 217

Figure V-4: Phylogenetic tree based on the translated (α subunit) amino acid sequences of PCR-amplified *dsrAB* cDNA from the NEREIS+BAL microcosm at 270 days. The tree was inferred using the Neighbor-Joining method and evolutionary distances were computed using the Poisson correction method. There were a total of 195 positions in the final dataset. The scale bar corresponds to 0.05 substitutions per site. Percentages of 100 bootstrap resamplings that supported the branching orders in each analysis are shown above or near the relevant nodes. Bootstrap values are shown for branches with more than 50% bootstrap support. Cultivable strains database sequences are shown in bold, with Genbank accession numbers in brackets. Representative clones of OTUs are highlighted in light grey and dominant OTUs in dark grey. 218

CHAPITRE VI : REPONSE ET ROLE DES BACTERIES NITRATE-REDUCTRICES DANS LA DEGRADATION DES HYDROCARBURES PETROLIERS DANS DES SEDIMENTS BIOTURBES

Figure VI-1: Relative abundance (%) of terminal restriction fragments (T-RFs) in *nirS* T-RFLP patterns. The analysis is based on the average profiles (n=3) at 2 days, 180 days and 270 days of incubation from CTRL; BAL, NEREIS and NEREIS+BAL microcosms..... 244

Figure VI-2: Affiliation of NirS deduced amino acid sequences from PCR amplified *nirS* gene fragments. Phylogenetic tree was constructed with the Neighbor-joining method. Bootstrap values (>50%) for 1,000 replicates are shown at the branch points. Database sequences are shown in bold, with Genbank accession numbers in brackets. White circles indicate sequences found only in BAL library and black stars indicate sequences found only in NEREIS+BAL library. Roman numbers refer to clusters discussed in the text. 246

Figure VI-3: Phylogenetic composition and similarity of BAL (grey) and NEREIS+BAL consortia (black). NEREIS+BAL consortia are indicated by (*). The different OTUs are noticed P1 up to P29. (○) indicate sequences found only in BAL library and (★) indicate sequences found only in NEREIS+BAL library. DBT= dibenzothiophene; FLU= fluoranthene; CHR= chrysene; PYR= pyrene. 249

Figure VI-4: Comparison of denitrifying communities in enrichment cultures by clustering analysis based on *nirS* T-RFLP data. (○) BAL enrichments, (★) NEREIS+BAL enrichments. DBT= dibenzothiophene; FLU= fluoranthene; CHR= chrysene; PYR= pyrene..... 251

Figure VI-5: Venn diagram from T-RFLP (sediments and consortia) and in silico restriction (libraries) of *nirS* fragments. 252

CHAPITRE VII : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Figure VII-1 : Schéma conceptuel de la réponse des communautés microbiennes suite à la contamination pétrolière dans des sédiments non bio-augmentés (A) et bio-augmentés (B)..... 267

Figure VII-2 : Représentation schématique de la dynamique des membres de la communauté microbienne au sein des sédiments non bio-augmentés et bio-augmentés suite à la contamination pétrolière. BAT : Bactéries Aérobie Totales..... 269

Figure VII-3 : schéma conceptuel des interactions existant au sein des sédiments (tranche 0-2cm) après chaque traitement. 271

LISTE DES TABLES ET TABLEAUX

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Tableau I-1: Effets de la macrofaune sur la décomposition et la re-minéralisation du carbone organique. Inhibition : ‘-’ ; stimulation : ‘+’ (d’après Aller & Aller, 1998).	52
Tableau I-2 : Bactéries hydrocarbonoclastes anaérobies dégradant les alcanes (méthane exclus) (Widdel and Grundmann, 2010).....	63
Tableau I-3 : Bactéries hydrocarbonoclastes anaérobies dégradant les hydrocarbures aromatiques (Widdel and Grundmann, 2010).....	65
Tableau I-4 : Résumé des risques pour l’environnement marin liés aux activités anthropiques (Nogales et al., 2010)	75

CHAPITRE II : PROCEDURES EXPERIMENTALES

Tableau II-1: Dominance (%) des espèces macrobenthiques recensées dans trois carottiers prélevés sur site (C1, C2 et C3).....	94
Tableau II-2 : Caractéristiques des différents couples d’amorces utilisées lors des PCRs de notre étude. (1) PCR Touchdown : 56°C – 0,5°C / cycle (x 10 cycles), 54°C (x 30 cycles) ; (2) PCR Touchdown : 60°C – 1°C / cycle (x 10 cycles), 50°C (x 30 cycles)	102
Tableau II-3 : Sites de coupures et température optimale d’activité des enzymes de restriction utilisées.....	105
Tableau II-4 : Caractéristiques des différents couples d’amorces utilisées en PCR quantitative lors de notre étude.....	110
Tableau II-5 (A) programmes utilisé pour le dosage des hydrocarbures aromatiques ; (B) programme utilisé pour le dosage du dotriacontane.	119

CHAPITRE IV : IMPACT DU PETROLE ET DE LA BIOTURBATION SUR LA COMMUNAUTE ARCHEENNE

Tableau IV-1: Correspondance entre les fragments de digestion générés in silico à partir des séquences des banques de clones et les données T-RFLP (HaeIII). MCG : Miscellaneous Crenarchaeotic Group ; MBG : Marine Benthic Group ; NHG : Novel Halobacterales. Les T-RF générés in silico non assignés au profil T-RFLP ont été notifiés comme non déterminés (n.d.).	199
--	-----

CHAPITRE V : SUIVI DE LA DYNAMIQUE ET DE L'ABONDANCE DES MICRO-ORGANISMES SULFATO-REDUCTEURS

Table V-1: T-RFLP OTUs affiliation to dsr clone library based on RsaI and TaqI restriction enzymes. 221

Table V-2: Identification of phylogenetic groups of dominant OTUs (> 5%) from dsr cDNA NEREIS+BAL_{270d} library. 222

CHAPITRE VI : REPONSE ET ROLE DES BACTERIES NITRATE-REDUCTRICES DANS LA DEGRADATION DES HYDROCARBURES PETROLIERS DANS DES SEDIMENTS BIOTURBES

Table VI-1: Characteristics of 16S rRNA libraries from enrichment cultures on fluoranthene, dibenzothiophene (DBT), pyrene and chrysene. Hydrocarbons removal and nitrate consumption after 30 days of incubation (relative to the beginning of the experiment)..... 248

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Les bactéries jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement de tous les écosystèmes car elles sont essentielles aux processus de décomposition et de recyclage des éléments. Elles créent et assurent l'équilibre de l'atmosphère, la purification des eaux et jouent également un rôle déterminant dans l'atténuation naturelle de nombreux contaminants environnementaux ce qui les rend indispensables.

La pollution de l'environnement marin par les substances toxiques d'origine anthropique est un des problèmes majeurs auxquels doivent faire face les sociétés actuelles. Ces pollutions, liées aux activités humaines, entraînent un nombre considérable d'effets négatifs sur la santé humaine, la qualité de l'air et de l'eau, la détérioration des écosystèmes, la biodiversité et la contamination des chaînes alimentaires. Les polluants organiques tels que les hydrocarbures pétroliers, contaminent la colonne d'eau et les sédiments dans le monde entier. Dans le cas d'une marée noire, le temps moyen nécessaire pour la réhabilitation d'un site est estimé à une dizaine d'années, mais pour certains écosystèmes, cela peut prendre plusieurs décennies. En terme quantitatif, le pétrole est le polluant organique le plus important dans les environnements marins et les environnements côtiers figurent parmi les plus touchés par ces pollutions. Cette dégradation de la qualité des ressources des écosystèmes peut avoir des répercussions sociales, économiques et écologiques importantes.

La biodégradation microbienne, qui représente l'un des processus clé de l'atténuation naturelle, est de plus en plus couramment envisagée comme une alternative aux procédés physico-chimiques et mécaniques pour la réhabilitation des sites contaminés. Ainsi, l'effet de la pollution aux hydrocarbures sur la communauté microbienne des écosystèmes marins a été l'objet de nombreuses études, principalement à cause des inquiétudes liées aux marées noires accidentelles telles que celles provoquées par l'Exxon Valdez en Alaska, le Prestige en Espagne, ou encore le Deepwater Horizon dans le Golfe du Mexique. La plupart de ces études ont porté sur l'effet de déversements de pétroles bruts sur la diversité microbienne, les changements en réponse aux essais de bioremédiation (impliquant généralement l'ajout de nutriments) et l'étendue de la biodégradation des hydrocarbures dans les environnements pollués. Ces études ont permis l'établissement de modèles afin de prédire la réponse de la

communauté microbienne lors d'une contamination pétrolière. Ils ont d'ailleurs été utilisés récemment lors de l'explosion de la plate-forme Deepwater Horizon. Cependant, il est également admis que certains paramètres comme la température liée aux variations saisonnières, la nature du milieu (sédiment sableux, vaseux) ou encore les interactions entre les êtres vivants constituant l'écosystème étudié, peuvent moduler ces réponses. Ils vont déterminer la distribution, l'abondance ainsi que l'activité des espèces microbiennes dans l'environnement. Les processus de biodégradation des hydrocarbures pétroliers ainsi que la diversité microbienne du site contaminé pourront être modifiés et diverger des modèles déjà établis. De ce fait, pour une meilleure compréhension de la bio-réhabilitation des écosystèmes marins, il apparaît indispensable de les prendre en considération lors de l'étude de l'impact d'une contamination pétrolière sur l'écosystème.

Ces paramètres sont multiples et dans le cadre de ce travail de thèse le choix s'est porté sur les organismes bioturbateurs. Ils peuvent être retrouvés en forte abondance dans les milieux côtiers de type vasière et représentent donc une composante biologique importante des environnements marins benthiques. De plus il a été démontré que ces organismes peuvent modifier la structure physique et chimique du sédiment et altérer les habitats des autres espèces. Ces activités communément appelée bioturbation affectent les cycles biogéochimiques des nutriments, des contaminants et des micro-organismes (Christensen et al., 2002 ; Banta et al., 2003 ; Kogure et al., 2005 ; Cuny et al., 2007).

Des études antérieures ont mis en évidence que ces organismes modifient la structure des communautés microbiennes capables de dégrader les hydrocarbures (hydrocarbonoclastes) ainsi que leur capacité de dégradation. Cependant, jusqu'à présent la majorité de ces travaux a porté sur des molécules cibles (e.g. pyrène, phénanthrène) rendant difficile l'extrapolation à une contamination pétrolière (mélange complexe: hydrocarbures aromatiques, aliphatiques, résines, asphaltènes) (Näslund et al., 2010 ; Timmermann et al., 2011).

Le but principal de ce travail de thèse était donc de savoir dans quelle mesure la réponse des communautés microbiennes à une contamination pétrolière allait être modifiée dans des sédiments bioturbés. Considérant les éléments cités précédemment, nous avons suggéré que lors d'une contamination pétrolière:

(i) les processus de structuration des communautés microbiennes sont modifiés par la présence de la faune bioturbatrice, et

(ii) que les activités de dégradation des composés du pétrole et donc l'efficacité de dégradation l'est également.

Afin de vérifier ces hypothèses, une étude comparative basée sur une expérimentation en microcosmes a été mise en place sur une durée de 270 jours. Les travaux menés ont été centrés sur le suivi de la diversité microbienne de sédiments marins faiblement et fortement bioturbés (bio-augmentation en organismes fouisseurs) soumis à une pollution pétrolière, Le travail de thèse présenté avait pour objectifs:

- de déterminer l'impact des organismes fouisseurs sur l'efficacité de dégradation des communautés microbiennes ;
- d'évaluer les capacités de dégradation potentielles des communautés autochtones issues des deux types de sédiments sur des molécules de haut poids moléculaire ;
- de comparer les modifications structurales des communautés microbiennes en réponse à l'apport de pétrole dans les sédiments faiblement et fortement bioturbés;
- de fournir de nouvelles informations concernant le rôle structural des organismes bioturbateurs sur les communautés microbiennes.

Les études antérieures réalisées visant à déterminer les modifications structurales des communautés microbiennes suite à une contamination pétrolière ont été réalisées au niveau génomique (ADN) et se sont essentiellement basées sur l'analyse du gène codant l'ARNr 16S *Bacteria* ou de gènes impliqués directement dans la dégradation aérobie des hydrocarbures (*alk*, *diox*). Dans le cadre de ce travail de thèse nous avons entrepris cette étude (i) par une analyse de la diversité taxonomique afin d'obtenir une image globale de la diversité au sein des sédiments (ARNr 16S *Bacteria* et *Archaea*) et (ii) par une analyse de la diversité fonctionnelle en ciblant différents groupes métaboliques anaérobies connus pour être impliqués dans la dégradation des hydrocarbures (dénitrifiants, sulfato-réducteurs et méthanogènes). En effet, bien que l'oxydation aérobie est considérée comme le processus majoritaire de la dégradation de la matière organique (Wakeham and Canuel, 2006), la profondeur de la zone oxique est estimée entre quelques millimètres à quelques centimètres dans les sédiments (Revsbech et al., 1980 ; Jørgensen, 1983). Par conséquent, les processus de respiration anaérobie représentent des processus de minéralisation relativement importants en milieux côtiers.

De plus, il nous fallait également prendre en considération la fraction totale et active des différentes communautés microbiennes. La diversité a donc été suivie sur deux niveaux d'études complémentaires : au niveau génomique (ADN, communauté totale) et transcriptionnel (ARN, communauté active).

Enfin, le potentiel de dégradation des micro-organismes autochtones ainsi que l'impact structural des organismes fouisseurs sur les micro-organismes hydrocarbonoclastes ont été évalué par l'utilisation combinée d'outils moléculaires et cultureux.

Ce travail de recherche est présenté sous forme de six chapitres. Une synthèse bibliographique (chapitre I) fait tout d'abord un état des connaissances acquises sur les hydrocarbures, les communautés microbiennes de sédiments côtiers, la dynamique des communautés en réponse à une contamination pétrolière, ainsi que sur la bioturbation. Le chapitre II présente les procédures expérimentales utilisées tout au long des études réalisées. Les résultats de cette étude sont présentés sous forme de quatre publications (chapitres III à VI). L'ensemble des résultats obtenus ainsi que les perspectives de travail qui en découlent sont présentés dans le chapitre VI.

Cette étude s'inscrit dans le projet de recherche DHYVA (Dégradation des Hydrocarbures dans les Vasières) financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR). Ce projet associe 4 laboratoires partenaires (EEM – UMR IPREM 5254, Pau ; ECABIE – UMR IPREM 5254, Pau ; LMGEM – UMR 6117, Marseille ; CEDRE, Brest).

CHAPITRE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I: Synthèse bibliographique

1. L'ENVIRONNEMENT MARIN : LIEU D'UNE ACTIVITE MICROBIENNE

IMPORTANTE

1.1. Minéralisation de la matière organique (MO)

Les sédiments marins côtiers jouent un rôle important dans la minéralisation de la matière organique (Middelburg et al., 1993). En effet, ils sont responsables de 83% de la minéralisation sédimentaire totale (Jørgensen, 1983) et accumulent environ 87% de la matière organique totale enfouie dans les sédiments (Bernier, 1982). Les principales réactions qui gouvernent la dégradation de la MO et donc les cycles biogéochimiques des éléments sont des réactions d'oxydo-réduction. Ces réactions de transfert d'électrons sont principalement dues aux métabolismes microbiens (Bernier, 1980 ; Henrichs, 1992). Au sein du sédiment, les accepteurs d'électrons sont principalement l'oxygène, le nitrate, le sulfate et le carbonate (Nedwell, 1984). Selon le « modèle de Froelich », l'oxydation de la MO consomme de façon séquentielle les différents accepteurs d'électrons inorganiques présents dans le système dans un ordre reflétant le gain énergétique potentiel pour les micro-organismes, respectivement: $O_2 > NO_3^- > Mn(IV), Fe(III), > SO_4^{2-} > HCO_3^-$ (Froelich et al., 1979; Canfield et al., 2005).

Les voies de dégradation de la MO dépendent de la disponibilité de ces accepteurs terminaux d'électron (Blackburn and Blackburn, 1993). Typiquement, les sédiments présentent une stratification verticale des conditions rédox qui déterminent l'enchaînement de ces réactions qui sont réalisées du potentiel rédox le plus fort vers des potentiels rédox de plus en plus faibles (Figure I-5). Cette stratification va également influencer la répartition des différentes communautés microbiennes au sein du sédiment (Kristensen, 2000). Selon le modèle de Park & Jaffé (1996), on peut découper verticalement le sédiment superficiel en six couches en fonction des réactions microbiennes et chimiques (respiration aérobie, réduction des nitrates, du manganèse, du fer, réduction des sulfates et méthanogénèse) (Park and Jaffé, 1996) (Figure I-1). Plus simplement, on peut distinguer trois zones : la zone oxic, suboxique et anoxique (Kristensen, 2000).

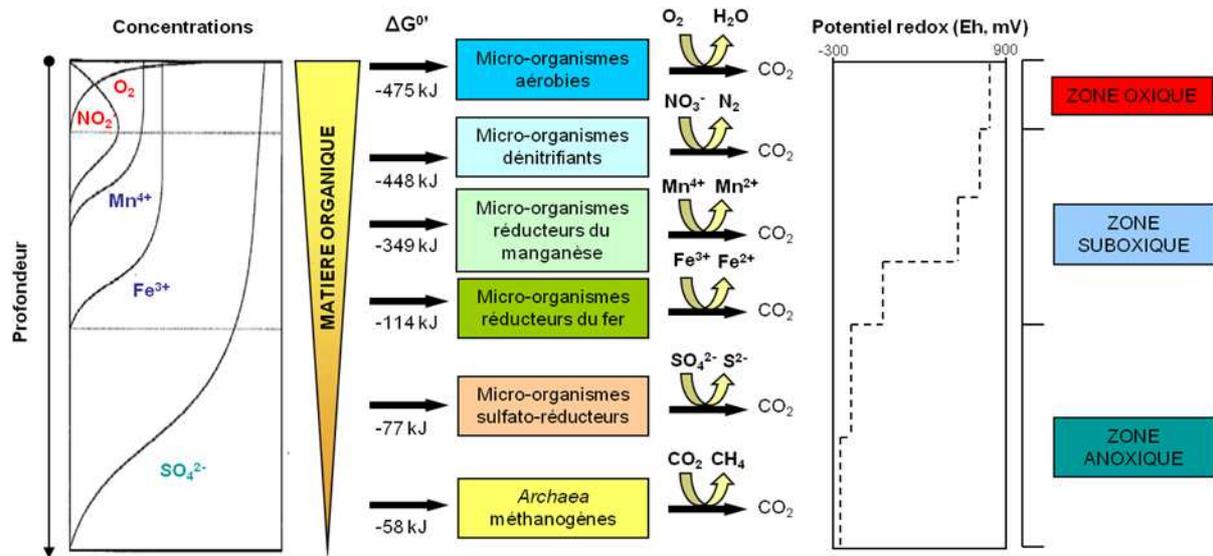


Figure I-1: Réactions de minéralisation de la matière organique et profil rédox dans le sédiment marin. $\Delta G^{0'}$: variation d'enthalpie libre exprimé en kJ /mol CH₂O (d'après Park & Jaffé, 1996 et Kristensen, 2000)

L'activité microbienne tend à être plus importante à proximité de l'interface eau-sédiment, dans la **zone «oxique»**. L'épaisseur de cette zone étant limitée par la pénétration de l'oxygène, on estime sa profondeur entre quelques millimètres (sédiment vaseux) à quelques centimètres (sédiment sableux) dans les sédiments (Revsbech et al., 1980 ; Jørgensen, 1983). Cette zone est un lieu privilégié pour la dégradation de la MO et le recyclage des sels nutritifs par les micro-organismes (Costanza et al., 1997).

La **zone «suboxique»** est caractérisée par la présence de nitrate, de manganèse et de fer oxydé. 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), bien qu'ils puissent être abondants dans certains sédiments littoraux (e.g. marécages), ils ne sont disponibles que ponctuellement dans les sédiments marins, en particulier dans les sédiments hautement contaminés.

Enfin, dans la **zone «anoxique»**, le sulfate est l'accepteur d'électrons le plus abondant. 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 est sans doute le processus prépondérant (Kleikemper et al., 2002). Lorsque le sulfate est épuisé, les composés comme le méthane, le dioxyde de carbone ou la MO elle-même sont les

composés qui dominent les processus diagénétiques (fermentation et méthanogénèse) (Sørensen et al., 1979).

Néanmoins, ce schéma reste très théorique car, en réalité, les différentes conditions et contraintes du milieu modifient radicalement cette stratification verticale pour aboutir à un remaniement total des sédiments et des différents composés, et par conséquent, la structuration des communautés microbiennes associées. En effet, les courants ou l'activité de la macrofaune (bio-irrigation, bioturbation) peuvent contribuer à déstructurer la microtopographie des sédiments (Jørgensen and Revsbech, 1985; Huettel and Gust, 1992). Les gradients fluctuent également au cours du temps en fonction des cycles saisonniers et nycthémeraux. De plus, des populations microbiennes aux métabolismes différents, et même théoriquement incompatibles, peuvent cohabiter, comme par exemple les bactéries aérobies et sulfato-réductrices (Cypionka et al., 1985). Ce phénomène peut s'expliquer, entre autres, par l'existence de micro-niches qui présentent des conditions environnementales distinctes par rapport à celles établies globalement au sein d'un même niveau sédimentaire (Westermann and Ahring, 1987 ; Bertics and Ziebis, 2010).

1.2. Groupes microbiens majeurs dans les sédiments côtiers

Les processus de transport et de transformation cyclique des éléments tels que le carbone, l'azote ou encore le soufre permettent la régulation des écosystèmes. Bien que souvent abordés séparément, les cycles biogéochimiques des éléments sont en étroite interaction dans l'environnement. La richesse métabolique des communautés microbiennes présentes au sein des sédiments permet un rôle majeur de ces micro-organismes dans les transformations du carbone, du soufre et de l'azote (Fenchel, 1999).

Le cycle du carbone est régi par deux phénomènes principaux: la photosynthèse qui permet la fixation du carbone (transformation du CO₂ en carbone organique) et la respiration ou fermentation qui permet un retour du carbone à l'atmosphère par minéralisation de la matière organique complexe en CO₂. La dégradation de la matière organique peut être réalisée aussi bien en condition d'aérobiose (bactéries hétérotrophes aérobies) que d'anaérobiose (micro-organismes fermentaires, dénitrifiants, sulfato-réducteurs et méthanogènes) (Figure I-2). Ces processus de dégradation aboutissent à la production de CO₂ et de biomasse. L'oxydation aérobie de la matière organique est considérée comme le processus majoritaire de la dégradation de la matière organique (Wakeham and Canuel, 2006).

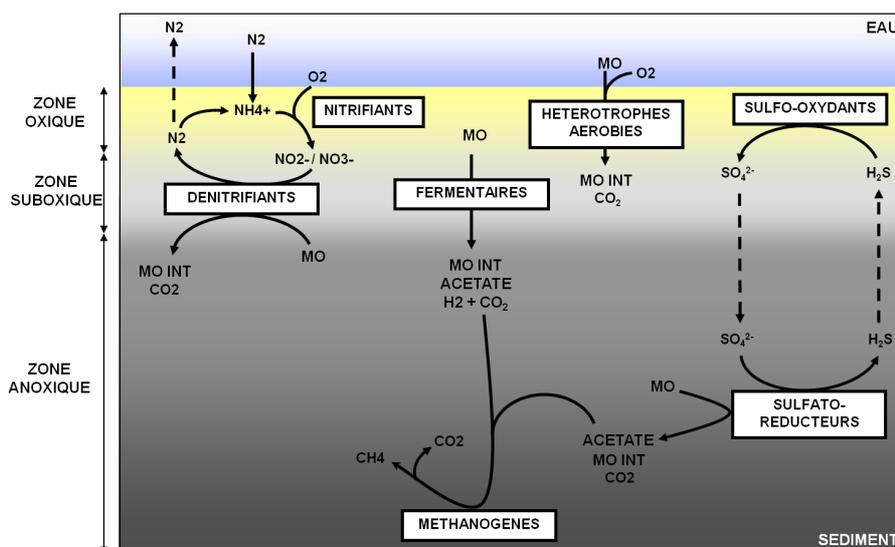


Figure I-2 : *Modèle conceptuel simplifié de la répartition des principaux acteurs microbiens de la dégradation de la matière organique au sein du sédiment. (MO : Matière organique ; MO INT : Matière organique intermédiaire).*

Lors de ce travail de thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à trois de ces groupes microbiens : les micro-organismes dénitrifiants, sulfato-réducteurs et les archées méthanogènes.

1.2.1. Les micro-organismes dénitrifiants

La dénitrification est l'un des processus clés du cycle de l'azote, et est l'une des principales sources d'émissions d'oxyde nitrique et d'azote pour l'atmosphère (Bothe et al., 2007 ; Jetten, 2008). Elle peut être effectuée par une grande variété de micro-organismes et même si certains eucaryotes comme les champignons et les foraminifères sont capables de dénitrifier, ce processus est principalement assuré par les bactéries (Zumft, 1997). C'est une alternative à la respiration aérobie dans laquelle les nitrates jouent le rôle d'accepteur final d'électron. Elle est active en présence de faibles concentrations d'oxygène ou en son absence.

1.2.1.1. Ecologie des micro-organismes dénitrifiants

Plusieurs études utilisant des marqueurs moléculaires de la dénitrification ont démontré que ces organismes sont ubiquistes. Ils ont été détectés dans des habitats variés incluant les sols (Wolsing and Priemé, 2004 ; Throbäck et al., 2007), les estuaires (Nogales et al., 2002 ; Santoro et al., 2006), les sédiments marins (Braker et al., 2000 ; Falk et al., 2007) et l'eau de mer (Castro-González et al., 2005 ; Oakley et al., 2007).

En milieu côtier, l'abondance de matière organique favorise largement la dénitrification (Thamdrup and Dalsgaard, 2002). Cependant, la dénitrification est en compétition avec le processus de réduction dissimilatrice des nitrates (RDNA) pour

l'utilisation des nitrates. L'intensité de l'activité dénitrifiante est proportionnelle à la concentration en nitrate. Dans les sédiments marins côtiers, les apports en nitrate proviennent d'une part de la nitrification, et d'autre part de la colonne d'eau qui reçoit les rejets urbains, agricoles et industriels. Les communautés dénitrifiantes seront particulièrement abondantes dans les sédiments marins côtiers où la réserve en matériel organique, facilement assimilable (source de carbone soluble), est plus abondante. Le processus de dénitrification prend place dans la zone sédimentaire au-dessus de celle où s'effectue la sulfato-réduction (Sørensen et al., 1979). Néanmoins, elle sera inhibée en présence de sulfates en excès et surtout de sulfures à raison de 0,3 mM seulement (Sørensen et al., 1980).

1.2.1.2. Processus de dénitrification et marqueur moléculaire associé

Le processus de dénitrification est constitué de quatre étapes au cours desquelles le nitrate initial (NO_3^-) est successivement réduit en nitrite (NO_2^-), en oxyde nitrique (NO) puis en oxyde nitreux (N_2O) pour aboutir à de l'azote atmosphérique (N_2) (Figure I-3). Les enzymes qui interviennent à chacune de ces étapes sont respectivement : Nitrate réductase (Nar), Nitrate réductase liée à la membrane (Nap), Nitrite réductase (Nir), Oxyde nitrique réductase (Nor) et enfin l'Oxyde nitreux réductase (Nos).

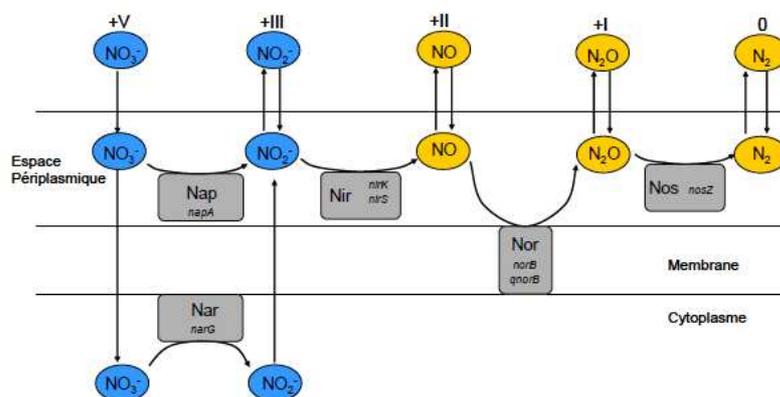


Figure I-3 : Représentation schématique de la localisation des différentes enzymes impliquées dans le processus de dénitrification par rapport à la membrane cytoplasmique. Nar : Nitrate réductase ; Nap : Nitrate réductase liée à la membrane ; Nir : Nitrite réductase ; Nor : Oxyde nitrique réductase, Nos : Oxyde nitreux réductase. Les noms de gènes en italique codent pour les sous-unités catalytiques. Les composés dissous sont représentés en bleu et les produits gazeux en orange. Les chiffres romains correspondent à la valence de l'azote dans chaque molécule azotée (Wallenstein et al., 2006).

La capacité de respiration anaérobie des nitrates se retrouve dans la plupart des groupes taxonomiques (Jeter and Ingraham, 1981), aussi bien chez les archées, les bactéries

Gram-négatives et Gram-positives. Cependant, tous les micro-organismes dénitrifiants ne possèdent pas tout le panel génétique présenté ci-dessus. En effet, il est relativement fréquent d'isoler des microorganismes qui ne peuvent réaliser qu'une partie des transformations décrites. Pour parler de dénitrification, il demeure cependant nécessaire que le produit final de la respiration soit un composé gazeux (Knowles, 1982).

Le qualificatif d'organisme dénitrifiant nécessite d'une part, que le taux de conversion de NO_3^- (ou NO_2^-) en N_2O et/ou N_2 soit d'au moins 80 % ; d'autre part, que cette réduction soit couplée à une production d'énergie permettant la croissance. De plus, la présence d'une des deux Nitrite réductases actives (NirS ou NirK), enzymes impliquées dans la deuxième étape de la dénitrification (réduction des nitrites en oxyde nitrique), est nécessaire (Zumft, 1993). Ces deux enzymes sont les enzymes clé de la dénitrification et de ce fait représentent de bons marqueurs moléculaires. Elles se distinguent par des groupements prosthétiques différents, l'un contenant un atome de cuivre (NirK), et l'autre un atome de fer (NirS). Jusqu'à présent, 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 alors que NirK, n'est présente que dans 30 % des bactéries dénitrifiantes étudiées (Coyne et al., 1989).

1.2.1.3. Effet de l'O₂ sur la dénitrification

La dissimilation du nitrate est généralement inhibée en aérobiose, car les électrons de la chaîne respiratoire sont préférentiellement détournés vers l'oxygène. En général, la dénitrification s'établit quand la concentration en O_2 est inférieure à $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ (Robertson and Kuenen, 1984). Il est donc nécessaire que la vitesse de consommation de l'oxygène soit suffisante pour permettre l'établissement de conditions anoxiques favorisant ce métabolisme. Néanmoins, la dénitrification aérobie est maintenant clairement établie (Robertson and Kuenen, 1984 ; Baek et al., 2001 ; Zehr and Ward, 2002) et a également été détectée au sein de l'environnement (Gao et al., 2010).

1.2.2. Les microorganismes sulfato-réducteurs (MSR)

Les micro-organismes sulfato-réducteurs (MSR) sont très répandus dans les habitats anoxiques, où ils utilisent le sulfate comme accepteur terminal d'électrons lors de la dégradation des composés organiques (Muyzer and Stams, 2008). La réduction du sulfate peut représenter plus de 50% de la minéralisation du carbone organique dans les sédiments marins (Jørgensen and Fenchel, 1974) et les sulfures ainsi générés représentent 95 % des sulfures

produits en milieu marin (Jørgensen, 1977). Les MSR sont donc des acteurs importants dans les cycles du soufre et du carbone.

1.2.2.1. Ecologie des MSR

Les MSR forment un groupe diversifié et sont répartis dans sept groupes phylogénétiques, cinq chez les *Bacteria* (dont les *Deltaproteobacteria* et les *Firmicutes*) et deux chez les *Archaea* (*Euryarchaeota* et *Crenarchaeota*) (Itoh et al., 1998 ; Castro et al., 2000 ; Rabus et al., 2006 ; Muyzer and Stams, 2008). Des études sur la diversité métabolique des MSR ont permis de mettre en évidence leur capacité à se développer sur une vaste gamme de substrats (Klemps et al., 1985 ; Rabus et al., 1993 ; Rees et al., 1998). Ce sont également les micro-organismes qui réduisent 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, 1988 ; Widdel and Hansen, 1992 ; Dalsgaard and Bak, 1994). 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.

Grâce à cette diversité physiologique, les micro-organismes sulfato-réducteurs colonisent des milieux aux conditions environnementales diverses et variées : la rhizosphère (Hikes et al., 1999), des sédiments marins (Mussmann et al., 2005), des aquifères, des cheminées hydrothermales (Jeanthon et al., 2002), des suintements d'hydrocarbures (Knittel et al., 2003) ou encore des environnements saturés en oxygène (Risatti et al., 1994 ; Minz et al., 1999). Ils ont également été détectés dans des environnements où on peut trouver des valeurs de pH acides (sites minier de drainage acide, Giloteaux et al., 2010), ou des pH basiques (Sen and Johnson, 1999). Certains MSR ont même été retrouvés dans des associations syntrophiques au sein de consortiums microbiens (Boetius et al., 2000), ou dans le cadre d'une relation symbiotique (dans le ver marin *Olavius algarvensis*) (Dubiller et al., 2001).

1.2.2.2. Réduction dissimilatrice des sulfates et marqueur moléculaire associé

La réduction dissimilatrice des sulfates (Figure I-4) est réalisée en trois étapes. Le sulfate est d'abord activé en adénosine-5'-phosphosulfate (APS) qui est ensuite réduit en sulfite. Ces deux réactions sont catalysées respectivement par l'ATP sulfurylase et l'APS réductase. Enfin, le sulfite produit est réduit en sulfure lors d'une réaction catalysée par la bisulfite réductase dissimilatrice (Dsr) (Rabus et al., 2000).

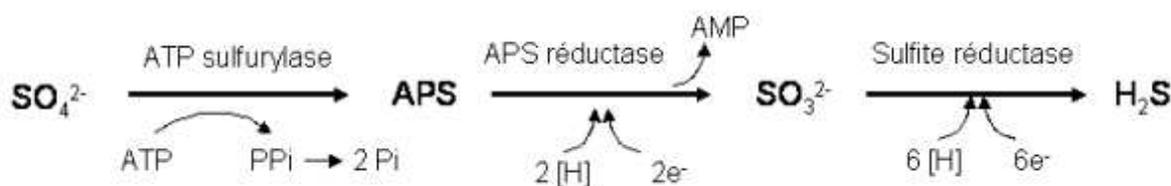


Figure I-4: Schéma simplifié de la voie dissimilatrice de la sulfato-réduction (Singleton, 1993).

La Bisulfite réductase est une enzyme hétérodimérique composée des sous-unités DsrA et DsrB dont les gènes correspondant forment l'opéron *dsrAB* (dissimilatory sulfite reductase) qui possèdent un haut degré de conservation (Karkhoff-Schweizer et al., 1995). Ils ont été proposés comme marqueur fonctionnel des MSR (Stahl et al., 2002). En effet, les gènes codant pour la Bisulfite réductase dissimilatrice 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). Les topologies des arbres phylogénétiques basés sur les gènes codant l'ARNr 16S et *dsrAB* sont congruentes (Zverlov et al., 2005), malgré quelques discordances expliquées par des transferts génétiques horizontaux (Klein et al., 2001). Ainsi, l'étude de la diversité des MSR basée sur l'analyse des gènes fonctionnels *dsrA* et *dsrB* constitue une bonne alternative par rapport à l'étude des gènes codant l'ARNr 16S (Leloup et al., 2007).

1.2.2.3. Tolérance / respiration de l'oxygène par les MSR

Juqu'en 1990, les MSR étaient considérés comme des organismes anaérobies stricts, cependant, des études d'exposition de cultures pures de MSR 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' O_2 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 pour se protéger de ces composés, de mécanismes de détoxification, 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 D.M, 2001). Cependant, certains sulfato-réducteurs ont également la faculté de le

respirer (i.e. de l'utiliser comme accepteur final d'électron) (Dilling and Cypionka, 1990). La respiration de l'oxygène a maintenant été démontrée chez plusieurs souches : *Desulfobulbus propionicus*, *Desulfococcus multivorans*, *Desulfobacterium autotrophicum* et chez certaines *Desulfovibrio* (Dilling and Cypionka, 1990).

Ainsi, ces organismes peuvent survivre sous des conditions micro-oxiques où ils respireraient le nitrate ou l'oxygène (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 des zones oxiques de sédiments marins, estuariens et d'eau douce (Sahm et al., 1999).

1.2.3. Les archées méthanogènes

La production biogénique de méthane ou méthanogénèse est un processus anaérobie important dans le cycle global du carbone et correspond à l'étape finale de la dégradation anérobie de la matière organique (Liu and Whitman, 2008). L'émission globale annuelle de méthane est estimée entre 500 et 600 x 10⁹ kg dont environ 74% a une origine biologique (Whitman et al., 2006). Pour les océans, le flux annuel de méthane est estimé entre 10 et 15 x 10⁹ kg par an (Liu and Whitman, 2008). La méthanogénèse est le moyen pour les archées méthanogènes d'obtenir de l'énergie pour leur croissance. A ce jour, ces organismes sont les seuls connus pour être capables de produire du méthane (Thauer, 1998).

1.2.3.1. Ecologie des méthanogènes

Dans les environnements anoxiques, la matière organique est décomposée en CH₄ et CO₂ grâce à la coopération d'au moins trois groupes métaboliques. Les micro-organismes fermentaires décomposent la MO complexe en H₂, formate, CO, acétate, et en acides gras volatiles. Le groupe des acétogènes décomposent les acides gras volatiles en acétate, formate et H₂ qui sont des substrats pour la croissance des archées méthanogènes (Figure I-5).

Les archées méthanogènes sont anaérobies strictes et sont très largement distribuées dans l'environnement, réparties en fonction de leur adaptation aux différentes conditions de température, de pH et de salinité des milieux (Liu and Whitman, 2008). Cependant, ces organismes restent confinés aux environnements strictement anaérobies (sédiments marins, sédiments d'eau douce, marais, lacs, mers et océans, tractus digestif de l'homme et des animaux, dépôts d'ordures, sources chaudes, tapis d'algues en décomposition). Ils occupent la position terminale dans la dégradation anaérobie de la matière organique, mais leur activité

peut être inhibée par celle des bactéries qui utilisent d'autres accepteurs d'électrons comme les nitrates ou les sulfates.

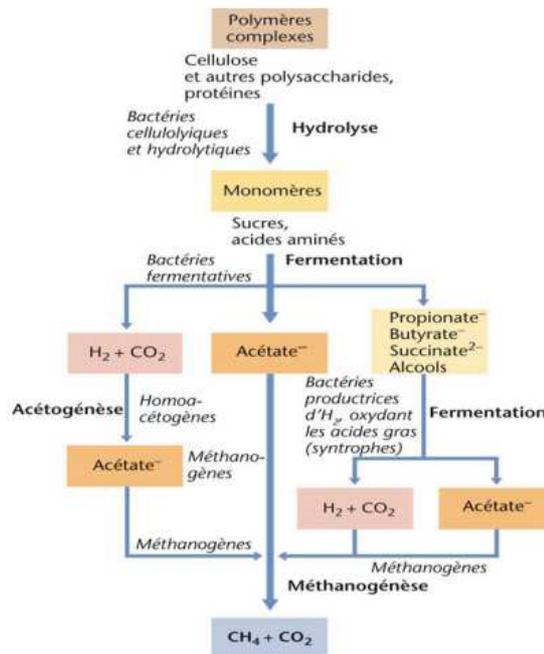


Figure I-5: Dégradation anaérobie de la matière organique en méthane. (Madigan and Martinko, 2007).

Bien que les archées méthanogènes soient très diversifiées (classées au sein de 5 ordres), elles ne peuvent utiliser qu'une gamme restreinte de substrats (trois grands types: le CO₂, les composés méthylés et l'acétate) (Liu and Whitman, 2008).

Les méthanogènes des sédiments marins ont des taux de croissance lents lorsqu'ils sont cultivés dans des milieux de culture spécifiques en laboratoire. Par exemple, le temps de doublement dans des conditions optimales de croissance est de 3,5 jours pour l'espèce *Methanosarcina baltica* (Von Klein et al., 2002). Ainsi, ces microorganismes sont très difficiles à cultiver (Ritchie et al., 1997). Les effectifs cellulaires des archées méthanogènes parmi la population microbienne totale, calculés à l'aide de techniques de PCR en temps réel (QPCR, Quantitative Polymerase Chain Reaction), ont mis en évidence que les méthanogènes représentent moins de 1 % des densités cellulaires totales dans des sédiments marins (Colwell et al., 2008). Cette observation pourrait expliquer pourquoi il est souvent difficile de détecter les méthanogènes dans les sédiments marins, que ce soit par l'utilisation de techniques moléculaires ou de cultures d'enrichissement.

1.2.3.2. Méthanogénèse et marqueur moléculaire

Le métabolisme énergétique des méthanogènes comprend deux parties (Figure I-6 (A)). Dans la partie oxydative de la voie de méthanogénèse, le co-enzyme M (H-s-CoM) et le coenzyme B (H-S-CoB) sont oxydés en hétérodisulfure CoM-S-S-CoB par le CO₂, l'acétate ou un composé en C1 réduit (CH₃-X) comme le méthanol ou les méthylamines, qui sont quant à eux réduits en CH₄. Dans la partie réductrice, l'hétérodisulfure est réduit en co-enzyme M et en co-enzyme B, et le transport d'électrons est couplé à la production d'énergie par phosphorylation d'un ADP en ATP (Thauer, 1998).

La voie de méthanogénèse comporte au total 7 étapes (Figure I-6 (B)) dont la dernière correspond à la réduction du groupement méthyl lié au CoM qui est libéré sous forme de méthane. Cette réaction est catalysée par la Méthyl co-enzyme M réductase (McrM). L'enzyme McrM semble être unique et est retrouvée chez tous les méthanogènes (Thauer, 1998).

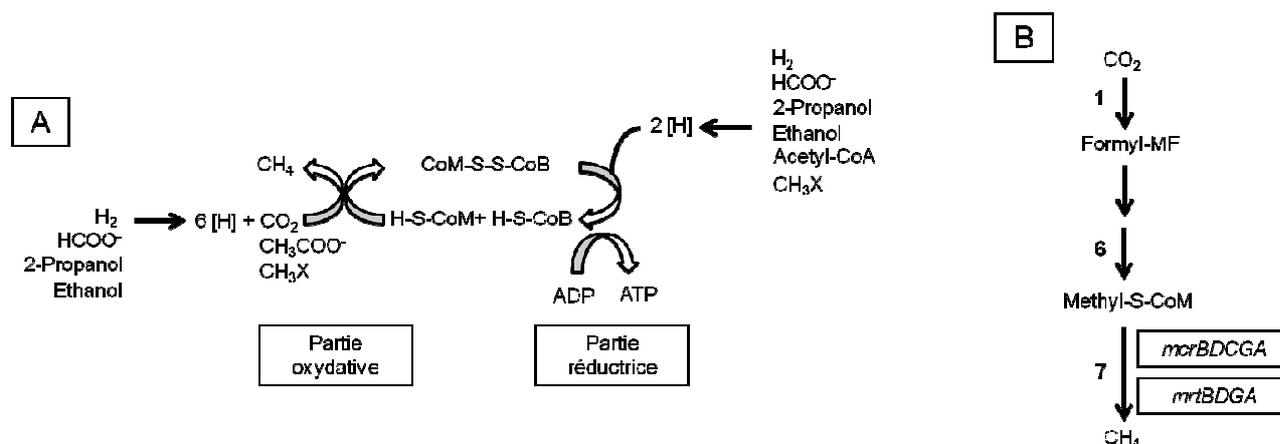


Figure I-6: (A) Métabolisme énergétique chez les méthanogènes (Thauer, 1998); (B) Voie de méthanogénèse basée sur la réduction de CO₂ dépendant du H₂ (Reeve et al., 1997).

La Méthyl co-enzyme M réductase possède trois sous-unités codées par les gènes *mcrA*, *mcrB* et *mcrG*. Ces trois gènes font partie de l'opéron *mcrBDCGA*. La sous-unité catalytique α de la MCR, codée par le gène *mcrA*, possède des domaines très conservés, et détectés chez tous les méthanogènes. Ainsi, le gène *mcrA* est hautement conservé ce qui en fait un bon candidat comme marqueur moléculaire pour des études en écologie microbienne. De plus, les arbres phylogénétiques construits à partir du gène *mcrA* pour les méthanogènes

présentent des topologies comparables à celles des arbres construits à partir des gènes codant l'ARNr 16S (Hales et al., 1996 ; Luton et al., 2002).

1.2.3.3. Effet de l'oxygène moléculaire

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. vanniellii*, 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 consortiums avec des micro-organismes anaérobies 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).

1.2.4. Interactions entre les MSR et les archées

Dans les milieux anaérobies qui ont un faible potentiel d'oxydo-réduction, les micro-organismes sulfato-réducteurs (MSR) sont en compétition avec d'autres micro-organismes anaérobies pour des substrats communs (les bactéries fermentaires, les bactéries acétogènes réductrices de proton, les homoacétogènes et les méthanogènes). La présence de sulfate est cruciale dans cette compétition. En présence de sulfate les MSR consomment les produits de

fermentation, alors qu'en absence de sulfate, l'hydrogène et l'acétate produits directement par la fermentation ou indirectement par l'acétogénèse sont consommés par les méthanogènes.

La capacité d'oxydation des substrats des MSR permet de distinguer deux groupes (Widdel, 1988) expliquant également les interactions possibles entre ces micro-organismes et les archées méthanogènes :

- **les MSR du groupe I**, chez lesquelles l'oxydation à partir du lactate et de l'éthanol est incomplète et s'arrête au stade acétate (e.g. *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfomonas* ou *Desulfotomaculum nigrificans*) ;
- **les MSR du groupe II**, chez lesquelles l'oxydation complète du substrat conduit au CO₂ (*Desulfobacterium autotrophicum*, *Desulfonema* ou *Desulfobacter*).

L'acétate joue donc aussi un rôle important dans les interactions entre les MSR et les archées méthanogènes. Il est libéré en amont par les acétogènes à partir de produits de fermentation. Ainsi, les MSR du groupe II seront en compétition avec les méthanogènes. Au contraire, une collaboration pourra s'installer avec les MSR du groupe I qui produisent de l'acétate.

Un autre processus, l'oxydation anaérobie du méthane (OAM), est réalisée par l'action syntrophique d'archées méthanotrophes (ANME) et de bactéries sulfato-réductrices (BSR) (Boetius et al., 2000). La majorité du méthane émis dans les sédiments marins est consommée via l'oxydation anaérobie du méthane (OAM). Cette réaction a généralement lieu dans la « zone de transition sulfate-méthane » (SMTZ). Les consortiums responsables sont typiquement composés d'archaea appartenant aux ANME-1 (*Methanomicrobiales*), ANME-2 et ANME-3 (*Methanosarcinales*) et des BSR affiliées aux genres *Desulfosarcina*, *Desulfococcus* (associées aux ANME-1 et -2) et *Desulfobulbus* (ANME-1). Cette réaction peut se faire selon plusieurs mécanismes (méthanogénèse reverse, acétogénèse, Méthylogénèse) (Thauer, 2011).

2. LES VASIERES, UN MILIEU AUX FONCTIONS ECOLOGIQUES MULTIPLES

La production biologique de la zone côtière représente entre 18 et 33 % de la production océanique mondiale en dépit d'une surface relativement faible représentant 7%

de la surface océanique mondiale (Wollast, 1991). Parmi les écosystèmes côtiers, les vasières font partie des systèmes les plus productifs (McLusky, 1989).

2.1. Les vasières

Les vasières sont des étendues de sédiments meubles (vases) déposés sur les rivages marins, les estuaires ou les deltas. Leur formation résulte du colmatage de certaines anses du littoral ou des rives d'estuaires par des sédiments fins formant un milieu anoxique (vases plus ou moins sableuses). Ces sédiments sont de nature variable et proviennent soit de la mer (érosion marine), soit de matériaux apportés par les fleuves. Ces zones humides sont soumises au flux et au reflux de la mer et sont donc plus ou moins recouvertes d'eau selon l'amplitude des marées (Figure I-7). On distingue ainsi 2 zones bien distinctes : la slikke et le schorre (mots issus du néerlandais et signifiant respectivement boue ou vase et pré salé) (De Langhe, 1978).

La slikke est la partie inférieure et est pratiquement dépourvue de végétation. Elle est composée de vase molle, lisse et est recouverte à chaque marée. Elle abrite une faune composée de nombreux invertébrés marins (vers et mollusques). Les slikkes sont formées d'un sédiment exclusivement pélitique à la granulométrie très fine dans laquelle les particules inférieures à 2 μm constituent la moitié du poids sec du sédiment (Verger, 1995).

Le schorre, la partie haute, est plus souvent émergé. Il est constitué d'un sol plus ferme recouvert par la mer seulement aux fortes marées. Cette zone est tapissée d'une végétation basse et dense qui sert de zones de repos et de reproduction pour les oiseaux.

Ces milieux, naissant de la jonction de plusieurs cours d'eau et finissant dans la mer, suscitent un grand intérêt naturel car ce sont des écosystèmes très riches sur le plan biologique. Les fluctuations de la salinité, le rythme des marées et l'envasement important y créent des conditions de vie très particulières auxquelles ne sont adaptées que peu d'espèces vivantes. Par contre, l'apport important de matière organique assure une nourriture abondante aux espèces qui supportent de telles conditions. Les densités en individus sont considérables au sein de chaque espèce, notamment chez les mollusques, les vers et les crustacés.

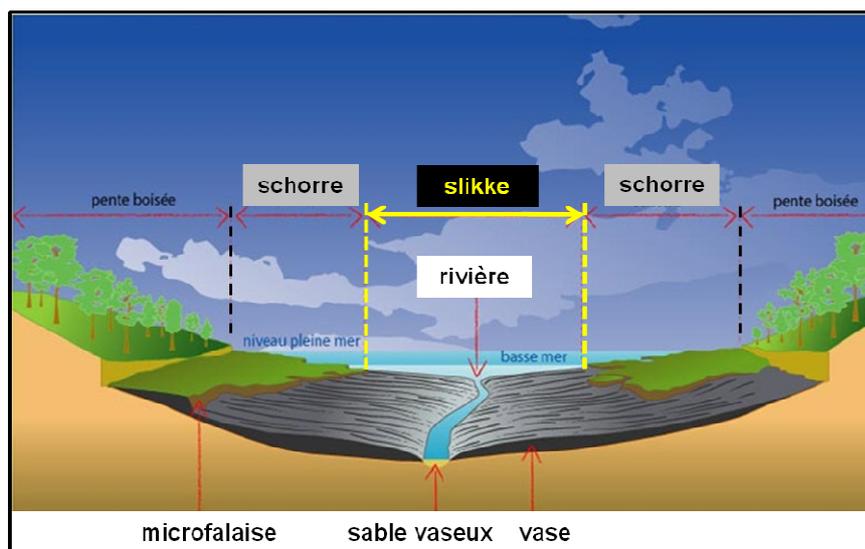


Figure I-7: Représentation schématique des différentes zones d'une vasière

Les vasières sont importantes dans le cycle du carbone et à l'origine d'une importante productivité biologique (McLusky, 1989). Ces zones sablo-vaseuses assurent des fonctions prépondérantes dans l'équilibre des écosystèmes côtiers: elles filtrent, piègent et transforment une grande partie des éléments polluants. Ces zones littorales sont le siège de réseaux trophiques complexes où des organismes y résident en permanence et d'autres ne font qu'y passer. Enfouis dans la vase, à l'abri de la dessiccation, ces organismes filtrent l'eau de mer, se nourrissent de la matière organique présente dans les sédiments ou broutent les bactéries et les microalgues (diatomées) qui constituent l'essentiel du peuplement. Cette forte productivité attire de nombreux oiseaux qui viennent s'y nourrir. De plus, les vasières jouent, plus ou moins directement, un rôle important dans les activités humaines telles la conchyliculture, la chasse et la pêche.

Les vasières sont donc un lieu de stockage des sédiments fins qui ont à la fois une fonction d'épuration et de transformation (contaminants chimiques, sels nutritifs) et une fonction écologique (nourricerie, abondance de faune et flore benthiques).

Les organismes marins particulièrement adaptés à ces milieux sont des animaux (> 0,5 mm) qui creusent le sédiment et la méiofaune (0,05-0,5 mm) qui vit dans les espaces interstitiels. Ces organismes fouisseurs créent des bioturbations en mélangeant les sédiments qui permettent ainsi leur oxygénation. Ces sédiments, régulièrement mis en suspension par les courants, piègent et accumulent les polluants ce qui perturbe l'équilibre de cet écosystème de manière chronique. Les perturbations subies entraînent des déséquilibres pouvant se

répercuter sur plusieurs années et s'étendre au reste de l'écosystème côtier et à l'ensemble de la chaîne trophique.

2.2. Importance de la bioturbation dans les processus de l'écosystème marin

2.2.1. Le concept de bioturbation

La bioturbation correspond aux déplacements de matériel particulaire (i.e. remaniement sédimentaire) et dissous (i.e. bio-irrigation) dans et à la surface des sédiments, induis par l'activité des organismes benthiques (Nereis Park Conference, Renesse, Pays-Bas, 2008). Elle concerne différents groupes d'espèces animales (macro-invertébrés, méio-invertébrés et vertébrés) et végétales (développement racinaire des plantes aquatiques supérieures) ainsi que des micro-organismes (bactéries, champignons, micro-algues). Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux macro-invertébrés : la macrofaune.

La bioturbation est liée à l'ensemble des activités comportementales de ces organismes dans la colonne sédimentaire. Ceci regroupe leurs déplacements, la recherche de nourriture, leurs modes alimentaires et leurs mécanismes respiratoires, dont les manifestations les plus facilement observables sont: (i) le creusement de galeries et de terriers (structures biogènes), (ii) l'ingestion de particules sédimentaires, (iii) la production de fèces, (iv) l'excrétion de déchets métaboliques, et (v) la circulation d'eau dans les galeries (irrigation). La macrofaune colonise surtout les couches superficielles des sédiments où la MO est la plus abondante et la plus fraîche, et l'oxygène le plus disponible, mais elle peut également pénétrer assez profondément dans le sédiment (Gerino et al., 1999). D'un point de vue écologique, les organismes bioturbateurs sont qualifiés d'ingénieurs de l'écosystème car ils vont directement ou indirectement moduler la disponibilité des ressources pour les autres espèces et auront donc un impact sur l'écosystème (Jones et al., 1994).

2.2.2. Principales actions des organismes bioturbateurs

La bioturbation entraîne un mélange et un brassage des particules du sédiment superficiel (remaniement sédimentaire) ainsi qu'un transport de l'eau interstitielle et des solutés qui lui sont associés (bio-irrigation) (Matisoff, 1995). Il en résulte une hétérogénéité spatiale, verticale et horizontale, des sédiments (Mermillod-Blondin et al., 2003a) sur des profondeurs pouvant atteindre plusieurs mètres en milieu marin (Gérino, 1992).

- La bio-irrigation (ou ventilation)

La bio-irrigation est générée par certains organismes qui construisent des galeries ou des terriers dans le sédiment, qu'ils irriguent en générant un courant d'eau à des fins respiratoire et nutritionnelle (Meysman et al., 2006). C'est un processus important dans les échanges de composés solubles entre les sédiments et la colonne d'eau (Galaktionov et al., 2003). Elle se fait par diffusion à travers l'interface eau-sédiment, et est due à l'activité des organismes fouisseurs lorsqu'ils irriguent leur terrier afin d'oxygéner leur milieu et d'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 les activités bactériennes aérobies et anaérobies (Aller and Aller, 1998). Le mode, la fréquence et l'amplitude de bio-irrigation varie selon l'organisme considéré (François et al., 1999 ; Gerino et al., 2003). De manière générale, ce mécanisme entraîne une alternance de conditions oxygènes et anoxiques au rythme de l'activité des organismes (Brune et al., 2000).

- Le remaniement des sédiments

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). De ce fait, cinq types d'organismes bioturbateurs ont été définis (François et al., 1997 ; Nogaro et al., 2009).

(i) Les biodiffuseurs vont déplacer les particules de manière aléatoire sur de courtes distances (Robbins et al., 1979) ; (ii) Les convoyeurs vers le haut induisent un lien direct entre deux strates géochimiquement différentes car ils ingèrent des particules sédimentaires en profondeur, dans la zone anoxique, et rejettent leurs pelotes fécales à la surface du sédiment (Fisher et al., 1980) ; (iii) A contrario, les convoyeurs vers le bas entraînent un transport de matériel sédimentaire vers le bas. C'est le cas, par exemple, de certains polychètes Nereidae (Smith et al., 1986) ; (iv) Les régénérateurs transfèrent le sédiment profond vers la surface (Gardner et al., 1987), et (vi) les diffuseurs à galeries, entraînent des mouvements de particules et de matière organique par biodiffusion aux alentours de l'habitat et des mouvements de la surface vers le fond des galeries (Michaud et al., 2005).

2.2.3. Conséquences de la bioturbation

2.2.3.1. *Modifications physiques*

Parmi les effets directs de la bioturbation, le déplacement des organismes provoque la redistribution du matériel particulaire qui peut entraîner la resuspension, une décohésion des particules de sédiment et l'érosion des sédiments (Davis, 1993). De plus, ces structures biogènes augmentent la surface d'échange entre la colonne d'eau et le sédiment, ce qui favorise les échanges de matière à l'interface. Enfin, la plupart des macro-invertébrés bioturbateurs étant microphages, l'ingestion/égestion de particules va modifier les propriétés sédimentaires telles que la porosité, la perméabilité, la stabilité, ou encore la rugosité des sédiments (Jumars et al., 1981 ; Aller et al., 1983 ; DeMaster et al., 1985; Mermillod-Blondin et al., 2003b). La granulométrie peut également être affectée par certains types d'organismes qui ingèrent préférentiellement les particules les plus petites et les moins denses et les redistribuent sous forme de pelotes fécales (Taghon, 1989). Ces modifications physiques du sédiment peuvent avoir à plus long terme des effets majeurs sur la sédimentation, la stabilité et l'érosion du substrat, ainsi que sur la distribution des polluants au sein du sédiment.

2.2.3.2. *Modifications biogéochimiques*

Les effets sur la géochimie des sédiments sont induits (1) par l'organisme lui-même lorsqu'il respire, se nourrit, excrète ou sécrète du mucus, (2) par le brassage des particules qu'il produit et qui réexpose la matière organique aux eaux surnageantes oxygénées, et (3) par l'irrigation et notamment, la ventilation active et périodique du terrier chez les diffuseurs à galeries. D'après Rhoads (1974), les processus biogéochimiques pouvant être significativement influencés par la bioturbation sont:

- la forme et l'amplitude des gradients de potentiel redox (Eh), de pH et O₂,
- les taux d'échange des composés chimiques dissous ou adsorbés entre les phases solides et aqueuses,
- la distribution verticale des espèces biogéochimiques majeures,
- et donc les cycles biogéochimiques des éléments (C, N, S, P) (Rhoads, 1974).

Comme la température, la lumière, la vitesse du courant et les apports de MO, la bioturbation est donc un facteur important de contrôle des processus diagénétiques dans les sédiments superficiels (Krantzberg, 1985 ; Kristensen, 2000 ; Mermillod-Blondin and Rosenberg, 2006).

L'augmentation de la surface d'échange entre la colonne d'eau et le sédiment au niveau des structures biogènes, permet une pénétration plus importante de l'oxygène et des

nutriments dans le sédiment (Svensson et al., 2001 ; Stief and De Beer, 2002 ; Glud et al., 2003 ; Pischedda et al., 2008) (Figure I-8).

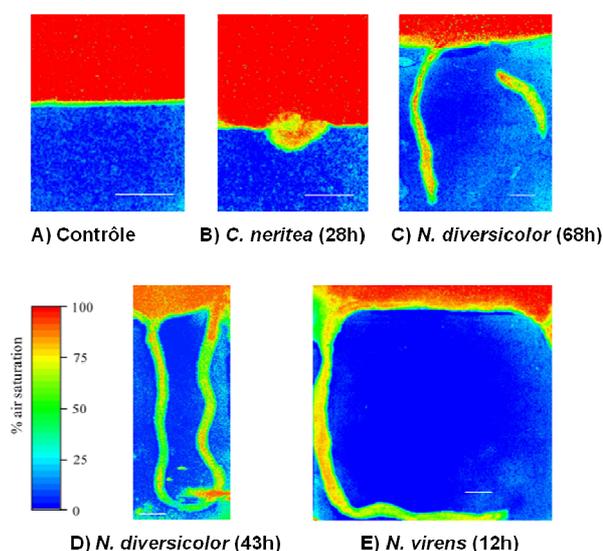


Figure I-8: Distribution de l'oxygène dans des sédiments bioturbés. (A) Contrôle sans organisme (résolution : 570 x 570 μm); (B) *C. neritea* (résolution : 610 x 610 μm); (C) et (D) *N. diversicolor* (résolution : 500 x 500 μm and 790 x 790 μm); (E) *N. virens* (résolution : 770 x 770 μm). (Pischedda et al., 2008).

La stratification verticale des accepteurs d'électrons précédemment décrite apparaît donc beaucoup plus complexe dans les environnements bioturbés. En effet, la succession des fronts d'oxydo-réduction se reporte sur le contour des structures biogènes qui sont bien oxygénés (Wang et al., 2001) ou autour de micro-environnements comme les pelotes fécales formant alors des microniches réduites dans un sédiment oxydé (Aller et al., 2001).

Ainsi, la bioturbation conduit à la formation d'une mosaïque tridimensionnelle complexe et hétérogène de microhabitats sédimentaires avec des gradients variables d'oxygénation et de potentiel rédox (Kristensen, 2000 ; Aller et al., 2001; Pischedda et al., 2012). A cela, il faut ajouter les effets du bioconvoiyage qui va permettre la remontée de particules depuis des zones réduites en profondeur vers des zones oxygènes à l'interface. Les éléments réduits associés à ces particules vont pouvoir alors être réoxydés et servir à nouveau d'accepteurs d'électrons pour dégrader la MO. Les déplacements et le mode alimentaire de ces organismes (deposit-feeding) expose la MO associée au sédiment à des conditions variables d'oxygénation et de potentiel redox par l'alternance de l'enfouissement/remise en suspension et de l'ingestion/égestion des particules sédimentaires.

La présence de bioirrigateurs peut considérablement augmenter la surface d'échange à l'interface eau/sédiment et donc les flux des solutés et des gaz vers le sédiment (NO_3^- , O_2) ou vers la colonne d'eau (PO_4^{3-} , NH_4^+ , CO_2 , CH_4) (Fukuhara and Sakamoto, 1987 ; Matisoff and Wang, 2000 ; Lewandowski et al., 2007).

2.2.3.3. *Modifications biologiques : effet sur les communautés microbiennes*

Les perturbations physiques et les variations biogéochimiques engendrées par la bioturbation peuvent transformer considérablement le milieu de vie de l'ensemble des espèces benthiques (Jones et al., 1997). Leur action peut donc influencer la répartition, la composition et le fonctionnement des communautés macrofauniques, méiofauniques et microbiennes. Nous nous intéresserons essentiellement à l'impact sur les communautés microbiennes. Les effets de l'activité de la macrofaune se reflètent sur la biomasse, l'activité métabolique et la composition des communautés microbiennes (Aller and Yingst, 1978 ; Alongi, 1985 ; Kristensen et al., 1991 ; Bertics and Ziebis, 2009).

2.2.3.3.1. Effets sur la biomasse

Localement, les micro-organismes peuvent être consommés par les macro-organismes brouteurs lors de l'ingestion des sédiments (Mermillod-Blondin et al., 2002 ; Stief and De Beer, 2006). Ce phénomène, communément appelé « grazing » va entraîner une diminution locale de la biomasse bactérienne. A contrario, le broutage de certaines bactéries va également créer des surfaces libres qui pourront être recolonisées par des populations microbiennes en croissance dans des phases connectées (Reichelt, 1991).

Lors de l'ingestion des sédiments, les bactéries associées au sédiment vont transiter dans l'intestin de l'organisme brouteur, certaines pourront survivre au passage dans l'intestin et éventuellement y proliférer. Elles seront alors excrétées avec les matières fécales. Les pelotes fécales produites peuvent contenir une forte biomasse bactérienne qui soutiendra une forte activité bactérienne. La figure I-9 récapitule les types d'associations qui ont été recensées entre l'intestin des invertébrés aquatiques et les bactéries (Harris, 1993).

En plus d'augmenter la disponibilité en nutriments, la macrofaune apporte également de la MO fraîche et labile (mucus et fèces) dans les sédiments de subsurface, ce qui fait de leurs terriers des habitats favorables pour certaines communautés microbiennes (Stief and De Beer, 2002). C'est ce qu'on appelle le « gardening ».

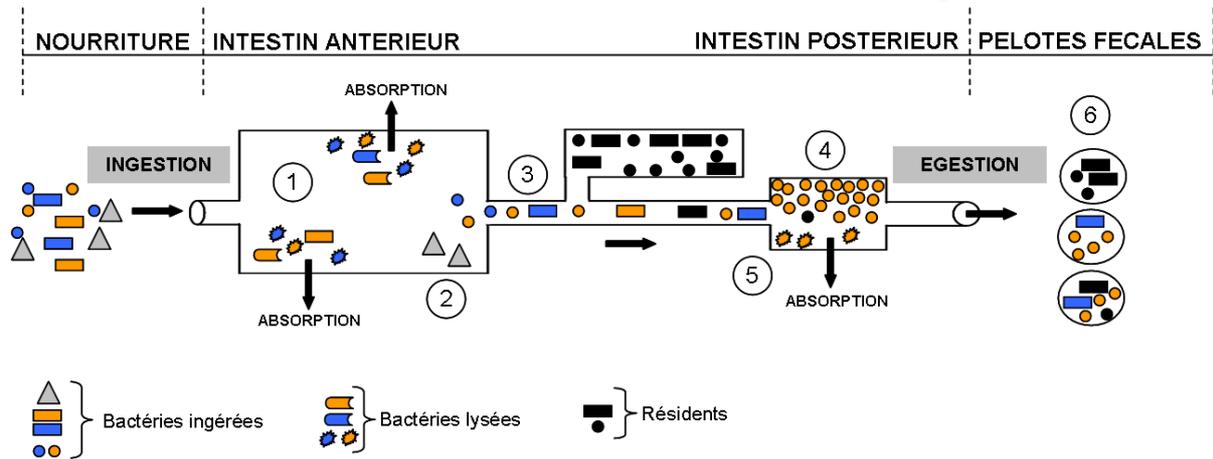


Figure I-9 : Devenir des bactéries ingérées par les invertébrés aquatiques au sein de l'intestin (d'après Harris, 1993). Dès leur ingestion, les bactéries peuvent être lysées et absorbées (1), certaines peuvent être pathogènes pour l'hôte et coloniser les muqueuses intestinales (2). Les bactéries pouvant survivre à cette étape vont transiter dans l'intestin (3), jusqu'à la région postérieure où elles peuvent proliférer (incubation) (4). Cette production bactérienne, ou leurs produits, peuvent ensuite être utilisés par l'hôte (5). Enfin, selon les capacités de survie des bactéries ingérées, elles seront excrétées avec les matières fécales (6).

2.2.3.3.2. Effets sur l'activité

Dans les sédiments bioturbés, le lieu et les voies de minéralisation de la matière organique sont affectés parce que les micro-organismes eux-même le sont, ceci au travers des activités de bioturbation. Ainsi, en altérant l'environnement direct des micro-organismes (échanges de flux des composés réduits et oxydés, disponibilité des nutriments), les activités des animaux benthiques peuvent influencer les taux de décomposition sédimentaire et modifier les processus de diagenèse précoce (Table I-1) (Aller and Aller, 1998; Stief et al., 2005).

En présence de macrofaune, la couche de surface oxydée du sédiment se propage plus profondément (Figure I-10). Ajouté à la ventilation des terriers et l'excrétion d'ammonium par les organismes dans les terriers, la nitrification est stimulée, 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). 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).

Tableau I-1: Effets de la macrofaune sur la décomposition et la re-minéralisation du carbone organique. Inhibition : '-' ; stimulation : '+' (d'après Aller & Aller, 1998).

Activité de la macrofaune	Effets	Taux de décomposition
Manipulation des particules	Exposition des substrats	+
	Augmentation de la surface d'échange	+
Grazing	Consommation de micro-organismes /	+
	Stimulation de la croissance microbienne	
Excrétion / sécrétion	Mucus	+
	Nutriments	+
	Stimulation de la croissance microbienne	+
Construction / sécrétion	Synthèse de produits réfractaires ou inhibiteurs	-
Irrigation	Apport de composés solubles	+
	Accumulation de métabolites	+
	Augmentation de la ré-oxydation des composés réduits	+
Transport des particules	Transfert entre les différentes zones rédox	+
	Augmentation de la ré-oxydation des composés réduits	+
	Oscillations rédox	+

En présence de macrofaune, la couche de surface oxydée du sédiment se propage plus profondément (Figure I-10). Ajouté à la ventilation des terriers et l'excrétion d'ammonium par les organismes dans les terriers, la nitrification est stimulée, 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). Les micro-niches anoxiques ainsi que l'augmentation de la matière organique liées à la construction des terriers et à leur

maintenances 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).

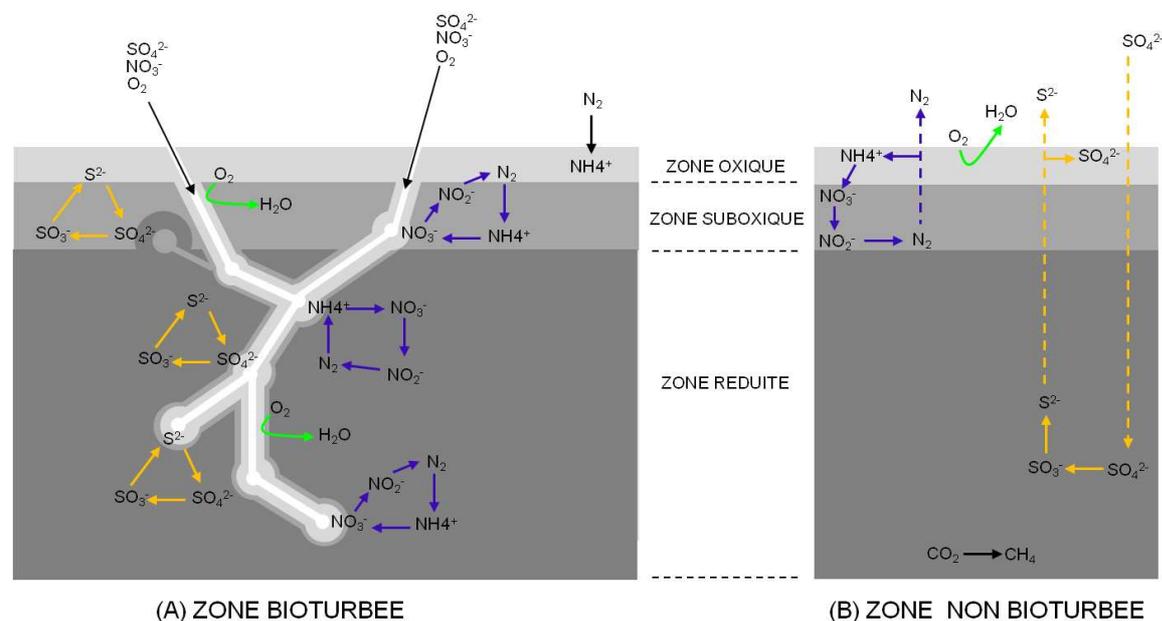


Figure I-10 : Illustration simplifiée des connaissances acquises sur les cycles biogéochimiques dans un sédiment bioturbé (A) en comparaison à un sédiment non bioturbé (B).

De plus, une étude récente a suggéré que les bactéries sulfato-réductrices pouvaient également être responsable de la fixation d'azote atmosphérique dans les sédiments bioturbés afin de compenser la perte liée au couplage nitrification-dénitrification (Bertics et al., 2010). Enfin, les niches oxiques permettent la dégradation microbienne aérobie dans la couche de subsurface (zone suboxique) et les oscillations répétées des conditions rédox dans les sédiments, stimulent la reminéralisation de la matière organique (Aller and Yingst, 1985 ; Forster and Graf, 1992). Aucune étude sur l'activité des archées méthanogènes n'a été réalisée dans des sédiments bioturbés probablement car ces micro-organismes ont longtemps été considérés comme très sensibles à l'oxygène.

2.2.3.3.3. Effets sur la composition des communautés microbiennes

L'étude de la structure de la communauté bactérienne colonisant des sédiments bioturbés a été entreprise à l'aide de méthodes moléculaires, notamment par comparaison entre les parois, la surface des terriers, et les sédiments environnants. Ces études se sont basées sur des analyses PLFA (Marinelli et al., 2002), des techniques d'empreintes moléculaires ou de clonage (Lucas et al., 2003 ; Matsui et al., 2004 ; Papaspyrou et al., 2006 ; Laverock et al., 2011). Ainsi, il a clairement été démontré que la communauté bactérienne colonisant les terriers est distincte de celle du sédiment environnant. Par conséquent, les

structures biogènes de la macrofaune ne doivent pas être considérées simplement comme une extension de l'interface eau-sédiments car elles sont caractérisées par des propriétés physiques et chimiques uniques ainsi que par une communauté microbienne qui leur est propre (Fenchel, 1996 ; Pischedda et al., 2011; Kristensen and Kostka, 2005 ; Papaspyrou et al., 2006).

Les résultats basés sur la comparaison entre les différents compartiments du sédiment (paroi du terrier, surface, subsurface) ont montré que les relations existant entre ces différentes communautés peut être une conséquence des similitudes observées au niveau physico-chimique (Bird et al., 2000 ; Bertics and Ziebis, 2009). Le lien entre ces différents micro-environnements dépend également de l'écologie de l'organisme étudié. Ainsi, les communautés bactériennes associées au terrier du polychaete *Nereis diversicolor* et du crabe violoniste *Uca crenulata* sont plus semblables à celles retrouvées en subsurface (Lucas et al., 2003 ; Bertics and Ziebis, 2009). En revanche, pour d'autres espèces de polychaetes et pour les crevettes *Thalassinidea*, cette communauté montre plus de similarité avec celle associée à la surface (Steward et al., 1996 ; Bertics and Ziebis, 2009 ; Pischedda, 2009). Ces observations soulignent que les terriers des différentes espèces d'organismes bioturbateurs ne présentent pas les mêmes propriétés biogéochimiques (Aller et al., 1983 ; Christensen et al., 2000 ; Papaspyrou et al., 2006).

Des différences dans la structure de la communauté bactérienne ont également été mises en évidence entre les différents terriers issus du même sédiment pour une même espèce bioturbatrice, ce qui suggère que les processus de construction, d'irrigation et d'entretien de ces structures affectent aussi la distribution des bactéries dans les terriers (Laverock et al., 2010).

Toutes ces observations indiquent que les activités de la macrofaune vont déterminer la structure des communautés au sein du sédiment. Ce processus de restructuration a été étudié par ajout d'organismes bioturbateurs au sein de sédiments par comparaison à un sédiment contrôle. Peu d'études sont actuellement recensées et leurs résultats sont divergents. Par exemple, L'une d'entre elles a rapporté une augmentation d'un facteur deux de la proportion des séquences affiliées aux *Gamma-protéobactéries* en présence des crevettes *Upogebia deltaura* et *Callianassa subterranea*, accompagnée d'une forte diversité (Laverock et al., 2010). Au contraire, en présence des polychaetes *N. diversicolor*, aucune modification de la communauté bactérienne n'a été observée au bout de 45 d'incubation. (Cuny et al., 2007).

3. RE-HABILITATION DES MILIEUX MARINS : BIODEGRADATION DES COMPOSES PETROLIERS PAR LES MICRO-ORGANISMES

Bien que la formation du pétrole résulte de processus naturels de transformation de la matière organique (MO) (Seewald, 2003), il est également un polluant majeur. Une pollution est définie comme une introduction dans l'environnement (air, eau, sol) de substances portant atteinte à la santé humaine et aux écosystèmes. Elle est essentiellement liée aux activités humaines. Les pollutions liées aux hydrocarbures entraînent un nombre considérable d'effets négatifs sur la santé humaine, la qualité de l'air et de l'eau, la détérioration des écosystèmes terrestres et marins, la biodiversité, la contamination des chaînes alimentaires (O'Rourke and Connolly, 2003). Parmi les différents processus impliqués dans le devenir des hydrocarbures, la biodégradation des hydrocarbures pétroliers par les micro-organismes est considérée comme un processus majeur (Leahy and Colwell, 1990).

3.1. Origines et composition des pétroles

3.1.1. Contaminations pétrolières des environnements marins

L'environnement marin est le compartiment le plus touché par la pollution aux hydrocarbures (O'Rourke and Connolly, 2003 ; Prince et al., 2003). Ces 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 pétrole est estimé comme étant la principale source mondiale d'énergie primaire avec 33,6% du total (données 2010, BP Statistical Review of World Energy 2011). Par conséquent, les activités anthropiques conduisent à leur dispersion dans les environnements marins, provoquant des modifications de l'environnement aquatique ainsi que des conséquences graves sur les écosystèmes et la santé humaine (Head and Swannell, 1999). Le transport maritime représente une des plus grosses sources d'hydrocarbures et de pollution pétrolière des océans. Depuis 1970, environ 700 incidents ont été recensés dans 99 pays, les plus médiatisés étant l'Exxon Valdez (1989), l'Erika (1999), le Prestige (2002), Hebei Spirit (2007) et dernièrement l'Event Horizon (2010) et le Réna (2011). Bien que les statistiques montrent clairement une tendance à la baisse du nombre de déversements de grande ampleur (> 700 Mt) le nombre d'accidents annuels reste constant (environ 20 à 25 par an) (Renken, 2010) (<http://www.itopf.com/information->

services/publications/papers/HamburgConference.html). Par conséquent la nécessité de mettre en œuvre des moyens de réponse à ces pollutions demeure d'actualité.

3.1.2. Composition des pétroles

Les hydrocarbures peuvent être classés en (i) insaturés, ils possèdent une à plusieurs double-liaison(s) (alcènes) ou triple-liaison(s) (alcynes), (ii) saturés, ils ne possèdent pas de double ou de triple liaison et peuvent être linéaires (n-alcane e.g. hexadécane), ramifiés (e.g. pristane) ou alicycliques (e.g. stères) et (iii) aromatiques, parmi lesquels on distingue les alkylbenzènes (BTEX) et les HAPs (hydrocarbures aromatiques polycycliques) dont la structure comprend au moins 2 cycles aromatiques fusionnés (Heider et al., 1999). Les hydrocarbures aromatiques sont hautement cancérigènes et seize d'entre eux ont été classés par l'US Environmental Protection Agency (EPA) comme polluants fortement toxiques dont l'étude est prioritaire (Samanta et al., 2002).

Parmi ces composés, les hydrocarbures saturés et aromatiques sont les principaux constituants du pétrole. (Figure I-11) (Holliger and Zehnder, 1996 ; Widdel and Rabus, 2001). Des composés polaires (composés oxygénés, sulfurés et azotés) ainsi que des hydrocarbures insaturés sont également retrouvés en faible proportion. Enfin, des métaux, principalement du soufre, du vanadium et du nickel mais aussi du fer, du cuivre et de l'uranium sont présents à l'état de traces.

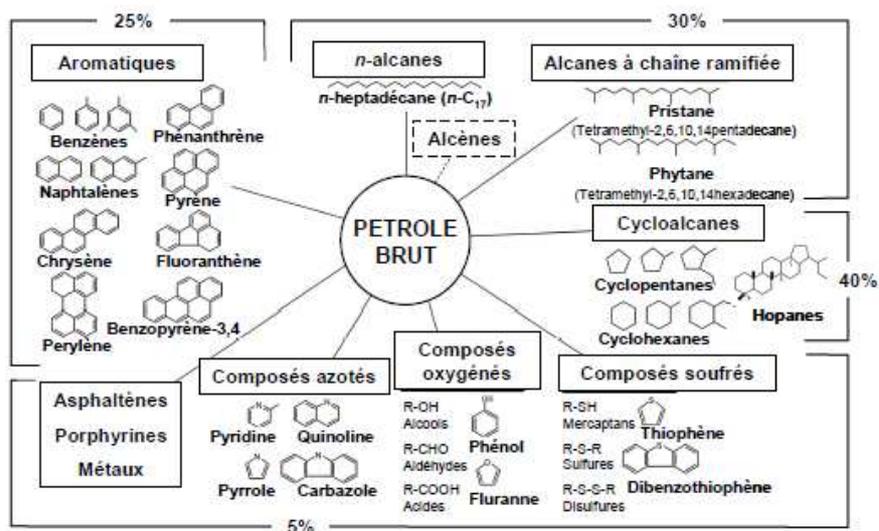


Figure I-11 : Abondance moyenne des composés hydrocarbonés et non hydrocarbonés présents dans un pétrole brut (Bertrand et al., 1989).

3.2. Origines des hydrocarbures en milieu marin

Les hydrocarbures sont des composés exclusivement constitués d'hydrogène et de carbone. Ils sont largement répandus dans l'environnement et font partie des constituants de la matière organique (MO). Leur présence ubiquiste dans l'environnement marin à des concentrations plus ou moins élevées est liée à la multiplicité de leurs origines. Leur formation peut résulter de processus biologiques ou géochimiques. Ainsi, des monoterpènes et de nombreux n-alcanes ont été retrouvés dans les micro-organismes, les plantes et les animaux (Langenheim, 1994 ; Ladygina et al., 2006). On présume qu'ils joueraient le rôle de cires protectrices vis-à-vis d'agressions extérieures (Birch and Bachofen, 1988). L'hydrocarbure formé par dégradation biologique le plus abondant sur Terre est sans aucun doute le méthane (CH_4) dont la formation (la méthanogénèse) est un processus exclusivement réalisé par un groupe d'archées anaérobies (Forterre et al., 2002). De nombreux hydrocarbures aromatiques peuvent également provenir de la combustion incomplète de matière organique pendant l'activité volcanique (Doyle et al., 2008).

Enfin, leur abondance ainsi que leur utilisation dans l'industrie comme source d'énergie en font l'un des groupes de composés chimiques les plus importants. Ils sont également les principaux constituants des pétroles (Holliger and Zehnder, 1996) et si la principale origine des hydrocarbures pétroliers dans le milieu marin est naturelle (suintements, érosion des sédiments), les apports anthropiques restent importants.

3.3. Devenir des hydrocarbures en milieu marin

Au sein des écosystèmes marins, les hydrocarbures sont soumis à différents processus affectant leur devenir et leur persistance. Très rapidement, interviennent des processus complexes d'altération dont la durée et l'ampleur dépendent des propriétés et de la composition du pétrole introduit ainsi que des conditions environnementales (Payne et al., 2003). L'étroite interaction entre les mécanismes physiques, chimiques et biologiques de dispersion et de dégradation des constituants du pétrole conduira à l'élimination de tout ou partie de la contamination. Les mécanismes physico-chimiques gouvernant le devenir du pétrole et de ses constituants dans l'environnement marin sont l'étalement / la dispersion, l'évaporation, la dissolution, l'émulsification, la photo-oxydation et la sédimentation (Figure I-12). Cependant, bien que tous les constituants du pétrole ne soient pas biodégradables (entre 3 et 30% des molécules retrouvées dans les pétroles) (Prince et al., 2003), l'évolution de la composition du pétrole dépend bien plus de processus de biodégradation microbienne que des

processus d'altération cités précédemment (Muschenheim and Lee, 2002). Par conséquent seul ce processus a été détaillé par la suite.

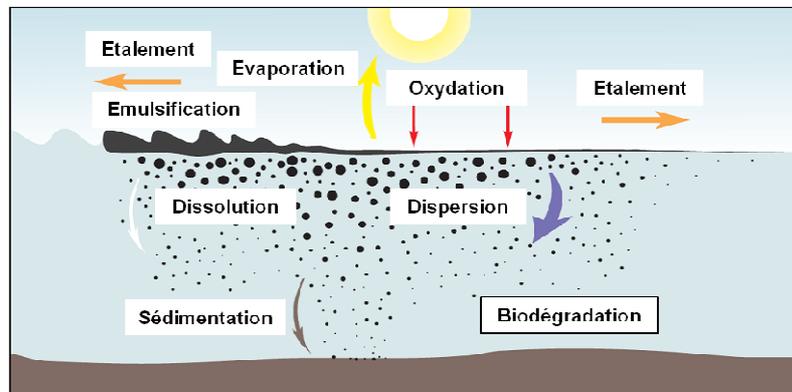


Figure I-12: Processus intervenant dans le devenir des hydrocarbures pétroliers dans la colonne d'eau et les sédiments. (ITOPF ; <http://www.itopf.com/information-services/publications/technical-reports/>)

3.3.2. Biodégradation des hydrocarbures

Une grande variété de micro-organismes présente la capacité à dégrader les hydrocarbures. Ils sont qualifiés d'« hydrocarbonoclastes » (Berthe-Corti and Höpner, 2005). Ces micro-organismes sont largement répandus dans les environnements marins, à la fois dans la colonne d'eau et dans les sédiments (Leahy and Colwell, 1990 ; Bagoon et al., 2001 ; Van Hamme et al., 2003). Ils dégradent les hydrocarbures selon les différentes voies de respiration aérobies et anaérobies décrites précédemment pour la minéralisation de la MO (Figure I-13).

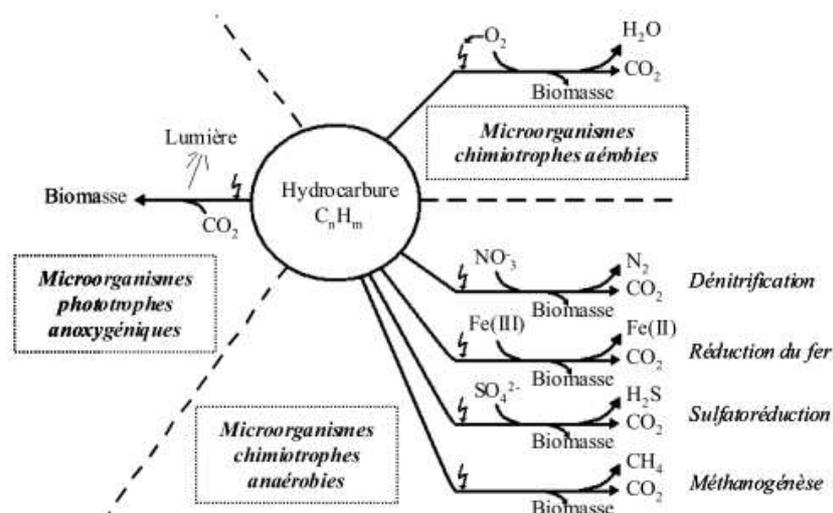


Figure I-13: Métabolismes impliqués dans l'utilisation des hydrocarbures par les micro-organismes. D'après Widdel et Rabus (2001).

3.3.2.1. Biodégradation aérobie des hydrocarbures

Les bactéries utilisant les hydrocarbures comme source de carbone et d'énergie ont été mises en évidence par Zobell en 1946. Depuis, de nombreuses souches ont été isolées et décrites et ont permis la caractérisation de voies de biodégradation.

3.3.2.1.1. Voies de biodégradation aérobie des alcanes

Dans la plupart des cas décrits, la dégradation aérobie des n-alcanes est initiée par l'incorporation d'un atome d'oxygène (hydroxylation) conduisant à la formation d'un alcool primaire. A ce jour, on distingue trois voies de dégradation: l'oxydation terminale, diterminale et subterminale de l'hydrocarbure (Figure I-14).

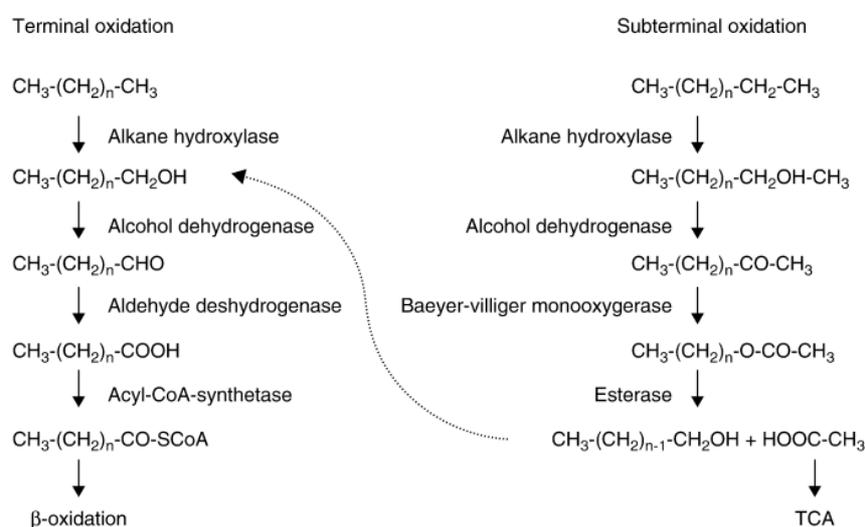


Figure I-14 : Voies de dégradation des n-alcanes les plus fréquentes (oxydation terminale et subterminale) (Rojo, 2010)

Cette réaction est catalysée par une alcane hydroxylase (alcane monooxygénase) ou un cytochrome P450 (Leahy and Colwell, 1990) conduisant à la formation d'un alcool. Cet alcool est ensuite oxydé via l'action d'une alcool déshydrogénase formant l'aldéhyde correspondant qui est ensuite transformé en acide carboxylique par une aldéhyde déshydrogénase. L'acide carboxylique ainsi formé est soit métabolisé par l'intermédiaire de la voie de la β -oxydation, soit incorporé dans la voie de synthèse des lipides cellulaires (van Beilen et al., 2003).

L'hydroxylation initiale des n-alcanes peut être réalisée par des enzymes appartenant à différentes familles (van Beilen et al., 2003 ; Van Beilen and Funhoff, 2007). Par facilité, on distingue trois catégories : les alcanes C_1-C_4 (méthane à butane) sont oxydés par des enzymes méthane monooxygénases *like*, C_5-C_{16} (pentane à hexadécane) par des

enzymes membranaires non hémiques du type AlkB *like* ou des cytochromes P450 (monooxygénase à hème) et C₁₇ et plus, par des systèmes enzymatiques moins bien connus (Van Beilen and Funhoff, 2007 ; Wentzel et al., 2007). Récemment, quatre alcane hydroxylase ont été caractérisées chez *Alcanivorax dieselolei* B-5, une souche capable de dégrader les *n*-alcanes de 5 à 36 atomes de carbone (Liu et al., 2011). Des analyses par PCR quantitative ont démontré que les gènes *p450* et *Alma* étaient surexprimés en présence d'alcanes à chaîne moyenne (C₈ à C₁₆) ou à longue chaîne (C₂₂ à C₃₆), alors que les gènes *alkB1* et *alkB2* étaient surexprimés en présence d'alcanes présentant 12 à 26 atomes de carbone. Par conséquent, au sein d'une même souche, plusieurs systèmes d'alcane hydroxylase assurent l'utilisation d'une large gamme d'alcanes.

En effet, bien que certaines souches bactériennes ne contiennent qu'une seule alcane hydroxylase (*Pseudomonas putida* GPO1), il est assez fréquent de trouver des souches qui contiennent plus d'un système d'oxydation des alcanes (Rojo, 2010). Dans de nombreux cas, mais pas toujours, ces enzymes ont des gammes différentes de substrat ou des modèles d'induction différents. C'est les cas par exemple de *A. Borkumensis* SK2, qui possède deux hydroxylases AlkB et deux gènes codant pour des cytochromes P450 soupçonnés d'être également impliqués dans la dégradation des alcanes (Hara et al., 2004 ; Sabirova et al., 2006 ; Schneiker et al., 2006). La présence de différents gènes de dégradation, souvent très divergents au sein d'une seule souche bactérienne suggère que le transfert horizontal a grandement facilité la propagation de ces gènes.

3.3.2.1.2. Voies de biodégradation aérobie des hydrocarbures aromatiques

L'étape initiale d'attaque des HAPs par les bactéries consiste en l'incorporation de un ou deux atomes d'oxygène dans l'hydrocarbure par l'intervention d'une mono- ou dioxygénase entraînant ainsi l'oxydation du cycle aromatique (Pérez-Pantoja et al., 2010). A l'issue de plusieurs réactions biochimiques, l'attaque par l'oxygénase conduit à un cis-dihydrodiol caractéristique de la dégradation bactérienne. Les produits sont ensuite minéralisés ou incorporés dans la biomasse cellulaire (Habe and Omori, 2003 ; Bamforth and Singleton, 2005). On distingue la dégradation des hydrocarbures aromatiques de « faible poids moléculaire » (2 ou 3 noyaux aromatiques), et de « haut poids moléculaire » pour lesquels le nombre de noyaux aromatiques est supérieur ou égal à 4. En effet, les enzymes impliquées dans la dégradation de ces deux types d'hydrocarbures aromatiques sont

généralement différentes et peu d'informations sont disponibles sur les enzymes de dégradation des aromatiques de haut poids moléculaire.

Le cas de la biodégradation du naphthalène a toujours servi de référence pour étudier la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques car c'est la molécule la plus simple et la plus soluble. Les informations sur la dégradation de cette molécule ont été utilisées pour comprendre et prédire les voies de dégradation des molécules plus complexes telles que les hydrocarbures à trois cycles aromatiques et plus (Seo et al., 2009). La dégradation du naphthalène commence par l'attaque du cycle aromatique par la naphthalène dioxygénase (Figure I-14). Une série de réactions conduit ensuite à la formation de salicylate qui sera lui-même transformé en catéchol ou gentisate, des intermédiaires caractéristiques de la dégradation des composés monoaromatiques (Eaton, 1994).

Le métabolisme du naphthalène a également été bien étudié sur un plan génétique notamment chez la souche *Pseudomonas putida* G7 car un plasmide codant pour le catabolisme du naphthalène a été isolé. Les gènes impliqués présentent une diversité importante (*nah*, *dox*, *pah*, *phd*) et sont présents chez différents genres bactériens (Habe and Omori, 2003).

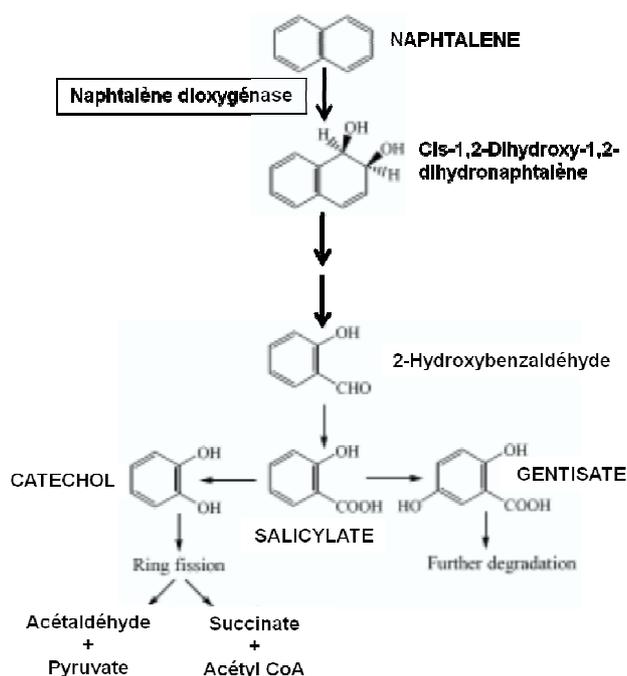


Figure I-15 : Voies métaboliques de la dégradation du naphthalène par les bactéries aérobies. D'après Seo et al., 2009

3.3.2.2. Biodégradation anaérobie des hydrocarbures

Les hydrocarbures peuvent être dégradés en anaérobiose avec le nitrate, le fer (III), ou le sulfate comme accepteur d'électrons, dans des conditions de méthanogénèse, ou par photosynthèse anoxygéniques. Dans les environnements anoxiques, l'absence d'oxygène implique une stratégie d'activation enzymatique spécifique. Ainsi, les bactéries anaérobies possèdent différentes voies biochimiques pour convertir les hydrocarbures, substrats apolaires, en composés contenant un groupement polaire (Heider et al., 1999). Des voies de dégradation ont été décrites en conditions de dénitrification, sulfato-réduction et méthanogénèse (Habe and Omori, 2003 ; Wentzel et al., 2007 ; Foght, 2008 ; Mbadinga et al., 2011). Ces réactions conduisent à la formation de composés comprenant une fonction acide qui seront alors transformés en acétyls-coA par la voie de la β -oxydation. Ces acétyls-coA seront alors ensuite pris en charge par le cycle de Krebs.

3.3.2.2.1. Voies de biodégradation anaérobie des alcanes (hors méthane)

Les souches anaérobies décrites à ce jour effectuent la minéralisation des alcanes de C_3 à C_{30} , en condition de dénitrification ou de sulfato-réduction (méthane exclus ; Tableau I-2) (Kniemeyer et al., 2007 ; Wentzel et al., 2007 ; Widdel and Grundmann, 2010) et appartiennent aux *Béta*-, aux *Gamma*- ou aux *Deltaprotéobactéries*. La biodégradation a également été observée en condition de méthanogénèse (Schink, 1985 ; Jones et al., 2008) dans des cultures d'enrichissement.

Les mécanismes principaux d'attaque des alcanes sont l'activation par l'ajout de fumarate (Figure I-16A) (Aeckersberg et al., 1991 ; So and Young, 1999a ; , 1999b ; Cravo-Laureau et al., 2005 ; Callaghan et al., 2006) et la carboxylation (Figure I-16B) (Aeckersberg et al., 1998 ; Callaghan et al., 2009) (pour revue (Fuchs, 2008 ; Mbadinga et al., 2011).

Le mécanisme d'ajout de fumarate semble être le mécanisme le plus répandu, il a été mis en évidence chez la plupart des souches sulfato-réductrices, des souches dénitrifiantes et récemment dans une culture d'enrichissement avec octacosane (C_{28}) en condition de méthanogénèse (Callaghan et al., 2010). La protéine impliquée dans cette réaction est une protéine de la famille des enzymes à radical glycylyl, l'Alkyl succinate synthase (Ass) (Callaghan et al., 2008). C'est un analogue de la Benzyl succinate synthase (Bss) qui appartient également à cette famille d'enzyme et qui est impliquée dans la dégradation anaérobie des BTEX.

Tableau I-2 : Bactéries hydrocarbonoclastes anaérobies dégradant les alcanes (méthane exclus) (Widdel and Grundmann, 2010).

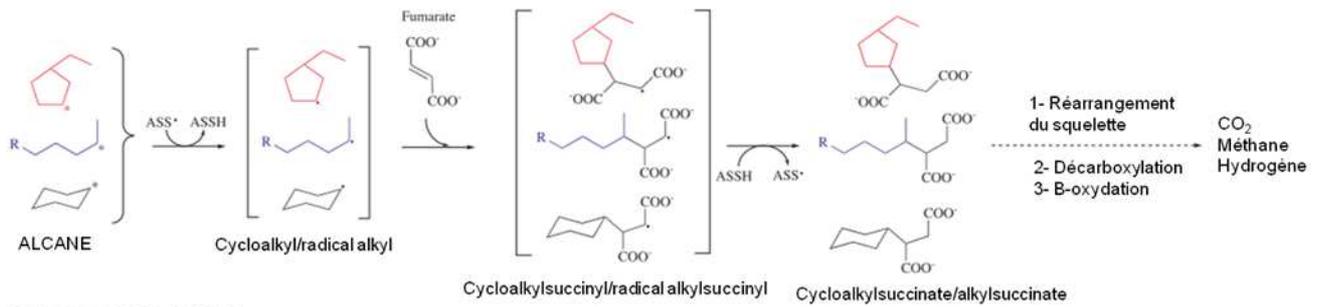
Métabolismes	Espèces, souches	Hydrocarbures	Références
Dénitrification	Souche HxN1	n-alcanes C ₆ -C ₈	(Ehrenreich et al., 2000)
	Souche OcN1	n-alcanes C ₈ -C ₁₂	(Ehrenreich et al., 2000)
	Souche HdN1	n-alcanes C ₆ -C ₃₀	(Ehrenreich et al., 2000 ; Zedelius et al., 2011)
	<i>Pseudomonas balearica</i> (BerOc6)	n-alcanes C ₁₅ -C ₁₈	(Grossi et al., 2008)
	<i>Marinobacter</i> sp. (BC36, BC38, BP42)	octadécane	(Bonin et al., 2004)
Sulfato-réduction	Souche AK-01	n-alcanes C ₁₃ -C ₁₈	(So and Young, 1999a)
	Souche BuS5	propane, n-butane	(Kniemeyer et al., 2007)
	Souche Hxd3	n-alcanes C ₁₂ -C ₂₀	(Aeckersberg et al., 1991)
	Souche Pnd3	n-alcanes C ₁₄ -C ₁₇	(Aeckersberg et al., 1991)
	Souche PL12	n-alcanes C ₆ et C ₁₀	(Higashioka et al., 2009)
	Souche TD3 (thermophile, 60°C)	n-alcanes C ₆ -C ₁₆	(Rueter et al., 1994)
	<i>Desulfatibacillum aliphaticivorans</i> CV2803	n-alcanes C ₁₃ -C ₁₈	(Cravo-Laureau et al., 2004b)
	<i>Desulfoglaeba alkanexedens</i> ALDC	n-alcanes C ₆ -C ₁₂	(Davidova et al., 2006)
<i>Desulfoglaeba alkanexedens</i> lake	n-alcanes C ₆ -C ₁₀	(Davidova and Sufлита, 2005 ; Davidova et al., 2006)	

D'autres mécanismes alternatifs, plutôt atypiques, ont également été proposés (Figure I-16C). Par exemple, la souche *Pseudomonas chloritidismutans* AW-IT est capable de produire de l'oxygène moléculaire, via la respiration de chlorate (dismutation), qui sera alors utilisé pour oxyder l'alcane à l'aide d'une oxygénase (Figure I-16C-1) (Mehboob et al., 2009). Cette réaction est qualifiée « d'oxygénation inhabituelle » de l'alcane, car elle se déroule sous une atmosphère totalement anoxique.

Une stratégie similaire via "la production d'oxygène intra-cellulaire" est également possible avec des accepteurs d'électrons comme les nitrates ou les nitrites (Ettwig et al., 2010). Cependant, il a été récemment présumé que l'oxyde nitrique ou les nitrites générés lors de la réduction des nitrates peuvent être directement impliqués en tant que co-réactif dans l'activation des alcanes chez la souche *HdN1* (Figure I-16C-2) (Zedelius et al., 2011). Enfin, une étude récente réalisée en condition de méthanogénèse suggère que les alcanes pourraient être activés via une hydroxylation (Figure I-16C-3) (Head et al., 2010).

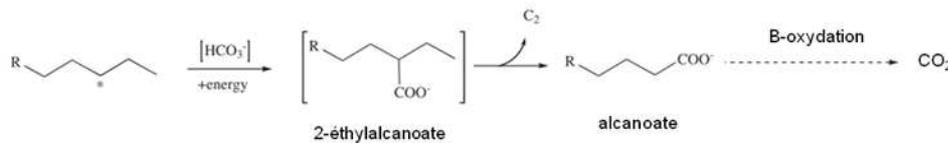
A) ADDITION DE FUMARATE

BSR / Bactéries dénitrifiantes / Enrichissement en condition de méthanogénèse



B) CARBOXYLATION

(Souche *Hxd3* / Culture d'enrichissement (réduction des nitrates))



C) MECANISMES ALTERNATIFS

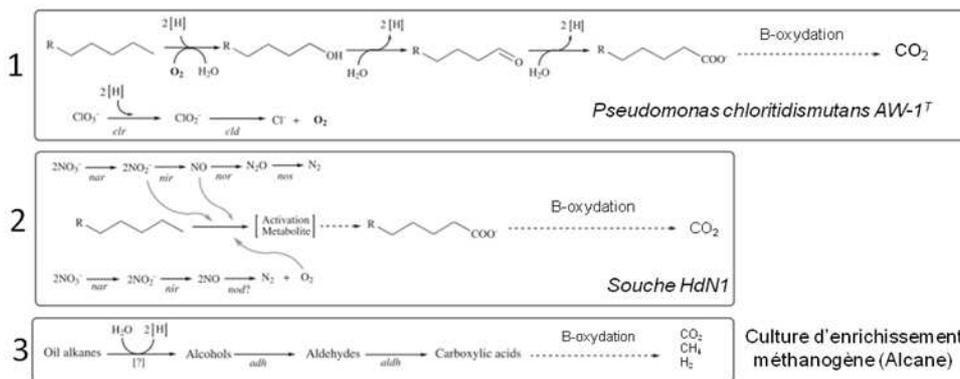


Figure I-16 : Voies de dégradation anaérobie des alcanes (Mbadina et al., 2011)

3.3.2.2.2. Voies de biodégradation anaérobie des hydrocarbures aromatiques

Plusieurs études ont montré la biodégradation des hydrocarbures aromatiques en anaérobie, cependant, la majorité des souches isolées dégradent essentiellement les BTEX (mono-aromatiques) et le naphtalène (Tableau I-3). Ces souches appartiennent aux *Alpha-*, aux *Béta-*, aux *Gamma-*, aux *Deltaprotéobactéries* ou aux *Firmicutes*. La dégradation des hydrocarbures aromatiques a été démontrée en condition de dénitrification, sulfato-, ferri-réduction et photosynthèse anoxygénique.

Tableau I-3 : Bactéries hydrocarbonoclastes anaérobies dégradant les hydrocarbures aromatiques (Widdel and Grundmann, 2010).

Métabolismes	Espèces, souches	Hydrocarbure	Référence
Dénitri-fication	<i>Azoarcus toluvorans</i> (Td-21)	Toluène	(Song et al., 1999)
	<i>Azoarcus toluclasticus</i> (MF63)	Toluène	(Song et al., 1999)
	<i>Azoarcus</i> sp. (DN11, AN9)	Benzène, toluène, m-xylène	(Kasai et al., 2006)
	<i>Dechloromonas</i> sp. (RCB, JJ)	Benzène, toluène	(Coates et al., 2001)
	<i>Thauera aromatica</i> (DNT-1)	Toluène	(Shinoda et al., 2004)
	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (NAP-3-1)	Naphthalène	(Rockne et al., 2000)
	<i>Vibrio pelagius</i> (NAP-4)	Naphthalène	(Rockne et al., 2000)
	<i>Magnetospirillum</i> sp. (BM1232)	Toluène	(Shinoda et al., 2005)
Ferri-réduction	<i>Geobacter metallireducens</i> GS15	Toluène	(Lovley et al., 1993)
Sulfato-réduction	<i>Desulfobacula phenolica</i> (PHO1)	Toluène	(Rabus et al., 1993)
	<i>Desulfotomaculum</i> (OX39)	Toluène, m-xylène, o-xylène	(Morasch and Meckenstock, 2005)
	Souche <i>mXyS1</i>	Toluène, m-xylène, m-ethyltoluène, m-isopropyltoluène	(Harms et al., 1999)
	Souche <i>NaphS3</i>	Naphthalène, 2-méthyl-naphtalène	(Musat et al., 2009)
	Strain <i>oXyS1</i>	Toluène o-xylène, o-ethyltoluène	(Harms et al., 1999)
	Souche <i>EbS7</i>	Ethylbenzène	(Kniemeyer et al., 2003)
Photosynthèse anoxygénique	<i>Blastochloris sulfoviridis</i> (Top1)	Toluène	(Zengler et al., 1999b)

Actuellement, quatre voies de dégradations sont reconnues (pour revue (Foght, 2008 ; Fuchs, 2008): l'addition de fumarate catalysée par une enzyme à radical glycyll (Widdel and Rabus, 2001); la méthylation des aromatiques non substitués (Safinowski and Meckenstock, 2006) ; l'hydroxylation catalysée par une déshydrogénase (Rabus and Widdel, 1995), et la carboxylation (Zhang and Young, 1997) (Figure I-17). Ces réactions conduisent à la formation de cycles saturés, l'oxydation et/ou au clivage du cycle produisant des métabolites comme le benzoyl-CoA qui peut être incorporé pour la biomasse ou être complètement oxydé (Harwood et al., 1998).

Jusqu'à présent, la dégradation anaérobie des composés mono-aromatiques comme le benzène, toluène, éthylbenzène et le xylène (BTEX) ont été très documentés en comparaison à la dégradation anaérobie des HAPs ou des alcanes. En effet à ce jour, la dégradation anaérobie a été démontré pour un nombre limité de HAPs en présence de nitrate, de fer, de manganèse, de dioxyde de carbone et de sulfate (Meckenstock et al., 2004). Il s'agit notamment du naphthalène (2 cycles) et du phénanthrène (3 cycles) ainsi que de quelques HAPs alkylés

(Coates et al., 1997 ; Zhang and Young, 1997 ; Rockne and Strand, 2001 ; Chang et al., 2006). La voie du fumarate semble être prédominante dans la transformation anaérobie des monoaromatiques alkylés (Biegert et al., 1996) et des HAPs (Annweiler et al., 2001), et peut également être impliquée dans le catabolisme des aromatiques non substitués après méthylation (Ulrich et al., 2005 ; Safinowski and Meckenstock, 2006).

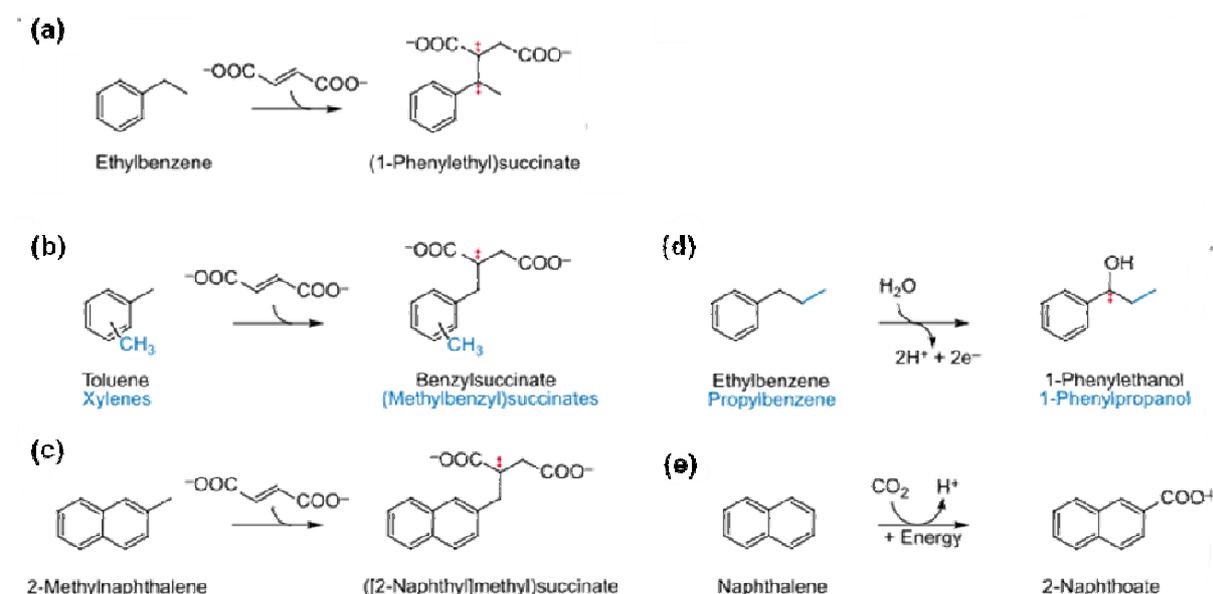


Figure I-17: Exemples de réactions initiales de dégradation anaérobie d'hydrocarbures aromatiques. D'après Widdel et Rabus (2001). Addition de fumarate (a,b,c), déshydrogénation (d) et carboxylation (e).

L'enzyme impliquée dans l'attaque initiale du toluène, la Benzyl succinate synthase (Bss), appartient à un nouveau groupe d'enzyme à radical glycyI (Buckel and Golding, 2006). L'enzyme a été isolée et caractérisée chez la souche dénitrifiante *T. aromatica* K172 (Leutwein and Heider, 2002) tout comme chez *Azoarcus* sp souche T (Beller and Spormann, 1999). Son activité, a été démontrée dans des cultures d'enrichissement incubés en présence de nitrate (Biegert et al., 1996; Beller and Spormann, 1997a), de ferIII (Kane et al., 2002), de sulfate (Beller and Spormann, 1997b) ainsi qu'en condition de méthanogénèse (Beller and Edwards, 2000). Aucune des enzymes spécifiques de la dégradation des HAPs n'ont été décrites, en raison de la rareté des cultures pures obtenues sur ces substrats. Néanmoins, une étude protéomique récente réalisée sur la culture d'enrichissement N47 a mis en évidence de nouvelles enzymes qui pourraient être impliquées dans l'activation initiale du naphthalène en condition de sulfato-réduction (Bergmann et al., 2011). Les carboxylases identifiées

pourraient représenter une nouvelle classe d'enzyme apportant de nouvelles perspectives dans la dégradation anaérobie des HAPs.

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). Toutefois, certaines espèces isolées peuvent dégrader plusieurs types d'hydrocarbures en condition oxique. 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 (HAP) ainsi que l'octadécane (alcane) (Brito et al., 2006). A ce jour, un phénomène de co-métabolisme du toluène a pu être mis en évidence chez des souches dégradant les alcanes en anaérobiose (Zedelius et al., 2011). De plus, d'autres espèces ont la capacité de réaliser la dégradation des hydrocarbures sous des conditions oxique et anoxique (Grishchenkov et al., 2000 ; Shinoda et al., 2004).

3.3.3. Facteurs affectant la biodégradation

Plusieurs facteurs sont limitants et déterminent l'efficacité des processus de biodégradation (Figure I-18) :

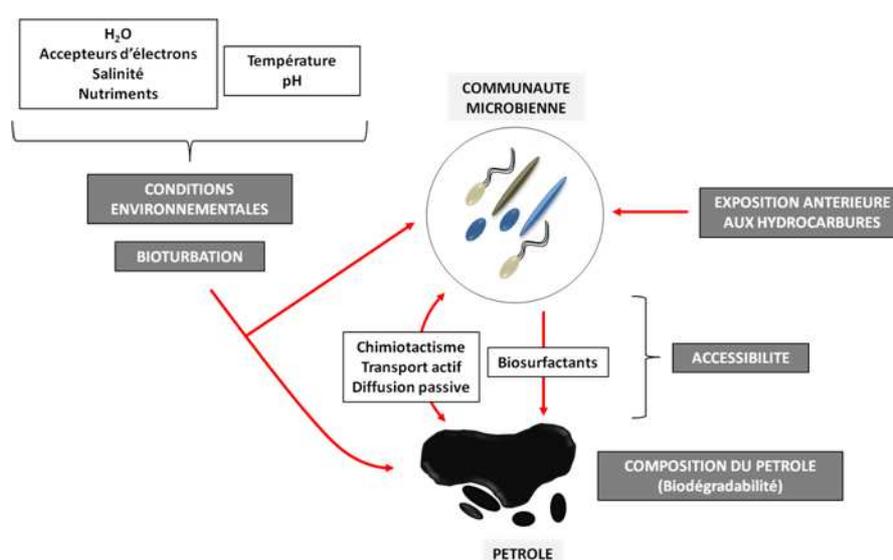


Figure I-18 : Facteurs affectant l'efficacité de biodégradation

Certains **paramètres environnementaux** comme la température et le pH vont affecter les propriétés du pétrole (viscosité du pétrole, volatilité et solubilité des molécules) et l'activité des communautés microbiennes (Chung et al., 2000 ; Boszczyk-Maleszak et al., 2006). La salinité constitue également un facteur important pour le développement des microorganismes de par la grande variabilité qui peut s'opérer périodiquement dans les environnements marins (Venosa and Zhu, 2003). Lors d'un rejet de pétrole en mer, l'apport de carbone augmente et la biodisponibilité de l'azote et du phosphore qui deviennent les facteurs limitants de la biodégradation (Rosenberg et al., 1996). La présence de nutriments est donc un facteur déterminant. Enfin, la présence d'accepteurs d'électrons (oxygène, sulfate) va contribuer directement à la croissance microbienne.

La **biodégradabilité des hydrocarbures** : les hydrocarbures ne présentent pas tous la même susceptibilité aux attaques microbiennes. Ainsi, ils peuvent être classés du plus facilement biodégradable au plus persistant : n-alcanes > alcanes ramifiés > aromatiques à faible poids moléculaire > alcanes cycliques > aromatiques à haut poids moléculaire > stéranes, hopanes (Van Hamme et al., 2003 ; Yemashova et al., 2007).

L'historique de contamination du site d'étude va déterminer le temps de réponse des micro-organismes autochtones (Vandecasteele, 2005). En effet, la pré-exposition aux hydrocarbures de la communauté bactérienne entraîne une sélection de populations capables de répondre rapidement à l'addition ultérieure de pétrole (Taketani et al., 2010) (cf.paragraphe 5.2.).

L'accessibilité au substrat dépend de plusieurs mécanismes permettant aux cellules bactériennes de détecter, solubiliser, importer et dégrader l'hydrocarbure (Ron and Rosenberg, 2002 ; Berthe-Corti and Höpner, 2005).

L'**activité bioturbatrice**, (mélange des particules, irrigation des sédiments) qui engendre le relargage et la re-distribution des composés organiques hydrophobes associés aux sédiments (Gordon et al., 1978 ; Schaffner et al., 1997). Ainsi, les potentiels de biodégradation des hydrocarbures sont globalement plus élevés dans les sédiments bioturbés qu'en absence de macrofaune (Chung and King, 1999 ; Christensen et al., 2002 ; Grossi et al., 2002 ; Timmermann et al., 2011). Par exemple, une augmentation de 180 à 200% de la minéralisation microbienne du pyrène a pu être observée en présence des polychaetes *Nereis virens* et *Arenicola marina* (Timmermann et al., 2008). De la même manière, les polychètes *Nereis virens* et *Capitella capitata* sont connus pour améliorer la dégradation microbienne des HAPs comme le benzo [a]anthracène (Gardner et al., 1979) et l'anthracène (Bauer et al.,

1988). Cela peut s'expliquer par une oxygénation intermittente du sédiment bioturbé, ce qui favorise la biodégradation de la MO par les micro-organismes (Madsen, 1991 ; Aller, 1994).

A contrario, la bioturbation participe également à la préservation et à la remobilisation des hydrocarbures dans les sédiments. Durant le remaniement sédimentaire, la faune bioturbatrice favorise la désorption des hydrocarbures et par conséquent leur diffusion dans la colonne d'eau (Gilbert et al., 1994 ; Schaffner et al., 1997 ; Christensen et al., 2002). En effet, bien que la macrofaune puisse améliorer la minéralisation microbienne des hydrocarbures (lié à l'apport d'oxygène du à la construction de terriers et à l'irrigation), elle en diminue également la biodisponibilité et, par conséquent, contre l'effet stimulant de l'irrigation au sein des sédiments. Cela a pu être démontré dans les sédiments de terriers des polychaetes *Nereis diversicolor* et *Arenicola marina*, pour lesquels la biodisponibilité du pyrène mesurée était inférieure à celle retrouvée dans les eaux de surface ainsi que dans les sédiments environnants (Timmermann et al., 2008). C'est ce phénomène qui pourrait également expliquer les résultats obtenus lors d'une autre étude réalisée deux ans plus tard, qui a montré que l'augmentation de l'abondance de la méiofaune dans des sédiments avait pour conséquence de diminuer de façon significative la minéralisation du naphthalène (Näslund et al., 2010).

Dans les zones d'intense remaniement, ou la faune benthique ingère plusieurs fois par an le sédiment de surface, l'action digestive de la macrofaune, représente une part non négligeable de la solubilisation des hydrocarbures. Les sucs digestifs des dépositivores ont montré leur efficacité à solubiliser les HAPs (Penry and Weston, 1998 ; Weston and Mayer, 1998). Ces biosurfactants sont présents en grande quantité dans le système digestif de la macrofaune benthique (Ahrens et al., 2001). En conséquence, les hydrocarbures liés au sédiment sont solubilisés lors du transit intestinal des organismes (Gilbert et al., 2001). Enfin, la capacité des polychètes marins à accumuler et à métaboliser les HAP a été documentée pour quelques espèces (McElroy, 1990 ; Kane Driscoll and McElroy, 1997 ; Forbes et al., 2001 ; Christensen et al., 2002b).

La répartition des hydrocarbures au sein du sédiment est également modifiée et dépend principalement du type d'organisme bioturbateur présent (Caradec et al., 2004). Ainsi, un transfert des hydrocarbures de la surface vers les couches plus profondes du sédiment a été observé (Holmer et al., 1997 ; Madsen et al., 1997 ; Grossi et al., 2002).

4. LIEN ENTRE DIVERSITE ET FONCTION D'UN ECOSYSTEME

Le fonctionnement des écosystèmes est supporté par les différents organismes vivant dans ces écosystèmes, eux-mêmes sous le contrôle de différents facteurs (Figure I-19). Les observations accumulées dans le domaine de l'écologie accompagnées de modèles théoriques ont montré que les propriétés des écosystèmes dépendent en grande partie de la biodiversité en termes de caractéristiques fonctionnelles des organismes présents et de la distribution et l'abondance de ces organismes dans l'espace et le temps (Hooper et al., 2005).

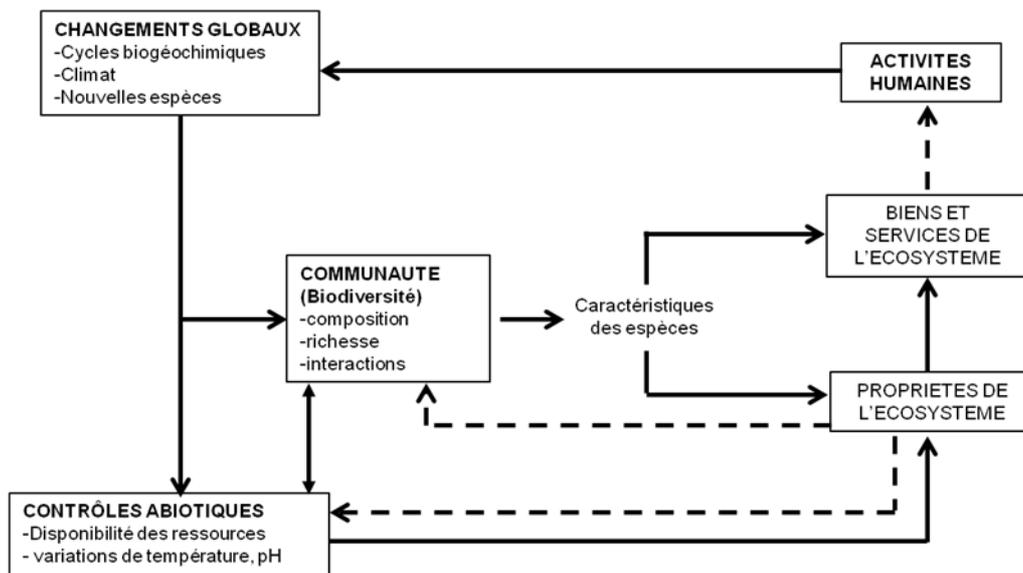


Figure I-19: *Rétroactions entre les activités humaines, les changements globaux, et les contrôles biotiques et abiotiques sur les propriétés de l'écosystème (d'après Hooper et al., 2005).*

L'importance des différents taxons composant une communauté pour le maintien d'un processus dans un écosystème a été soulignée (Griffiths et al., 2004). Ainsi, la stabilité de la communauté, c'est à dire l'absence d'extinction ou d'explosion démographique de certaines espèces suite à une perturbation, dépend de la diversité dans la communauté (Loreau et al., 2003).

4.1. Diversité microbienne

En écologie microbienne, le terme « communauté » désigne des assemblages d'espèces bactériennes qui sont en interaction dans un même écosystème, milieu, habitat et/ou qui partagent une même fonction. De ce fait, le terme communauté sera utilisé avec une connotation fonctionnelle, par exemple, *la communauté dénitrifiante* qui rassemble

l'ensemble des bactéries partageant la capacité à dénitrifier. Une autre acception du terme sera également utilisée avec cette fois-ci une connotation taxonomique pour les communautés bactériennes et archées.

La diversité bactérienne décrit le nombre d'espèces bactériennes et leur abondance relative dans une communauté, ou la quantité et la distribution de l'information (génétique) dans la communauté (Torsvik et al., 2002). Si l'on considère généralement que la diversité bactérienne ne représente qu'un faible pourcentage de la biodiversité globale, la grande diversité des ressources énergétiques et voies métaboliques qu'elles utilisent leur confèrent un rôle majeur dans le fonctionnement des écosystèmes (sur toutes les espèces identifiées 0,2% seraient des bactéries (Convention de la Diversité Biologique, Rio de Janeiro, 1992)). L'étude de la diversité bactérienne est donc importante pour connaître la composition génétique de la communauté (structure de la communauté), comprendre les schémas de distribution des bactéries et améliorer la connaissance de ces communautés pour permettre le fonctionnement et la viabilité des écosystèmes (Ovreas, 2000).

Les mécanismes par lesquels la diversité microbienne influencent le fonctionnement de l'écosystème sont liés aux attributs des espèces plutôt qu'au nombre total d'espèces présentes (Giller et al., 2004 ; Peter et al., 2011). Ainsi les bactéries peuvent être groupées en fonction des voies métaboliques qu'elles sont capables d'assumer (ex : bactéries sulfato-réductrices). La diversité fonctionnelle peut donc être définie comme le nombre de processus ou fonctions qu'une communauté est capable de réaliser, mais également comme la diversité microbienne au sein d'un groupe métabolique (Gaston and Spicer, 1998 ; Konopka, 2009).

Actuellement, plusieurs approches complémentaires permettent de décrire la diversité microbienne au sein d'un écosystème (Figure I-20).

L'isolement de souches microbiennes permet d'identifier les capacités fonctionnelles de communautés microbiennes. Cependant, le pourcentage de bactéries potentiellement cultivables est estimé entre 0,1 et 3% selon l'environnement considéré (Amann et al., 1995). Par conséquent, la diversité bactérienne naturelle est largement sous-estimée par les techniques « culturales ». De plus il est difficile de savoir si les souches isolées sont des membres représentatifs de la communauté. Les approches par l'utilisation d'isotopes (substrats marqués) permettent d'identifier les membres importants de la communauté ayant une activité métabolique. Enfin, les outils moléculaires basés sur l'étude des acides nucléiques fournissent de considérables informations sur les relations taxonomiques et l'évolution des espèces bactériennes. Ainsi, ces outils permettent d'appréhender la diversité taxonomique par l'analyse de séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, ainsi que la diversité fonctionnelle

depuis le développement des marqueurs fonctionnels en biologie moléculaire (par exemple, le gène codant pour la Méthyl Coenzyme réductase A, *mcrA* pour les *Archaea* méthanogènes).

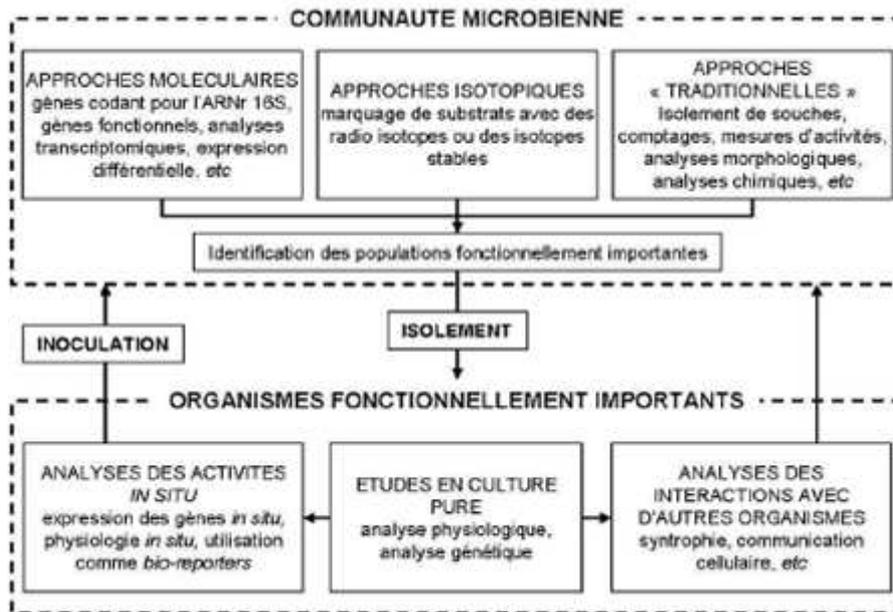


Figure I-20: Schéma de travail global pour l'étude de la communauté microbienne. Modifié d'après Watanabe et Hamamura (2003).

Les techniques moléculaires sont généralement basées sur l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) d'un gène d'intérêt, utilisé comme marqueur phylogénétique ou marqueur d'une activité spécifique (Pontes et al., 2007). Elles permettent ainsi l'étude d'une communauté complexe, simplifiée ou d'un organisme particulier.

Ainsi, l'ADN extrait de la communauté microbienne (le «métagénome») peut être analysé selon différentes techniques :

- par une étape d'amplification PCR suivie par clonage et séquençage des gènes tels que ceux de l'ARN ribosomal 16S donnant un accès à la phylogénie des membres de la communauté et permettant une identification partielle de ces membres .
- par des techniques qualifiées d'empreintes moléculaires (fingerprint) comme la DGGE et la TGGE, la SSCP ou encore la T-RFLP ;
- En générant une banque métagénomique en clonant directement l'ADN métagénomique extrait d'un hôte bactérien. La banque pourra ensuite être criblée selon différentes méthodes ;
- Enfin, la dernière approche implique le séquençage direct de l'ADN métagénomique par shotgun (séquençage à haut débit, pyroséquençage).

A cela on peut rajouter la quantification du nombre de gènes ou l'expression de ce gène (suivi des transcrits correspondant) grâce à la PCR quantitative donnant une information sur l'abondance des gènes cibles mais également sur leur niveau d'activité. Ces différentes approches de métagénomique doivent être complétées par l'approche traditionnelle de culture *in vitro*.

La plupart des études effectuées sur les communautés microbiennes se sont basées sur la distribution des séquences de l'ADNr 16S ce qui ne donne aucune indication sur le niveau d'activité des populations ou sur les membres actifs. En effet, il est supposé qu'une partie non négligeable des bactéries marines seraient dormantes ou auraient un taux de croissance très lent, et que seulement une petite fraction serait considérée comme métaboliquement active (Sherr et al., 1999; Del Giorgio and Bouvier, 2002). De plus, plusieurs études ont montré les divergences existant entre la diversité microbienne obtenue à partir de l'ADN (fraction totale de la communauté) et de l'ARN (fraction métaboliquement active) indiquant que ces deux approches sont complémentaires et nécessaires pour bien comprendre l'écosystème (Troussellier et al., 2002 ; Moeseneder et al., 2005 ; Rodríguez-Blanco et al., 2009; Kamke et al., 2010).

De plus en plus d'études ont entrepris l'analyse de la diversité microbienne d'environnements divers dans le but de rechercher des modèles communs ainsi que le déterminisme de leur distribution dans l'environnement (Martiny et al., 2006 ; Ramette and Tiedje, 2007). Ainsi, la question de la nature ubiquiste des micro-organismes s'est posée. Grâce à la résolution croissante des nouveaux outils d'études disponibles, il est apparu qu'un grand nombre d'espèces rares étaient communément retrouvées dans la plupart des environnements. Ceci reflète le remarquable potentiel de dispersion des micro-organismes dans l'environnement confortant ainsi le concept de Lourens Baas Becking "everything is everywhere but the environment selects". La distribution des organismes dans l'environnement serait donc le résultat de facteurs historiques, y compris la dispersion par le vent, l'eau et les animaux, et des adaptations aux conditions locales comme les changements dans l'espace et du temps (Baas-Becking, 1934 ; Fuhrman, 2009).

4.2. Perturbation de la structure des communautés microbiennes

4.2.1. Définition

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 modification. 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 (Figure I-21) (Schimel et al., 2007).

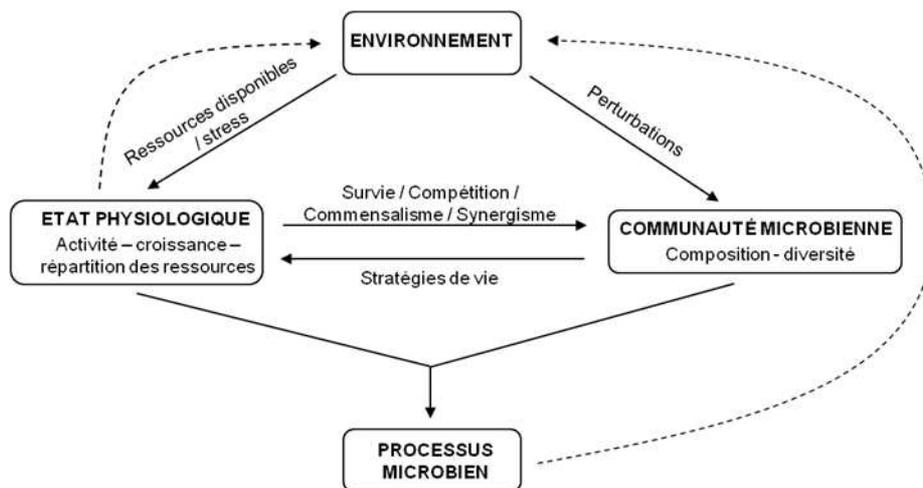


Figure I-21 : Représentation schématique des interactions environnement/physiologie microbienne, composition de la communauté et processus de l'écosystème (modifié d'après Schimel et al., 2007).

A l'échelle de l'écosystème, le « stress » est généralement considéré comme une stimulation chronique (par exemple, la sécheresse) qui impose des coûts physiologiques, tandis qu'une « perturbation » est généralement considérée comme un événement subit qui implique des perturbations physiques et/ou la mortalité directe (incendie, les tempêtes de vent, récolte). A l'échelle microbienne, cette distinction est moins claire, la composition et les fonctions de la communauté microbienne pouvant varier considérablement en fonction de la profondeur, des conditions rédox ou encore de la disponibilité de la matière organique ou des nutriments (Jensen et al., 1993 ; Urakawa et al., 2000 ; Köpke et al., 2005 ; Jansen et al., 2009). D'autres perturbations physiques fréquentes comme la houle, la marée ou la bioturbation peuvent intervenir dans ces modifications, c'est pourquoi, au niveau des communautés microbiennes, nous emploieront le terme de perturbations.

Les adaptations physiologiques que développent les micro-organismes nécessitent un temps de réponse plus ou moins long qui dépend entre autres, de l'intensité et de la rapidité de la variation subie. Ainsi, comprendre les changements de composition des communautés microbiennes passe par la détermination des facteurs qui affectent ces communautés.

4.2.2. Facteurs modifiant la structure des communautés

Comme expliqué précédemment, à l'échelle microbienne, les perturbations sont nombreuses. Dans l'environnement, les micro-organismes sont régulièrement soumis aux fluctuations de température, salinité, des gradients physico-chimiques de sulfure, d'oxygène, de pH ou de lumière (Revsbech et al., 1983 ; Noll et al., 2005). Les interactions existant entre les communautés microbiennes (le commensalisme, le synergisme et la compétition) vont également influencer sur le devenir de la communauté présente.

Les activités humaines comme le développement urbain, l'industrialisation, l'aquaculture, le transport maritime ou encore le tourisme modifient sensiblement notre environnement et par une action directe ou indirecte elles peuvent également avoir un impact sur les communautés microbiennes (Tableau I-4).

Tableau I-4 : *Résumé des risques pour l'environnement marin liés aux activités anthropiques (Nogales et al., 2010)*

Activité humaine	Principaux polluants	Impacts et risques
Agriculture / élevage	Fertilisants, pesticides, antibiotiques	Enrichissement en éléments nutritifs, eutrophisation, propagation de la résistance aux antibiotiques
Développement urbain	Déchets domestiques, boues d'épuration	Eutrophisation, agents pathogènes (bactéries et virus), toxicité des produits chimiques et métaux lourds
Industries	Déchets industriels, polluants organiques, métaux lourds, radionucléides	Toxicité, bioaccumulation, dépôts atmosphériques
Transport maritime	Hydrocarbures, xénobiotiques (agents antifouling et métaux lourds)	Toxicité, bioaccumulation, introduction d'espèces exotiques, dispersion d'agents pathogènes
Extraction du pétrole / raffinage	Hydrocarbures	Toxicité, bioaccumulation
Tourisme	Détritus (plastiques, cigarettes), déchets fécaux, nutriments, hydrocarbures, xénobiotiques	Mort d'animaux sauvages, hypoxie / anoxie, enrichissement en nutriments, développement des algues, dispersion d'agents pathogènes
Aquaculture	Enrichissement organique, déchets fécaux, antibiotiques	Charge organique élevée, hypoxie / anoxie, dispersion d'agents pathogènes, introduction d'espèces exotiques, résistances aux Antibiotiques, métissage des poissons échappés

Dans le contexte actuel où la problématique de l'environnement est devenue un enjeu politique, il s'avère indispensable de comprendre et de prédire la capacité des communautés autochtones à se maintenir ou à se restructurer. De ce fait, l'effet des perturbations d'origine anthropiques sur les communautés bactériennes est très documenté. Des études ont montré que la structure des communautés bactériennes est modifiée dans des zones contaminées par les BTEX (Benzène, Toluène et Xylène) (Röling et al., 2001), les antibiotiques et les HAPs (Said et al., 2010) ou les pesticides (Widenfalk et al., 2008). Néanmoins, la réponse des communautés microbiennes peut diverger d'une étude à une autre soulignant ainsi que leur réponse face aux changements de l'environnement n'est pas universelle.

4.2.3. Effet d'une « perturbation » sur la structure des communautés

Les facteurs de perturbation multiples coexistent très souvent dans un environnement donné. Les effets de ces facteurs peuvent alors être additifs, synergiques ou antagonistes ce qui rend très complexe les réponses possibles aux perturbations et donc leur étude (Cloern, 2001 ; Paerl et al., 2006 ; Crain et al., 2008). L'ampleur et la fréquence de l'impact ont également leur importance bien que dans les écosystèmes marins, la force de l'impact n'est pas toujours proportionnelle à la quantité de polluants entrant dans le système. L'effet des perturbations sur les communautés microbiennes marines est schématisé figure I-22.

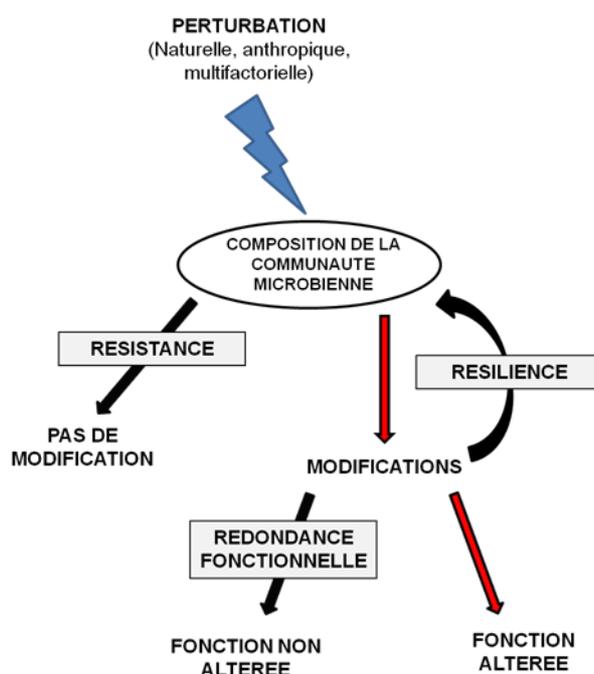


Figure I-22 : Schéma simplifié des effets des perturbations sur les communautés microbiennes marines (d'après Nogales et al., 2010).

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., 2010). 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-Kaplon 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 leur capacité à s'adapter à la nouvelle situation, peuvent prendre le dessus sur les autres et en conséquence accroître leur représentation 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).

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).

5. DYNAMIQUE ET DIVERSITE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DANS LES ENVIRONNEMENTS CONTAMINES AUX HYDROCARBURES

Afin de mieux comprendre les processus de biodégradation des hydrocarbures *in situ* et par la suite d'améliorer les approches de bioremédiation, il est primordial d'étudier l'écologie des communautés microbiennes dans les sites contaminés (Watanabe, 2001). L'étude de la dynamique (variations spatio-temporelles) des communautés microbiennes en réponse à une contamination aux hydrocarbures est donc nécessaire afin de mieux comprendre l'importance et le rôle des différentes populations bactériennes lors de la biodégradation de ces polluants. Les approches culture-indépendantes (moléculaires) ont fortement contribué à la compréhension du comportement des communautés microbiennes dans leur environnement et particulièrement pour les micro-organismes anaérobies. Les processus de dégradation mis en œuvre sont des processus lents (Capone and Bauer, 1992) et leur étude par les méthodes traditionnelles (isolement) demande parfois des conditions expérimentales difficiles à mettre en œuvre (Harayama et al., 1999 ; Heider et al., 1999).

Actuellement, peu d'études sur la réponse à une contamination sur des environnements ont pu être réalisées *in situ* du fait notamment de la difficulté à contaminer un site « sain » directement (Macnaughton et al., 1999 ; Ogino et al., 2001 ; Röling et al., 2004b ; Miralles et al., 2007b ; Brussaard et al., 2010). De plus, lors de telles études, les paramètres environnementaux (e.g. température, pluie) peuvent rendre difficile l'interprétation des données obtenues. Une des alternatives possibles pour pallier à cette contrainte consiste à réaliser des expérimentations en microcosmes (Yakimov et al., 2005 ; Roeselers et al., 2006 ; McKew et al., 2007 ; Fahy and McKew, 2010).

5.1. Reconstitution d'un environnement miniature

Les écosystèmes expérimentaux ont pour but de représenter l'environnement et sont des outils importants pour l'évaluation des effets de facteurs anthropiques sur les individus d'un écosystème. Leur utilisation facilite l'accès à un certain nombre de propriétés physico-chimiques, biologiques et toxicologiques en fournissant des conditions contrôlées et sans risque pour l'environnement (utilisation de produits carcinogènes, mutagènes). Ainsi, ils permettent à l'expérimentateur de simplifier un système à ses fondamentaux, de contrôler l'échelle, les effets de l'environnement et de réduire l'hétérogénéité spatiale (Bloesch, 1988 ; Perry and Troelstrup Jr, 1988). Ils ont été largement employés dans l'étude des effets de différents facteurs sur la structure des communautés microbiennes, jouant ainsi un rôle important au cours de la dernière décennie dans la compréhension des écosystèmes (Gremion et al., 2004 ; Cappello et al., 2007b ; Stres et al., 2008 ; Vercraene-Eairmal et al., 2010 ; Lee et al., 2011 ; Verhamme et al., 2011). Ces unités expérimentales sont appelées micro-, méso- ou macrocosmes, l'utilisation de ces préfixes servant à définir la taille du système. Ainsi Bloesch (1988) a suggéré qu'un microcosme serait d'un volume inférieur à 1 m³, un mésocosme, entre 1 m³ et 1000 m³ et un macrocosme serait supérieur à 1000 m³ (Bloesch, 1988). La taille, le type, la conception et la complexité de ces unités expérimentales vont varier d'une étude à l'autre, cependant, un environnement naturel est très complexe et de ce fait, très difficile à reproduire. Néanmoins, leur conception dépendra essentiellement de la question scientifique adressée. Il n'y a donc pas de protocole général, mais plutôt des considérations à prendre en compte pour leur mise en place. Ces systèmes sont donc très flexibles. Ainsi, ils permettent l'étude de différentes « matrices » (sable, sédiments), peuvent simuler des environnements soumis à l'action des vagues ou de la marée ou également être conçus pour apporter un minimum de perturbations sur la structure de l'environnement.

Les microcosmes offrent un bon compromis pour l'étude des communautés microbiennes et offrent de nombreux avantages (Fahy and McKew, 2010). Etant donné leur taille (les plus simples sont réalisés en flacons de culture), ils peuvent être préparés en grande quantité (réplicats), précisément, rapidement et à faible coût, permettant ainsi de tester des hypothèses avec une puissance statistique. En effet, les expériences complexes doivent être conçues avec suffisamment de réplifications afin d'évaluer au mieux l'effet des traitements appliqués. Les paramètres tels que la température, le pH, l'agitation, la disponibilité en oxygène, les accepteurs d'électrons, la concentration en nutriments et substrats ou encore le type et la quantité d'inoculum peuvent être contrôlés individuellement.

Il y a également des limites dans l'utilisation des microcosmes, notamment « l'effet bouteille » (des communautés microbiennes différentes poussent à l'interface du milieu / matrice et le bord du récipient). De plus, en microcosmes fermés, les nutriments et l'oxygène peuvent s'épuiser et conduire à un « vieillissement » du système, des métabolites toxiques peuvent également s'accumuler (Fahy and McKew, 2010). Ainsi, l'utilisation d'un environnement simplifié peut conduire à des résultats tronqués (taux de dégradation, communautés non représentatives). Leur utilisation a donc soulevé la question majeure de la représentativité des résultats obtenus à petite échelle par rapport à la réalité de l'environnement, parmi la communauté scientifique. En bref, dans quelle mesure peut-on extrapoler les résultats obtenus en laboratoire pour prédire des modèles dans un environnement naturel? Cette problématique a été soulevée par Head et al. (2006), et malgré des divergences observées dans certains cas (Röling et al., 2002), de nombreuses caractéristiques observées en microcosmes sont également observées « sur le terrain » (Head et al., 2006).

5.2. Dynamique des communautés microbiennes

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 restent encore limitées et exposées à de nombreuses controverses. Ce manque de connaissances est encore plus marqué pour la dynamique des communautés microbiennes anaérobies.

Ainsi, les études sur la dynamique des communautés microbiennes se sont essentiellement basées sur le gène codant pour l'ARNr 16S des *Bacteria* et la plupart des connaissances acquises concernent les bactéries aérobies. Après addition d'un pétrole, un phénomène de succession des populations bactériennes liée à une utilisation séquentielle des substrats au cours du temps a été rapporté (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 I-23) (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).

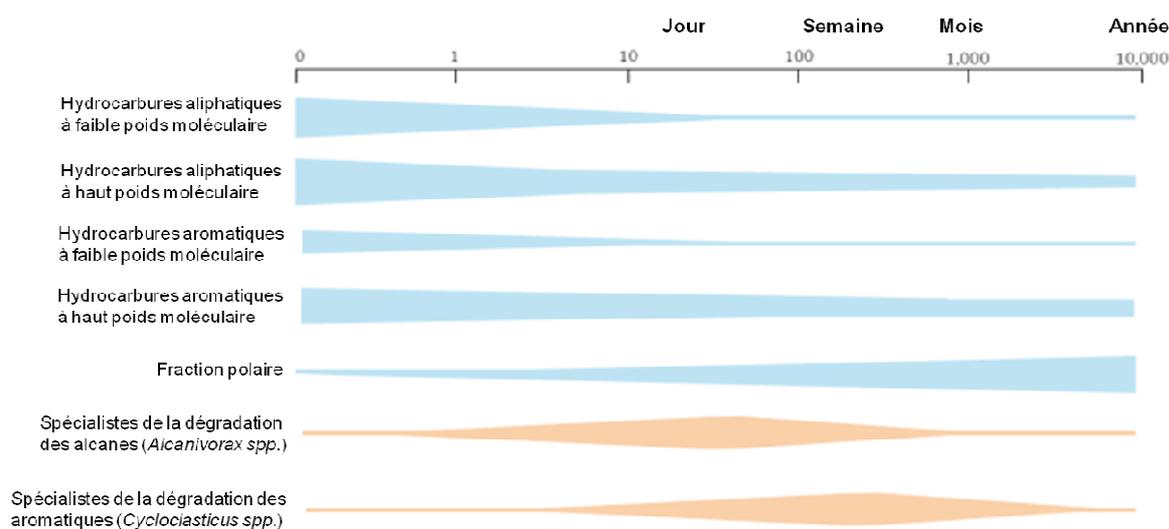


Figure I-23 : Observation des changements de la composition d'un pétrole et de l'abondance des organismes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures en fonction du temps suite à une contamination pétrolière (Head et al., 2006).

L'ajout de pétrole peut provoquer 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). Par exemple, l'exposition de la communauté microbienne aux alcanes induit une augmentation du nombre de copies des gènes *alkB* (Whyte et al., 2002 ; Heiss-Blanquet et al., 2005) mais également une diminution de leur diversité (Kuhn et al., 2009). Il y a donc une sélection des microorganismes capables d'utiliser la nouvelle source de carbone et d'énergie et

restructuration de la communauté d'origine. Ces micro-organismes sont relativement peu abondants 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). 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., 2007). La plupart du temps, une exposition aux hydrocarbures sélectionne préférentiellement des organismes à Gram négatif et en particulier des *Protéobactéries* (e.g. *Alcanivorax* (Yakimov et al., 1998), *Cycloclasticus* (Dyksterhouse et al., 1995), *Marinobacter* (Gauthier et al., 1992), *Oleiphilus* (Golyshin et al., 2002), *Oleispira* (Yakimov et al., 2003)).

Ainsi, les hydrocarbures peuvent entraîner une augmentation des populations hydrocarbonoclastes (Syutsubo et al., 2001), une chute de la diversité (Yakimov et al., 2005) ou même aucune modification (Evans et al., 2004 ; Röling et al., 2004b). En effet, les communautés bactériennes exposées à des contaminations chroniques et accidentelles ou soumises à des antécédents de contamination ne présentent pas les mêmes réponses adaptatives (Carman et al., 1996 ; Hayes et al., 1999 ; Evans et al., 2004 ; Greenwood et al., 2009). Une étude récente a comparé la réponse de communautés microbiennes issues d'une mangrove proche d'une raffinerie (subissant des déversements pétroliers) et d'une mangrove qui n'avait pas été en contact avec le pétrole (pristine), suite à une pollution pétrolière (Taketani et al., 2010). Il a été constaté que l'addition de pétrole entraînait des modifications structurales de la communauté bactérienne pour les deux types de mangrove. Cependant, une plus grande divergence a été constatée pour la mangrove pristine indiquant que les phylotypes présents dans la mangrove polluée étaient plus résistants aux changements provoqués par le pétrole, alors que la communauté pristine a dû s'adapter aux composés pétroliers (Perez-Jimenez and Kerkhof, 2005; Labbe et al., 2007; Taketani et al., 2009). La communauté bactérienne présente dans le milieu préalablement exposé aux hydrocarbures aurait subi une pré-sélection de populations minoritaires, capable de répondre rapidement à l'addition de pétrole.

Des études basées sur le gène codant pour l'ARNr 16S ont également mis en évidence la présence d'*Archaea* dans plusieurs environnements où des hydrocarbures sont présents, comme par exemple des gisements de pétrole, dans de l'eau contenue dans des cavités souterraines de stockage de pétrole ou dans des aquifères contaminés (Magot et al., 2000 ; Watanabe et al., 2002 ; Kleikemper et al., 2005). Parmi les *Archaea*, les méthanogènes ont souvent été détectés en grand nombre (Kasai et al., 2005 ; Yoshida et al., 2005 ; Liu et al., 2009). Actuellement la réponse des communautés archées face à une

contamination par des hydrocarbures dans des environnements tels que les sédiments côtiers a été très peu étudiée et de ce fait est peu connue.

Des expérimentations en microcosmes (sédiments) ont pourtant été réalisées dans l'objectif d'élargir les connaissances sur la réponse adaptative des archées (Röling et al., 2004 ; Yakimov et al., 2005). Cependant, elles ont rapporté leur échec dans l'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S *Archaea* après addition de tétradécane, phénanthrène ou de pétrole. Il semblait donc que le pétrole avait un effet négatif sur les archées et qu'elles n'avaient vraisemblablement pas de rôle dans la dégradation des hydrocarbures au sein des sédiments. Pourtant lors de ces mêmes études leur détection a été possible in situ après contamination et dans le sédiment de départ. Ces résultats furent attribués à la difficulté de reproduire les conditions environnementales nécessaires à un ré-ensemencement des sédiments par des archées issues de l'eau de mer ou provenant d'invertébrés vivant dans le biotope en conditions naturelles (Röling et al., 2004).

Une étude plus récente, réalisée sur des sédiments marins collectés à 20 mètres de profondeur s'est également intéressée à l'impact du pétrole sur la diversité des archées (Miralles et al., 2010). Un enrichissement des *Euryarchaeoata* (environ 73% du nombre de séquences totales) et notamment des archées méthanogènes a été constaté après 503 jours de contamination au pétrole suggérant cette fois-ci leur implication dans la dégradation du pétrole et plus particulièrement celle des méthanogènes.

5.3. Dynamique et diversité des communautés anaérobies

L'étude des micro-organismes anaérobies est souvent réalisée en microcosme, ou à partir de communautés microbiennes simplifiées (cultures d'enrichissements) sous des conditions anoxiques. Traditionnellement, la disparition de l'hydrocarbure étudié est reliée à la disparition des accepteurs d'électrons (SO_4^{2-} , NO_3^-) ou à la production des composés réduits (HS^- , NO_2^- , CH_4). L'ajout d'inhibiteurs spécifique du métabolisme ciblé est également utilisé, ou encore la détection de métabolites spécifiques à certaines voies de dégradation (succinates). Ainsi quelques études ont démontré que des composés aliphatiques et aromatiques pouvaient être dégradés dans des sédiments côtiers, portuaires et estuariens, maintenus en anoxie (Coates et al., 1997 ; Rothermich et al., 2002 ; Kolukirik et al., 2011). Grâce à l'apport de la biologie moléculaire en écologie, la diversité de certains de ces micro-organismes a également été estimée dans des environnements contaminés, mais jusqu'à présent très peu d'études se sont intéressées aux processus de structuration de ces

communautés suivant une contamination pétrolière. Ainsi les connaissances accumulées concernent principalement leur activité.

5.3.1. Etudes liées directement au processus de dégradation des hydrocarbures

A ce jour, peu de gènes liés à la dégradation anaérobie des hydrocarbures ont été mis en évidence (*bss*, *ass*, *bcr*) et les bases de données de séquences sont peu fournies, ce qui restreint l'accès à ces communautés dans les échantillons environnementaux. Jusqu'à présent, seules la Benzylsuccinate synthase (Bss) et la Benzoyl Coenzyme A réductase (Bcr) servaient d'indicateurs pour la dégradation anaérobie des composés aromatiques (Hosoda et al., 2005 ; Song and Ward, 2005). Leur utilisation comme biomarqueur, et particulièrement la Bss, pour les études environnementales est bien documentée (Higashioka et al., 2009). Cependant ces enzymes sont impliquées dans la dégradation des composés mono-aromatiques comme le toluène et le xylène qui sont des hydrocarbures peu représentatifs des hydrocarbures retrouvés lors d'une contamination pétrolière.

Récemment, la découverte de l'Alkylsuccinate synthase (Ass), impliquée dans la dégradation anaérobie des alcanes (Callaghan et al., 2008), a fourni un nouvel outil dans l'étude de la dégradation anaérobie et donc de nouvelles perspectives pour l'étude d'environnements contaminés. Ce gène a été mis en évidence seulement chez quelques souches (dénitrifiante et sulfato-réductrice), et à ce jour seulement une étude sur la diversité des alkyl succinate synthases dans différents sites contaminés a été entreprise (Callaghan et al., 2010). Ainsi, une grande diversité des gènes *assA* a été révélée dans ces sédiments impactés par les hydrocarbures. La corrélation entre l'expression de ce gène et la dégradation des hydrocarbures pétroliers a également été démontrée lors d'une incubation en microcosmes (Kolukirik et al., 2011).

5.3.2. Les communautés microbiennes anaérobies

5.3.2.1. Communauté sulfato-réductrice

Plusieurs études ont démontré que les bactéries sulfato-réductrices (BSR) étaient largement impliquées dans les processus de dégradation observés *in situ* (Coates et al., 1996 ; Coates et al., 1997 ; Phelps et al., 1998 ; Hayes and Lovley, 2002 ; Rothermich et al., 2002). Leur dominance au sein de sédiments marins contaminés au pétrole a été démontrée (Miralles et al., 2007b ; Paissé et al., 2008), ainsi que la stimulation de leur activité en présence d'hydrocarbures (Kleikemper et al., 2002). Dans la majorité des cas, les banques de clones basées sur le gène codant l'ARNr 16S ou les gènes fonctionnels ont mis en évidence la forte

représentativité des membres de la famille des *Desulfobacteraceae*, qui sont capables de réaliser une minéralisation complète de substrats organiques et des *Desulfobulbaceae*, qui oxydent le propionate en acétate. Les membres de la famille des *Desulfovibrionaceae*, oxydant le lactate sont rarement retrouvés (Lanoil et al., 2001 ; Dhillon et al., 2003 ; Knittel et al., 2003 ; Mills et al., 2005 ; Lloyd et al., 2006 ; Lösekann et al., 2007).

A ce jour, une seule étude rapporte les modifications structurales de la communauté sulfato-réductrice face à une contamination pétrolière (Miralles et al., 2007a). Cette étude, basée sur le gène codant l'ARNr 16S, a été réalisée *in situ* dans un sédiment marin à 20m de profondeur après contamination pétrolière. Les auteurs ont montré que les différents membres de la communauté sulfato-réductrice ne présentaient pas la même réponse face à la contamination. Ainsi, le groupe des *Desulfococcus-Desulfonema-Desulfosarcina* n'a montré de modifications qu'au bout de 503 jours de contamination, contrairement au groupe des *Desulfovibrio-Desulfomicrobium* qui en a montré au bout de 135 jours. Cette étude a donc démontré qu'il existe une grande variabilité dans la réponse aux hydrocarbures selon les groupes considérés au sein de la communauté sulfato-réductrice.

5.3.2.2. Communauté dénitrifiante

La dégradation anaérobie des hydrocarbures en condition de dénitrification a été démontrée grâce aux cultures d'enrichissement (Al-Bashir et al., 1990 ; Bregnard et al., 1996 ; Yoshida et al., 2005 ; Callaghan et al., 2009). Néanmoins des mesures de l'activité de dénitrification, réalisées en microcosmes sur différents types de sédiments marins, tendent à montrer que ce processus serait inhibé suite à l'apport de pétrole dans le sédiment (Bonin et al., 1990). En effet, à la surface du sédiment, le pétrole limite la pénétration de l'oxygène, ce qui inhibe la nitrification, et par conséquent, diminue l'apport en accepteurs d'électrons pour la communauté dénitrifiante. De plus, le pétrole engendre une diminution du potentiel rédox favorisant les micro-organismes sulfato-réducteurs au détriment des micro-organismes dénitrifiants. Malgré tout, l'abondance des micro-organismes dénitrifiants n'est pas modifiée et leur capacité à dénitrifier est toujours présente. Ces résultats ont été confortés par une analyse moléculaire quantitative des gènes impliqués dans la réduction de l'oxyde nitreux en azote atmosphérique et des transcrits associés (Kolukirik et al., 2011). En effet, aucune activité n'a pu être détectée au sein du sédiment pendant 224 jours d'incubation avec du pétrole. Néanmoins, une analyse plus fine du sédiment, réalisée par strate, a également démontré que l'inhibition de la dénitrification liée au pétrole peut être localisée dans les deux

premiers centimètres du sédiment, et que l'activité peut être détectée dans la couche inférieure des sédiments (Gilbert et al., 1997a).

Des résultats contradictoires ont également été rapportés, suggérant que le pétrole n'est pas le seul facteur déterminant de l'activité de la communauté dénitrifiante. Ainsi, des taux de dénitrification mesurés dans les sédiments contaminés se sont avérés comparables à ceux des sédiments non contaminés montrant ainsi que la dénitrification n'était pas affectée lors d'un apport en pétrole (Bonin et al., 1994). Le genre *Pseudomonas* a d'ailleurs été détecté en forte abondance (85% des isolats).

5.3.3.3. Communauté méthanogène

Les connaissances sur la diversité de ces micro-organismes lors d'une contamination pétrolière sont limitées et ont été principalement accumulées grâce aux analyses basées sur le gène codant l'ARNr 16S évoquées précédemment. Récemment, la quantification des gènes ainsi que des transcrits de la *McrA* dans un sédiment contaminé au pétrole a démontré que les méthanogènes présentaient une forte activité dans ces sédiments (Kolukirik et al., 2011). Des études antérieures en microcosmes ont démontré la conversion d'alcane en méthane (Zengler et al., 1999 ; Anderson and Lovley, 2000 ; Jones et al., 2008), néanmoins, l'oxydation des alcanes dans ces conditions résulte d'interactions syntrophiques (Zengler et al., 1999). Ainsi, au sein de cette communauté hydrocarbonoclaste, la communauté méthanogène n'intervient que dans l'étape finale de minéralisation. Par conséquent, leur rôle reste encore peu connu.

5.4. Impact de la bioturbation sur les micro-organismes dans un environnement contaminé aux hydrocarbures

Actuellement, les connaissances acquises sur l'effet de la bioturbation sur la structure des communautés microbiennes dans un environnement contaminé aux hydrocarbures sont limitées. Néanmoins, les études réalisées suggèrent que les terriers construits par la macrofaune abritent une communauté hydrocarbonoclaste aérobie qui lui est propre. En effet, des sédiments marins issus de terriers de différents organismes bioturbateurs ont été collectés et leur potentiel de dégradation a été testé sur différents hydrocarbures avec différents accepteurs d'électrons (oxygène, nitrates, fer (III), sulfate). Les résultats ont indiqué que la dégradation du benzène, de HAPs et de l'hexadécane n'avait lieu qu'en présence d'oxygène (Chung and King, 1999). De plus, une nouvelle espèce bactérienne hydrocarbonoclaste,

Lutibacterium anuloderans, a été isolée d'un terrier du polychaete *N. virens* par enrichissement sur phénanthrène (Chung and King, 2001).

Deux autres études basées sur l'analyse du gène codant l'ARNr 16S (T-RFLP et RISA) ont également mis en évidence des profils différents de communautés bactériennes entre le sédiment contaminé bioturbé et non bioturbé en présence de pétrole et de naphthalène (Cuny et al., 2007 ; Näslund et al., 2010). Dans le premier cas, ces différences ont été corrélées avec les différences de taux de dégradation obtenus, les sédiments bioturbés montrant un taux de dégradation plus important. Dans l'autre cas, l'augmentation de l'abondance de la méiofaune entraîne effectivement des modifications de la structure de la communauté bactérienne mais diminue également de façon significative la minéralisation du naphthalène (Näslund et al., 2010).

Enfin, en 1997, un modèle basé sur l'étude de la dénitrification, donc lié aux activités microbiennes, a été établi dans des sédiments bioturbés (Gilbert et al., 1997b) (Figure I-24).

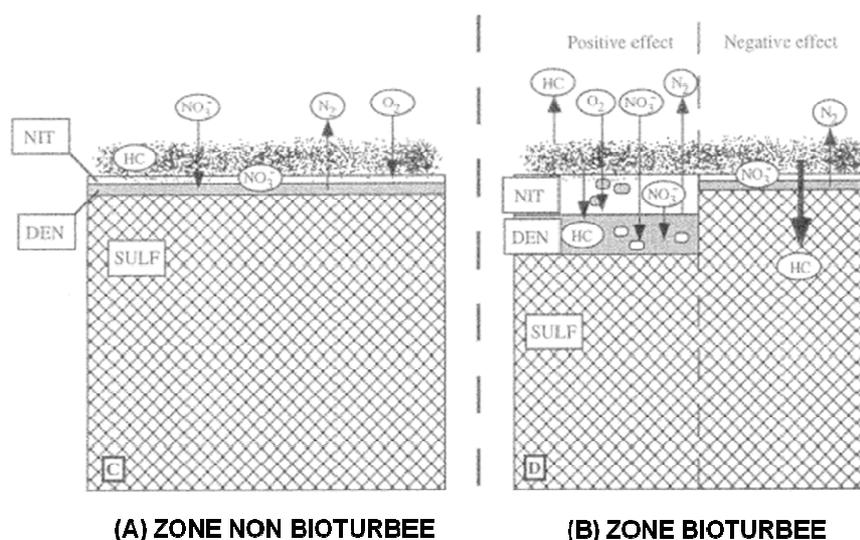


Figure I-24 : Dénitrification et distribution des hydrocarbures dans les sédiments lié à la présence de la macrofaune. L'épaisseur des différentes couches du sédiment et des flèches sont représentatives de l'intensité des processus. HC: hydrocarbures; NIT: nitrification, DEN: dénitrification, SULF: sulfato-réduction (Gilbert et al., 1997b).

Comme évoqué précédemment, lors d'un apport en pétrole, des conditions anoxiques s'établissent rapidement à la surface du sédiment (A). Ces conditions sont principalement dues à une forte activité des micro-organismes aérobies qui consomment rapidement l'oxygène, mais également à l'effet couvrant du pétrole qui limite la pénétration des solutés au sein du sédiment. Par conséquent, ces nouvelles conditions vont entraîner l'inhibition de la

nitrification et induire une forte activité sulfato-réductrice. La production de sulfures en grosse quantité inhibant à son tour la dénitrification. Au contraire, la présence de la macrofaune dans les sédiments contaminés (B) augmente la pénétration de l'oxygène au sein du sédiment et induit la création de micro-niches oxiques et anoxiques. Cet apport en oxygène limite l'anoxie des sédiments à la surface et par conséquent, stimule la nitrification et déplace la sulfato-réduction dans les couches plus profondes du sédiment. Enfin, l'enfouissement des hydrocarbures dans les couches inférieures du sédiment va soit stimuler la dénitrification (hydrocarbures en petite quantité), soit renforcer son inhibition en intensifiant les conditions anoxiques du sédiment et la sulfato-réduction (grosse quantité d'hydrocarbures enfouis).

Considérant tous les éléments énoncés précédemment, la « réponse » des communautés microbiennes des sédiments marins, liée à l'apport en hydrocarbures apparaît comme un processus complexe. Cette réponse reste encore peu connue surtout en ce qui concerne les communautés microbiennes anaérobies qui jouent pourtant un rôle primordial dans la dégradation de la matière organique des sédiments marins. Elle est également dépendante des autres organismes présents au sein de l'écosystème et notamment des organismes fouisseurs qui modifient considérablement leur environnement. Les interactions biotiques entre la macrofaune benthique et les bactéries dégradant les hydrocarbures ont été peu étudiées jusqu'à présent. La plupart des études recensées jusqu'à présent s'appuient essentiellement sur l'effet structurant de la bioturbation sur la communauté microbienne ou l'impact de la bioturbation sur la dégradation de molécules cibles.

Dans ce contexte, le travail de thèse présenté vise à apporter des connaissances supplémentaires dans la compréhension des processus microbiens de restauration de l'écosystème en tenant compte de la macrofaune benthique. La réalisation de ce travail de recherche a nécessité une approche pluridisciplinaire et la mise en place de microcosmes. Il s'agissait de :

- déterminer si la macrofaune benthique modifie les processus de structuration des communautés microbiennes mis en place lors d'une contamination pétrolière, notamment par l'étude de la dynamique de différentes communautés microbiennes,
- caractériser ces modifications en caractérisant les communautés microbiennes obtenues,
- déterminer si ces modifications peuvent être reliées à l'efficacité de dégradation des hydrocarbures,

Un intérêt particulier a été porté aux communautés métaboliquement actives et plus particulièrement aux communautés anaérobies.

Cette étude a mis en œuvre des analyses de diversité microbienne et l'isolement de consortium microbiens anaérobies hydrocarbonoclastes (IPREM-EEM, Pau), le suivi de la dégradation des hydrocarbures (Cèdre, Brest), le suivi de l'évolution quantitative du vanadium (IPREM-ECABIE, Pau) et l'évaluation du remaniement sédimentaire lié à la présence de la macrofaune (LMGEM, Marseille).

CHAPITRE II

PROCEDURES EXPERIMENTALES

CHAPITRE II: Procédures expérimentales

1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

1.1. Site de prélèvement

Dans le cadre du projet DHYVA (Dégradation d'HYdrocarbures dans les VAsières), des sédiments vaseux situés sur l'Aber Benoît ont été recueillis à l'automne 2007 en vue de mettre en place le dispositif expérimental. L'Aber Benoit est situé au nord ouest du Finistère en région bretonne et s'étale sur 8 km de long. Son estuaire est long de 12 km et s'étale sur 8 communes pour terminer sa course dans la Manche. Sa superficie totale est de 140 km². Le site de prélèvement se situe au sein de la commune de Tréglonou (Figure II-1 ; 48°33'12.40"N - 4°32'8.69"W).



Figure II-1 : Localisation géographique de l'aber Benoît dans la commune de Tréglonou

Ces sédiments ont montré un pH= 7,8 avec une teneur en carbone organique de 6,8% et une salinité de 3,5‰. La teneur en eau des sédiments a été estimée à 60% et une analyse chimique a détecté environ 4 mg d'hydrocarbures biogéniques par gramme de sédiment sec dans la couche supérieure du sédiment (0-2 cm). La densité et la caractérisation de la macrofaune autochtone a été réalisée à partir de trois carottes prélevées sur le site d'échantillonnage (Tableau II-1).

Tableau II-1: Dominance (%) des espèces macrobenthiques recensées dans trois carottiers prélevés sur site (C1, C2 et C3)

	C1	C2	C3
<i>Nereis diversicolor</i>	26,09	0	31,82
<i>Nephtys hombergi</i>	4,35	0	0
<i>Hydrobia ulvae</i>	69,57	83,33	50
<i>Mya arenaria</i>	0	16,67	18,18

Quatre espèces différentes caractéristiques des estuaires envasés ont été recensées dont *Hydrobia ulvae*, un gastéropode, est l'espèce dominante. La densité moyenne de la macrofaune autochtone a été estimée à $2419 \pm 6,08 \text{ ind.m}^{-2}$ et la densité du polychaete *Nereis diversicolor* atteignait 509 ind.m^{-2} correspondant à une biomasse de 61 g.m^{-2} .

1.2. Expérimentation en microcosmes

1.2.1. Mise en place du dispositif expérimental

Afin de mettre en place l'expérimentation en microcosmes, 12 blocs de vases ont été prélevés avec soin à l'aber Benoît grâce à un système de boîte d'allumette, afin de préserver la structure de la vase (Figure II-2). 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 sédiment).



(A) Démoulage du bloc de vase



(B) Transfert du bloc de vase dans un bac recouvert d'une membrane géotextile

Figure II-2: Prélèvement des sédiments vaseux sur le site d'étude

Les douze microcosmes ont ensuite été raccordés à un dispositif alimenté en eau de mer provenant de l'aquarium Océanopolis (Brest) (Figure II-3). 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 (12 heures) ont été appliqués. L'arrivée d'eau est programmée à chaque marée montante, ainsi l'eau est renouvelée à chaque cycle de marée (20 L par boîte). A marée haute, le niveau d'eau est maintenu à environ 5 cm au-dessus de la surface des sédiments grâce à un robinet flotteur. Enfin, chaque bac est relié à un seau collecteur lui-même placé sur une table élévatrice au centre du dispositif. Celle-ci est programmée pour s'abaisser au moment de la marée descendante, et ainsi les bacs se vident progressivement de leur eau qui est déversée au centre du dispositif.

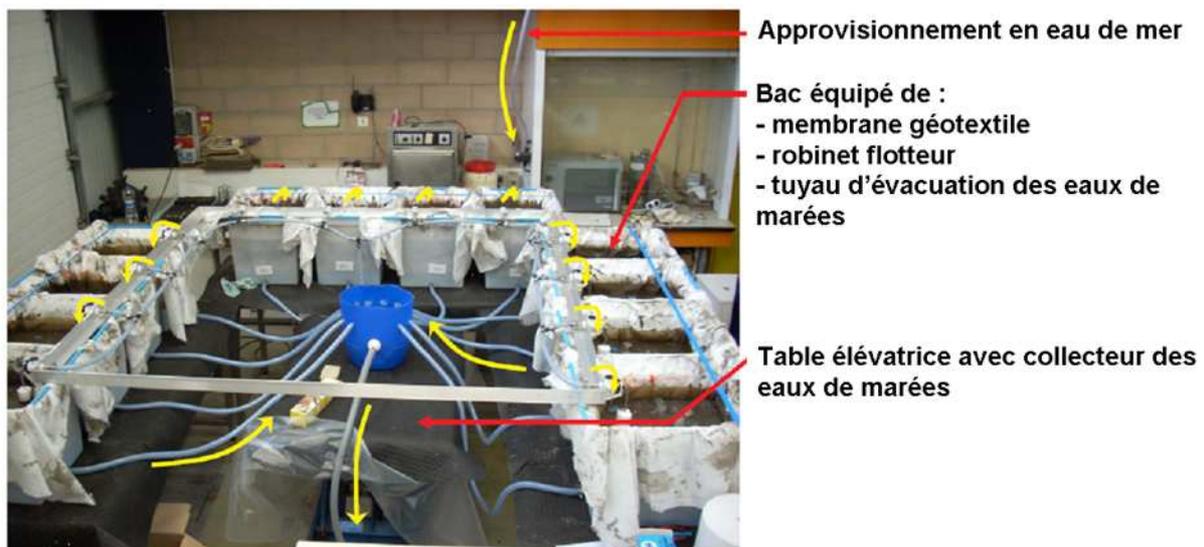


Figure II-3: Dispositif expérimental

Après 7 jours de stabilisation des sédiments, du pétrole brut BAL 110 et des polychaetes *Nereis diversicolor* ont été ajoutés dans les microcosmes, afin de simuler une pollution

pétrolière et d'augmenter l'activité de bioturbation au sein des sédiments. Ainsi, quatre conditions ont été appliquées en triplicata (N = 12) :

- (i) CTRL: sédiment seul,
- (ii) BAL: ajout de pétrole (BAL 110) dans les sédiments
- (iii) NEREIS: ajout de polychaetes *N. diversicolor* dans les sédiments
- (iv) NEREIS+BAL : addition simultanée de pétrole (BAL 110) et de polychaetes *N. diversicolor*.

L'expérimentation a duré 270 jours, de novembre 2007 à juillet 2008.

L'ordre des microcosmes autour du dispositif a été choisi par tirage au sort afin de ne pas influencer les résultats par leur disposition. Ainsi les quatre conditions sont représentées de façon aléatoire autour du dispositif.

Ajout du pétrole dans les microcosmes

La couche supérieure des sédiments de chaque microcosme (0-2 cm) a été collectée, ces sédiments ont ensuite été mélangés puis homogénéisés. Ce mélange a ensuite été divisé en deux. Du pétrole BAL 110 a été ajouté à l'une des deux parties à une concentration finale de 25,6 mg.g⁻¹ de sédiment sec. 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 microcosmes et étalés à la surface des sédiments (couche 0-2 cm). Le sédiment contaminé a été réparti entre les microcosmes BAL et NEREIS+BAL, et le sédiment non contaminé entre les microcosmes CTRL et NEREIS.

Le pétrole choisi pour l'expérimentation (BAL 110 ; Arabian light) est un pétrole brut léger étêté à 110°C. Autrement dit, ce type de pétrole est en grande partie composé d'hydrocarbures saturés (environ 60%) et en plus faible proportion (28%) d'hydrocarbures aromatiques (Figure II-4). Il a été choisi pour sa forte teneur en hydrocarbures aliphatiques étant considérés comme plus facilement biodégradables.

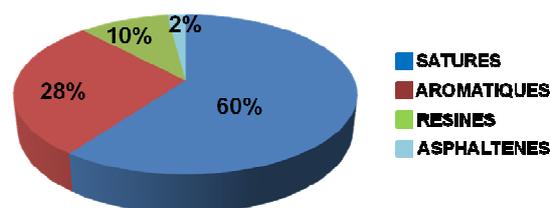


Figure II-4 : Composition type d'un pétrole brut léger de type BAL.

Ajout des polychaetes

Afin d'augmenter les activités de bioturbation au sein des microcosmes, la biomasse initiale des polychaetes *N. diversicolor* a été augmentée de 10 fois. Autrement dit, 473 individus.m⁻² ont été rajoutés correspondant à une biomasse de 614 g.m⁻² dans les microcosmes NEREIS et NEREIS+BAL.

Ces annélides polychètes appartiennent à la famille des Nereididae et font partie des espèces macrobenthiques les plus représentées dans les sédiments côtiers sablo-vaseux (Figure II-5) (Clay, 1967 ; Kristensen, 1988b). 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.m⁻² (Kristensen, 1988b). Ils vivent dans un terrier en forme de « U » ou de « Y », tapissé de mucus qu'ils sécrètent. Les terriers sont activement irrigués et avec le temps, ils peuvent se développer en un réseau de galeries atteignant plus de 20 cm de profondeur (Gerino and Stora, 1991 ; Davey, 1994). Ces organismes présentent un mode de nutrition dépositivore, se nourrissant à la surface des sédiments aux alentours de leur terrier (Esselink and Zwarts, 1989). Cependant, ils peuvent également être suspensivores, filtrant l'eau et les particules (plancton) à travers un filet de mucus au sein de leur terrier (Riisgard, 1991).



Figure II-5 : *Polychaete Nereis diversicolor* (<http://www.univ-lehavre.fr/cybernat/pages/neredive.htm>)

Ajout des luminophores

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 microcosmes une heure après l'introduction des polychaetes. Ainsi, une suspension de luminophores oranges (100 g, 63-125 µm) a été

homogénéisée et répandue à la surface des microcosmes (Figure II-6). A 180 jours, des luminophores de couleur verte ont également été ajoutés à la surface des microcosmes, témoignant cette fois-ci de l'activité de remaniement des trois derniers mois d'incubation (180-270 jours).

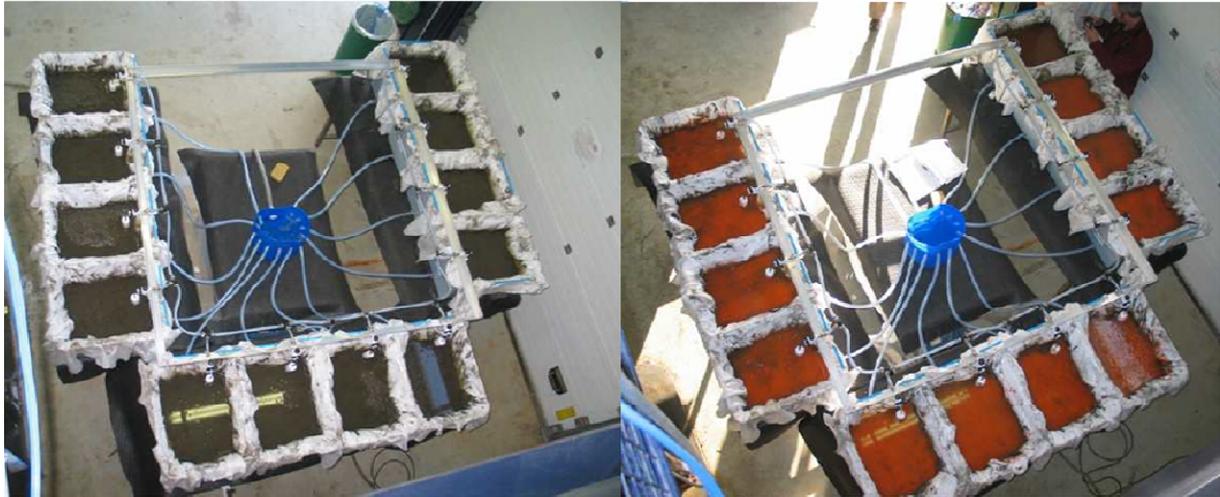


Figure II- 6: *Vue des microcosmes avant (à gauche) et après (à droite) l'ajout des luminophores oranges.*

1.2.2. Stratégie d'échantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé à 2, 7, 30, 90, 180 et 270 jours d'incubation, le temps de référence (t_0) correspondant à l'ajout de pétrole et des polychaetes dans les microcosmes. Pour chaque prélèvement effectué, un récipient de même volume a été placé au sein du sédiment afin d'éviter de déstructurer le sédiment.

Analyses moléculaires

Au total, 5 prélèvements par microcosme ont été effectués dans la partie supérieure du sédiment (0-2 cm, eppendorf de 2 ml). De plus, à l'aide d'une seringue, deux autres prélèvements réalisés dans la hauteur 0-5 cm du sédiment ont été réalisés en conservant sa structure pour l'étude de la stratification. Les échantillons ont été conservés à -80°C en attendant d'être analysés.

Par conséquent, pour chaque condition et à chaque temps, les analyses moléculaires ont été réalisées sur six répliqués. Nous avons distingués les répliqués d'échantillonnage (échantillons issus du même microcosme, $N=2$), et les répliqués biologiques (nombre de microcosmes, $N=3$). Ainsi, les répliqués issus du même microcosme nous permettent de tenir compte de la variabilité existant au sein du sédiment.

Analyses chimiques

Deux prélèvements par microcosme ont été réalisés dans des tubes Falcon de 50ml (0-10 cm) en conservant la structure du sédiment dans sa hauteur pour les analyses chimiques des hydrocarbures et du Vanadium (un prélèvement par analyse) (N=3).

Analyse du remaniement sédimentaire

Environ un tiers de chaque microcosme a été préservé des différents prélèvements dans le but de quantifier le remaniement sédimentaire à la fin de l'incubation (270 jours).

2. TECHNIQUES MOLECULAIRES

2.1. Extraction des acides nucléiques

2.1.1. Extraction des acides nucléiques totaux des sédiments issus des microcosmes (0-2 cm)

2.1.1.1. Extraction de l'ADN génomique total

Les ADNs génomiques ont été extraits de 24 échantillons à chaque temps (2 prélèvements par bac et 3 microcosmes par condition sur 6 temps). Les extractions ont été réalisées à partir de 250 mg de sédiments à l'aide du kit commercial *UltraClean™ Soil DNA isolation kit* (MoBio Laboratoires) selon les recommandations du fournisseur. Au préalable, une étape de centrifugation des sédiments a été rajouté afin éliminer l'eau du sédiment (15 min, 5000 g). Une fois extraits, les ADNs génomiques ont été aliquotés et conservés à -20°C pour une conservation à court terme et -80°C pour une conservation à long terme dans 50 µl d'eau milliQ.

Ce kit combine deux types de lyse cellulaire, une lyse mécanique par broyage et une lyse chimique. En outre la rapidité d'exécution qu'offre l'utilisation d'un kit d'extraction, il permet également des extractions homogènes et facilement reproductibles limitant ainsi les biais inhérents à l'extraction d'ADN (important lors de l'analyse de la diversité microbienne).

2.1.1.2. Extraction de l'ARN total

Les ARNs totaux ont également été extraits de 24 échantillons à chaque temps (2 prélèvements par bac et 3 microcosmes par condition sur 6 temps). Les extractions ont été réalisées à partir de 2g de sédiments l'aide du kit commercial *RNA PowerSoil™ Total RNA Isolation Kit* (MoBio Laboratoire) selon les recommandations du fournisseur. Ce kit combine

également les deux types de lyse cités précédemment. Une fois extraits, les ARNs ont été aliquotés et conservés à -80°C dans 100 µl d'eau traitée au DEPC (Diethyl pyrocarbonate).

Ce kit a été sélectionné parmi d'autres car il offrait un bon compromis quantité / qualité des ARNs ainsi que la possibilité de travailler avec de grandes quantités de sédiments, indispensable pour obtenir une quantité suffisante d'ARN total.

Des précautions particulières ont été appliquées lors de la manipulation des ARN, notamment l'utilisation de consommables certifiés « RNase-free » autoclavés, ou encore l'utilisation de solutions et de matériels (pipettes, paillasse) traités avec une solution de diéthyl pyrocarbonate (DEPC) stérile.

2.1.3. Extraction de l'ADN génomique total des cultures d'enrichissement et des souches bactériennes

Les extractions d'ADN génomique total des souches bactériennes ont été réalisées sur les culots bactériens obtenus après centrifugation des cultures (10 min, 8000 g), à l'aide du kit commercial *UltraClean™ Soil DNA isolation kit* (MoBio Laboratoires) selon les recommandations du fournisseur. Une fois extraits, les ADN génomiques ont été aliquotés et conservés à -20°C pour une conservation à court terme et -80°C pour une conservation à long terme dans 50 µl d'eau milliQ.

Les extractions de l'ADN génomique des cultures d'enrichissement réalisées sur les différents hydrocarbures a également été réalisée à l'aide du kit MoBio, cependant, au préalable, les cultures ont été filtrées (30 ml ; acétate de cellulose), et les filtres broyés dans l'azote liquide.

2.2. Contrôle de la qualité, de la taille et évaluation de la concentration des acides nucléiques par électrophorèse

Après extraction, la qualité et la taille des ADN et ARNs extraits ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose. Les gels contenaient 1% (m/v) d'agarose dans un tampon TBE 1X (Acide borique 90 mM, Tris-base 90 mM, EDTA 2,5 mM pH 8.3). La migration des différents échantillons a été réalisée sous une tension de 100 V pendant 30 minutes environ, en parallèle de la migration d'un marqueur de poids moléculaire (Smart Ladder, échelle de 200 à 10 000 pb, Eurogentec). Après 15 minutes dans un bain de bromure d'éthidium à une concentration de 0,5 µg.ml⁻¹ (BET : agent intercalant de l'ADN), les gels d'agarose ont été

placés sous lumière UV afin de visualiser par fluorescence la qualité et la quantité des ADN et des ARNs extraits.

2.3. Réactions de polymérisation en chaîne et purifications

2.3.2. La polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR est une technique de répllication *in vitro* ciblée qui permet d'obtenir, à partir d'un échantillon complexe et peu abondant, d'importantes quantités d'un fragment d'ADN spécifique. 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). L'amplification du fragment d'ADN cible est exponentielle. Un thermocycleur automatisé répète des cycles de trois étapes : la dénaturation de l'ADN (1 min à 94°C), l'hybridation des amorces à la température d'hybridation, (Tableau II-2) et la synthèse du brin complémentaire grâce à une ADN polymérase thermostable (45s à 72°C/kilobases). L'ensemble des cycles de PCR est précédé par une étape de dénaturation de l'ADN (10 min à 94°C) et suivi d'une élongation finale (10 min à 72°C). La réaction de PCR est préparée dans un volume réactionnel final de 50 µl contenant l'ADN matriciel, 0,2 µM de chacune des deux amorces utilisées (Tableau II-2), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 à 2,5 U de Taq polymérase (Ozyme) en fonction du gène à amplifier avec son tampon réactionnel 1X final. Dans le cas de la T-RFLP, l'amorce forward (F) est fluorescente, elle portant un fluorochrome en 5' (FAM : 5-carboxy-fluorescéine).

Dans le cas d'amplification qualifiée de difficile, dans notre cas l'amplification des ADNc environnementaux, un protocole de PCR nichée ou semi-nichée a été employé. Il s'agit d'une PCR effectuée sur le produit d'amplification d'une première PCR. La première amplification est effectuée avec des amorces dites « externes », puis une seconde amplification est réalisée à partir du produit de la première PCR avec des amorces qualifiées d'interne au premier fragment obtenu. Dans le cas de la PCR semi-nichée, lors de la deuxième PCR une des deux amorces du deuxième couple est commune au premier couple.

Pour l'analyse de la diversité par T-RFLP, en PCR nichée, seul le deuxième couple d'amorce est marqué pour l'analyse. Bien que cette technique de PCR puisse induire une diminution de la diversité, elle apporte aussi une plus grande sensibilité et spécificité d'amplification. La vérification des amplifications PCR par comparaison avec un ADN positif

est ensuite réalisée par électrophorèse sur gel d'agarose de 1 %. (les conditions de migration sont identiques à celle décrites précédemment).

Tableau II- 2 : *Caractéristiques des différents couples d'amorces utilisées lors des PCRs de notre étude. (1) PCR Touchdown : 56°C – 0,5°C / cycle (x 10 cycles), 54°C (x 30 cycles) ; (2) PCR Touchdown : 60°C – 1°C / cycle (x 10 cycles), 50°C (x 30 cycles)*

Gène ciblé et amorces	Séquence (5'-3')	Température d'hybridation (°C)	Taille de l'amplicon (pb)	Références
ARNr 16S bactérien				
63F	CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC	58	1300	(Marchesi et al., 1998)
1387R	GGG CGG WGT GTAA CAA GGC			
ARNr 16S Archaea				
21F	TTC CGG TTG ATC CYG CCG GA	55	900	(DeLong, 1992)
958R	YCC GGC GTT GAM TCC AAT T			
nirS				
nirS1F	CCT AYT GGC CGC CRC ART	54 (1)	800	(Braker et al., 1998)
nirS6R	CGT TGA ACT TRC CGG T			
dsrAB				
dsr1F	ACS CAC TGG AAG CAC G	54	1900	(Wagner et al., 1998)
dsr4R	GTG TAG CAG TTA CCG CA			
dr619AF	GYC CGG CVT TCC CST ACA A	54	1300	(Giloteaux et al., 2010)
dsr1905BR	RTG HAC SGC GCC GCA CAT			
mcrA				
ME1	GCM ATG CAR ATH GGW ATG TC	50	490	(Hales et al., 1996)
MLR	TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT			
MLF	GGT GGT GTM GGA TTC ACA CAR TAY GCW ACA GC	55	470	(Luton et al., 2002)
MLR	TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT			
alkB				
alkB 2F	CAYGARYTGGGYCAYAA	50 (2)	414	(Paisse et al., 2011)
alkB 1R	AACTAYNTYGARCAYTACGG			
alkB 3F	TAYGGNCAYTTCTWYRTYAGCA	50	344	(Paisse et al., 2011)
alkB 1R	AACTAYNTYGARCAYTACGG			
vecteur de clonage				
M13F	CTG GCC GTC GTT TTA C	54	Variable (> 200)	TOPO TA Cloning® (Invitrogen)
M13R	GGT CAT AGC TGT TTC CTG			

Y= C/T ; K= G/T ; R= A/G ; B= C/G/T ; M= A/C ; D=A/G/T ; V= A/C/G ; H= A/C/T

2.3.2. La rétrotranscription *in vitro* des ARNs

Avant l'utilisation des ARNs pour une rétrotranscription, les ARNs 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 d'ADN est vérifiée par une PCR réalisée sur l'ARN traité avec les amorces ciblant l'ARNr 16S. L'absence d'amplification atteste de l'efficacité du traitement.

La rétrotranscription (RT) est une technique qui permet la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'un brin matrice d'ARN grâce à une transcriptase inverse. La réaction de RT a été réalisée à partir d'hexamères aléatoires (Roche) et de la *Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase* (USB Corporation). Le protocole classique du fournisseur de la RT a été suivi. Il comporte une première étape de dénaturation du mix ARNs-hexamères pendant 5 min à 75°C puis 5 min dans la glace. Un deuxième mix comportant l'enzyme (RT), des dNTPs ainsi que le tampon de l'enzyme ont été rajoutés avant d'incuber 2h à 42°C, puis la réaction est stoppée par une incubation de 5 min à 95°C. Les produits de RT ont ensuite été directement utilisés pour une réaction de PCR ou conservés à –20°C. Pour vérifier que la réaction PCR est bien réalisée à partir des ADNc et non à partir d'ADN « résiduel », un contrôle PCR négatif avec de l'extrait d'ARN non rétro-transcrit a été réalisé en parallèle.

2.3.3. Purification des produits PCR

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

2.4. Analyses moléculaires de la diversité

La diversité a été appréciée à deux niveaux: la diversité taxonomique, soit l'ensemble des bactéries et des archées présentes dans l'écosystème étudié et la diversité fonctionnelle, soit l'étude des micro-organismes impliquée dans un processus particulier.

Pour la diversité taxonomique, le gène cible doit être présent dans l'intégralité de la communauté étudiée. Le gène choisi est le gène codant pour l'ARNr 16S qui est très conservé. Ainsi ce gène est un excellent marqueur taxonomique car 2 individus présentant des séquences différentes d'ARNr 16S peuvent être considérés d'espèces ou de groupes

d'espèces différents. Pour la diversité fonctionnelle, plusieurs gènes cible ont fait l'objet de notre étude : des gènes clés impliqués dans les cycles biogéochimiques, ainsi que dans la dégradation aérobie des alcanes.

2.4.1. Analyse du polymorphisme de longueur des fragments terminaux de restriction (Terminal-Restriction Fragments Length-Polymorphism – TRFLP)

2.4.1.1. Principe

La méthode de T-RFLP a été développée en 1997 (Liu et al., 1997). Cette technique repose sur la détection de fragments terminaux de restriction (Terminal Restriction Fragments, T-RFs) d'un gène d'intérêt. Le gène d'intérêt est amplifié par PCR grâce à des amorces marquées à l'aide de fluorochrome, puis les amplicons sont digérés par des endonucléases de restriction. Les T-RFs marqués obtenus sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire et permettent d'obtenir une empreinte moléculaire de la communauté bactérienne, que celle-ci provienne d'un environnement simple ou complexe (Hartmann and Widmer, 2008). La longueur de ces T-RFs peut varier d'une espèce à l'autre selon la position de la séquence nucléotidique reconnue par l'enzyme. Les populations bactériennes sont ainsi représentées par la taille en paires de base (pb) de leurs fragments de restriction terminaux respectifs. Les avantages majeurs de cette technique sont (i) son niveau de résolution (Clement et al., 1998 ; Blackwood et al., 2003), (ii) son excellente reproductibilité de signatures de la diversité (ii) le traitement d'un grand nombre d'échantillons (technique à haut débit). La T-RFLP a été largement utilisée pour étudier les communautés bactériennes et elle est particulièrement recommandée pour étudier des profils complexes de communautés (Hartmann and Widmer, 2008). C'est donc un outil puissant pour comparer les communautés.

2.4.1.2. Protocole expérimental

L'amplification des ADNs ou ADNc est réalisée avec des amorces fluorescentes. Le marquage de ces oligonucléotides est réalisé par fixation d'un fluorochrome au niveau de leur extrémité 5' (dans notre cas : 5'-carboxy-fluorescéine phosphoramidite noté FAM). Les mêmes conditions de PCR décrites plus haut ont été appliquées.

Environ 100 ng des produits PCR purifiés sont ensuite soumis à des digestions enzymatiques par différentes endonucléases de restriction (Table II-3) selon les recommandations du fournisseur (New England BioLabs). Les enzymes de restriction utilisées reconnaissent des sites spécifiques de clivages à 4 paires de bases et présentent ainsi une fréquence de coupure importante ($4^4=256$ paires de bases). L'hydrolyse est réalisée dans

le tampon réactionnel préconisé par le fournisseur avec 3 unités d'enzymes. Une incubation de 3 heures est réalisée à la température optimale d'activité de l'enzyme utilisée afin de limiter la digestion partielle des fragments de PCR.

Table II- 3 : Sites de coupures et température optimale d'activité des enzymes de restriction utilisées

Enzymes de restriction	Site de reconnaissance coupure (5'-3')	Gènes ciblés	Température optimale d'activité
HaeIII	GG/CC	ARNr 16S bactérien	37°C
Hinfl	G/ANTC		37°C
HaeIII	GG/CC	ARNr 16S archaea	37°C
TaqI	T/CGA		65°C
HhaI	GCG/C	<i>nirS</i>	37°C
TaqI	T/CGA		65°C
RsaI	GT/AC	<i>dsrAB</i>	37°C
TaqI	T/CGA		65°C
Sau96I	G/GNCC	<i>mcrA</i>	37°C
MspI	C/CGG		37°C
Hinp1I	G/CGC	<i>alkB</i>	37°C
Sau96I	G/GNCC		37°C
Sau3AI	/GATC		37°C

Enfin, 1 à 2 µl des produits de digestion sont dénaturés pendant 5 min à 95°C, en présence de 10 µL de formamide (dénaturant chimique) et 0,25 µL de marqueur de poids moléculaires (TAMRA 500, Applied Biosystems) puis immédiatement mis dans la glace. Les produits de digestion sont ensuite séparés par électrophorèse capillaire grâce à un séquenceur automatique (*ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer*, Applied Biosystems) Après une injection électrocinétique de l'échantillon pendant 15 secondes dans un capillaire contenant un gel polymère adapté (gel de polyacrylamide Pop-4, Applied Biosystems), la migration s'effectue sous une tension de 15 kV pendant 30 minutes à 60°C. Cette migration entraîne alors la séparation des différents fragments de restriction selon leur taille. Seuls les T-RFs vont être détectés, car ils contiennent l'amorce fluorescente. Une analyse préliminaire des électrophorégrammes est réalisée grâce au logiciel Genescan v3.0 (Applied Biosystems) permettant de déterminer les tailles des différents fragments détectés par comparaison à un marqueur moléculaire standard (TAMRA 500, Applied Biosystems).

2.4.2. Conception de banques de gènes

2.4.2.1. Principe du clonage et du séquençage

Le clonage a pour but de séparer les séquences amplifiées par PCR (inserts) en les intégrant individuellement dans des plasmides (vecteurs). Après transformation, les cellules possédant les plasmides recombinants (vecteur avec insert) sont sélectionnées sur milieu sélectif. Une amplification de l'insert est ensuite possible à l'aide d'amorces flanquantes s'hybridant sur le plasmide. Après digestion enzymatique, les différents clones peuvent enfin être classés en fonction des profils de restriction de leurs inserts respectifs, mettant ainsi en évidence différentes populations (technique de *Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP).

L'identité de chaque population peut être approchée par le séquençage de l'insert. La réaction de séquençage est basée sur le principe d'une amplification linéaire d'un fragment d'ADN matriciel (Sanger et al., 1977). Le fragment à séquencer est utilisé comme matrice lors de la synthèse nucléotidique réalisée par une ADN polymérase. Le brin complémentaire de l'ADN matrice est synthétisé à partir de l'extrémité 3'OH de l'amorce appariée, en présence de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs) et de didésoxyribonucléotides triphosphates (ddNTPs) portant quatre fluorochromes différents. Les ddNTPs, analogues structuraux des dNTPs et deshydroxylés en 3', sont des terminateurs de chaîne. Ainsi, l'incorporation d'un ddNTP dans la chaîne nucléotidique lors de l'élongation entraîne l'arrêt de l'extension de la séquence. Le pool d'oligonucléotides néo-synthétisé est ensuite séparé en fonction de la taille par électrophorèse capillaire. Il devient alors possible de déterminer pour chacun des quatre fluorochromes utilisés la taille des fragments obtenus et d'en déduire la séquence nucléotidique du fragment analysé.

2.4.2.2. Protocole expérimental du clonage

Dans le cas des échantillons issus des microcosmes CTRL, BAL, NEREIS et NEREIS+BAL (0-2cm), les produits de PCR ont été obtenus pour les 6 réplicats. Ils ont ensuite été poolés afin de réaliser l'étape de clonage. Les banques réalisées sur le temps T 2 jours sont quant à elles issues des produits de PCR de 12 échantillons, autrement dit un échantillon de chaque bac a été traité (pour les quatre conditions).

Conception de la banque de clones

Afin de constituer des banques de clones, les produits de PCR excisés puis purifiés sont insérés dans le vecteur de clonage. Pour ce faire, deux kits de clonage ont été utilisés: le kit TOPO TA Cloning® (Invitrogen), et le kit pGEM®-T-Easy Vector System (Promega). Dans le premier cas, le produit de PCR est inséré dans le vecteur de clonage pCR®-2.1-TOPO® qui est activé par une topoisomérase I permettant la ligation du produit de PCR. Dans le second cas, les produits de PCR sont insérés dans le vecteur p-GEM et la ligation se fait sous l'action d'une ligase.

Les bactéries compétentes sont ensuite transformées avec le produit de ligation. Les clones ayant intégré le plasmide recombinant sont sélectionnés sur milieu solide Luria Bertani LB (Tryptone, 10 g.L⁻¹ ; extrait de levure, 5 g.L⁻¹ ; NaCl, 5 g.L⁻¹), ampicilline, 100 µg.mL⁻¹ ; IPTG, 40 µg.mL⁻¹ et X-gal, 40 µg.mL⁻¹ selon le test blanc/bleu de la β-galactosidase. Enfin, l'insert des clones recombinants pris au hasard est amplifié en réalisant la réaction de PCR directement sur les cellules bactériennes pour chaque clone avec les amorces M13F et M13R situées sur le plasmide et entourant l'insert d'ADN (cf. paragraphe 2.3.2.). Les étapes de PCR utilisées sont les suivantes : 15 min à 94°C, 35 cycles de 3 étapes (45 sec à 94°C, 45 sec à 54°C, 1 min à 72°C) puis 10 min à 72°C. La taille et la quantité d'insert amplifié ont été contrôlées par électrophorèse sur gel d'agarose à 1 %.

Profils de restriction (RFLP)

Dans certains cas, les produits de PCR obtenus à partir des clones ont été analysés grâce à la technique de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). La digestion enzymatique est utilisée afin d'étudier le polymorphisme des séquences des différents échantillons. Des digestions enzymatiques par deux ou trois enzymes de restriction ont été réalisées successivement afin de mettre en évidence la diversité génétique des inserts. Environ 100 ng des différents produits de PCR purifiés sont soumis à des digestions enzymatiques par différentes endonucléases de restriction (Table II-3, paragraphe 2.4.1.2.) selon les recommandations des fournisseurs (New England Biolabs, Promega). L'hydrolyse est réalisée dans le tampon réactionnel préconisé par le fournisseur avec 3 unités d'enzymes. Une incubation de 3 heures est réalisée à la température optimale d'activité des enzymes utilisées. Les produits de digestion ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 3 % dans du TBE 1X (Tris base, 90 mM ; Acide borique, 90 mM ; EDTA, 2.5 mM, pH 8.3) pendant 3 h à 90 V. La présence de BET à 0,5 µg.mL⁻¹ dans le gel a permis de visualiser l'ADN digéré sous lumière UV.

2.4.2.3. Séquençage

Les produits PCR des inserts étaient directement envoyés à GATC Biotech SARL (Konstanz, Germany).

2.5. Quantification par PCR en temps réel

2.5.1. Principe de la 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 générée 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-PCR quantitative).

2.5.2. Génération d'un standard externe pour la quantification par PCR en temps réel

Le standard consiste en une solution titrée d'ADN ou d'ADNc amplifiés par PCR selon les conditions décrites précédemment avec 1µL d'ADN et les mêmes amorces que celles utilisées pour quantifier le fragment. Les produits PCR ont été purifiés à l'aide du kit commercial *illustra™ GFX™ PCR DNA and gel band purification kit* (GE healthcare) puis clonés comme décrit plus haut (cf. paragraphe 2.4.2.2.) Enfin, un clone recombinant a été ensemencé dans du LB liquide avec de l'ampicilline à 100 µg.mL⁻¹. Les plasmides recombinants ont ensuite été extraits à l'aide du kit S.N.A.P. Miniprep Kit (Invitrogen) à partir de 3mL de culture. Après linéarisation du plasmide, la quantité d'ADN plasmidique en solution a été dosée avec le kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Les mesures ont été réalisées sur un appareil de PCR en temps réel Mx 3005P™ (Stratagene).

Confection d'un standard pour la quantification de l'ADN

Le nombre de copies du gène ciblé est ensuite déterminé à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Nombre de copies (molécules / } \mu\text{l)} = \frac{\text{Concentration d'ADN (g/}\mu\text{l)}}{\text{Taille du plasmide (pb)} \times \text{MM}} \times A$$

Où A est le nombre d'Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$) mol⁻¹ et MM, la masse molaire (considérant que le poids moyen d'une paire de base est de 650 Daltons)

Ainsi, la gamme standard peut être générée par dilution de l'ADN plasmidique.

Confection d'un standard pour la quantification des ADNc

Pour la quantification d'ADNc, il est nécessaire de confectionner une gamme standard d'ADNc. De ce fait, une transcription *in vitro* est réalisée sur l'ADN plasmidique avec le kit MEGAscript® T7 Kit (Ambion) selon les recommandations du fournisseur. L'ARN obtenu est ensuite quantifié avec le kit Quant-iT™ RiboGreen® RNA Reagent and Kits (Invitrogen), et le nombre de copies du gène ciblé est déterminé à l'aide de la même formule énoncée plus haut excepté que MM= 340 Daltons. Enfin, une transcription inverse est réalisée à partir de l'ARN synthétisé (dont le nombre de copies est connu), et des dilutions des produits de RT (ADNc) sont réalisées pour la confection de la gamme standard.

2.5.3. Amplification en temps réel

Les quantifications ont été effectuées sur un appareil de PCR en temps réel Mx 3005P™ (Stratagene) dans un volume final de 25µL contenant 1µL d'ADN matriciel ou 10ng d'ADNc, le mélange enzymatique Power SYBR® green PCR master mix (Applied Biosystem, 2X) à une concentration finale de 1X et les amorces à des concentrations dépendant du couple utilisé (Table II-4). Les amplifications ont été précédées d'une étape de dénaturation initiale (10min à 94°C), puis 40 cycles selon 3 étapes : dénaturation (1 min, 94°C), l'hybridation des amorces à la température d'hybridation (Tableau II-4, 20 sec) et une élongation (30 sec, 72°C). Le SYBR Green est un agent intercalant de l'ADN double brin qui excité à 492nm émet de la fluorescence à 515nm mesurée par l'appareil à la fin de l'étape d'hybridation. Une courbe de fusion des produits de PCR obtenus a été réalisée à la fin de chaque amplification. Pour cela une rampe de température de 55°C à 95°C est effectuée durant laquelle la fluorescence est mesurée tout le long.

Les résultats obtenus par PCR en temps réel ont été analysés à l'aide du logiciel MxPro™ QPCR software (Stratagen). La pureté des produits de PCR a été vérifiée (i) par

l'observation d'un seul et unique pic de fusion après analyse des courbes de fusion (courbe de dissociation) des amplicons réalisées à la fin de chaque PCR en temps réel, et (ii) par la présence d'une seule bande de taille attendue par analyse sur gel agarose 1% ou 3% selon la taille de l'amplicon. Cette deuxième étape est nécessaire étant donné que les séquences ciblées proviennent d'une communauté microbienne complexe et peuvent donc diverger dans leur composition. Ainsi, on peut observer deux pics distincts sur la courbe de dissociation obtenue à l'étape (i) et ne visualiser qu'un seul amplicon à l'étape (ii). Enfin, l'absence d'ADN dans les échantillons d'ARN a été vérifiée par Q-PCR sur le gène codant l'ARNr 16S.

Tableau II-4 : Caractéristiques des différentes couples d'amorces utilisées en PCR quantitative lors de notre étude.

Gène ciblé et amorces	Séquence (5'-3')	Température d'hybridation (°C)	Taille de l'amplicon (pb)	Références
ARNr 16S bactérien				
338F	ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG	55	180	(Park and Crowley, 2006)
518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG			
dsrB				
DSRp2060F	CAA CAT CGT YCA YAC CCA GGG	55	350	(Geets et al., 2006)
DSR4R	GTG TAG CAG TTA CCG CA			(Wagner et al., 1998)
alkB				
alkB 2F	CAY GAR YTG GGY CAY AA	50	414	(Paisse et al., 2011)
alkB 1R	AAC TAY NTY GAR CAY TAC GG			

Y= C/T ; K= G/T ; R= A/G ; B= C/G/T ; M= A/C ; D=A/G/T ; V= A/C/G ; H= A/C/T

3. TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE

3.1. Milieux de culture

3.1.1. Milieux de culture aérobie

3.1.1.1. Milieu minimum

La composition du milieu de culture utilisé pour les cultures réalisées en aérobie est, en g.l⁻¹ d'eau distillée : KCl, 0,75; NH₄Cl, 0,00265; NaCl, 24 ; CaCl₂.2H₂O, 1,47 ; MgSO₄.7H₂O, 6,64 ; MgCl₂.6H₂O, 3,895 ; NaCl, 20. Après stérilisation du milieu à l'autoclave, plusieurs solutions sont rajoutées : Na₂CO₃ (0,265 g.l⁻¹), 100 µl de tampon phosphate (Composition précisée ci-dessous), 1 ml des solutions de vitamines V7 (Pfennig

and Trüper, 1992), de solution d'oligo-éléments SL12 (Overmann et al., 1992). Le pH du milieu a ensuite été ajusté à 7,0-7,5.

Tampon phosphate (q.s.p. 1 L d'eau distillée) :

K_2HPO_4 , 6,24 g et KH_2PO_4 , 1,92g. La solution est stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes.

3.1.2.2. Milieux riches

Marine Broth

De la peptone ($5g.l^{-1}$) ainsi que de l'extrait de levure ($1g.l^{-1}$) sont ajoutés au milieu minimum contenant les solutions SL12 et V7.

Milieu GYM

La composition du milieu de culture est : Glucose ($4 g.l^{-1}$), extrait de levure ($4 g.l^{-1}$) et extrait de malt ($10 g.l^{-1}$).

Milieu TSB

Le milieu Trypticase Soy Broth a été préparé à partir d'une poudre commerciale à raison de $30g.l^{-1}$.

Nutrient Broth

La composition du milieu de culture est : Glucose ($1 g.l^{-1}$), peptone ($15 g.l^{-1}$), chlorure de sodium ($6 g.l^{-1}$), extrait de levure ($3 g.l^{-1}$).

3.1.1. Milieux de culture anaérobie

3.1.1.1. Milieu minimum

La composition du milieu de culture utilisé pour les cultures réalisées en anaérobiose est, en $g.l^{-1}$ d'eau distillée : KH_2PO_4 , 0,2; NH_4Cl , 0,3; $NaCl$, 24 ; $MgCl_2.6H_2O$, 4,46 ; KCl , 0,5 ; $CaCl_2.2H_2O$, 0,15. Après stérilisation du milieu à l'autoclave, plusieurs solutions sont rajoutées : $Na_2S.9H_2O$ ($0,3g.l^{-1}$), $NaHCO_3$ ($1,5 g.l^{-1}$), 1 ml des solutions de vitamines V7 (Pfennig and Trüper, 1992), de solution d'oligo-éléments SL12 (Overmann et al., 1992) et de sélénite-tungstate de sodium (Widdel and Bak, 1992) (Composition précisée ci-dessous). Le pH du milieu a ensuite été ajusté à 7,3-7,5.

Ce milieu de culture a été préparé dans une fiole de Widdel (Figure II-7). Après stérilisation à l'autoclave à 120°C (20 min), ce milieu a été directement refroidi sous N_2/CO_2 (90/10). Le milieu a été distribué dans des flacons type pénicilline préalablement stérilisés à l'autoclave. Ces récipients ont ensuite été fermés hermétiquement avec un bouchon téflonné maintenu par une capsule d'aluminium, puis gazé au N_2/CO_2 .

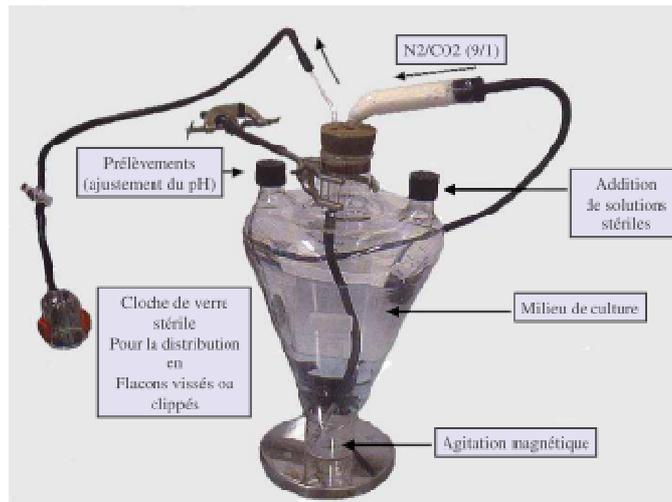


Figure II-7 : Fiole de Widdel utilisée pour la préparation et la distribution des milieux en anoxie.

Solution d'oligo-éléments SL12 (q.s.p. 1 L d'eau distillée) :

EDTA, 3,0 g ; FeSO₄.7H₂O, 1,1 g ; CoCl₂.6H₂O, 190 mg ; MnCl₂.2H₂O, 50 mg ; ZnCl₂, 42 mg ; NiCl₂.6H₂O, 24 mg ; Na₂MoO₄.2H₂O, 18 mg ; H₃BO₃, 300 mg ; CuCl₂.2H₂O, 2 mg. La solution est stérilisée à l'autoclave à 121°C pendant 20 minutes, puis stockée à l'obscurité.

Solution de vitamines V7 (q.s.p. 1 L d'eau distillée):

biotine, 2 mg ; *p*-aminobenzoate, 10 mg, thiamine, 10 mg ; pantothénate, 5 mg ; pyrodoxamine, 50 mg, vitamine B12, 20 mg ; nicotinate, 20 mg. La solution est stérilisée par filtration (membrane filtrante de porosité 0,2 µm) et stockée à l'obscurité.

Solution de sélénite tungstate (q.s.p. 1 L d'eau distillée):

NaOH, 0,4 g ; Na₂SeO₃, 5H₂O, 6 mg ; Na₂WO₄, 8 mg. La solution est stérilisée à l'autoclave (120°C, 20 minutes).

3.1.1.2. Milieux minimum supplémentés

- Pour la mise en culture de pétrole, le milieu minimum décrit ci-dessus a été supplémenté avec un cocktail de substrats : lactate (2 mM), pyruvate (2 mM), butyrate (2 mM), acétate (2 mM), méthanol (2 mM), extrait de levure (0,05 g.l⁻¹).
- Dans certains cas, un milieu mixte constitué de LB et de milieu minimum a également été utilisé.

3.2. Préparation des cultures d'enrichissement

3.2.1. A partir des sédiments issus des microcosmes

Des cultures d'enrichissement (aérobie et anaérobie) ont été réalisées à partir de sédiment collecté dans chacun des microcosmes contaminés au pétrole (BAL et NEREIS+BAL) au temps final de l'incubation (270 jours). Les prélèvements (3 pour chaque condition) ont été mélangés, puis, un slurry a été préparé dans du milieu minimum. Ce slurry a été inoculé (10% v/v) dans des flacons pénicillines contenant du milieu de culture minimum. Les hydrocarbures testés (Figure II-8) ont été rajoutés à raison de 100 mg.l⁻¹ final, excepté l'indénopyrène dont la concentration finale s'élevait à 2,5 mg.l⁻¹. Lorsque deux hydrocarbures étaient ajoutés, leur concentration respective était de 50 mg.l⁻¹.

Les hydrocarbures testés ont été choisis (i) en fonction des connaissances actuelles des voies de dégradation (peu connues), (ii) pour leur persistance dans l'environnement (haut poids moléculaires) (Figure II-9). Des repiquages successifs (10% v/v) ont été réalisés dans le but d'éliminer la matière organique présente au sein du sédiment et de ce fait sélectionner des communautés hydrocarbonoclastes.

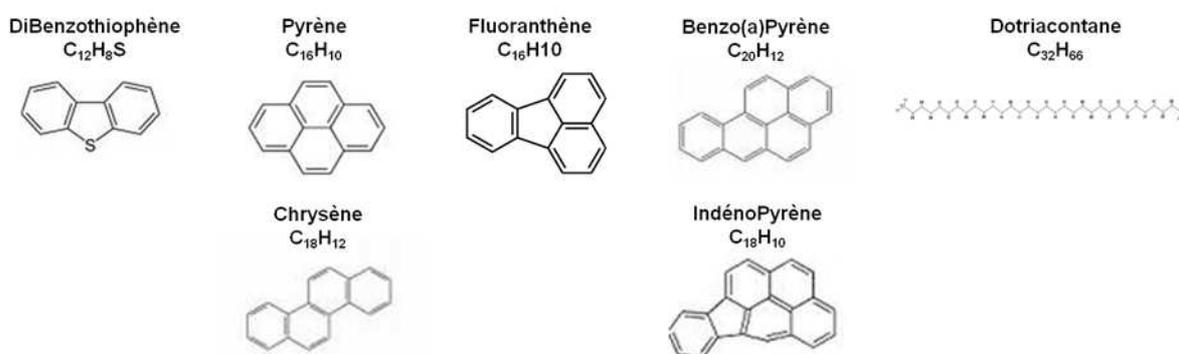


Figure II-8 : Formules des différents hydrocarbures utilisés dans cette étude pour les cultures d'enrichissement.

3.2.1.1. Cultures d'enrichissement aérobies

Les cultures ont été incubées à 30°C, sous agitation (250 rpm). Les différentes sources de carbone utilisées sont: (1) dibenzothiophène, (2) benzo(a)pyrène, (3) indénopyrène, (4) indénopyrène + pyrène, (5) benzo(a)pyrène + pyrène, (6) dibenzothiophène + fluoranthène. Les repiquages ont été réalisés d'après des observations microscopiques des cultures, ainsi que l'observation de trouble dans le milieu. Les hydrocarbures testés ont été rajoutés à raison 100 mg.l⁻¹ comme indiqué précédemment.

3.2.1.2. Cultures d'enrichissement anaérobies

Ces cultures ont été réalisées en présence de différentes sources de carbone : (1) dotriacontane, (2) dibenzothiophène, (3) chrysène, (4) pyrène, (5) fluoranthène, (6) chrysène + pyrène + fluoranthène.

Les flacons ont été fermés hermétiquement avec un bouchon butyl maintenu par une capsule d'aluminium, puis gazés au N₂ / CO₂. Ces cultures ont été réalisées en condition de sulfato-réduction, dénitrification et fermentation par ajout, respectivement, de sulfate (SO₄²⁻, 20 mM), nitrate (NO₃⁻, 20 mM) et sans d'accepteur d'électron. Les cultures ont été incubées à température ambiante dans l'obscurité sans agitation. Les repiquages ont été réalisés en fonction de la consommation de nitrate (dénitrification), de la production de sulfure (sulfato-réduction) ou de la production de gaz (fermentation) qui ont été suivi tout le long de l'incubation à intervalles réguliers.

3.3. Isolement de souches pures

3.3.1. Isolement de souches aérobies

3.3.1.1. En milieu solide sélectif

Des isolements de souches aérobies hydrocarbonoclastes ont été entrepris en milieu solide à partir des cultures d'enrichissement réalisées. Une gélose à 40 g.l⁻¹ a été lavée trois fois à l'eau MilliQ afin d'éliminer les impuretés, puis stérilisée (20 min, 121°C). Du milieu minimum stérile (2X) est ajouté à volume équivalent, puis le milieu gélosé (20 g.l⁻¹) est coulé en boîte de Pétri. Après solidification du milieu, des solutions d'hydrocarbures préparées dans de l'acétone (100 mg.l⁻¹) ont été étalées à la surface du milieu afin d'obtenir une fine couche de cristaux à la surface. Après évaporation de l'acétone, 1 ml des différentes cultures d'enrichissement sont étalés sur la couche d'hydrocarbures formée.

3.3.1.2. En milieu riche solide

L'isolement de souches aérobies en milieu riche a été réalisé dans un milieu mixte (LB-milieu minimum) gélosé par la méthode des cadrans. Les boîtes ont été incubées à 30°C. Après 48h d'incubation les colonies présentant des morphologies distinctes ont été repiquées en milieu liquide (LB-milieu minimum).

3.3.2. Isolement de souches anaérobies

Un mélange composé d'une gélose (40 g.l⁻¹) préalablement lavée à l'eau distillée avant d'être autoclavées (20mn à 121°C) additionnée de milieu minimum stérile (2X) (volume équivalent) a été préparé puis placé sous gaz (N₂/CO₂). Les différents accepteurs d'électrons ont été ajoutés à raison de 20mM de sulfate et de nitrate. Des milieux sans accepteur d'électrons ont également été confectionnés pour la condition de fermentation. Le milieu gélosé (20 g.l⁻¹) est ensuite coulé en boîte de Pétri. Après solidification du milieu, des solutions d'hydrocarbures préparées dans du dichlorométhane (100 mg.l⁻¹) ont été étalées à la surface du milieu afin d'obtenir une fine couche de cristaux à la surface. 1 ml issu des cultures d'enrichissement ont été étalés sur la couche d'hydrocarbure. Les boîtes ont ensuite été incubées dans une jarre anaérobie préalablement gazée au N₂/CO₂. Les jarres ont été placées dans une étuve à 30°C, jusqu'à obtention de colonies sur la gélose. Les cubes de gélose contenant les colonies ont été prélevés sous la loupe binoculaire à l'aide d'un scalpel stérile. Ils ont ensuite été remis en culture (liquide) en tube Hungate préalablement gazé (N₂/CO₂), dans du milieu minimum supplémenté de l'hydrocarbure correspondant.

3.3.3. Contrôle de la pureté d'une souche et conservation

Afin de vérifier qu'une culture est effectivement axénique, outre l'examen microscopique en contraste de phase, des ensemencements en conditions oxiques et anoxiques en milieu riche sont réalisés. Les souches sont conservées à -80°C, à partir d'une culture dense en phase exponentielle, avec ajout de glycérol stérile à une concentration finale de 30 % (v/v). Pour la conservation des bactéries anaérobies, le glycérol stérile employé est au préalable dégazé sous atmosphère N₂/CO₂. De même, les flacons de culture (tubes Hungate) sont de nouveau dégazés, après addition de glycérol, sous atmosphère N₂/CO₂ (90/10, v/v). Puis, les cultures sont transvasées dans des cryo-tubes, placées 30-45 minutes au réfrigérateur (4°C) avant stockage à -80 °C.

3.4. Identification des souches

L'identification des souches isolées a été réalisée par galerie API, examen macro-et microscopique des caractères morphologiques, coloration de Gram et par séquençage du gène codant l'ARNr 16S.

3.5. Criblage des souches

3.5.1. Par profil génotypique : RFLP

Une amplification du gène codant l'ARN 16S a été réalisée directement sur colonie, puis des digestions enzymatiques sont réalisées successivement avec 2 enzymes de restriction selon les recommandations des fournisseurs sur l'amplicon (New England Biolabs, Promega) (Tableau II-3). L'hydrolyse a ensuite été réalisée selon le protocole décrit plus haut. Les profils obtenus sont classés par génotype (profils) et permettent ainsi de discriminer les souches entre elles.

3.5.2. Sur la base d'une activité

3.5.2.1. Criblage à l'INT des souches hydrocarbonoclastes

3.5.2.1.1. Principe

Les sels de tétrazolium, comme l'INT (2-(p-Iodophényl)-3(p-nitrophényl)-5-phényl tétrazolium chloride), sont des indicateurs de l'activité déshydrogénase. Ces enzymes participent à la respiration et témoignent donc d'une activité cellulaire. L'INT détourne les électrons issus de l'activité déshydrogénase et est réduit en un composé coloré (rouge), le formazan. Cet outil fournit un bon criblage de la croissance des souches bactériennes sur hydrocarbures et peut être réalisé en microplaque permettant ainsi le traitement rapide de nombreuses souches (Haines et al., 1996 ; Johnsen et al., 2002).

3.5.2.1.2. Protocole expérimental

Afin d'obtenir de la biomasse, une pré-culture des différents isolats aérobies a été réalisée en milieu LB (Luria-Bertani) (48h, 30°C, 250 rpm). Après incubation, 1 ml de la pré-culture est centrifugé (10 min, 8000 g), puis le culot cellulaire est lavé avec le milieu minimum décrit plus haut. Au total, trois étapes de lavages successifs ont été réalisées et le culot cellulaire est finalement resuspendu dans 100 µl de milieu minimum. 20 µl des solutions stock d'hydrocarbures préparées dans de l'hexane (5mg.ml⁻¹) ont été déposés au fond des puits de la microplaque. Après évaporation de l'hexane, 200 µl de milieu minimum et 10 µl de l'inoculum préparé ont été ajoutés dans chaque puit. La microplaque a ensuite été incubée pendant 10 jours à 30°C. La perte de volume a été surveillée et en cas d'évaporation du milieu, de l'eau stérile a été rajoutée. Au bout de 10 jours d'incubation, 50 µl de p-iodonitrotétrazolium violet (INT) (2,5 g.l⁻¹) préparé dans du milieu minimum et stérilisé par

filtration, a été rajouté dans chaque puit. La lecture est faite visuellement à plusieurs temps par rapport aux conditions contrôle (voir ci-dessous): lecture immédiate, après 5h, 12h et 24h. Une réponse positive est indiquée par un précipité rouge (Figure II-9).

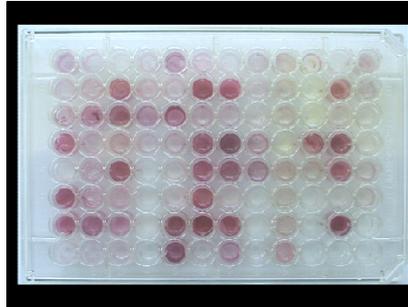


Figure II-9 : Observation de précipités rouges dans les puits après ajout d'INT

Des puits contrôle ont également été réalisés en parallèle afin d'éviter les faux positifs ou les faux négatifs:

- milieu LB + inoculum afin de vérifier la croissance de la souche testée,
- milieu LB sans inoculum afin de vérifier les conditions de stérilité,
- milieu minimum sans inoculum afin de vérifier l'absence d'interaction entre le milieu et l'INT,
- milieu minimum sans inoculum+ hydrocarbures pour vérifier l'absence d'interaction entre l'hydrocarbure et l'INT,
- milieu minimum + inoculum sans hydrocarbure.

3.5.2.2. Criblage des bactéries dénitrifiantes

3.5.2.2.1. Principe

Ce criblage est basé sur l'alcalinisation du milieu provoquée par la réduction des nitrates ou des nitrites. Un indicateur de pH coloré permet de mettre en évidence ce phénomène (Mazoch and Kučera, 2002).

3.5.2.2.2. Protocole expérimental

200 μ l des cultures ont été prélevés et déposés en microplaque. Une solution de bleu de bromothymol (indicateur coloré) est ajoutée à raison de 10 μ l d'une solution à 5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. La lecture du test est immédiate. Le bleu de bromothymol est un indicateur de couleur verte à pH neutre, jaune dans des conditions acides et bleu dans des conditions alcalines. Un virage à

la couleur bleue est un résultat positif (Figure II-10). En parallèle, le milieu sans inoculum (incubé dans les mêmes conditions) a été testé.

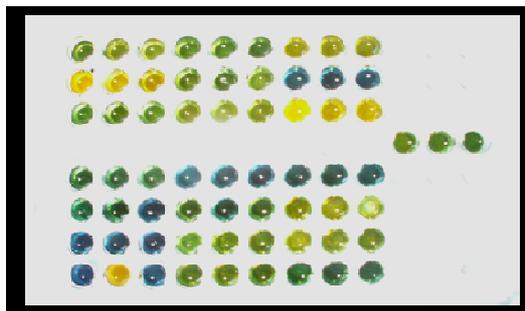


Figure II-10 : Visualisation du changement de pH grâce au virage du BBT (bleu : pH alcalin ; jaune : pH acide).

4. TECHNIQUES DE DOSAGES CHIMIQUES ET BIOCHIMIQUES

4.1. Dosage des hydrocarbures

Les tests de dégradation pour les consortiums ainsi que pour les souches isolées sur les différents hydrocarbures utilisés (pyrène, fluoranthène, chrysène, dibenzothiophène et dotriacontane) ont été réalisés en triplicat. L'étalon interne utilisé pour ce dosage est l'heptaméthylnonane ou HMN ($C_{16}H_{34}$). La quantité introduite est fonction de la quantité d'hydrocarbure initiale afin d'obtenir une concentration finale de HMN similaire à celle de l'hydrocarbure. Le solvant utilisé pour extraire l'hydrocarbure est le dichlorométhane (10 ml pour 30 ml de culture). Les flacons additionnés de dichlorométhane-HMN sont inclinés à l'horizontal et agités (table agitante, 250 rpm, 20 min) . La phase organique est prélevée à l'aide d'une pipette pasteur et est introduite dans des flacons à chromatographie. Les analyses ont été réalisées avec un chromatographe en phase gazeuse (GC Agilent Technologies) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme ($290^{\circ}C$) et d'une colonne capillaire (30 m x $320\ \mu m$ x $0,25\ \mu m$) contenant une phase stationnaire du type HP-5. La température de l'injecteur était de $280^{\circ}C$ et le volume d'échantillon injecté était de $1\ \mu l$. Deux programmes ont été utilisés en fonction de l'hydrocarbure dosé (Tableau II-5 (A) et (B)).

Le programme (A) a été utilisé pour le dosage du dibenzothiophène, du chrysène, du pyrène et du fluoranthène, le programme (B), pour le dotriacontane. Le gaz vecteur employé était l'hélium avec un débit de $2\ ml \cdot min^{-1}$. Une courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant des rapports [hydrocarbure]/[HMN] croissants allant de 0,64 à 1,91.

Tableau II-5 (A) programmes utilisé pour le dosage des hydrocarbures aromatiques ; (B) programme utilisé pour le dosage du dotriacontane.

(A)			(B)		
	°C / min	Température (°C)		°C / min	Température (°C)
		150			60
rampe 1	15	300	rampe 1	20	180
		150	rampe 2	10	280
			rampe 3	4	300
					60

4.2. Dosage des sulfures

4.2.1. Principe

Le dosage des sulfures a été réalisé selon la méthode de Cline (1969) afin d'évaluer l'activité de sulfato-réduction dans les divers inocula. Ce dosage est basé sur la formation de bleu de méthylène engendré par l'association de deux molécules de diméthyl-p-phénylène diamine (DMPD) par un pont sulfure en présence de chlorure de fer qui fait office de catalyseur (Cline, 1969).

4.2.2. Protocole

L'échantillon (20 µl) a été prélevé stérilement et injecté dans 480 µl d'acétate de zinc à 2% (m/v) (20 g d'acétate de zinc, 1 ml d'acide acétique, q.s.p. 1 l d'eau distillée) qui permet de piéger les sulfures (par formation de sulfure de zinc). Le dosage colorimétrique est réalisé en ajoutant les réactifs suivants : 200 µl de DMPD à 0,2% (m/v) (2 g de 4-amino-n,n-diméthylaniline sulfate ($C_8H_{12}N_2 \cdot H_2SO_4$), 200 ml d'acide sulfurique concentrée, qsp 1 l d'eau distillée), 10 µl de chlorure de fer à 10% (m/v) puis 200 µl d'eau distillée. Après vingt minutes de réaction, l'absorbance de la solution colorée a été déterminée avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 670 nm. Le blanc a été préparé en ajoutant 20 µl du milieu de culture à la place de l'échantillon. La concentration en sulfures a été déterminée par calcul à l'aide d'un étalon, le sulfure de sodium ($Na_2S \cdot 9H_2O$) à des concentrations connues. La limite de détection de cette méthode est de 10 µM.

4.3. Dosage des nitrates

4.3.1. Principe

Les nitrates peuvent nitrer le cycle aromatique de l'acide salicylique en présence d'acide sulfurique concentré. En milieu basique, le composé nitré obtenu présente une coloration jaune intense avec un maximum d'absorption à 413 nm. Dans le cas où l'acide salicylique est utilisé en excès, cette absorption est proportionnelle à la concentration initiale en nitrate.

4.3.2. Protocole

L'échantillon (100 µl) a été prélevé stérilement et ajouté à 400 µl de réactif (50 ml d'acide sulfurique + 0,25 g d'acide salicylique). Au bout de 20 minutes de réaction, 9,5 ml de soude 2N ont été rajoutés et l'absorbance de la solution colorée a été déterminée avec un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 413 nm. Le blanc a été préparé en ajoutant 100 µl du milieu de culture à la place de l'échantillon. La concentration en nitrate a été déterminée par calcul à l'aide d'une solution étalon de nitrate de potassium (KNO₃), à des concentrations connues.

5. TRAITEMENT DES RESULTATS

5.1. Analyse des données T-RFLP

5.1.1. Obtention de la matrice de données

Les profils obtenus pour chacun des réplicats par l'analyse de T-RFLP sont tout d'abord nettoyés manuellement (élimination des « faux » pics caractérisés par une forme mal définie et un étalement visible du signal). Les profils sont ensuite exportés en une matrice de données intégrant pour chaque échantillon l'abondance (hauteur du pic, soit son intensité en unités de fluorescence) des pics détectés (T-RFs identifiés selon leur taille en pb). Certains pics mal identifiés (épaulement, double pic, etc.), dont la taille diffère de moins de 1 pb, ont été associés et leurs intensités de fluorescence sommées. Seuls les pics d'une intensité supérieure à 30 unités de fluorescence (bruit de fond) ont été considérés. Pour minimiser les artefacts liés à différentes quantités d'ADN injectées en électrophorèse capillaire, les données ont été normalisées en divisant l'intensité de fluorescence de chacun des pics (*I_i*) par l'intensité total du signal.

Cette étape est réalisée de la manière suivante :

$$pi = li / \sum_{i=1}^R li$$

où li est l'intensité du pic i , pi est l'intensité normalisée du pic i , et R le nombre total de pics.

Les variations liées à l'efficacité des PCR ont ensuite été minimisées en éliminant les T-RFs présentant une intensité de fluorescence relative inférieure à 0,5% ($pi < 0,005$). L'ensemble de ces manipulations permet d'obtenir une matrice de données avec comme premières variables (colonnes) les indices de migration (tailles des fragments en pb) des T-RFs et les différents échantillons comme secondes variables (lignes). L'ensemble de ce tableau croisé dynamique est ensuite utilisé pour des analyses statistiques.

5.1.2. Traitement des réplicats

Dans le cadre de l'expérimentation en microcosmes, six réplicats par condition ont été obtenus à chaque temps (deux prélèvements par microcosme, soit six réplicats au total pour chaque traitement : CTRL, BAL, NEREIS et NEREIS+BAL). Un profil T-RFLP a été généré pour chacun de ces échantillons, puis les profils issus du même microcosme (réplicat d'échantillonnage) ont été moyennés, générant alors trois profils par condition. Chacun de ces profils « synthétiques » tient donc compte de la variabilité retrouvée dans les microcosmes.

5.1.3. Pré-traitement des données

En fonction du jeu de données, différents pré-traitements (ou aucun traitement) a été appliqué aux données :

- Lorsque les quantités d'ADN injectées au séquenceur n'ont pas pu être standardisées, le traitement de Dunbar a été appliqué. Il consiste à ramener l'intensité de fluorescence de tous les échantillons à la même valeur (Dunbar et al., 2001).
- Lorsqu'une trop grande variabilité entre les trois profils générés a été observée (principalement due à l'absence/présence de certains T-RFs), les T-RFs présents que dans un seul des profils ont été éliminés. Ce dernier pré-traitement a également été appliqué dans le cadre des expérimentations réalisées sur les cultures d'enrichissement.

5.2. Analyse phylogénétique des séquences

5.2.1. Détection des structures chimériques

Le traitement des séquences brutes a été réalisé à l'aide du logiciel *Sequencher v4.1.4*. Les séquences codant pour l'ARN ribosomique 16S ont été vérifiées avec les programmes Mallard et Pintail (Ashelford et al., 2005 ; , 2006) pour déterminer d'éventuelles séquences hybrides générées par PCR. L'amplification par PCR peut générer des chimères, c'est-à-dire des séquences artéfactuelles produites au cours de l'amplification. Ces chimères doivent être détectées et filtrées avant les analyses phylogénétiques. Le principe utilisé pour la détection de chimères est celui des plus proches voisins. Une séquence chimère correspond à la fusion de plusieurs séquences. Ainsi, lorsque l'on compare une chimère avec un ensemble de séquences, on s'attend à retrouver plusieurs matches, distants phylogénétiquement, qui vont obtenir un bon score d'alignement avec différentes parties de la séquence chimère.

5.2.2. Identification et alignement

Les séquences traitées sont comparées avec celles présentes dans la banque de données GenBank database du National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) grâce à l'outil d'alignement *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul et al., 1997). Cette étape permet l'identification de la séquence par homologie avec des séquences connues. Un alignement multiple du jeu de séquence obtenu et incluant des séquences externes (meilleurs BLASTs) a été réalisé avec Clustal X.2 (Thompson et al., 1997) puis ajustés à la taille de la séquence nucléotidique la plus courte. Une analyse par le logiciel MEGA4 (Tamura et al., 2007) a permis de générer une matrice de distance élaborée par comparaison des séquences d'ADN (ou ADNc) selon la méthode de *Neighbor-joining* (Saitou and Nei, 1987). Cette matrice est ensuite représentée sous forme d'un arbre phylogénétique. Des analyses de *bootstrap* avec 1000 itérations ont été effectuées pour vérifier la robustesse des arbres. Les séquences obtenues ont été déposées dans les banques de données DDBJ/EMBL/GenBank (voir numéros d'accèsion dans chacun des chapitres de résultats).

5.3. Analyse des données de PCR quantitative

De la même manière que l'analyse T-RFLP, dans le cas de l'expérimentation en microcosme, la quantification du nombre de copies de gènes a été réalisée sur les six réplicats pour chaque condition (N=3 x 2). Par conséquent, les données acquises pour chaque microcosme (N=2) ont été moyennées générant ainsi, trois valeurs. Les résultats sont

exprimés en copies de gènes par ng d'ADN afin de d'obtenir des valeurs indépendantes de l'efficacité d'extraction des acides nucléiques.

6. ANALYSES STATISTIQUES

6.1. ANOVA

Après avoir vérifié la normalité des données (test de Kolmogorof-Smirnov), ainsi que l'homogénéité des variances (test de Levène) le test paramétrique ANOVA a été utilisé pour comparer les échantillons. Dans certains cas, les données ont nécessité une transformation (racine carrée, $\log+1$) pour atteindre ces conditions. Des comparaisons multiples ont ensuite été effectuées à l'aide de tests post-hoc qui ont été choisis en fonction du jeu de données. Le test de Tukey a été préférentiellement utilisé lorsque les données ont pu être normalisées par des réplicats d'échantillonnage (N=6) (cf. paragraphe 1.2.2.). A contrario, un test moins sévère, le test de Duncan, a été appliqué lorsque cette normalisation n'a pas été possible (N=3). C'est le cas, par exemple des analyses des composés du pétrole dans les microcosmes. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel Statistica (Statsoft).

6.2. Test de Mantel

Les corrélations existant entre des matrices de similarité ont été évaluées à l'aide du test de Mantel. Cette corrélation est testée statistiquement en comparant le coefficient de corrélation obtenu à la distribution des coefficients de corrélation calculés à partir de matrices théoriques générées aléatoirement en permutant les données initiales (5000 permutations aléatoires de lignes et colonnes). La distance de Bray-Curtis a été utilisée pour les profils générés par T-RFLP (matrice initiale exprimées en abondance relatives) et la distance Euclidienne a été choisie pour les données obtenues par PCR quantitative ou les données du type hydrocarbures (abondance absolue). Les analyses ont été réalisées à l'aide de la fonction mantel du package « vegan » à l'aide du logiciel R.

6.3. Calculs d'indices de diversité (diversité α)

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 les plus utilisés dans cette étude sont la richesse spécifique et l'indice de Simpson.

La richesse spécifique

C'est l'indice de biodiversité le plus simple, il rend compte du nombre d'individus d'une espèce présents au sein de la communauté.

L'indice de Simpson

Il mesure la probabilité que deux individus sélectionnés au hasard appartiennent à la même espèce, selon l'équation:

$$D = \sum Ni (Ni-1) / N (N-1)$$

Où Ni représente le nombre d'individus de l'espèce donnée et N, le nombre total d'individus.

L'indice de diversité de Simpson représenté par 1-D (utilisé dans notre étude), à une valeur maximum de diversité représenté par la valeur 1, et le minimum de diversité par la valeur 0. Cet indice de diversité donne plus de poids aux espèces abondantes qu'aux espèces rares. Le fait d'ajouter des espèces rares à un échantillon, ne modifie pratiquement pas sa valeur.

6.4. Calculs d'indices de similarité (distances, diversité β)

L'indice de Bray-Curtis a été utilisé lors des calculs des matrices de distance. C'est une méthode robuste et fiable couramment appliquée pour exprimer des relations en matière d'écologie ou des sciences de l'environnement. Elle tient compte de l'abondance des différentes espèces et est calculé comme suit :

$$S_{jk} = 100 \left\{ 1 - \frac{\sum_{i=1}^n |y_{ij} - y_{ik}|}{\sum_{i=1}^n (y_{ij} + y_{ik})} \right\}$$

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 auront une similarité de 100% alors que des échantillons radicalement différents, 0%.

Dans le cas de données binaire (présence / absence =1 / 0), c'est l'indice de Jaccard qui a été utilisé, il est calculé comme suit :

$$S_{jk} = 100 [a / (a+b+c)]$$

a = est le nombre d'espèce présent l'échantillon,

b = le nombre d'espèces présent dans l'échantillon j mais absent de l'échantillon k ,

c = le nombre d'espèces présent dans l'échantillon k mais absent de l'échantillon j .

6.5. Analyses statistiques des banques de gènes

6.5.1. Analyse de raréfaction:

C'est une méthode statistique qui permet d'estimer le nombre d'espèces présentes dans un sous-échantillon pris au hasard à partir d'un échantillon donné. A partir du nombre d'individus de chacune des espèces dénombrées dans l'échantillon, il est possible de calculer une série d'estimations du nombre d'espèces présentes ($E[S]$) dans des sous échantillons de nombre d'individus (n) plus petit que l'échantillon d'origine. La méthode de raréfaction permet de générer une courbe dite courbe de raréfaction. L'allure de cette courbe donne des indications sur le taux d'accumulation de l'abondance relative de chacune des espèces présentes tout au long de leur échantillonnage. Il est ainsi possible de contrôler l'effet de la taille d'un échantillon sur le nombre d'espèces observées. Dans le cas des banques de clones, l'analyse de raréfaction peut être appliquée afin d'estimer si un nombre suffisant de clones a été analysé pour estimer la diversité de la banque. Lors de notre étude, les analyses de raréfaction ont été effectuées avec le programme PAST (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>).

6.5.2. Recouvrement de la banque de clones :

La valeur de recouvrement (C , *coverage value*) d'une banque de clones permet d'estimer l'efficacité d'exploitation de la banque. Autrement dit, plus cet indice est proche de la valeur 1, plus les clones analysés sont représentatifs de la banque. Cette valeur a été calculée à partir de l'équation $C = 1 - (n1/N)$ où $n1$ représente le nombre de clones représentés une seule fois dans une banque de N clones (Good, 1953).

6.5.3. Comparaison de deux banques de clones (analyse LIBSHUFF) :

L'analyse LIBSHUFF (LIBrary SHUFFling, (Singleton et al., 2001)) permet de comparer deux banques de clones afin de déterminer si elles sont significativement différentes l'une de l'autre. Cette analyse utilise un indice ΔC de comparaison entre deux banques ; plus cet indice sera important, plus les deux banques sont différentes. Les analyses LIBSHUFF ont été réalisées à l'aide du programme `[-LIBSHUFF` obtenu à l'adresse <http://www.bio.umass.edu/micro/schloss/software/slibshuff/>.

6.5.4. Détermination du nombre d'unités opérationnelles taxonomiques (OTUs)

A l'aide d'une matrice de distance décrivant les distances génétiques existant entre les différentes séquences, les séquences sont assignées à des OTUs (Operational taxonomic units) selon différents niveaux phylogénétiques (par exemple à 3% pour les séquences codant

l'ARNr 16S). Cette analyse a été réalisée avec le programme DOTUR (Distance based OTU and Richness taxonomix) (Schloss and Handelsman, 2005) afin de déterminer le nombre d'OTUs de chaque banque. Ainsi, les séquences ont tout d'abord été alignées avec le logiciel Clustal X.2 et les distances ont été calculées par le programme DNAdist disponible sur le portail Mobylye (<http://mobylye.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py>) (Rice et al., 2000). La matrice de distance générée a ensuite été utilisée avec le programme DOTUR.

6.3. Analyses statistiques des données T-RFLP

6.3.1. Représentation des données

L'analyse statistique des données vise tout d'abord à obtenir une représentation graphique lisible de la répartition des différents échantillons en fonction des similitudes de leurs profils T-RFLP. Plus les profils T-RFLP présenteront des caractéristiques respectives similaires (abondances relatives des différents T-RFs détectés), plus les échantillons respectifs pourront être considérés comme proches au niveau de leur biodiversité. Pour ces analyses statistiques, les logiciels Primer 6 version 6.1.6, MVSP version 3.13 et R (fonction isoMDS, package « MASS ») ont permis de représenter graphiquement la répartition des échantillons sous forme de dendrogrammes, ou de Multidimensional Scaling (MDS).

6.3.1.1. Analyse multivariée

L'analyse multivariée Multidimensional Scaling (MDS) 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. Son objectif principal est de représenter, de façon aussi fidèle que possible, les relations entre des objets situées dans un espace à n dimensions et la proximité entre les objets reflétant leur similarité. Les distances utilisées sont celles de Bray-Curtis.

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. Les valeurs de stress fournies par le programme R donnent une valeur de stress multipliée par 10.

Le MDS n'est pas une projection au sens classique, mais une recherche de placement optimal sous contrainte de dimension et est considéré comme une technique robuste.

L'utilisation du logiciel R a permis d'introduire des ellipses de confiance basée sur la variabilité existant entre les réplicats (fonction `ordiellipse`). Le niveau de confiance traditionnellement utilisé est de 95%, autrement dit, l'ellipse générée autour des échantillons indique que la communauté a 95% de chance d'occuper cet espace. La configuration en MDS permettant de visualiser directement les distances existant entre les différents profils, si les ellipses de deux communautés présentent des espaces communs, elles ne peuvent être distinguées l'une de l'autre.

6.3.1.2. Analyse de classification hiérarchique: dendrogramme

Cette méthode de classification est destinée à produire des groupements décrits par un certain nombre de variables ou caractères. Elle procède en fait à la construction de classes par agglomération successive des objets deux à deux, jusqu'à obtention d'un seul groupe hiérarchique. Tout d'abord, une matrice de similarité est générée, et les deux objets montrant la plus forte similarité sont groupés ensemble. Ce groupe est alors considéré comme un seul objet. La matrice de similarité est à nouveau calculée et la plus forte similarité entre deux objets est à nouveau recherchée. Ce procédé sera réitéré jusqu'à l'obtention d'un seul et unique groupe.

6.3.2. 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 traitements expérimentaux (dans notre cas, le temps et les traitements appliqués) (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 inter-groupes divisée par la somme des carrés des distances intra-groupes (Anderson, 2005). Cette analyse a été réalisé avec la fonction `adonis` du package « `vegan` » du logiciel R.

CHAPITRE III

STRUCTURE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES EN REPONSE A UNE CONTAMINATION PETROLIERE DANS DES SEDIMENTS BIOTURBES

CHAPITRE III: Structure des communautés bactériennes en réponse à une contamination pétrolière dans des sédiments bioturbés

1. INTRODUCTION

En raison de l'importance des micro-organismes dans les processus de restauration des écosystèmes, de nombreuses études ont été entreprises afin de comprendre les processus impliqués. Face à des contaminations pétrolières simulées, ils ont largement démontré leur efficacité. Cependant les connaissances acquises en milieux marins côtiers, les plus touchés par cette pollution, restent limitées. De plus, la plupart des études réalisées ne tiennent pas compte des interactions biotiques existant dans un écosystème et pouvant influencer sur l'activité microbienne et par conséquent sur la biodégradation.

La macrofaune benthique, qualifiée d'ingénieur de l'écosystème, est connue pour son activité bioturbatrice au sein des sédiments. L'effet de ces organismes sur la colonne sédimentaire a été largement étudié. Leur présence, source d'hétérogénéité dans les sédiments, affecte leur environnement et donc les métabolismes ainsi que la structure des communautés microbiennes. Ils représentent donc une composante importante de l'écosystème marin en intervenant largement dans les processus écosystémiques tels que les processus de restauration de l'environnement.

Actuellement, peu d'informations sont disponibles sur la réponse des communautés bactériennes face aux hydrocarbures pétroliers en milieu bioturbé, pourtant, ces organismes peuvent être retrouvés en forte abondance dans certains écosystèmes côtiers. Afin de mieux adapter les stratégies de bio-réhabilitation de ces environnements, il est primordial de s'interroger sur l'impact qu'auront ces organismes sur l'atténuation naturelle des hydrocarbures: Vont-ils modifier les processus de dégradation microbiens ? La diversité microbienne? Si oui, dans quelle mesure ? Et enfin quelles sont les répercussions sur l'écosystème étudié ?

Afin de répondre à ces questions, une étude en microcosmes de 270 jours (9 mois) a été entreprise à partir de sédiments marins. Une vasière a été choisie comme écosystème modèle et un dispositif expérimental reproduisant les cycles de la marée a été conçu dans le but de se rapprocher au plus des conditions environnementales. Quatre conditions ont été simulées : une contamination pétrolière par ajout de pétrole, la bioturbation par bio-augmentation en polychaetes (*Hediste diversicolor*), la synergie de ces deux facteurs, ainsi qu'un contrôle.

Lors de cette étude, la dégradation du pétrole a été estimée en suivant la disparition des hydrocarbures et du vanadium au sein des sédiments durant 270 jours. Le vanadium a été utilisé ici comme un indicateur de modifications chimiques du pétrole. L'activité de remaniement sédimentaire liée à la macrofaune a été estimée grâce à l'utilisation de fluorochromes. La dynamique des communautés bactériennes totales et métaboliquement actives a été décrite à l'aide d'outils moléculaires couramment utilisés en écologie microbienne (i.e. extraction d'ADN / ARN, RT-PCR, T-RFLP). Nous nous sommes basés sur l'étude du gène codant l'ARNr 16S *Bacteria*, un marqueur universel. La communauté bactérienne active a également été caractérisée en fin d'incubation afin de comprendre les processus de restructuration liés à cette réponse. Enfin, cette étude a été complétée par une description relative de la structure de la communauté hydrocarbonoclaste exprimant le gène *alkB* impliqué dans la dégradation aérobie des alcanes.

Cette étude est issue de la collaboration des différents partenaires du projet DHYVA, elle est présentée sous forme d'un article soumis pour publication dans la revue *Applied and Environmental Microbiology*.

2. PUBLICATION 1: Impact of crude oil on bacterial community structure in bioturbated sediments

Magalie Stauffert¹, Cristiana Cravo-Laureau¹, Ronan Jézéquel², Philippe Cuny³, Franck Gilbert^{4,5}, Cécile Militon³, David Amouroux⁶, Fatima Mahdaoui⁶, Brice Bouyssiére⁴, Georges Stora³, François-Xavier Merlin², Robert Duran^{1*}

¹*Equipe Environnement et Microbiologie, Université de Pau et des Pays de l'Adour, IPREM UMR CNRS 5254, BP 1155, 64013 Pau Cedex, France, robert.duran@univ-pau.fr*

²*CEDRE, 715 rue Alain Colas, CS 41836, 29218 Brest Cedex 1, France*

³*Laboratoire de Microbiologie, Géochimie et Ecologie Marines UMR CNRS 6117, Centre d'Océanologie de Marseille, Université de la Méditerranée, Campus de Luminy, BP 901, 13288 Marseille Cedex 9, France*

⁴*Université de Toulouse ; UPS, INP ; EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle) ; 29 rue Jeanne Marvig, F-31055 Toulouse, France*

⁵*CNRS ; EcoLab ; F-31055 Toulouse, France*

⁶*Equipe Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, IPREM UMR CNRS-UPPA 5254, Technopole hélioparc, 2 avenue Pierre Angot, 64053 PAU Cedex 9, France*

Keywords: bacterial community structure / bioturbation / BAL 110 oil / marine sediments / *Hediste diversicolor*

Running title: Bacterial communities in bioturbated oiled-sediments

Cette étude, présentée sous forme d'article, a été soumise dans la revue *Applied and Environmental Microbiology*

ABSTRACT

Burrowing macrofauna, playing a role in the transfer of nutrients and contaminants into the sediments, can modify the microbial metabolisms and affect the fate of contaminants. With a multidisciplinary approach, we studied the impact of oil on microbial activities in bioturbated marine coastal sediments. An original experimental device was setup to simulate the tidal cycles with natural seawater in order to mimic environmental conditions. After 270 days, although the addition of *Hediste (Nereis) diversicolor* induced the burying of oil in deeper layer, 60% of hydrocarbons were removed irrespective of the addition of *H. diversicolor*. The characterization of the bacterial communities, at both genomic and transcriptional levels, by 16S rRNA-T-RFLP and 16S rRNA libraries analyses showed an effect of the treatment (oil, Nereis, Nereis+oil) on the bacterial community structure and composition as well as on its dynamics. Under uncontaminated conditions, the bacterial community structure was modified by the addition of *H. diversicolor*, increasing bacterial diversity with a characteristic “Gamma shift”, sequences related to *Gammaproteobacteria* being the more abundant. From the oil-contaminated microcosms two distinct bacterial communities, showing similar degradation capacities, were found depending on the addition of *H. diversicolor*. Both bacterial communities were dominated by *Gammaproteobacteria* with a pronounced “Gamma shift” also observed when *H. diversicolor* was added. The second most abundant sequences were related to *Deltaproteobacteria* affiliated to bacterial groups involved in sulfur cycle, including sulfur-oxidizing, sulfur- and sulfate-reducing bacteria. However, both bacterial communities harboured different phylotypes related to potential hydrocarbonoclastic bacteria highlighting the influence of reworking activity on the bacterial community functioning.

2.1. Introduction

Estuaries and coastlines are important biological niches due to their large productivity and biodiversity. These complex and dynamic ecosystems are fragile and often impacted by anthropogenic activities (54). Hydrocarbon compounds especially polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), are among the most toxic, persistent and abundant contaminants in these zones where they tend to accumulate in the sediments (13). As a consequence, the coastlines, and particularly the muddy areas constitute pollutant reservoirs that are threats for the ecosystem and the human health as well. The biodegradation of hydrocarbons by microorganisms is a crucial mechanism by which petroleum and other hydrocarbon pollutants are eliminated from the environment (39). Recently, several studies have demonstrated that the impact of oil hydrocarbons on microbial communities involves complex mechanisms (48, 49) that are dependent on the contamination history (11, 52, 66) resulting in the selection of hydrocarbonoclastic microorganisms (34, 65).

The fate of hydrocarbons in the environment is not only dependent on microbial activities, but also on sediment characteristics, physical-chemical factors (electron acceptors, temperature), nutrients, cometabolites availability, and bioturbation (8). The benthic macrofauna which physically mix sediments and introduce oxygen into sediments by burrow ventilation greatly affects the biogeochemical cycles of nutrients, contaminants and microorganisms (7). Several studies have demonstrated that bioturbation processes play an important role in the burial and the degradation of oil hydrocarbons (25), PAHs (15) and acyclic hydrocarbons (31). In addition, polychaetes have the enzymatic potential to solubilise aromatic compounds (42, 43). Burrowing activity can also affect the overall microbial metabolic activities such as the nitrifying (56) and the sulfate-reducing activities (32, 45). It has been shown that the increase of the microbial abundances and activities is due to complex biogeochemical interactions induced by bioturbation (33, 37, 40). In addition, specific bacterial patterns due to bioturbation activities have been reported in presence of hydrocarbons (18).

The aim of the present study was to determine how oil affects the bacterial community structure and composition in bioturbated mud sediments. An original microcosm system maintaining the structure of muddy sediments under tidal cycles was setup. A set of chemical and microbial analysis was performed over a nine month period to follow i) the degradation of petroleum by estimating hydrocarbon content and vanadium release ii) the macrofaunal reworking activity and iii) the bacterial communities structures and composition at genomic

and transcriptional levels. This multidisciplinary approach, combined with multivariate analyses, provided new insight on the behaviour of bacterial communities in response to oil addition in bioturbated sediments.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Sampling area

Mud sediments for microcosm experiments were collected in autumn 2007 at the tidal basin Aber-Benoît, located in Brittany region (Treglonou, France, 48° 33'12.40"N; 4° 32'8.69"W).

This sediment showed a pH 7.8 with an organic carbon content of 6.8% and a salinity of 35‰. The sediment moisture content was 60% and chemical analysis detected about 4 mg of biogenic hydrocarbons per gram of dry sediment in upper layer of sediment (2 cm). Sediments were composed by 3% clay (<3.9 microns), 31% silt (3.9-62.5 microns) and 66% sand (62.5-2000 microns). Density and characterization of autochthonous macrofauna was performed from three cores collected on the sampling site. Four different species were found and average density of macrofauna was estimated to $2419 \pm 6.08 \text{ ind.m}^{-2}$, polychaetes *Hediste* (*Nereis*) *diversicolor* density reaching 509 ind.m^{-2} corresponding to 61 g.m^{-2} .

2.2.2. Microcosms setup

Sediments were collected carefully with core collector to maintain the sediment structure, and then transferred over geotextile membrane on microcosm boxes (65 cm x 50 cm x 41 cm; approximately 30 L of sediment). Twelve microcosm boxes were setup and connected with a device supplying natural, sand filtered and UV-treated seawater from Oceanopolis aquarium (Brest, France) ensuring constant sea water quality. Tidal cycles (12 hours) were applied using a water level control consisting on 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 (Figure III-1). After 7 days of sediment stabilization, BAL 110 oil (Arabian Light crude oil topped at 110°C) and *Hediste* (*Nereis*) *diversicolor* were added in microcosms in order to simulate oil pollution and to magnify sediment reworking respectively. Four conditions were applied in triplicate (N=12) as follows: (i) CTRL: control condition, (ii) BAL: oil addition, (iii) NEREIS: addition of *H. diversicolor* and (iv) NEREIS+BAL, addition of oil and *H. diversicolor*. The 2 cm upper layer of each box was collected, pooled and homogenized. This

mixture was spread over the sediment surface (2 cm layer). For the contaminated conditions (BAL and NEREIS+BAL), the mixture contained 25.6 mg of BAL 110 oil per gram of wet sediment. For the conditions where *H. diversicolor* was added (NEREIS and NEREIS+BAL), the initial biomass of *H. diversicolor* was increased 10 fold (addition of 614 g.m⁻² i.e. 982 ind.m⁻²). Two hours after the reintroduction of the surface layers and of the polychaetes the tidal cycle was initiated. Samples of sediment were further collected after 2, 7, 30, 90, 180 and 270 days of incubation (November 2007 - July 2008). For chemical analyses, one core sample (Falcon tube, 2.5 cm x 8 cm) was collected for each microcosm (triplicates per condition). For molecular analyses, superficial samples (0-2 cm, Eppendorf tube, 2 mL) were collected in duplicate for each microcosm (sampling replicate). Thus, six replicates per condition at each sampling time were obtained. The sub-samples 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 quickly frozen in liquid Nitrogen and stored at -80°C until analyze.

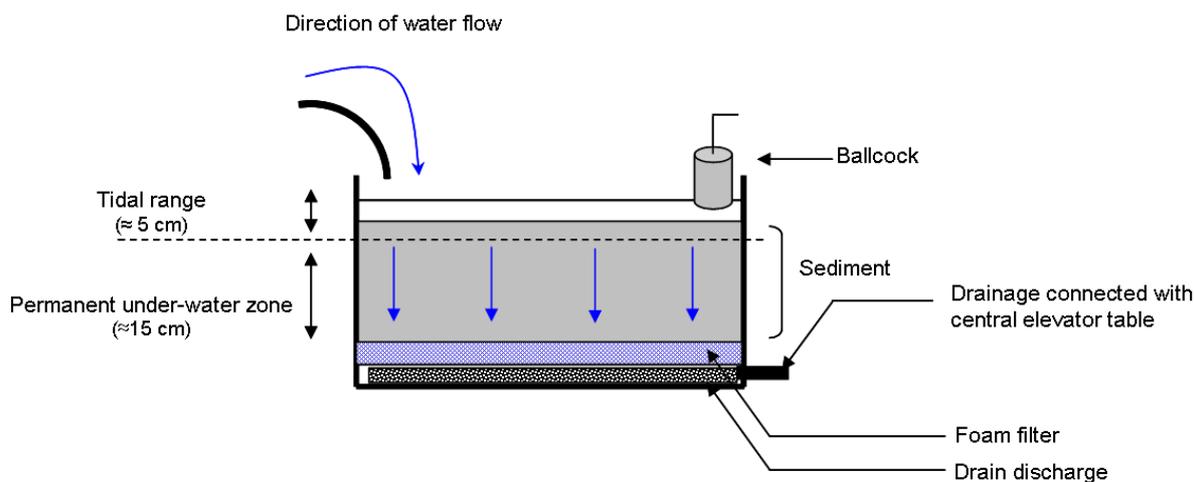


Figure III-1: Microcosms' box design. Sediments were maintained in such microcosm box and submitted to 12 hours tidal cycles renewing seawater at each tidal cycle.

2.2.3. Hydrocarbons extraction and analysis

Prior to analyses, each core of sediment were divided into four layers (0-2 / 2-4 / 4-6 / 6-8 cm). Each layer was then split for determination of moisture content (50°C for 24 hours), total petroleum hydrocarbons (TPH) concentrations and alkanes / aromatics analyses.

Sediment samples were spiked with deuterated aliphatic (d₄₂-eicosane) and aromatic hydrocarbons (d₈-naphthalene, d₁₀-biphenyl, d₁₀-phenanthrene, d₁₂-chrysene and d₁₂-

benzo(a)pyrene) surrogate standard (LGC standard, France) and then extracted with 30 mL methylene chloride at 100°C and 2000 psi for 14 min in a Dionex ASE 200 accelerated solvent extractor. Extractions of sediment were performed twice for each sample. Organic extracts were dried over Na₂SO₄ (activated at 400°C during 4 hours) and concentrated until approximately 2 mL using a Syncore (Büchi, Germany). Extracts were fractionated using SPE (Solid Phase Extraction) cartridge (silica/cyanopropyl (SiO₂/C3-CN; 1.0/0.5g, 6 mL; Interchim, France) (4). Saturate and aromatic fractions were eluted simultaneously with 8 mL of methylene chloride/pentane (80:20, v/v) and concentrated to approximately 2 mL.

TPH were analysed according to NF EN ISO 9377-2 using high temperature gas chromatography with a flame ionization detector (HTGC/FID) HP 6890N equipped with an auto sampler. 1 µL of samples was injected in purged splitless mode (splitless time: 2 minutes, flow: 50 mL/min) at 425°C. The initial oven temperature was 30°C, then increased at 20°C per minute 1 minute after injection to a final temperature of 415°C, then held for 30 minutes. The metallic chromatographic column was a DBHT-SIMD (Agilent J&W): 5m x 0.53 mm ID x 0.15 µm film thickness. The helium carrier gas was maintained at a constant flow of 15 mL/min. Different concentrations of BAL 110 diluted with methylene chloride were used to calibrate the method and then to quantify the TPH extracted from the sediment samples.

Alkanes and aromatics were quantified using a gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). The GC was an HP 6890N 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: 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm film thickness. The GC was coupled to an HP 5973 Mass Selective Detector (MSD) (Electronic Impact: 70 eV, voltage: 1200V). n-Alkanes and PAHs semi-quantifications were done by 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.

Data statistical analyses were performed with STATISTICA software, version 5.5 (StatSoft, USA). The TPH concentrations were tested by two-way analysis of variance (ANOVA) in order to investigate the effects of time (T), condition with or without added *H. diversicolor* (C), and their interaction (T x C) on the TPH contents of the experimental boxes. Prior to statistical analysis, homoscedasticity was assessed by Hartley's Fmax test. Significant

differences between paired means were determined using the multiple-range comparison test of Duncan. The significance level was set at $\alpha = 0.05$.

2.2.4. Vanadium extraction and analysis

During incubation, the vanadium content associated to the oil fraction of the sediment samples (residual oil fraction) was extracted following 5 subsequent liquid-solid extractions with xylene (ACS grade from Sigma-Aldrich). For each extraction 2 g of contaminated sediment was mixed with 2 ml of xylene, exposed to ultra sound for 2 h and finally centrifuged (30 min, 3000 g). The supernatant was filtered (0.2 μm) before analysis, while the solid residue followed a subsequent extraction step as described above.

The vanadium content of this extract was analyzed by microFIA ICP MS as previously described (12, 26). The total Vanadium concentration in BAL110 was $23 \pm 2 \mu\text{g/g}$.

2.2.5. Reworking activity

Sediment reworking activity in the different experimental boxes was estimated using fluorescent particulate tracers (luminophores; (23)). One hour after the introduction of *H. diversicolor* into the NEREIS and NEREIS-BAL boxes, a suspension of 100 g of orange luminophores (63-125 μm) was homogeneously spread over the sediment surface of each experimental box. At the end of the experiment, one sediment core (I.D.: 10 cm, length: 15 cm) was sampled from each experimental box. Each core was then sectioned in 0.5-cm thick layers from the surface down to 2 cm depth, and in 1-cm thick layers down to 10 cm. The sediment from each layer was removed separately and sieved through a 250 micrometer mesh to remove macrofauna from sediment particles. Sediments were then freeze-dried, gently crushed to powder and homogenized. Sediment subsamples were taken for counting of luminophore under UV-light (digital camera Olympus C-2500L; image analysis software Image-Pro Plus). An one-dimensional diffusion model allowed describing luminophore transport (biodiffusion-like coefficient D_b ; (50)).

2.2.6. Total DNA isolation of microbial communities

DNA was extracted from the 136 samples collected in upper layer of sediment (2 cm, 250 mg) using the UltraClean Soil DNA kit (MoBio Laboratories) according to the manufacturer's recommendations. Protocol was modified as following: sediment was previously centrifuged at $5000 \times g$ for 15 min, to remove water phase; and the initial step of

horizontally vortex was performed during 30 min. DNA was eluted in 50 μ L and stored at -20°C.

2.2.7. RNA isolation and reverse transcription

Total RNA extractions were performed from the 136 samples collected in upper layer of sediment (2 cm, 2 g) using the RNA Power Soil kit (MoBio Laboratories) according to the manufacturer's recommendations. Only RNase-free certified plastic-ware was used and all solutions were prepared with sterile diethyl pyrocarbonate-treated (DEPC) water. DNA was removed from the total nucleic acid extraction by DNase digestion, using Turbo DNA-free™ protocols (Ambion). The complete removal of DNA was verified by a control PCR using primers of bacterial 16S rRNA directly on RNA extract (PCR conditions described below). cDNA was produced by reverse transcription of RNA using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT, USB Corporation) with random hexamers (0.1 U A260, Roche) according to the manufacturer's recommendations. RT products were used immediately for PCR amplifications and the remaining products were stored at -20°C.

2.2.8. Amplification of bacterial 16S rRNA gene

16S rRNA gene was amplified from the 136 nucleic acid samples using the specific primers 63f (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') and 1387r (5'-GGGCGGWGTGTAACAAGGC-3') for *Bacteria* (41). The forward primer was labeled at the 5' end with the phosphoramidite fluorochrome carboxyfluorescein (FAM). PCR conditions were as follows: initial denaturation (94°C for 3 min) followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 30 s), annealing (58°C for 30 s), and extension (72°C for 60 s) and a terminal extension (72°C for 10 min). The reaction mix (50 μ L final volume) contained 50 mM buffer, 0.4 mM dNTP, 0.2 μ M of each primer and 1.25 U of Taq polymerase (Ozyme). PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis and purified with the PCR purification kit (GE Healthcare).

2.2.9. T-RFLP analysis

Purified 16S rRNA amplicons were separately digested by 3U of HaeIII and HinfI restriction enzymes at 37°C (New England Biolabs) in a final volume of 10 μ L for 3h. A desalting step by dialysis was performed using a 0.022 μ filter (Millipore). Then, digested products (1 μ L) were mixed with deionised formamide (10 μ L) and 0.25 μ L of internal size

standard (TAMRA GS-500, Applied Biosystems). Samples were denatured by heating at 95°C for 5 min and then immediately transferred onto ice. Fluorescently labeled fragments were separated and detected with an ABI PRISM 310 capillary sequencer (Applied Biosystems) run under GenScan mode. Injection was performed electrokinetically at 15 kV for 30 s and the runs at 15 kV were completed within 30 min. T-RFLP profiles were analyzed using GENSCAN version 3.1 software (Applied Biosystems). Only terminal fragments showing size ranged from 35 bp to 500 bp and height higher than 30 fluorescence units were considered for analysis.

2.2.10. Statistical comparison of T-RFLP profiles

The T-RFLP profiles were standardized by Dunbar's method (19). Then, raw data were normalized by dividing each peak height by the total signal intensity of the corresponding profile. T-RFLP profiles from sampling replicate (box duplicate) were averaged in order to obtain three profiles per condition (biological replicates, BR). Similarity between BR was estimated using UPGMA method for each condition, at each sampling time. Hierarchical analysis was performed with the average profiles from the three BR profiles, and groups were formed according to similarity obtained between the BR. 2D-MDS (Multidimensional scaling) were also performed with the three BR at each sampling time. Hierarchical clustering and 2D-MDS analysis were performed with Primer 6 software (Primer E, Plymouth, UK).

2.2.11. 16S cDNA library construction and analysis

16S cDNA libraries were obtained with unlabelled PCR products from initial sample (2 days), and at 270 days for the four conditions (CONTROL, NEREIS, BAL, NEREIS+BAL). For T_{2d} library, PCR products were obtained from 12 samples (three replicates per condition, i.e. one replicate per box) and PCR products were pooled. For libraries from T_{270d} samples PCR products were obtained from the six replicates per conditions and pooled before cloning. The PCR products were cloned in *Escherichia coli* TOP10F' using the pCR2.1 Topo TA cloning kit (Invitrogen Inc.). Clones were screened using M13 primers (Eurogentec) surrounding the cloning site. Selected clones were sequenced by GATC Biotech SARL (Konstanz, Germany). The sequences were compared with the GenBank nucleotide database library by BLAST on-line searches (3). The presence of chimeric sequences was checked with Mallard and Pintail tools. The DOTUR program was

used to determine Operational taxonomic units (OTUs) defined as sequence groups in which sequences differed by 3% for *16S rRNA* sequences (57). PAST (PAleontological Statistics v1.60) software was used to perform rarefaction analysis and calculate diversity indexes for each 16S cDNA library. The coverage value is given as $C=1-(n1/N)$ where $n1$ is the number of clones which occurred only once in the library (27) and species richness was calculated with the Chao Estimator website (<http://www2.biology.ualberta.ca/jbrzusto/rarefact.php>) (59). The compositions of bacterial communities were compared by clustering analysis using Pearson's correlation as a similarity distance and a heatmap was drawn with gplots package in R software (62). *In silico* restrictions of clone sequences were performed with mobyle website (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py>) (51).

2.2.12. Nucleotide sequence accession numbers

The sequences determined in this study have been submitted to the Genbank database under accession Nos. JF774416 to JF774826.

2.3. Results

2.3.1. Characterization of the biological reworking activity

The abundance of *H. diversicolor* was maintained all along the experiment, and was not significantly affected by oil addition (NEREIS: 1782 ± 382 ind.m⁻²; NEREIS+BAL: 2334 ± 989 ind.m⁻²; $p=0.26$). Biodiffusion-like coefficients (*Db*) varied with the different experimental conditions. The microcosms in which *H. diversicolor* were added showed higher *Db* (NEREIS: 0.70 ± 0.08 cm².y⁻¹; Mean \pm SD; $n=3$) compared to the other microcosms (*Db* from 0.18 to 0.33 cm².y⁻¹) which was the goal sought by the polychaete addition. Furthermore, this difference was particularly marked in presence of both *H. diversicolor* and oil (NEREIS+BAL: *Db*= 1.07 ± 0.12 cm².y⁻¹; Mean \pm SD; $n=3$), indicating that the reworking activity was enhanced by the oil addition. Furthermore, the luminophore distribution indicated that the most reworking activity was on the top 2 cm (data not shown). We thus analyzed microbial community on the 0-2 cm horizon, considering this luminophore distribution, and because it is the most oxygenated zone where efficient hydrocarbon degradation is expected.

2.3.2. Fate of petroleum compounds

In order to assess the fate of BAL 110 oil, total petroleum hydrocarbon (TPH) content was followed during the 270 days of experiment (Figure III-2A and III-2B). The distribution of TPH content according to the depth pointed out the burrowing activity of *H. diversicolor* (Figure III-2A). Indeed, in polychaetes bioaugmented condition (NEREIS+BAL), a mean of 23% of TPH were extracted from the 2–4 cm layer while they represented only 10% in microcosm without *H. diversicolor* addition (BAL). The increase in macrobenthic population and its related reworking activity clearly allowed a deeper burying of TPH into the sediments.

According to Duncan test, TPH concentration was significantly reduced irrespective of conditions after 90 days of incubation (BAL $p=0.0062$; NEREIS+BAL $p=0.0048$). At the end of incubation, 60% of the initial TPH was removed (data not shown). Considering the 0-2 cm layer (Figure III-2B), 57% of the initial TPH was removed in the BAL condition while 48% was removed in the NEREIS+BAL condition. This result indicated that the main TPH removal was obtained within the 0-2 cm layer.

The fate of BAL 110 oil in the sediment was also assessed by following the release of vanadium from the porphyrin complexes fraction (5). The residual vanadium content (vanadium extracted from the oil fraction of the sediment) decreased after T_{90d} irrespective of the condition (Figure III-2B) in agreement with TPH decrease, while uncontaminated sediment did not exhibit any detectable vanadium. At T_{180d} , the residual vanadium was no more detected testifying the modification of complex hydrocarbons. This result demonstrated that in our experimental conditions vanadium was either released into the medium or no more extractable after six months of incubation.

Focusing on the chemical composition of the biodegradable fraction (*n*-alkanes and PAHs; Figure III-2C), the *n*-alkanes content was reduced from 65% at T_{2d} , to 40 % at the end of experiment, corresponding to more than 80% depletion, while PAHs were depleted approximately two times less. Moreover, the *n*-C₁₈/phytane ratio decreased progressively from T_{90d} (2.2 ± 0.1 for BAL; 2.1 ± 0.2 for NEREIS+BAL) to T_{270d} (1.0 ± 0.1 for BAL; 0.7 ± 0.4 for NEREIS+BAL) with significant differences according to Duncan test (p -value <0.05). This observation indicated that the alkane depletion was due to a biodegradation process since linear alkanes (such as *n*-C₁₈) are more sensitive to microbial degradation than the alkylated (such as phytane) (44).

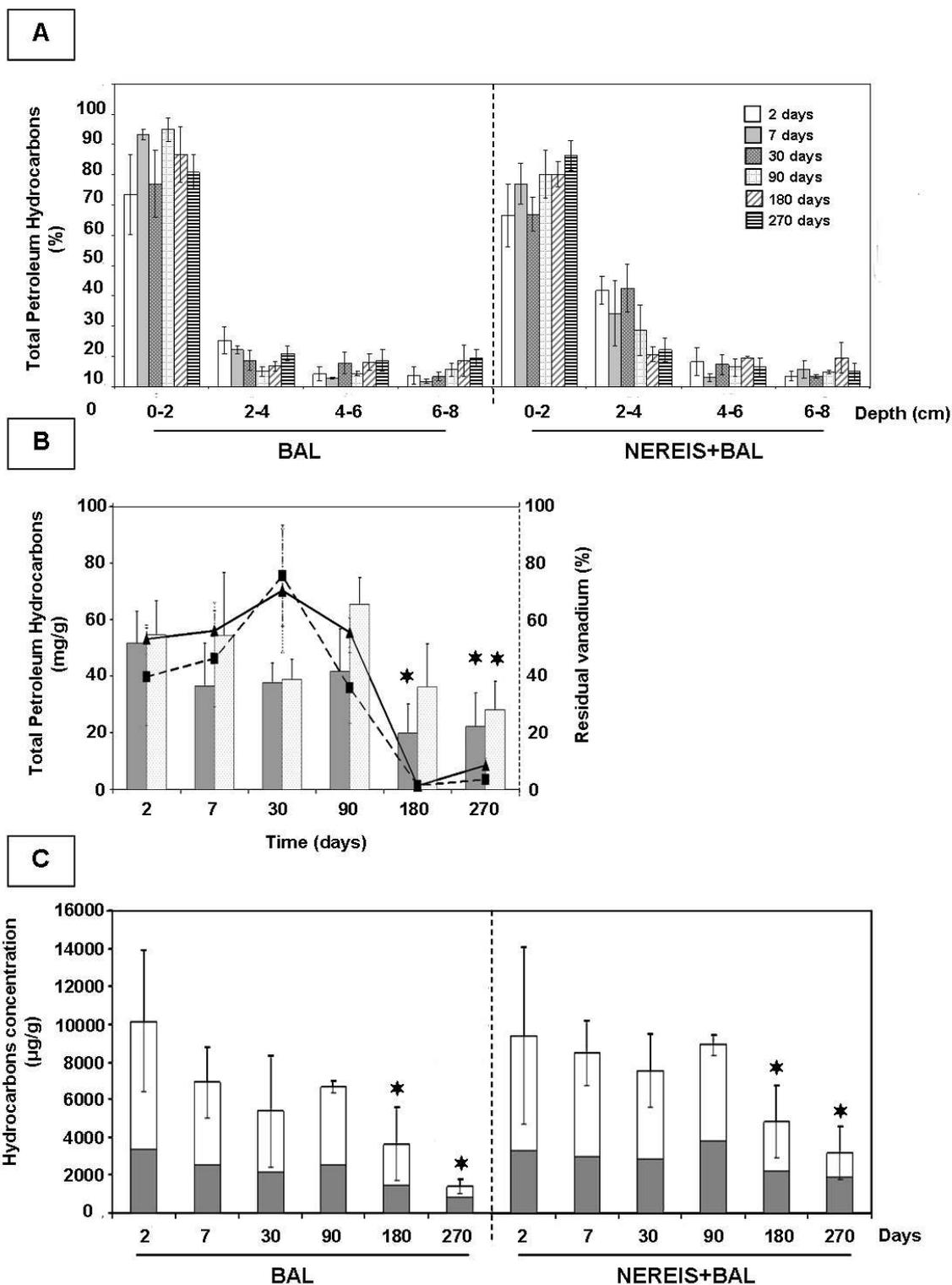


Figure III-2: Chemical analyses of hydrocarbon content in sediments.

A) Depth distribution of relative TPH content (%) in BAL and NEREIS+BAL conditions during the 270 days of experiment. The 100% TPH represents the total TPH per sampling time (addition of all depth). B) Total petroleum hydrocarbons (TPH) content (bars) and residual vanadium in extractable phase (curves) during the 270 days of the experiment for the BAL (grey bar and solid curve) and NEREIS+BAL (dotted bar and dotted curve) conditions. C) Concentration of alkanes (white bar) and aromatics (grey bar) during the 270 days of the experiment for the BAL (left) and NEREIS+BAL (right) conditions (SD were calculated for alkane + PAH). Stars show significant difference obtained by Duncan test (p -value < 0.05) compared to 2 days value.

2.3.4. Dynamic of total and active bacterial communities

Bacterial communities structures were followed by T-RFLP based on 16S rRNA genes and transcripts analyses for all incubation conditions all along the experiment. Analysis of similarity between the replicates revealed the spatial heterogeneity within and between microcosms highlighting the importance of the sampling strategy to obtain representative samples. According to the similarity observed between biological replicates (BR) threshold of 69.9% and 70.3% were applied to determine cluster for rRNA genes and transcripts analyses respectively (Figure III-3A and III-3D). Variability of the BR is shown on MDS analysis (Figure III-3B and III-3C).

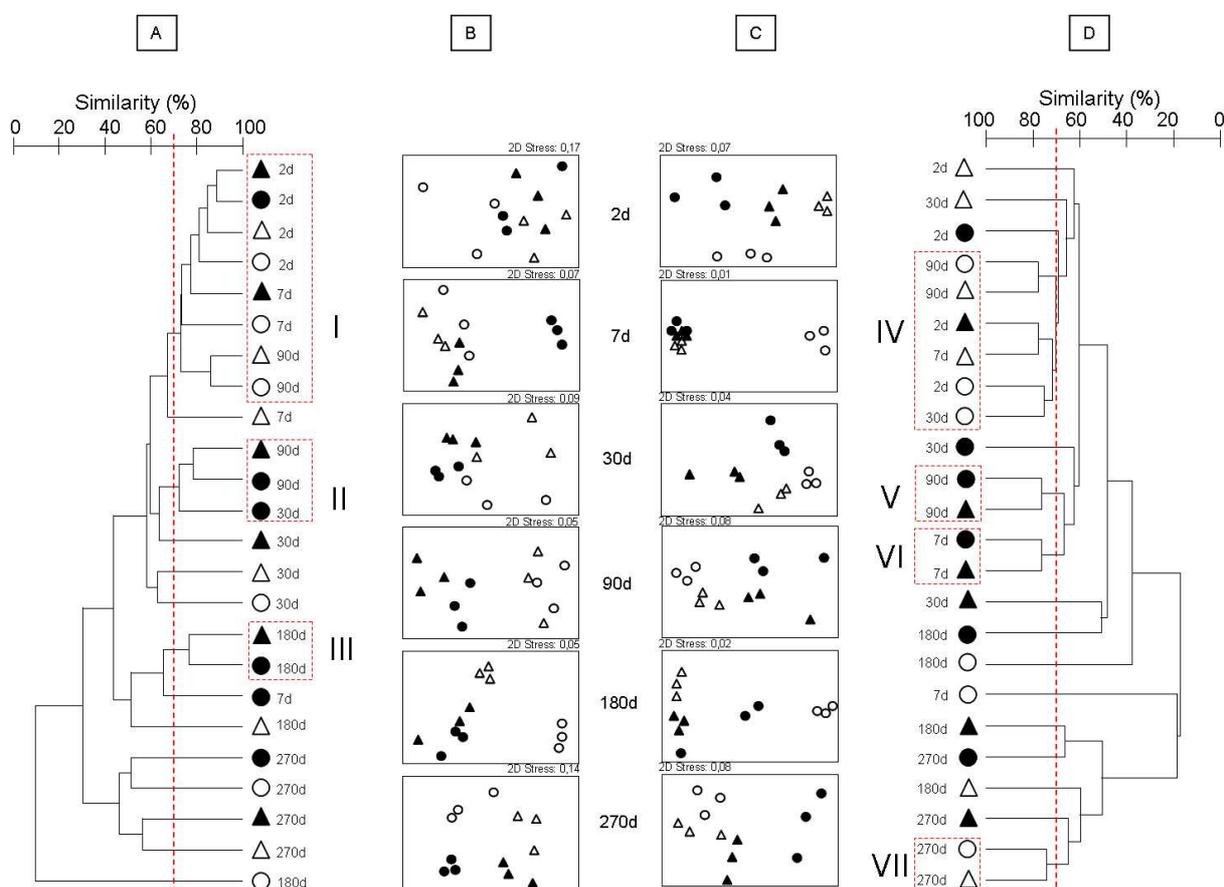


Figure III-3: Bacterial community structure comparisons based on T-RFLP analyses. Changes in total (A and B) and metabolically active (C and D) bacterial community structures during 270 days for the four conditions. Hierarchical analysis (A and D) was performed using the average similarity between replicates. Clusters were formed under 69.9% and 70.3% threshold. MDS analysis (B and C) was performed from the average of the duplicate from each microcosm box. CTRL, white circle; BAL, black circle; NEREIS, white triangle; NEREIS+BAL, black triangle.

The hierarchical clustering analysis (HCA) of total bacterial community (genomic analysis; Figure III-3A) showed the modification of bacterial communities structures (BCS). The HCA revealed the presence of three clusters (Figure III-3A), cluster I containing samples from the beginning of experiment (T_{2d}) irrespective of the experiment conditions, and clusters II and III containing oil-contaminated samples from T_{90d} and T_{180d} respectively. This observation showed that, irrespective of *H. diversicolor* addition, the presence of oil determined differences observed on bacterial community structure. As a consequence, in oil-contaminated microcosms BCS at T_{90d} and T_{180d} were not affected by *H. diversicolor* addition, despite its pronounced effect on BCS in NEREIS treatment (180 days). Nevertheless, in NEREIS and BAL microcosms BCS modifications were observed from the day 7 of incubation, whereas in NEREIS+BAL condition, BCS modification was observed from the day 30. At the end of experiment, specific BCSs were observed for each treatment showing a *H. diversicolor* effect in presence of oil (T_{270d}). Although the predictive identification of T-RFs has to be taken with caution, the *in silico* restriction of the 405 cloned sequences allowed a clear identification at the phylum/class taxonomic level. At T_{180d}, BAL and NEREIS+BAL communities were mainly composed by T-RFs belonging to *Gammaproteobacteria* representing about 45% of the profiles explaining their similarity. The shift between T_{180d} and T_{270d} was characterized by an increase of the relative abundance of T-RFs related to *Bacteroidetes* in NEREIS+BAL community. In contrast, the BAL community was mainly characterized by the presence of T-RFs related to *Gammaproteobacteria*.

At the transcriptomic level (Figure III-3D), the HCA confirmed the BCS shifts observed at the genomic level further highlighting the treatment effects. Nevertheless, in contrast to that observed with genomic analysis, oiled bacterial communities (BAL and NEREIS+BAL) clustered together from the day 2 (Figure III-3D, clusters V and VI) revealing a fast response of bacterial community to oil addition. After 90 days distinct BCS were observed except at T_{270d}, uncontaminated samples (CTRL and NEREIS) forming a cluster (cluster VII). Finally, at the end of experiment (T_{270d}) BCS were clearly distinct from T_{2d}. Furthermore, *in silico* restriction of cloned sequences revealed different taxonomic patterns than those observed at the genomic level, particularly the T-RFs related to *Deltaproteobacteria* that were found at high abundance whereas they were not detected at the genomic level. At T_{180d}, their abundance in BAL community (21.4%) compared to NEREIS+BAL community (2.4%) explained the discrepancies observed between these communities. The NEREIS+BAL community exhibited a higher abundance of T-RFs related to *Gammaproteobacteria* (56.3%) while the abundance of *Alphaproteobacteria* related T-RFs

was similar in both communities. At T_{270d}, the *Alphaproteobacteria* were more abundant in BAL community (19.5%) than in NEREIS+BAL community (2.3%).

2.3.5. Metabolic active bacterial communities composition

In order to characterize the bacterial communities compositions at T_{270d}, 16S cDNA libraries were constructed for each condition. An additional library was constructed with pooled 16S cDNA from samples of all conditions at T_{2d}. The characteristics of the libraries are shown in Table III-1. The coverage of the T_{270d} libraries from 51.4 to 76.4% indicated that the libraries were representative of the most abundant populations. The analysis of 405 complete sequences, representing 207 OTUs (considering 97% similarity threshold), showed that 82.6% of OTUs were found specifically in a condition, which supported the LIBSHUFF library's comparison revealing that the five libraries were composed of significantly different OTUs (P-values between 0.001 and 0.004).

Table III-1: Characteristics of the T_{2days}, CTRL_{270d}, BAL_{270d}, NEREIS_{270d} and NEREIS+BAL_{270d} cDNA clone libraries.

	2 days	270 days			
		CTRL	BAL	NEREIS	NEREIS+BAL
Number of clones	72	88	82	90	73
Number of OTUs	65	41	49	52	44
Chao estimation	288 ± 61.7	85 ± 19	90 ± 16	93 ± 15	64 ± 9
% of coverage	24.6	73.9	63.4	51.4	76.4
Simpson index	0.982	0.953	0.971	0.977	0.965
Shannon index	4.112	3.41	3.726	3.865	3.574

The comparison of the libraries composition at the phylum level highlighted the differences of the bacterial communities (Figure III-4, Table III-2). Sequences related to *Proteobacteria* and *Bacteroidetes* being the more abundant in all libraries except in NEREIS library (T_{270d}) where only *Proteobacteria* (98.6%) and *Nitrospirae* (1.4%) were detected. The other phyla were detected below 5% in all libraries. Among the *Proteobacteria*, the *Gammaproteobacteria* was the most abundant class found especially in the NEREIS library (90.3% of sequences). The *Deltaproteobacteria* were found the second most abundant among the *Proteobacteria*, with similar abundances (20.7% and 22.5%) in the contaminated NEREIS+BAL and BAL libraries while representing only 6.9% in the NEREIS library. Interestingly, in agreement with T-RFLP analyses, the *Alphaproteobacteria* were found the most abundant in the CTRL and BAL libraries (7.9% and 13.4% respectively) while they

represented less than 4% in libraries from microcosms where *H. diversicolor* was present. The *Betaproteobacteria* were found only in the BAL library and one sequence related to the *Zetaproteobacteria* was found in the CTRL library.

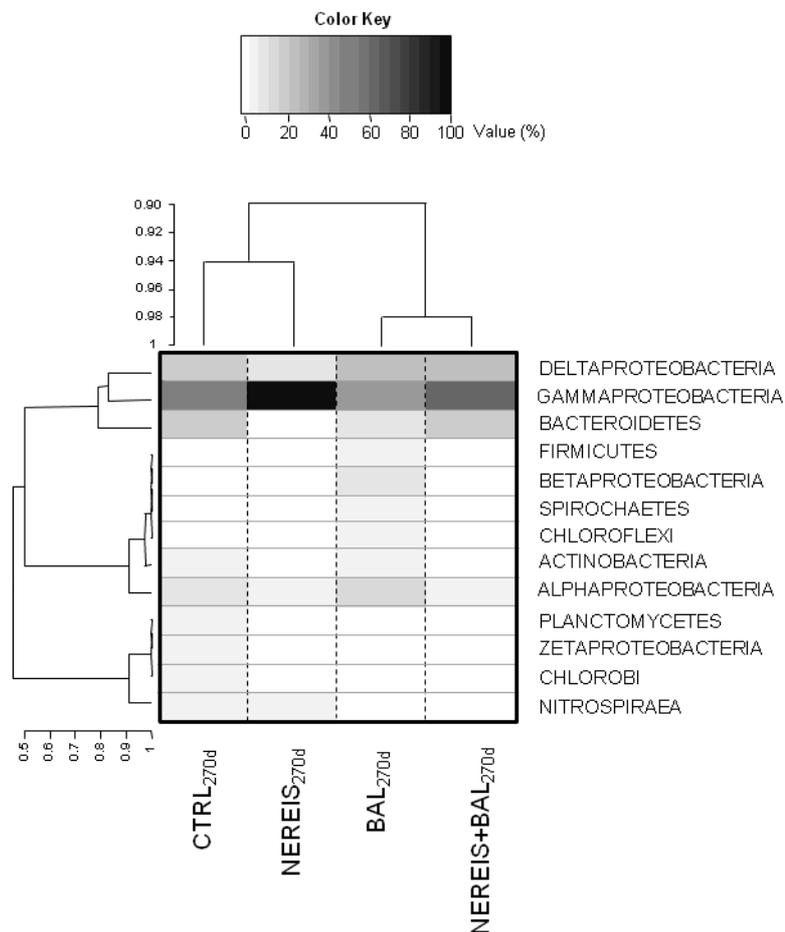


Figure III-4: Heatmap with double clustering showing the relationship between microcosm conditions and bacterial phylotypes (phylum level). The microcosm conditions are clustered in the top and bacterial phylotypes are clustered on the left of the heatmap according to their intensity profile similarity. Black corresponds to higher abundance and white to absence of taxa.

Focusing on *Gammaproteobacteria* and *Deltaproteobacteria*, the most abundant OTUs, it is important to notice that most of the sequences of the four T_{270d} libraries were affiliated to microorganisms involved in the sulfur cycle (Table III-2). They included the sulfur-oxidizing bacteria (SOB) such as purple sulfur bacteria within the *Chromatiaceae* and *Ectothiorhodospiraceae* families, sulfur-reducing *Desulfomonadaceae* and sulfate-reducing bacteria (*Desulfobacteraceae* and *Desulfobulbaceae*). The NEREIS library was characterized by 74.9% of sequences related to these families (about 40% in the other libraries). They were mainly affiliated to SOB (56.9%) as Sulfur-oxidizing bacterium ODIII6, *Thiohalophilus thiocyanatoxydans* and *Olavius algarvensis* sulfur-oxidizing endosymbiont. The

Table III-2: Identification of phylotypes from sequence analyses of cDNA libraries and their relative abundance (%). The numbers of clones are in brackets.

Phylogenetic groups	2 days	270 days			
		CTRL	BAL	NEREJS	NEREJS+BAL
ALPHAPROTEOBACTERIA	15	7.9	13.4	1.4	3.3
Rhodobacteraceae	6.8 (4)	2.3 (1)	2.4 (1)	-	2.2 (2)
Rhodospirillaceae	-	2.3 (2)	-	-	1.1 (1)
Sphingomonadaceae	2.7 (2)	-	-	-	-
Erythrobacteraceae	-	1.1 (1)	-	-	-
Hyphomicrobiaceae	2.7 (2)	-	-	1.4 (1)	-
Bradyrhizobiaceae	-	-	2.4 (2)	-	-
Rhodobiaceae	2.7 (2)	1.1 (1)	-	-	-
Methylocystaceae	-	-	2.4 (1)	-	-
Unclassified	-	1.1 (1)	6.2 (2)	-	-
BETAPROTEOBACTERIA	1.4	-	6.2	-	-
Rhodocyclae	1.4 (1)	-	-	-	-
Comamonadaceae	-	-	1.2 (1)	-	-
Burkholderiaceae	-	-	5 (1)	-	-
GAMMAPROTEOBACTERIA	39.6	50	39.3	90.3	58.4
Alteromonadaceae	6.8 (5)	7.8 (4)	7.4 (4)	16.7 (10)	20.3 (9)
Chromatiaceae	4.1 (3)	9.2 (4)	1.2 (1)	9.7 (5)	3.4 (1)
Ectothiorhodospiraceae	-	-	3.7 (1)	1.4 (1)	-
Unclassified Chromatiales	2.7 (2)	1.1 (1)	2.4 (2)	1.4 (1)	5.6 (2)
Unclassified Oceanospirillales	-	-	-	1.4 (1)	-
Piscirickettsiaceae	-	-	-	-	1.1 (1)
Pseudomonadaceae	-	-	-	-	5.6 (1)
Colwelliaceae	1.4 (1)	-	-	-	-
OM Group	-	-	2.4 (1)	1.4 (1)	-
SOB	20.5 (13)	31.9 (9)	19.8 (8)	56.9 (26)	21.3 (9)
Unclassified	4.1 (2)	-	2.4 (1)	1.4 (1)	1.1 (1)
DELTAPROTEOBACTERIA	11	16	20.7	6.9	22.5
Desulfobacteraceae	4.1 (3)	-	15.9 (8)	5.5 (3)	13.5 (7)
Desulfobulbaceae	1.4 (1)	1.1 (1)	2.4 (1)	-	-
Nitrospinaceae	-	1.1 (1)	-	-	-
Desulfuromonadaceae	-	-	1.2 (1)	1.4 (1)	-
Sorangineae	4.1 (2)	9.2 (1)	-	-	1.1 (1)
Halangiaceae	-	1.1 (1)	-	-	-
Unclassified	1.4 (1)	3.5 (1)	1.2 (1)	-	7.9 (1)
ZETAPROTEOBACTERIA	-	1.1	-	-	-
Mariprofundaceae	-	1.1 (1)	-	-	-
BACTEROIDETES	19.2	17.1	9.6	-	15.8
Flavobacteriaceae	13.7 (7)	-	2.4 (2)	-	1.1 (1)
Cytophagaceae	1.4 (1)	17.1 (6)	3.6 (1)	-	14.7 (7)
Sphingobacteraceae	2.7 (2)	-	-	-	-
Flexibacteraceae	-	-	2.4 (1)	-	-
Unclassified	1.4 (1)	-	1.2 (1)	-	-
ACTINOBACTERIA	1.4	1.1	4.8	-	-
Propionibacteraceae	-	-	1.2 (1)	-	-
Geodermatophilaceae	1.4 (1)	-	-	-	-
Unclassified	-	1.1 (1)	3.6 (2)	-	-
FIRMICUTES	6.9	-	2.4	-	-
Veillonellaceae	-	-	1.2 (1)	-	-
Clostridiaceae	1.4 (1)	-	-	-	-
Unclassified	5.5 (3)	-	1.2 (1)	-	-
PLANCTOMYCETES	-	2.2	-	-	-
Planctomycetaceae	-	2.2 (1)	-	-	-
DEFERRIBACTERES	1.4	-	-	-	-
Unclassified	1.4 (1)	-	-	-	-
SPIROCHAETES	-	-	2.4	-	-
Leptospiraceae	-	-	2.4 (1)	-	-
NITROSPIRAEA	-	3.4	-	1.4	-
Nitrospiraceae	-	3.4 (1)	-	1.4 (1)	-
CHLOROFLEXI	4.1	-	1.2	-	-
Caldilineaceae	2.7	-	-	-	-
Unclassified	1.4 (1)	-	1.2 (1)	-	-

Chromatiaceae were found in lower abundance in BAL and NEREIS+BAL libraries than in CTRL and NEREIS libraries indicating that they were affected by oil. In contrast, we observed that the sulfate-reducing *Desulfobacteraceae* were abundant (15.9% and 13.5%) in oil-contaminated libraries. The abundance of *Alteromonadaceae* was higher in microcosms where *H. diversicolor* was added.

The phylogenetic analysis also revealed the presence of sequences related to well-known hydrocarbonoclastic bacteria (HCB). They were more abundant in contaminated microcosms accounting for 14.5% (6 OTUs) and 18.8% (8 OTUs) of sequences in BAL and NEREIS+BAL libraries respectively. Different HCB related sequences were found in the bacterial communities from oil-contaminated microcosms. Sequences related to HCBs affiliated to *Betaproteobacteria* and sulfate-reducing strains of *Desulfococcus* and *Desulfatiferula* genera were found in BAL library while the NEREIS+BAL library was characterized by the presence of HCB sequences related to members of *Gammaproteobacteria* and sulfate-reducing strains of *Desulfobacterium* genera.

2.4. Discussion

In this study, we found that the structure and diversity of bacterial communities of marine sediment were affected by oil-contamination depending on the addition of the polychaetes *Hediste (Nereis) diversicolor* without affecting the overall removal capacity of oil. The degradation of BAL 110 oil was supported by both the reduction of total hydrocarbon content and the decrease of the extractible vanadium content from the oil fraction of the sediment. Vanadium is the most abundant metal in oil (55), we demonstrated that its release is correlated with the degradation of TPH testifying also the modification of complex hydrocarbons during the degradation process.

The NEREIS+BAL bacterial community showed higher diversity than the BAL bacterial community reflecting different structures with distinct sequences related to known hydrocarbonoclastic bacteria. Few studies have reported that burrowing organisms, through mucus excretion and oxygenation of sediments, influence the bacterial communities in the burrow and its surroundings as well (9, 22, 38). Their presence had an impact on the bacterial degradation capacities, stimulating microbial degradation of organic matter (1) and organic contaminants (35) including crude oil compounds (31). In the present study, the addition of *H. diversicolor* increased the reworking activity as previously reported (20) which was further enhanced in presence of BAL 110 oil. Similar observation has been reported (25), but this was not the case during a laboratory experiment where *H. diversicolor* reworking was found

reduced in presence of Arabian Light crude oil (24). The enhanced reworking activity could be explained by a reduced penetration of oxygen, nutrients, and organic matter in presence of oil that are required for macrobenthic life (14, 16). Regarding the effect of *H. diversicolor* and its reworking activity on the microbial degradation capacities controversial observations were reported. It was demonstrated that the degradation of pyrene was not improved by the presence of *H. diversicolor* (15) while a report showed that the mineralisation of naphthalene was reduced in presence of high density meiofauna (47). These studies, performed with single molecules, didn't focus on active bacterial communities composition. Thus, to the best of our knowledge, our study present for the first time the impact of petroleum, a complex mixture, on active bacterial communities composition in bioturbated sediments.

T-RFLP (both gene and transcript analyses) showed that BAL and NEREIS+BAL bacterial community dynamic was oil-dependent. A first structural shift was observed after 90 days of incubation in both contaminated BAL and NEREIS+BAL conditions followed by a second structural shift after 180 days of incubation suggesting that a succession of bacterial communities occurred which resulted on different bacterial patterns according to the treatment, both showing biodegradation capacities. Several studies demonstrated that the bacterial communities are first dominated by n-alkanes degrading bacteria and then by bacterial groups degrading polyaromatic hydrocarbons (PAHs), compounds more difficult to degrade (for review see (34)). In oil-contaminated microcosms, the comparison of bacterial communities based on T-RFLP and 16S RNA library analyses revealed that the bacterial communities followed a different dynamic in microcosms where the polychaetes were added resulting to two distinct bacterial communities. NEREIS+BAL active community was characterized by T-RFs related to *Gamma-* and *Deltaproteobacteria* while the most active T-RFs in BAL community were related to *Alpha-* and *Deltaproteobacteria*. The phylogenetic affiliation of 16S cDNA sequences indicated that almost all sequences were related to bacterial groups involved in the sulfur cycle; only 14% of total phylotypes were related to known HCB. Many studies have reported the dominance of HCBs in oil-contaminated ecosystems (8, 65, 67). The low abundance of HCBs in our sediments could be explained by the fact that the sediments were from a non-polluted environment, only biogenic hydrocarbons were detected, harboring a non-adapted bacterial community to petroleum compounds. Several reports demonstrated that the impact of crude oil on bacterial community and the oil degradation capacities were dependent on the pollution's history (21). The oil degradation was faster when bacterial communities are adapted to oil compounds (28). In our study, sediments considered as "pristine" were maintained in microcosms under ambient

temperature (starting in winter season) that could explain the slow degradation observed. Indeed low temperatures affect the bio-availability of hydrocarbon compounds by increasing their viscosity and decreasing their volatility (6) as well as the microbial activities (63). In the present study sequences related to sulfur-oxidizing bacteria (SOB) were found in lower abundance in contaminated libraries than in uncontaminated libraries. Most of these sequences were related to the cultivable strains *Thioalkalivibrio denitrificans* and *Thiohalophilus thiocyanoxidans* (60, 61). The ability of these strains to grow with different electron acceptors such as oxygen and nitrogen oxides has been shown demonstrating their adaptation capacity to different conditions and their role in the sulfur, nitrogen, and carbon biogeochemical cycles (58).

Sulfate-reducing bacteria (SRB) were found dominant in oil-contaminated microcosms (BAL and NEREIS+BAL). The simultaneous presence of both SOB and SRB communities testified that the sulfur cycle was active in the microcosms. SRB are known to play an important role on anaerobic oil degradation (17, 30, 53). They were found dominant in oil contaminated sediments (46, 48) and their activity being stimulated by the presence of hydrocarbons (36). Interestingly, their abundance (based on library analyses) was not affected by the addition of *H. diversicolor*. This observation was consistent with the increase of sulfate reduction rates observed in bioturbated sediments which was explained by the occurrence of reduced microniches through burrowing activity (10). However, other authors reported a decrease of sulfate-reduction rates in bioturbated sediment (29, 45).

In conclusion, we described two distinct bacterial communities showing similar overall oil degradation. The addition of *H. diversicolor* in the microcosms modified the bacterial community structure and composition without affecting the degradation capacity, it clearly favored the growth of *Gammaproteobacteria*, as it was already described in shrimp-inhabited sediment (38). This phenomenon was less pronounced in oil contaminated sediment but clearly noticeable. OTUs related to potential hydrocarbonoclastic bacteria were specific to each oil-contaminated condition and microbial communities were characterized by the presence of OTUs belonging to bacterial groups involved in sulfur cycle. This observation highlights the functional redundancy i.e. the similarity of hydrocarbon degradation as previously suggested (2, 64). Such phenomenon may be explained by the presence of taxa that are functionally redundant, or by the presence of taxa in both communities functioning differently but resulting in the same process when combined at the community level. Further knowledge on how bacterial communities adapt their metabolism to the presence and activity

of *H. diversicolor* is still required to understand the structuring effect of the reworking processes on bacterial communities. Such knowledge will be useful for the management of bacterial metabolisms involved in bioremediation processes of coastal marine sediments.

2.5. Acknowledgements

This work was supported by the French program ANR DHYVA (project ANR-06-SEST-09). We would like to thank the CEDRE technical staff for the setup of microcosm, all partners of the DHYVA project for their useful discussions, and Béatrice LAUGA for technical support. We also thank NORMANDIE APPÂTS, particularly Michel LOPUSZANSKI, who kindly provided the polychaetes.

2.6. References

1. Aller, R. C. 1994. Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation. *Chemical Geology* 114:331-345.
2. Allison, S. D., and J. B. H. Martiny. 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:11512-11519.
3. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402.
4. Alzaga, R., P. Montuori, L. Ortiz, J. M. Bayona, and J. Albaigés. 2004. Fast solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry procedure for oil fingerprinting: Application to the Prestige oil spill. *Journal of Chromatography A* 1025:133-138.
5. Amorim, F. A. C., B. Welz, A. C. S. Costa, F. G. Lepri, M. G. R. Vale, and S. L. C. Ferreira. 2007. Determination of vanadium in petroleum and petroleum products using atomic spectrometric techniques. *Talanta* 72:349-359.
6. Atlas, R. M., and R. Bartha. 1972. Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. *Canadian Journal of Microbiology* 18:1851-1855.
7. Banta, G. T., and O. Andersen. 2003. Bioturbation and the fate of sediment pollutants- Experimental case studies of selected infauna species. *Vie et Milieu* 53:233-248.

8. Berthe-Corti, L., and T. Höpner. 2005. Geo-biological aspects of coastal oil pollution. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 219:171-189.
9. Bertics, V. J., and W. Ziebis. 2009. Biodiversity of benthic microbial communities in bioturbated coastal sediments is controlled by geochemical microniches. *ISME Journal* 3:1269-1285.
10. Bertics, V. J., and W. Ziebis. 2010. Bioturbation and the role of microniches for sulfate reduction in coastal marine sediments. *Environmental Microbiology* 12:3022-3034.
11. Bordenave, S., M. S. Goñi-Urriza, P. Caumette, and R. Duran. 2007. Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology* 73:6089-6097.
12. Caumette, G., C. P. Lienemann, I. Merdrignac, H. Paucot, B. Bouyssièrè, and R. Lobinski. 2009. Sensitivity improvement in ICP MS analysis of fuels and light petroleum matrices using a microflow nebulizer and heated spray chamber sample introduction. *Talanta* 80:1039-1043.
13. Chen, G., and P. A. White. 2004. The mutagenic hazards of aquatic sediments: A review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* 567:151-225.
14. Cheong, C. J., and M. Okada. 2001. Effects of spilled oil on the tidal flat ecosystem - evaluation of wave and tidal actions using a tidal flat simulator *Water Science & Technology* 43 171–177.
15. Christensen, M., G. T. Banta, and O. Andersen. 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.
16. Chung, I. Y., K. J. Cho, K. Hiraoka, T. Mukai, W. Nishijima, K. Takimoto, and M. Okada. 2004. Effects of oil spill on seawater infiltration and macrobenthic community in tidal flats. *Marine Pollution Bulletin* 49:959-963.
17. Coates, J. D., J. Woodward, J. Allen, P. Philp, and D. R. Lovley. 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3589-3593.
18. Cuny, P., G. Miralles, V. Cornet-Barthaux, M. Acquaviva, G. Stora, V. Grossi, and F. Gilbert. 2007. Influence of bioturbation by the polychaete *Nereis diversicolor* on the structure of bacterial communities in oil contaminated coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin* 54:452-459.

19. Dunbar, J., L. O. Ticknor, and C. R. Kuske. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 67:190-197.
20. Duport, E., G. Stora, P. Tremblay, and F. Gilbert. 2006. Effects of population density on the sediment mixing induced by the gallery-diffuser *Hediste* (*Nereis*) *diversicolor* O.F. Müller, 1776. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 336:33-41.
21. Evans, F. F., A. S. Rosado, G. V. Sebastian, R. Casella, P. L. O. A. Machado, C. Holmström, S. Kjelleberg, J. D. Van Elsas, and L. Seldin. 2004. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* 49:295-305.
22. Fenchel, T. 1996. Worm burrows and oxic microniches in marine sediments. 1. Spatial and temporal scales. *Marine Biology* 127:289-295.
23. Gilbert, F., S. Hulth, V. Grossi, J. C. Poggiale, G. Desrosiers, R. Rosenberg, M. Gérino, F. François-Carcaillet, E. Michaud, and G. Stora. 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.
24. Gilbert, F., L. Rivet, and J. C. Bertrand. 1994. The in vitro influence of the burrowing polychaete *Nereis diversicolor* on the fate of petroleum hydrocarbons in marine sediments. *Chemosphere* 29:1-12.
25. Gilbert, F., G. Stora, and J. C. Bertrand. 1996. In situ bioturbation and hydrocarbon fate in an experimental contaminated mediterranean coastal ecosystem. *Chemosphere* 33:1449-1458.
26. Giusti, P., Y. Nuevo Ordonez, C. Philippe Lienemann, D. Schaumlöffel, B. Bouyssiere, and R. Lobinski. 2007. μ Flow-injection-ICP collision cell MS determination of molybdenum, nickel and vanadium in petroleum samples using a modified total consumption micronebulizer. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 22:88-92.
27. Good, I. J. 1953. The population frequencies of species and the estimation of the population parameters. *Biometrika* 40:237-264.
28. Greenwood, P. F., S. Wibrow, S. J. George, and M. Tibbett. 2009. Hydrocarbon biodegradation and soil microbial community response to repeated oil exposure. *Organic Geochemistry* 40:293-300.

29. Gribsholt, B., and E. Kristensen. 2003. Benthic metabolism and sulfur cycling along an inundation gradient in a tidal *Spartina anglica* salt marsh. *Limnology and Oceanography* 48:2151-2162.
30. Grossi, V., C. Cravo-Laureau, R. Guyoneaud, A. Ranchou-Peyruse, and A. Hirschler-Réa. 2008. Metabolism of n-alkanes and n-alkenes by anaerobic bacteria: A summary. *Organic Geochemistry* 39:1197-1203.
31. Grossi, V., D. Massias, G. Stora, and J. C. Bertrand. 2002. Burial, exportation and degradation of acyclic petroleum hydrocarbons following a simulated oil spill in bioturbated Mediterranean coastal sediments. *Chemosphere* 48:947-954.
32. Hansen, K., G. M. King, and E. Kristensen. 1996. Impact of the soft-shell clam *Mya arenaria* on sulfate reduction in an intertidal sediment. *Aquatic Microbial Ecology* 10:181-194.
33. Hansen, K., and E. Kristensen. 1998. The impact of the polychaete *Nereis diversicolor* and enrichment with macroalgal (*Chaetomorpha linum*) detritus on benthic metabolism and nutrient dynamics in organic-poor and organic-rich sediment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 231:201-223.
34. Head, I. M., D. M. Jones, and W. F. Röling. 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature reviews. Microbiology*. 4:173-182.
35. Holmer, M., V. E. Forbes, and T. L. Forbes. 1997. Impact of the polychaete *Capitella* sp. I on microbial activity in an organic-rich marine sediment contaminated with the polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene. *Marine Biology* 128:679-688.
36. Kleikemper, J., M. H. Schroth, W. V. Sigler, M. Schmucki, S. M. Bernasconi, and J. Zeyer. 2002. Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 68:1516-1523.
37. Kogure, K., and M. Wada. 2005. Impacts of macrobenthic bioturbation in marine sediment on bacterial metabolic activity. *Microbes and Environment* 20:191-199.
38. Laverock, B., C. J. Smith, K. Tait, A. M. Osborn, S. Widdicombe, and J. A. Gilbert. 2010. Bioturbating shrimp alter the structure and diversity of bacterial communities in coastal marine sediments. *ISME Journal*.
39. Leahy, J. G., and R. R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 54:305-315.
40. Lohrer, A. M., S. F. Thrush, and M. M. Gibbs. 2004. Bioturbators enhance ecosystem function through complex biogeochemical interactions. *Nature* 431:1092-1095.

41. Marchesi, J. R., T. Sato, A. J. Weightman, T. A. Martin, J. C. Fry, S. J. Hiom, and W. G. Wade. 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 64:795-799.
42. Mayer, L. M., Z. Chen, R. H. Findlay, J. Fang, S. Sampson, R. F. L. Self, P. A. Jumars, C. Quetel, and O. F. X. Donard. 1996. Bioavailability of sedimentary contaminants subject to deposit-feeder digestion. *Environmental Science and Technology* 30:2641-2645.
43. Mayer, L. M., L. L. Schick, R. F. L. Self, P. A. Jumars, R. H. Findlay, Z. Chen, and S. Sampson. 1997. Digestive environments of benthic macroinvertebrate guts: Enzymes, surfactants and dissolved organic matter. *Journal of Marine Research* 55:785-812.
44. McKenna, E. J., and R. E. Kallio. 1971. Microbial metabolism of the isoprenoid alkane pristane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68:1552-1554.
45. Mermillod-Blondin, F., R. Rosenberg, F. François-Carcaillet, K. Norling, and L. Mauclaire. 2004. Influence of bioturbation by three benthic infaunal species on microbial communities and biogeochemical processes in marine sediment. *Aquatic Microbial Ecology* 36:271-284.
46. Miralles, G., D. Nérini, C. Manté, M. Acquaviva, P. Doumenq, V. Michotey, S. Nazaret, J. C. Bertrand, and P. Cuny. 2007. Effects of spilled oil on bacterial communities of Mediterranean coastal anoxic sediments chronically subjected to oil hydrocarbon contamination. *Microbial Ecology* 54:646-661.
47. Näslund, J., F. J. Nascimento, and J. S. Gunnarsson. 2010. Meiofauna reduces bacterial mineralization of naphthalene in marine sediment. *ISME Journal* 4:1421-1430.
48. Paissé, S., F. Coulon, M. Goni-Urriza, L. Peperzak, T. J. McGenity, and R. Duran. 2008. Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 66:295-305.
49. Paissé, S., M. Goñi-Urriza, F. Coulon, and R. Duran. 2010. How a Bacterial Community Originating from a Contaminated Coastal Sediment Responds to an Oil Input. *Microbial Ecology* 60:394-405.
50. Quintana, C. O., M. Tang, and E. Kristensen. 2007. Simultaneous study of particle reworking, irrigation transport and reaction rates in sediment bioturbated by the

- polychaetes *Heteromastus* and *Marenzelleria*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 352:392-406.
51. Rice, P., L. Longden, and A. Bleasby. 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 16:276-277.
 52. Röling, W. F. M., M. G. Milner, D. M. Jones, K. Lee, F. Daniel, R. J. P. Swannell, and I. M. Head. 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* 68:5537-5548.
 53. Rothermich, M. M., L. A. Hayes, and D. R. Lovley. 2002. Anaerobic, sulfate-dependent degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum-contaminated harbor sediment. *Environmental Science and Technology* 36:4811-4817.
 54. Saiz-Salinas, J. I. 1997. Evaluation of adverse biological effects induced by pollution in the Bilbao Estuary (Spain). *Environmental Pollution* 96:351-359.
 55. Sasaki, T., H. Maki, M. Ishihara, and S. Harayama. 1998. Vanadium as an internal marker to evaluate microbial degradation of crude oil. *Environmental Science and Technology* 32:3618-3621.
 56. Satoh, H., Y. Nakamura, and S. Okabe. 2007. Influences of infaunal burrows on the community structure and activity of ammonia-oxidizing bacteria in intertidal sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 73:1341-1348.
 57. Schloss, P. D., and J. Handelsman. 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology* 71:1501-1506.
 58. Shao, M. F., T. Zhang, and H. H. P. Fang. 2010. Sulfur-driven autotrophic denitrification: Diversity, biochemistry, and engineering applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88:1027-1042.
 59. Simberloff, D. S. 1972. Properties of the rarefaction diversity measurement. *The American Naturalist* 106:414-418.
 60. Sorokin, D. Y., A. M. Lysenko, L. L. Mityushina, T. P. Tourova, B. E. Jones, F. A. Rainey, L. A. Robertson, and G. J. Kuenen. 2001. *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp. nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov. and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51:565-580.

61. Sorokin, D. Y., T. P. Tourova, E. Y. Bezsoudnova, A. Pol, and G. Muyzer. 2007. Denitrification in a binary culture and thiocyanate metabolism in *Thiohalophilus thiocyanoxidans* gen. nov. sp. nov. - A moderately halophilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing Gammaproteobacterium from hypersaline lakes. *Archives of Microbiology* 187:441-450.
62. Warnes, G. R., B. Bolker, L. Bonebakker, Gentleman, W. H. A. Liaw, T. Lumley, M. Maechler, A. Magnusson, S. Moeller, M. Schwartz, and B. Venables. 2011. gplots: Various R programming tools for plotting data. R package version 2.10.1 [Online]. <http://cran.r-project.org/web/packages/gplots/index.html>.
63. Wright, A. L., R. W. Weaver, and J. W. Webb. 1997. Oil bioremediation in salt marsh mesocosms as influenced by N and P fertilization, flooding, and season. *Water, Air, and Soil Pollution* 95:179-191.
64. Yachi, S., and M. Loreau. 1999. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:1463-1468.
65. Yakimov, M. M., R. Denaro, M. Genovese, S. Cappello, G. D'Auria, T. N. Chernikova, K. N. Timmis, P. N. Golyshin, and L. Giuliano. 2005. Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environmental Microbiology* 7:1426-1441.
66. Yakimov, M. M., G. Gentile, V. Bruni, S. Cappello, G. D'Auria, P. N. Golyshin, and L. Giuliano. 2004. Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 49:419-432.
67. Yoshida, A., H. Nomura, K. Toyoda, T. Nishino, Y. Seo, M. Yamada, M. Nishimura, M. Wada, K. Okamoto, A. Shibata, H. Takada, K. Kogure, and K. Ohwada. 2006. Microbial responses using denaturing gradient gel electrophoresis to oil and chemical dispersant in enclosed ecosystems. *Marine Pollution Bulletin* 52:89-95.

3. ETUDE DE LA COMMUNAUTE HYDROCARBONOCLASTE *alkB*

Les résultats précédents, basés sur l'analyse phylogénétique du gène codant l'*ARNr 16S* suggèrent que les bactéries hydrocarbonoclastes présentes au sein des sédiments contaminés aux hydrocarbures sont spécifiques à chaque traitement (BAL et NEREIS+BAL). Par conséquent, étant donné que les cinétiques de dégradation des hydrocarbures obtenues pour ces deux communautés sont similaires, cela signifie que malgré des origines phylogénétiques distinctes, elles dégradent avec la même efficacité.

Afin d'affiner notre analyse, nous avons entrepris l'étude de la diversité d'une communauté hydrocarbonoclaste. Cela nécessite l'utilisation de marqueurs moléculaires adaptés permettant de cibler spécifiquement les fonctions intervenant dans les processus de biodégradation. Le gène codant pour l'Alcane mono-oxygénase *AlkB*, impliquée dans la dégradation des alcanes en condition oxygène a été choisi comme modèle. L'analyse chimique de la fraction biodégradable du pétrole a montré que les alcanes présentaient une forte diminution au cours de l'incubation en microcosmes (cf. Figure III-2C et Figure III-6) et qu'elle était liée aux processus de biodégradation (indice C_{17} /pristane).

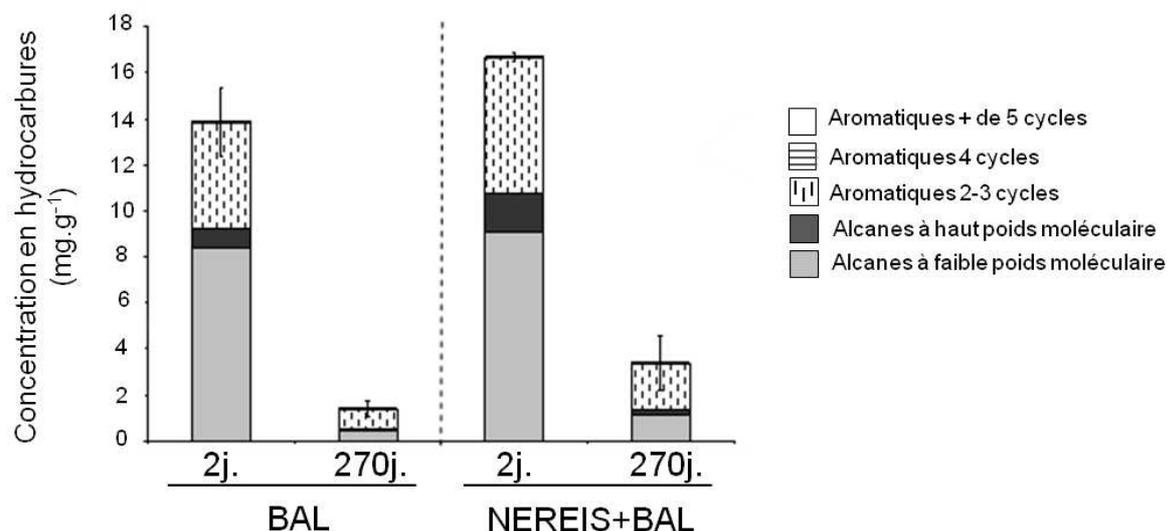


Figure III-5: Composition en alcanes et HAPs du pétrole dans les huit premiers centimètres des microcosmes, au temps initial et final de l'incubation pour les traitements BAL et NEREIS+BAL.

L'analyse des communautés capables de dégrader les alcanes a été réalisée sur les communautés métaboliquement actives, par T-RFLP au temps initial (2 jours) et au temps final (270 jours) de l'incubation en microcosmes.

Les trois profils obtenus pour chaque condition ont été moyennés. La matrice de données a ensuite subi une transformation en absence / présence, puis a été analysée en MDS (Figure III-7). Le pourcentage de similarité moyen observé entre les répliquats a été utilisé afin de délimiter des clusters en tenant compte de la variabilité. Une similarité de $36 \pm 15\%$ ayant été obtenue entre les répliquats, les clusters ont été tracés à 21% ($36-15\%$), 36% et 51% ($36+15\%$) de similarité.

L'analyse en MDS montre que les communautés *alkB* BAL et CTRL ont des profils très similaires à 2 et 270 jours (51%). Ainsi, au bout de 270 jours d'incubation, le pétrole ne semble pas avoir affecté la composition de la communauté. Au contraire, la communauté NEREIS+BAL_{270j} se distingue très clairement de ces deux traitements (36%) mettant en évidence un impact de la bioturbation sur la structure de la communauté dans les sédiments contaminés. Nous pouvons également noter qu'en début d'expérimentation (2 jours), les communautés NEREIS+BAL et BAL présentent plus de similarités que les communautés NEREIS et NEREIS+BAL. Cela pourrait indiquer une atténuation de l'effet de la bioaugmentation en polychaetes sur les premiers temps d'incubation due à la contamination pétrolière.

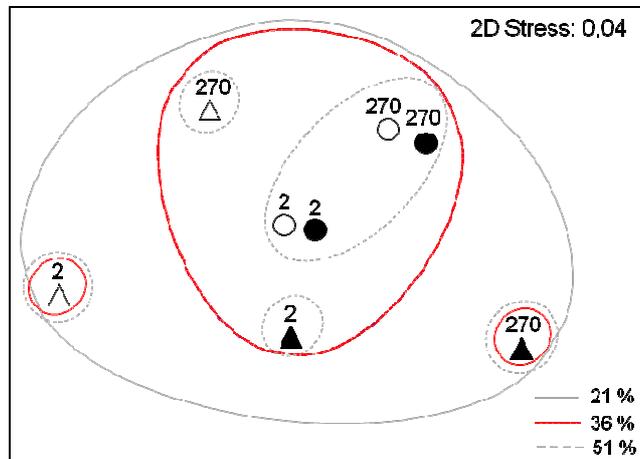


Figure III-6 : Comparaison de la structure des communautés *alkB* actives à 2 et 270 jours d'incubation. L'analyse en MDS est basée sur les profils T-RFLP des transcrits du gène codant pour *AlkB* (*Hinp11*, *Sau96I*, *Sau3AI*). CTRL ○, BAL ●, NEREIS △, NEREIS+BAL ▲.

Ainsi, en accord avec la présence d'alcane biogéniques au sein des sédiments non traités, les transcrits *alkB* ont été détectés dans tous les sédiments des microcosmes, autrement dit indépendamment de la présence de pétrole. Nos résultats montrent que l'apport d'alcane pétroliers n'a pas modifié ou peu la structure de la communauté hydrocarbonoclaste *alkB* au

bout de 270 jours d'incubation. Cela suggère que la nature (biogénique ou pétrolière) des hydrocarbures introduits importe peu dans la réponse structurale de ces communautés. Cela conforte des études ultérieures qui ont démontré que la présence de ce gène ne peut pas être associée à une contamination pétrolière (Palmroth et al., 2007; Kuhn et al., 2009 ; Paissé et al., 2011). Cependant, les profils T-RFLP n'ont été réalisés que sur le temps initial et final de l'incubation ne permettant pas de conclure totalement sur cette observation. Il se pourrait en effet, que dans notre cas, ce soit lié à un phénomène de résilience de la communauté BAL (retour à la structure initiale de la communauté). Afin de conclure il serait judicieux de réaliser les profils T-RFLP à partir des temps intermédiaires d'incubation. De plus, malgré des structures de communautés très semblables nous pouvons tout de même suggérer une expression différentielle de ces gènes entre les conditions CTRL et BAL. Ainsi, afin de statuer, nous pourrions également envisager l'étude de ces gènes par RT-PCR quantitative sur nos échantillons.

La présence du polychaete *H. diversicolor* au sein des sédiments induit des modifications structurales de cette communauté et sélectionne des bactéries hydrocarbonoclastes aérobies spécifiques à cet environnement qui globalement montrent la même efficacité de dégradation des alcanes. Certaines études antérieures ont suggéré que les terriers construits par la macrofaune abritent une communauté hydrocarbonoclaste aérobie spécifique (Chung et King, 1999 ; 2001). Les auteurs ont mis en cause les caractéristiques physico-chimiques retrouvées au sein de ces terriers, et notamment les conditions d'oxygénation intermittente due à la ventilation des macro-organismes qui sélectionnerait des bactéries aérobies tolérantes à de courtes phases d'anoxie. Etant donné que le pétrole n'influe pas la structure de la communauté BAL, et que la dégradation des différents alcanes dans les microcosmes sont similaires pour les deux traitements, cette explication conviendrait à nos résultats.

Ainsi plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- Tout d'abord, l'excrétion de métabolites, ou encore le mucus sécrété par la macrofaune sélectionnerait certains taxa (hydrocarbonoclastes) ayant la capacité de les métaboliser (Aller and Aller, 1986; Reichardt, 1988). Cependant, les profils des communautés obtenus pour les conditions NEREIS et NEREIS+BAL présentent de fortes dissimilarités rendant peu probable cette hypothèse.
- Puis l'oxygénation intermittente sélectionnerait des bactéries hydrocarbonoclastes aéro-anaéro facultatives (e.g. bactéries dénitrifiantes : *Marinobacter*). Cette hypothèse

semble plus plausible, étant donné la forte activité de remaniement mesurée dans les microcosmes NEREIS+BAL.

- Enfin, nous ne pouvons pas exclure que les voies de dégradation des hydrocarbures (alcanes, aromatiques) soient différentes dans les deux traitements (BAL et NEREIS+BAL) conduisant à la formation de métabolites qui sélectionnerait des microflore spécifiques à chaque traitement.

4. RESULTATS COMPLEMENTAIRES DE L'ETUDE : ANALYSE DES INTEGRONS

Dans le cadre du projet DHYVA, l'adaptation de la communauté microbienne à la contamination pétrolière a été abordée sur un tout autre aspect : la capacité des bactéries à acquérir de nouveaux gènes via les éléments génétiques mobiles (Rowe-Magnus et al., 2002 ; van der Meer et al., 2001). Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire (IPREM-EEM) dans le cadre de la thèse de Lionel Huang et s'est particulièrement intéressée aux intégrons (Huang et al., 2010). Ces éléments constituent un système naturel de capture, d'expression et de dissémination de gènes et sont notamment impliqués dans la multi-résistance des bactéries aux antibiotiques. Récemment, il a été mis en évidence un lien entre l'abondance de certains intégrons (classe 1) et les conditions écologiques ou le niveau de pollution de l'environnement (Hardwick et al., 2008 ; Wright et al., 2008). Ceci suggère que dans un environnement perturbé, ces éléments peuvent être disséminés dans la communauté bactérienne. Ainsi, l'objectif de ces travaux était de déterminer si les intégrons interviennent dans l'adaptation des communautés bactériennes lors d'une pollution pétrolière

Pour cela, dans un premier temps la diversité des intégrons au sein de la communauté bactérienne a été étudiée au cours de la pollution. La partie constante des intégrons a été étudiée, le gène *intI*. Des banques de clones ont été réalisées à 90 et 270 jours (3 et 9 mois) pour les traitements CTRL et BAL. Au total, 56 nouvelles séquences de gènes d'intégrase d'intégrons ont été caractérisées suggérant une grande diversité de ces gènes au sein de la communauté microbienne. La comparaison de banques de clones du gène *intI* a permis de suggérer une modification de la diversité liée à la contamination pétrolière (Figure III-8). A 270 jours, les banques *intI* BAL et CTRL montrent une forte dissimilarité (environ 70%). La modification de la diversité des gènes *intI* dans la communauté entre 90 et 270 jours en

présence de pétrole est liée à un gène *intI* particulier devenant majoritaire à 270 jours. Ce gène a été nommé *intIOPS*.

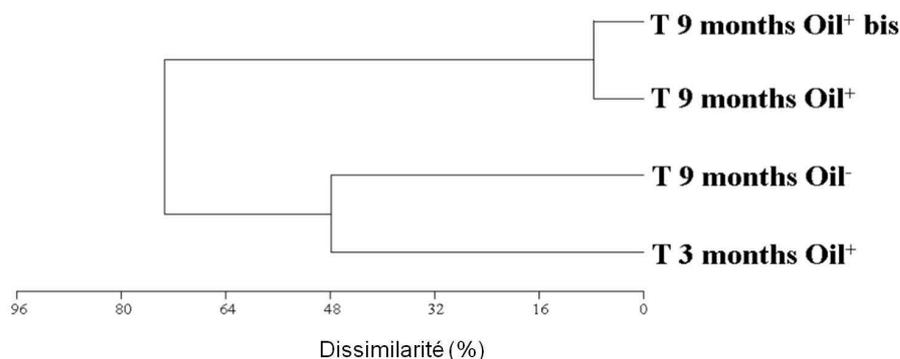


Figure III-7 : Comparaison des banques *intI*. Le dendrogramme a été construit par comparaison des séquences protéiques issues des différentes banques réalisées à 3 et 9 mois (90 et 270 jours). BAL : Oil+ et Oil+ bis (réplicat) ; CTRL : Oil-. (Huang et al., 2010)

Cette baisse de diversité du gène *intI* peut être corrélée aux modifications structurales des communautés bactériennes observées principalement sur les derniers temps d'incubation (cf. partie III-1 : entre 90 et 270 jours), suggérant ainsi une dissémination du gène *intIOPS* au sein de la communauté bactérienne pendant cette période. En effet, l'analyse T-RFLP de la composition de la communauté bactérienne BAL ne laisse pas supposer qu'un taxon majoritaire serait porteur de ce gène, une dissémination paraît donc plus probable (Huang, 2010). Nous pouvons donc envisager que ce gène transporte une cassette de gène jouant un rôle important dans l'adaptation de la communauté bactérienne à la contamination pétrolière.

Afin d'affiner ces résultats, l'abondance du gène *intIOPS*, a été évaluée au cours du temps par PCR quantitative dans les différents traitements (Figure III-9). Une augmentation significative de ce gène particulier a été mise en évidence partir de 90 jours dans les traitements contaminés au pétrole, BAL et NEREIS+BAL. La quantité relative du gène *intIOPS* observée pour la condition NEREIS+BAL s'est montrée beaucoup plus importante que dans la condition BAL. Nous pouvons donc supposer que (i) le mélange des sédiments lié à l'activité des polychaetes favorise le contact entre les bactéries et donc la dissémination des intégrons ou (ii) la bioturbation favorise la multiplication des bactéries qui possèdent un intégron.

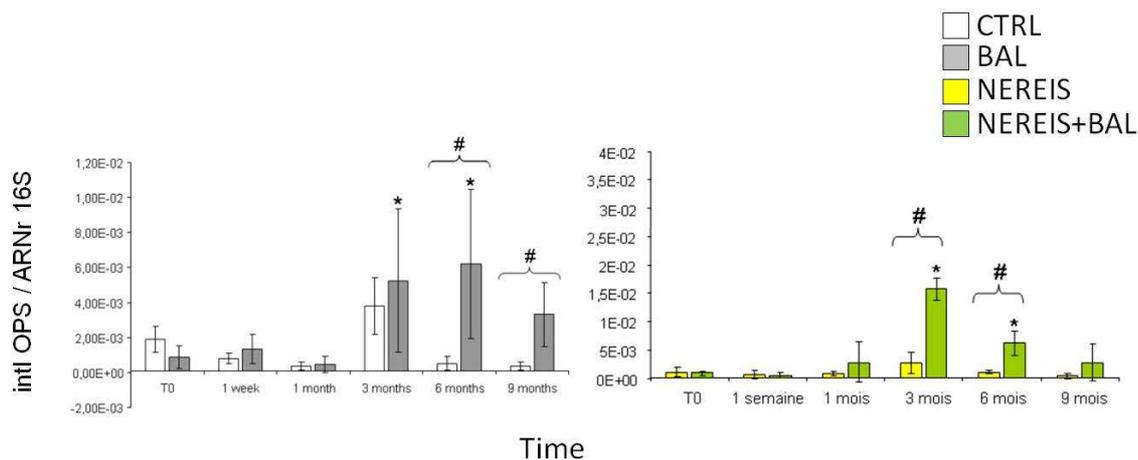


Figure III-8 : Abondance relative du gène *intIOPS*. Le ratio du nombre de copies des gènes *intIOPS*/ARNr 16S a été mesuré par PCR quantitative. Chaque donnée est une moyenne de quadruplicatas d'échantillons mesurés en duplicatas. * : valeurs qui sont statistiquement différentes du T0 dans la même condition ($p = 0,0209$ dans les deux cas). # : les deux valeurs considérées sont statistiquement différentes ($p = 0,0209$ dans les deux cas). (Huang *et al.*, 2010)

Quoiqu'il en soit, l'augmentation du nombre d'intégrons n'a pas favorisé la dégradation des hydrocarbures, ils n'interviendraient donc pas dans la dégradation des hydrocarbures. Afin de le vérifier, il faudrait caractériser les gènes transportés par cet intégron. C'est dans ce but, qu'une technique a été mise au point au laboratoire permettant de mettre en évidence la cassette de gènes la plus proche du gène *intI* et du promoteur impliqué dans l'expression des cassettes, autrement dit la cassette témoignant du dernier événement d'insertion (i.e. le dernier événement adaptatif) (Huang *et al.*, 2009). Cette cassette représente également la cassette la plus fortement exprimée. Une étude préliminaire a été entreprise par la construction d'une banque de première cassette de gènes à partir des sédiments BAL_{270j} (Huang, 2010). Ainsi, une séquence majoritaire a été obtenue. Il s'agit d'un ORF codant pour une protéine présentant de fortes identités avec des polysaccharides déacétylases et une identité maximum avec celle de *Desulforomonas acetoxidans*. Il a été montré que chez *Bacillus subtilis* la polysaccharide déacétylase est impliquée dans le processus de germination (Fukushima *et al.*, 2002), processus conduisant à la formation de spores.

Ces résultats préliminaires ne permettent pas de statuer sur le rôle des intégrons dans l'adaptation des communautés bactériennes face à la pollution pétrolière. A ce stade de l'étude, ils nous permettent de supposer que l'avantage conféré par les intégrons ne serait pas directement lié à la dégradation des hydrocarbures mais plutôt à une stratégie de survie face à des conditions environnementales défavorables (e.g. effet toxique du pétrole).

5. PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION

La réponse des communautés bactériennes soumises à une contamination pétrolière a été étudiée dans la partie supérieure du sédiment (0-2cm) par des techniques moléculaires basées sur les gènes codant pour l'ARNr 16S et l'Alcane mono-oxygénase AlkB. Elle a été évaluée dans des sédiments bioturbés présentant une faible et une forte activité de remaniement (bio-augmentation en polychaetes).

Il a ainsi pu être mis en évidence que **les processus de structuration des communautés bactériennes liées à la pollution pétrolière sont clairement affectés par l'abondance des polychaetes au niveau génomique et transcriptionnel**. Ces modifications ont pu être reliées à la forte activité de remaniement sédimentaire mesurée dans les microcosmes enrichis en polychaetes en présence de pétrole. En modifiant la communauté bactérienne, les polychaetes ont également sélectionné une communauté hydrocarbonoclaste spécifique. Néanmoins, **ces changements structuraux n'influent pas sur l'efficacité de dégradation des hydrocarbures. Nous avons suggéré une redondance fonctionnelle de la fonction de dégradation des hydrocarbures**. La bioturbation influencerait donc la diversité bactérienne mais pas la fonction globale de dégradation, **il n'y aurait donc pas de lien direct entre la diversité des bactéries actives et l'efficacité de dégradation**.

L'étude réalisée sur les intégrons a permis de mettre en évidence que **la bioturbation favorise la présence de ces éléments génétiques mobiles dans les sédiments contaminés aux hydrocarbures**. Bien que les gènes portés par ces éléments soient encore mal caractérisés, les premiers résultats obtenus suggèrent qu'ils seraient plus liés à une adaptation aux modifications des paramètres physico-chimiques des sédiments qu'à la dégradation des hydrocarbures. La caractérisation des différentes communautés bactériennes en début et fin d'expérimentation peut confirmer cette hypothèse. Nous avons observé une forte augmentation de l'abondance relative des bactéries sulfato-réductrices suite à la contamination pétrolière indépendamment de l'abondance en polychaetes, montrant clairement l'installation de conditions anoxiques dans les deux premiers centimètres des sédiments.

Différentes études portant sur les polychaetes ont démontré que ces organismes stimulent la dégradation des hydrocarbures (Chung and King, 1999 ; Grossi et al., 2002 ; Timmermann et al., 2008). Dans le cadre de notre expérimentation cela ne s'est pas vérifié.

Quelques études mettent en cause une diminution de la biodisponibilité des hydrocarbures dans les sédiments lié aux activités de bioturbation (enfouissement, mobilisation vers la colonne d'eau) (Timmermann et al., 2008 ; Näslund et al., 2010). Le sédiment choisi pour l'expérimentation est également très riche en matière organique, ainsi il est probable que **la bioturbation stimule la dégradation microbienne de la matière organique mais pas l'activité hydrocarbonoclaste**. Nous pourrions partiellement vérifier cette hypothèse en quantifiant l'expression des gènes *alkB* par exemple (par RT-PCR quantitative) dans les deux types de sédiments contaminés. Ainsi, les hydrocarbures pétroliers ne constitueraient pas la source de carbone préférentielle des micro-organismes autochtones des sédiments vaseux de l'Aber-Benoît. Cela est également cohérent avec le début tardif de la dégradation des hydrocarbures que nous avons observé (entre 180 et 270 jours). Ce délai est généralement beaucoup plus court dans le cas de communautés bactériennes adaptées à la contamination pétrolière (Païssé et al., 2010). Les dosages d'hydrocarbures réalisés sur les sédiments de l'Aber-Benoît ont montré l'absence d'hydrocarbures pétroliers et au contraire une forte quantité d'alcanes biogéniques, démontrant une forte activité primaire au sein de ces sédiments. Par conséquent, **la microflore autochtone ne présenterait pas de dispositions particulières pour la dégradation des hydrocarbures pétroliers**.

Une autre explication qui n'a pas pu être vérifiée serait que la cinétique de dégradation observée est liée aux variations de températures. En effet, l'expérimentation en microcosmes a eu lieu dans un hangar dont la température n'a pas été régulée. Elle a débuté en novembre 2007 (printemps) et a terminé en août 2008 (été). Ainsi, le début de la dégradation des hydrocarbures ont été observés en été. Les températures basses affectent la biodisponibilité des hydrocarbures ainsi que les activités microbiennes (Atlas and Bartha, 1972 ; Wright et al., 1997). Nous nous sommes procuré une estimation de la température ambiante mesurée à Brest (<http://www.wunderground.com/history>) au cours de la période d'incubation (Figure III-9). Ce graphe met en évidence que la période de biodégradation correspond effectivement à la période la plus chaude mesurée à Brest. Il paraît difficile de se prononcer étant donné que les variations de températures du hangar n'ont pas été monitorée, cependant, cette observation souligne l'importance de ce type de paramètres lors de la mise en place de microcosmes et surtout dans l'interprétation des données.

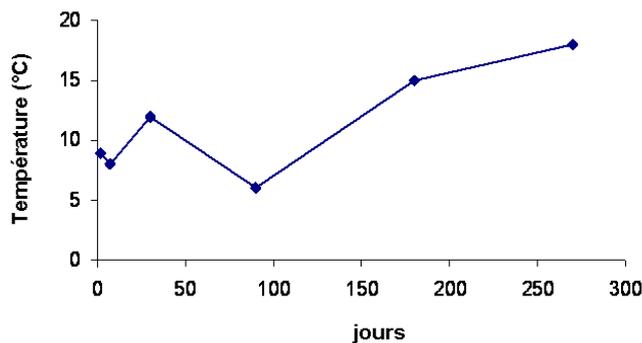


Figure III-9 : Evolution de la température ambiante moyenne mesurée à Brest au cours des 270 jours d'incubation en microcosmes (<http://www.wunderground.com/history>).

Ce travail a également mis en évidence un effet structurant fort des polychaetes sur la communauté bactérienne active. **L'enrichissement des sédiments en polychaetes a provoqué un « Gamma shift » de la communauté bactérienne** (augmentation du nombre relatif de *Gamma*-protéobactéries), fortement représentée par les *Alteromonadaceae* (principalement des bactéries affiliées au genre *Haliea*, aérobie stricte) et les SOB. Cette information est d'autant plus intéressante qu'une observation similaire a été faite dans des sédiments marins côtiers bioturbés par les crevettes *Upogebia deltaura* et *Callianassa subterranea*. Les auteurs ont mis en évidence une abondance relative de Gamma-protéobactéries deux fois plus élevée dans les sédiments bioturbés que dans le sédiment controle (sédiment non bioturbé) (Laverock et al., 2010). Ces organismes, qui présentent des modes d'irrigation et de nutrition différents, ont eu le même effet structurant sur la communauté bactérienne. Par conséquent, l'impact du polychaete *H. diversicolor* sur la structure des communautés bactériennes est très proche de celui des crevettes *U. deltaura* et *C. subterranea*. **L'effet structurant de la bioturbation ne serait donc pas dépendant de l'espèce bioturbatrice.** Ces résultats pourraient également suggérer qu'il **dépend essentiellement de l'origine de la communauté bactérienne, voire même de sa composition de départ.** En effet, l'étude réalisée sur les crevettes s'est basée sur des sédiments de surface, autrement dit, la microflore autochtone devait être principalement composée de bactéries aérobies et aéro-anaérobies facultatives, tout comme celle présente dans les deux premiers centimètres des sédiments de l'Aber-Benoît. C'est une hypothèse qu'il serait intéressant de vérifier, en comparant par exemple l'effet structurant d'un organisme bioturbateur sur des sédiments marins issus de différents environnements.

Grâce à cette étude nous avons donc démontré que la diversité microbienne et donc les processus de structuration de la communauté mis en place suite à la contamination pétrolière étaient modifiés dans les sédiments présentant une forte activité de bioturbation. Malgré cela, **des fortes similarités ont pu être mis en évidence entre les deux types de sédiments.** Notamment, la présence de bactéries phylogénétiquement affiliées à des bactéries sulfato-réductrices signifiant dans les deux cas l'installation de conditions anoxiques. Elles sont retrouvées en forte abondance, et beaucoup d'entre elles sont affiliées à des souches hydrocarbonoclastes suggérant une part importante des processus de biodégradation anaérobies des hydrocarbures pétroliers dans les deux sédiments contaminés. En accord avec cette observation, nous avons également constaté une diminution des SOB (aérobies) dans les deux sédiments. Ces faits ont souvent été relatés dans des sédiments marins contaminés aux hydrocarbures, par conséquent, il semblerait que **les schémas établis jusqu'à présent sur le comportement des communautés microbiennes suite à une contamination pétrolière s'appliqueraient également dans des sédiments fortement bioturbés.**

CHAPITRE IV

IMPACT DU PETROLE ET DE LA BIOTURBATION SUR LA COMMUNAUTE ARCHEENNE

CHAPITRE IV: Impact du pétrole et de la bioturbation sur la communauté archéenne

1. INTRODUCTION

Dans le chapitre précédent, l'impact d'une contamination pétrolière sur la structure des communautés microbiennes dans un sédiment bioturbé a été abordé au niveau taxonomique via l'analyse du gène codant l'ARNr 16S *Bacteria* et au niveau fonctionnel en ciblant directement les gènes liés au processus de biodégradation aérobie des alcanes, *alkB*. Cette étude basée sur des techniques moléculaires a permis de mettre en évidence des processus de remaniements structuraux de la communauté bactérienne liés à la pollution pétrolière, propres à cet environnement particulier.

Néanmoins, cette étude ne donne qu'une vision partielle du comportement des communautés microbiennes au sein de l'environnement. En effet, au sein du règne du vivant, les procaryotes sont répartis dans deux domaines : *Bacteria* et *Archaea*. Les premières études réalisées sur les archées avaient limité leur distribution écologique aux environnements extrêmes, ainsi peu d'importance leur ont été accordées lors des études des environnements marins côtiers. Cependant, l'utilisation des techniques moléculaires en écologie microbienne, a permis de dévoiler leur vaste distribution ainsi que leur grande diversité phylogénétique et métabolique suggérant un rôle important au sein de l'environnement marin (Chaban et al., 2006 ; Auguet et al., 2010 ; Jarrell et al., 2011). D'ailleurs, ces micro-organismes présentent des caractéristiques biochimiques uniques telles que la capacité de méthanogénèse, un processus anaérobie important dans le cycle du carbone.

Jusqu'à présent, la plupart des études de bioremédiation et donc les connaissances acquises sur la réponse des communautés microbiennes à une pollution pétrolière se sont essentiellement basées sur l'étude des *Bacteria*. Pourtant, la participation des *Archaea* à la dégradation aérobie et anaérobie (méthanogénèse) de certains hydrocarbures a été établie (Anderson et al., 2000 ; Al-Mailem et al., 2010 ; Tapilatu et al., 2010). Par conséquent, les

archées doivent être prises en compte dans les processus d'atténuation naturelle des hydrocarbures pétroliers.

De ce fait, nous proposons de fournir de nouvelles informations concernant la réponse de la communauté archéenne face à une contamination pétrolière. De plus, dans le contexte de notre étude, étant donné les conditions particulières d'oxygénation intermittente générées au sein du sédiment par les organismes fouisseurs, il s'avère également pertinent de préciser cette réponse pour les archées méthanogènes.

Afin d'y parvenir, nous avons suivi les variations temporelles de la communauté archéenne au sein des microcosmes en considérant sa fraction totale et métaboliquement active. Nous avons abordé cette étude en combinant l'utilisation d'un marqueur moléculaire taxonomique (gène codant pour l'ARNr 16S *Archaea*) à celle d'un marqueur moléculaire fonctionnel spécifique au processus de méthanogénèse, *mcrA* (gène codant pour la Méthyl Coenzyme réductase A).

Ces travaux sont présentés sous forme d'un article soumis pour publication dans la revue *Applied and Environmental Microbiology*.

2. PUBLICATION 2: Response of archaeal communities to oil spill in bioturbated Mudflat sediments

Magalie Stauffert, Cristiana Cravo-Laureau, Robert Duran*

Equipe Environnement et Microbiologie, Université de Pau et des Pays de l'Adour, UMR CNRS IPREM 5254, BP 1155, 64013 Pau Cedex, France, robert.duran@univ-pau.fr

Keywords : Archaea, methanogens, bioturbation, T-RFLP, oil contamination

Cette étude est présentée sous forme d'un article qui a été soumis dans la revue *Applied and Environmental Microbiology*

Running title: Archaeal community response to oil contamination

ABSTRACT

Mudflat sediments from the French Atlantic coast were maintained in microcosms in order to study the response of archaeal community to oil spill with the combined effect of the bioturbation activity of the polychaetes *Hediste (Nereis) diversicolor*. The dynamics of the archaeal community was monitored by combining comparative T-RFLP fingerprints and sequence library analyses based on 16S rRNA genes and transcripts. Methanogens were also followed by targeting the *mcrA* gene. *Crenarchaeota* were always detected in all communities irrespective of the addition of *H. diversicolor* and/or oil. The structure of archaeal communities was modified in presence of oil, with more pronounced changes when *H. diversicolor* was added that were characterized by a higher diversity, especially for the *Euryarchaeota* and *Thaumarchaeota*. The analysis of *mcrA* transcript showed a specific structure for each condition since the beginning of the experiment. Overall, oiled microcosms showed different communities irrespective of *H. diversicolor* addition, while similar hydrocarbon removal capacities were observed. The ecological significance of the impact of macrofauna activity and oil pollution on archaeal community, especially methanogens, must be taken into account in environmental bioremediation studies.

2.1. Introduction

Mudflats are subjected to a variety of pollution injuries from both sides, from the sea, predominantly by crude oil from shipping and offshore mining and from the land, principally through agricultural practices, urban waste waters and industrial activities. Mudflats are located on tidal zones, subjected to fluctuating parameters where the intensive activity of the macrofauna contributes to their heterogeneity influencing the physical, geochemical and biological benthic ecosystems. The bioturbation stimulates the organic matter mineralisation and the recycling of nutrients (2, 3), playing a key role in the global balance of biogeochemical cycles and limiting the storage of organic matter into the sedimentary column. Thereby, sediment bioturbation by macrofauna may change the distribution and degradation of organic compounds such as hydrocarbons (13, 14). Since several years, many studies have focused on macrofauna effect on bacterial communities (36, 43), on pollutant fate (21, 26, 28) and characterized the effects on both (38, 46). They revealed the stimulation of pollutant degradation (45), the change of bacterial activities (17, 35) and the modification in the bacterial communities structures (47, 55). However, to the best of our knowledge, all these studies have focused on *Bacteria*, and little attention has been paid to the effect of bioturbation on the archaeal community. The *Archaea* play a significant ecological role in marine environments, their ubiquity, diversity and complexity has been highlighted (11, 15) suggesting the need of improving our knowledge on this so-far little studied component of marine biota (16). Several studies have raised various metabolic functions involving *Archaea* in the nitrogen cycle (ammonia-oxidation), the sulfur cycle (sulfate-reduction and sulfur-oxidation) and the carbon cycle (methanogenesis and anaerobic methane oxidation) (30). Furthermore, these microorganisms have been shown to be involved in the mineralization of petroleum hydrocarbons in aerobic conditions (1, 57) and in anaerobic conditions, by methanogenesis (5, 12). Among the few studies focusing on archaeal communities in oil-polluted environments (10, 37, 48), only three have addressed the response of *Archaea* to oil contamination (44, 51, 56).

In order to gain a better understanding of the ecological significance of *Archaea* in oil polluted environments and how they are affected by bioturbation, we examined the response of marine archaeal communities to oil pollution. The response of archaeal community from mudflat sediments was characterized by applying culture-independent molecular approaches at both DNA and RNA levels, and then compared with that observed on highly bioturbated sediments where *Hediste (Nereis) diversicolor* was added.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Sampling area and experimental setup

Field site and experimental setup have been previously described (55) and are briefly summarised here. Muddy-sand sediment was obtained from the tidal basin Aber-Benoît (Treglonou, Brittany (France), 48° 33'12.40"N; 4° 32'8.69"W) for microcosm experiments. Sediments were collected carefully with core collector to maintain the sediment structure, and then transferred over geotextile membrane on microcosm boxes (65 cm x 50 cm x 41 cm; approximately 30 L of sediment). Twelve microcosm boxes were setup and connected with a device supplying natural sand filtered and UV-treated seawater from Oceanopolis aquarium (Brest, France). Tidal cycles (12 hours) were applied using a water level control consisting on 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. Four conditions were applied in triplicate (N=12) as follows: (i) CTRL: control condition, (ii) BAL: oil addition, (iii) NEREIS: addition of *Hediste (Nereis) diversicolor* and (iv) NEREIS+BAL, addition of oil and *H. diversicolor*. The upper 2 cm layer of each box was sampled, pooled and homogenized. This mixture was spread over the sediment surface (2 cm layer). The oil used for the experimentation was an Arabian Light oil topped at 110°C (BAL 110). For the contaminated conditions (BAL and NEREIS+BAL), the mixture contained 25.6 mg of BAL 110 oil per gram of wet sediment. For bioturbated conditions (NEREIS and NEREIS+BAL), the initial biomass of *H. diversicolor* was increased 10 fold (addition of 614 g.m² i.e. 982 ind.m²). The tidal cycle was initiated two hours after the reintroduction of the surface layers and the polychaetes addition.

Sediment sub-samples were collected after 2, 7, 30, 90, 180 and 270 days of incubation for chemical and molecular analyses (55). For molecular analyses, superficial samples (0-2 cm, Eppendorf tube, 2 ml) were collected in duplicate for each microcosm (sampling replicate). Thus, six replicates per condition at each sampling time were obtained. The sub-samples 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 quickly frozen in liquid Nitrogen and stored at -80°C until analyses.

2.2.2. Total DNA extraction of microbial communities

DNA was extracted from six replicates (two replicates per box, 136 samples) of 250 mg of sediments using the UltraClean Soil DNA kit (MoBio Laboratories) according to the

manufacturer's recommendations. Protocol was modified as following: sediment was previously centrifuged at $5000 \times g$ for 15 min, to remove water phase; and the initial step of horizontally vortex was performed during 30 min. DNA was eluted in 50 μ l and stored at -20°C.

2.2.3. RNA extraction and reverse transcription

Total RNA extraction from 2 g of sediments was performed from six replicates (136 samples) using the RNA Power Soil kit (MoBio Laboratories) according to the manufacturer's recommendations. Only RNase-free certified plastic-ware was used and all solutions were prepared with sterile diethyl pyrocarbonate-treated (DEPC) water. DNA was removed from the total nucleic acid extraction by DNase digestion, using Turbo DNA-free™ protocols (Ambion). The complete removal of DNA was verified by a control PCR using primers of 16S bacteria (PCR conditions described in amplification section). cDNA was produced by reverse transcription of RNA using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV RT, USB Corporation) with random hexamers (0.1 U A260, Roche) according to the manufacturer's recommendations. RT products were used immediately for PCR amplifications and the remaining products were stored at -20°C.

2.2.4. Amplification of 16S archaeal rRNA and *mcr* genes

Archaeal 16S rRNA gene fragments were amplified using primers Arch21f (5'-TTCCGGTTGATCCYGCCGGA-3') and Arch958r (5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3') (15). Reaction conditions in an Eppendorf thermal cycler were an initial denaturation (94°C, 5 min), 34 cycles of 94°C for 45 s, 55°C for 1 min and 72°C for 1 min; and a final extension (72°C, 10 min). For *mcrA* genes, primer MLf (5'-GGTGGTGTMGGATTCACACARTAYGCWACAGC-3') and MLr (5'-TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT-3') were used (42). Reaction conditions in an Eppendorf thermal cycler were an initial denaturation (95°C, 5 min), 35 cycles of 95°C for 45 s, 55°C for 45 s and 72°C for 1.5 min; and a final extension (72°C, 7 min). In the case of transcripts amplification a semi-nested PCR was performed. First round was performed with forward ME1 (5'-GCMATGCARATHGGWATGTC-3') primer (23) and reverse MLr primer. Reaction conditions in an Eppendorf thermal cycler were an initial denaturation (95°C, 5 min), 35 cycles of 95°C for 45 s, 50°C for 45 s and 72°C for 1.5 min; and a final extension (72°C, 7 min). The second round was performed with MLf and MLr primers as

described below. The reactions mix (50 µl final volume) contained 50 mM buffer, 0.2 mM dNTP, 0.2 µM of each primer and 1.25 U of Taq polymerase (Ozyme). In PCR for T-RFLP, the forward primers Arch21f and Mlf was 5'-labelled with 6-carboxyfluorescein (FAM). Products were checked in 1% agarose gels with ethidium bromide staining. Samples were stored at 4°C until further analysis. PCR products were purified with the PCR purification kit (GE Healthcare), and analysed by gel electrophoresis.

2.2.5. T-RFLP analysis and statistical comparison of T-RFLP profiles

The concentrations of purified Archaeal 16S rRNA and *mcr* genes amplicons were estimated by gel electrophoresis using the Smartladder standard (Eurogentec). Restriction digests were performed in a total volume of 10 µl containing between 50 and 100 ng of PCR amplicons with 3 U of restriction enzyme. HaeIII and TaqI (New England Biolabs) enzymes were used for 16S archaeal amplicon digestion (3h at 37°C and 65°C respectively). Sau96I (Promega) and MspI (New England Biolabs) were used for *mcrA* amplicons (3h at 37°C and 65°C respectively). 1 µl of digested amplicons were mixed with 10 µl of deionised formamide (Applied Biosystems) and 0.25 µl of the GeneScan-500 size standard (35-500 bp; Applied Biosystems). They were denatured by heating at 95°C for 5 min before analyses on an ABI Prism 310 capillary sequencer in GeneScan mode. Injection was performed electrokinetically at 15 kV for 30 s and the runs at 15 kV were completed within 30 min. T-RFLP profiles were analyzed using GENSCAN version 3.1 software (Applied Biosystems). Data sets were constructed by using peak height thresholds of at least 30 fluorescence units. Then, raw data were normalized by dividing each peak height by the total signal intensity of the corresponding profile. The statistical analyses of T-RFLP profiles (MDS-plot) and determination of diversity index were performed with the Primer 6 software (Primer E, Plymouth, UK). T-RFLP profiles of sampling replicate (2 per box) were averaged in order to obtain three profiles per sampling point for each condition. Similarity between these profiles was determined and an average similarity from these data was calculated. For 16S rRNA analyses, a unique profile was generated for each sampling point and clusters were formed according to averaged similarity obtained between the replicates. Average dissimilarity between each condition was determined using SIMPER function of Primer 6. Data statistical analyses were performed with STATISTICA software, version 5.5 (StatSoft, USA). The Simpson index variations were tested by two-way analysis of variance (ANOVA) in order to investigate the effects of time (T), condition with or without added *H. diversicolor* (C), and

their interaction (T x C) on the Simpson index of the experimental boxes. Significant differences between paired means were determined using the multiple-range comparison test of Duncan. The significance level was set at $\alpha = 0.05$.

2.2.6. Library construction and phylogenetic analysis

16S cDNA libraries were obtained with unlabelled PCR products from the initial sample (T_{2d} days) and from the samples at 270 days for the four conditions (CTRL_{270d}, NEREIS_{270d}, BAL_{270d}, NEREIS+BAL_{270d}). For T_{2d} library, PCR products were obtained from 12 samples (three replicates per condition, i.e. one replicate per box) and PCR products were pooled. For libraries from 270 days samples PCR products were obtained from the six replicates per conditions and they were pooled before cloning. The PCR products were ligated into the pGEM-T easy vector (Promega, USA) according to the manufacturer's protocol. The screening of clones was performed using M13 primers (Eurogentec) surrounding the cloning site. Selected clones were sequenced by GATC Biotech SARL (Konstanz, Germany).

Partial 16S rRNA gene sequences (about 800 bp) were compared to database sequences by BLAST searches (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (4). The presence of chimeric sequences was checked with Mallard and Pintail tools. Multiple sequence alignment of clones was performed by using CLUSTALX v1.83 (62). Phylogenies were constructed with the Molecular Evolutionary Genetics Analysis v3.0 program (Kumar *et al.*, 2003) using Kimura two parameters model and Neighbour-joining algorithm. DOTUR and PAST software were used to perform rarefaction analysis and calculate diversity indexes for each clone library. The coverage value is given as $C=1-(n1/N)$ where n1 is the number of clones which occurred only once in the library (22). In order to determine the significance of differences between the libraries, the LIBSHUFF method was applied (53).

2.2.7. Nucleotide sequences accession numbers

The Genbank accession numbers for the nucleotide sequences determined in this study are JF931218 to JF931648.

2.3. Results

The present study integrates a larger experiment designed to examine the impact of oil on microbial communities in bioturbated marine sediments. We previously showed that the total petroleum hydrocarbon (TPH) removal started after the day 90 of contamination

reaching approximately 60% at the end of the experiment irrespective of the addition of *Hediste (Nereis) diversicolor* although the biodiffusion-like coefficients (Db) estimating the bioturbation activity was about 5 times higher in presence of *H. diversicolor* (55). The bacterial communities showed different structural organisations with similar degradation capacities (55); we report here how archaeal communities responded to the presence of oil in bioturbated mudflat sediments.

2.3.1. Dynamics of total and metabolically active archaeal communities

Archaeal community structures were investigated by T-RFLP analysis at both genomic (Figure IV-1A) and transcriptional (Figure IV-1B) levels. Averages similarity between replicates were $67\pm 14.7\%$ and $74.7\pm 14.1\%$ for DNA- and RNA-based analysis respectively. Thus, according to this variability, clusters were determined over 52% (= 67%-15%) and 67% for DNA-based analyses and 60% (= 75%-15%) and 75% for RNA-based analyses.

For the DNA-based analysis, multidimensional scaling (MDS) analysis of T-RFLP data showed two distinct clusters over 52% similarity (A and B, Figure IV-1A). The cluster A contained all samples collected between 2 and 270 days except NEREIS_{270d} and NEREIS+BAL_{270d} found in cluster B and CTRL_{180d} which was found alone. Over 67% of similarity three subclusters appeared into cluster A (clusters 1, 2 and 3) showing that archaeal community structure was slightly modified during the first 90 days of incubation, irrespective of the experimental condition (cluster 1). Although a divergence was observed in the community structure (cluster 2) after oil contamination (BAL), no major structural variation could be observed in these microcosms except at 180 days. However, at the end of incubation, the BAL archaeal community was close to the original community (cluster 1). In contrast, samples from microcosms where *Hediste diversicolor* was added (NEREIS and NEREIS+BAL) showed a high similarity, with distinct archaeal community structure from the day 180 (clusters 3). A significant increase of Simpson diversity index (D) was observed only for NEREIS+BAL_{270d} (from $D_{2d}=0.87\pm 0.005$ to $D_{270d}=0.94\pm 0.011$, $p=0.01$ with Duncan test).

The T-RFLP pattern analysis of metabolically active archaeal communities (Figure IV-1B) showed two distinct clusters over 60% similarity (clusters A and B). Consistently with the DNA-based analysis, cluster A contained all samples collected between 2 and 270 days (except NEREIS_{2d}) and cluster B contained NEREIS_{270d} and NEREIS+BAL_{270d} samples. NEREIS_{180d} and NEREIS+BAL_{180d} were found outside cluster A showing distinct archaeal community structures. Over 75% similarity three subclusters (1, 2 and 3) were observed into

cluster A revealing more pronounced changes in archaeal community structures than the DNA-based analysis. The modification of the active archaeal community structure was observed from the second day (2 days samples falling in different clusters); the CTRL community at 90 and 180 days forming the cluster 3. At the end of incubation, the BAL archaeal community was close to the original community of control condition (cluster 2) as observed for the DNA-based analysis. As observed with the DNA analysis, the RNA analysis revealed an increase of the Simpson diversity index (D) for NEREIS+BAL_{270d} (from $D_{2d}=0.82\pm 0.001$ to $D_{270d}=0.88\pm 0.003$, $p=0.039$ with Duncan test).

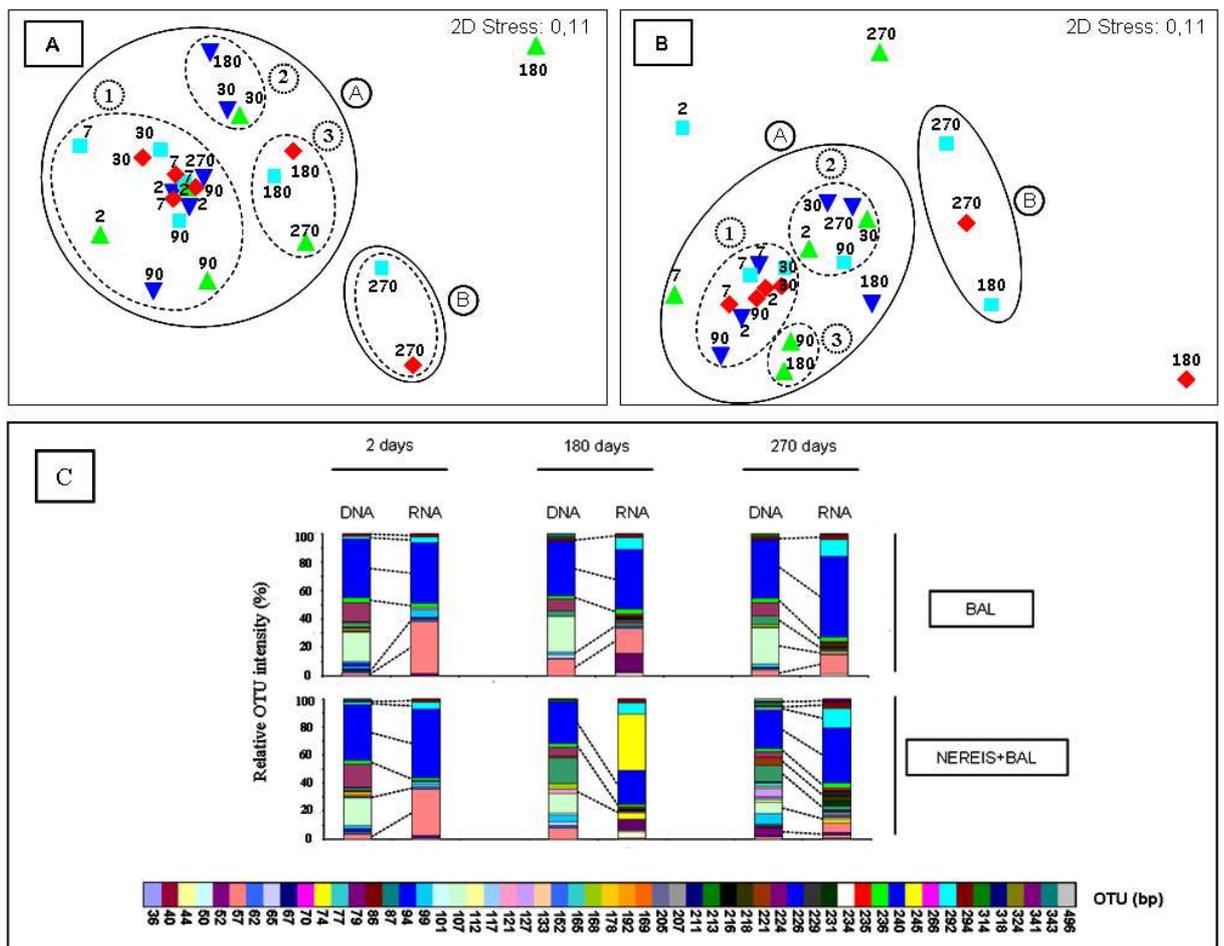


Figure IV-1: Comparison of archaeal community structures.

MDS analysis based on T-RFLP profiles (*HaeIII* and *TaqI*) from 16S rRNA gene (A) and 16S rRNA transcripts (B) extracted from sediment microcosms sampled at 2, 30, 90, 180 and 270 days of incubation. The clustering was performed from the average similarity between replicates. For (A) the clustering is related to 52% (dotted line) and 67% (solid line). For (B) the clustering is related to 67% (dotted line) and 75% (solid line). CTRL: ▲; BAL: ▼; NEREIS: ■; NEREIS+BAL: ◆. (C) Archaea OTU distribution (%) was followed by T-RFLP (*HaeIII* enzyme) based on the analysis of 16S rRNA gene and transcript for BAL and NEREIS+BAL treatments.

When comparing the BAL and NEREIS+BAL archaeal communities T-RFLP profiles, the number of T-RFs or OTUs (operational taxonomic units) was increasing during the incubation time for both DNA and RNA analyses (Figure IV-1C). The comparison of the DNA T-RFLP profiles with the RNA T-RFLP profiles showed that almost dominant T-RFs (with relative abundance $\geq 5\%$) found in the active community (RNA) were also found in the total community (DNA) but their relative abundance was lower, except for T-RF 245 bp which was detected only in the NEREIS+BAL treatment with the RNA analysis at 180 days. In contrast the T-RF 240 bp was found dominant in all profiles; ANOVA indicating no significant differences, especially when comparing DNA and RNA profiles suggesting that this OTU was not the more active in the archaeal community.

2.3.2. Composition of metabolically active archaeal communities

Phylogenetic analysis of cloned 16S cDNA sequences was performed for a pool of samples from all microcosms at day 2 (T_{2d}), CTRL_{270d}, BAL_{270d}, NEREIS_{270d} and NEREIS+BAL_{270d} microcosm sediment samples. Among the 431 sequences obtained for the five archaeal 16S rRNA transcript libraries, 73 OTUs (97% threshold) were obtained. The rarefaction analysis and the coverage (from 80.6% to 96%) indicated that most of the diversity of the *Archaea* was detected. Analyses of libraries by the LIBSHUFF method demonstrated that the five libraries were significantly different (data not shown). According to the clustering analysis (Figure IV-2A), BAL_{270d} library showed more similarity with T_{2d} library (54.9 %), as observed by T-RFLP analysis. Overall, *Crenarchaeota* represented the most abundant (119 sequences) and widespread phylum in the microcosm sediments. This phylum represented for 81.5% up to 100% of sequences in the libraries, except in NEREIS_{270d} library where it accounted only for 35%, explaining its low similarity with the other libraries (26.9%). The phylum of *Euryarchaeota* was the less represented (up to 6.8%) and detected only in CTRL_{270d} and NEREIS+BAL_{270d} libraries. Sequences belonging to ammonia-oxidizers *Thaumarchaeota* reached 62.5% in NEREIS_{270d} library while they accounted for about 11.6% and 11.2% in NEREIS+BAL_{270d} and CTRL_{270d} libraries respectively; they were not detected in BAL_{270d} library. These sequences showed between 93% and 98% identity with *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* (33), an autotrophic nitrifying marine archaeon..

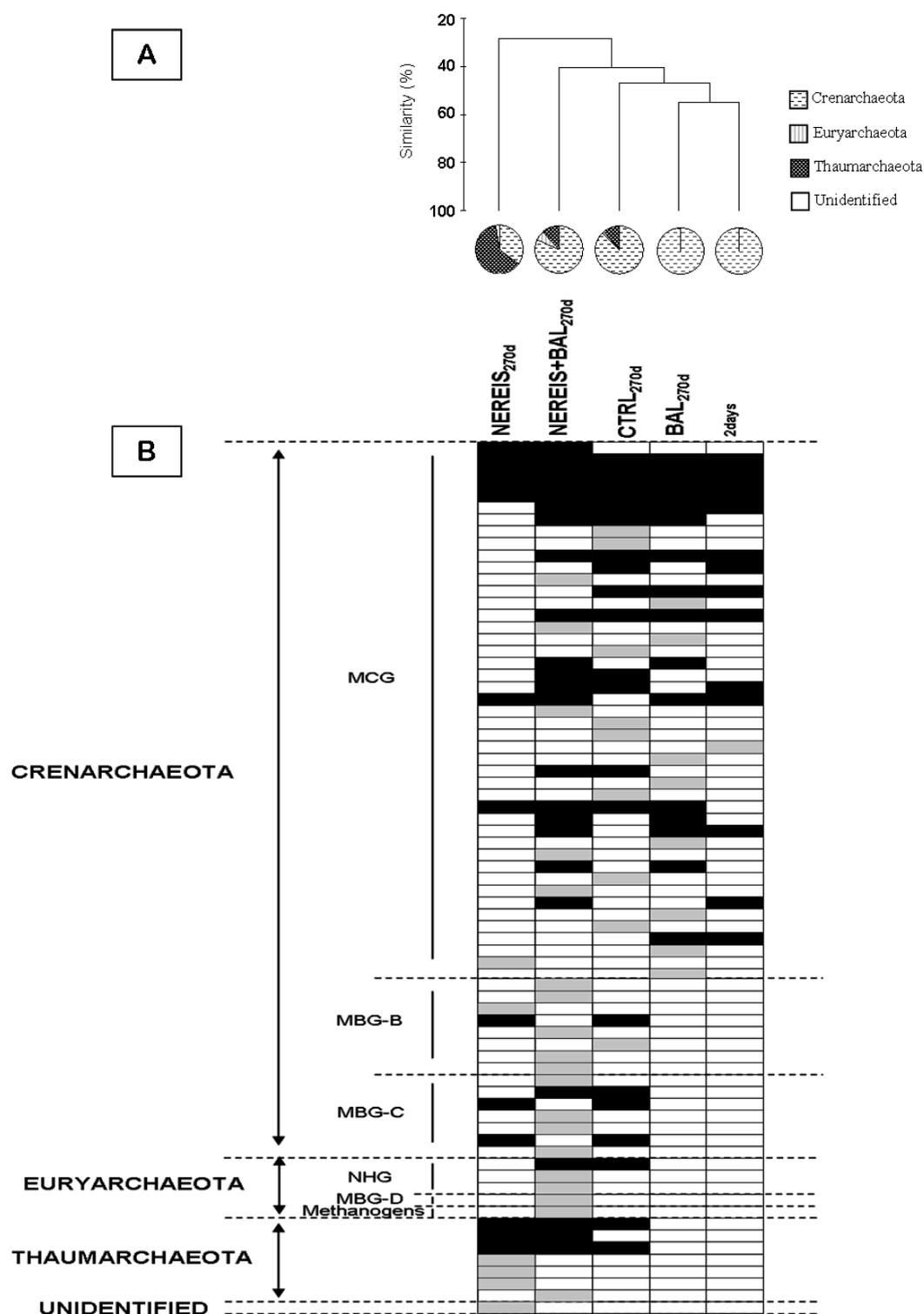


Figure IV-2: Comparison of cDNA archaeal libraries.

(A) Hierarchical clustering based on Bray Curtis similarity index calculated with the relative abundances of sequences. A threshold of 97% was applied for the phylogenetic affiliation of sequences. (B) Phylotypes (OTUs) distribution within the five libraries based on the absence/presence of the phylogenetic archaeal groups. Specific OTUs found only in one library are coloured in grey.

The 16S cDNA sequences fell into seven phylogenetic groups. Figure IV-2B shows the distribution of phylotypes (OTUs) within these phylogenetic groups for each library. All the sequences obtained for T_{2d} and BAL_{270d} libraries belonged to the Miscellaneous Crenarchaeotal Group (MCG). This MCG showed the highest number of phylotypes in all libraries. This group was related to T-RF 240 bp, which was found abundant in DNA- and RNA-based T-RFLP analyses. Among the 15 MCG OTUs detected from the beginning of experiment (T_{2d}), 14 OTUs were also found at 270 days in all conditions. NEREIS_{270d} library was characterized by the dominance of sequences related to ammonia-oxidizers *Thaumarchaeota* (62.5%), corresponding to 6 OTUs. In contrast, *Crenarchaeota*, which corresponded to 12 phylotypes represented only at 35% in this library.

The NEREIS+BAL library showed the most important richness (43 OTUs), the sequences being affiliated to different groups from distinct phyla: MCG, Marine Benthic Group B and C (MBG-B and C) among the *Crenarchaeota*; novel halobacterial group (NHG) (25) and Marine Benthic Group D (MBG-D) of the *Euryarchaeota*, and members of the *Thaumarchaeota*. Interestingly, most of sequences related to crenarchaeotal MBG-B, MGB-C and to *Euryarchaeota* were specific to NEREIS+BAL condition (13 of 15 OTUs). Methanogenic *Archaea* was found only in NEREIS+BAL_{270d} library (one OTU). It was affiliated to the Methanosarcinales order with 98% of identity with *Methanococcoides methylutens* (54), a marine methylotrophic methanogen.

2.3.4. Dynamics of total and metabolically active methanogenic communities

Structures of total and metabolically active methanogenic communities were analysed by T-RFLP based on *mcrA* gene (Figur IV-3, left) and transcript (Figure IV-3, right). Comparative analysis of *mcrA* DNA-based T-RFLP fingerprints showed clearly that NEREIS+BAL and CTRL microcosms exhibited distinct community structures from the day 2 and all along the experiment. In contrast, BAL and NEREIS communities overlapped with CTRL community until the day 180 of incubation. Thus, BAL and NEREIS+BAL treatments showed distinct community structures all along the experiment with a pronounced impact of polychaetes in presence of oil on methanogenic community.

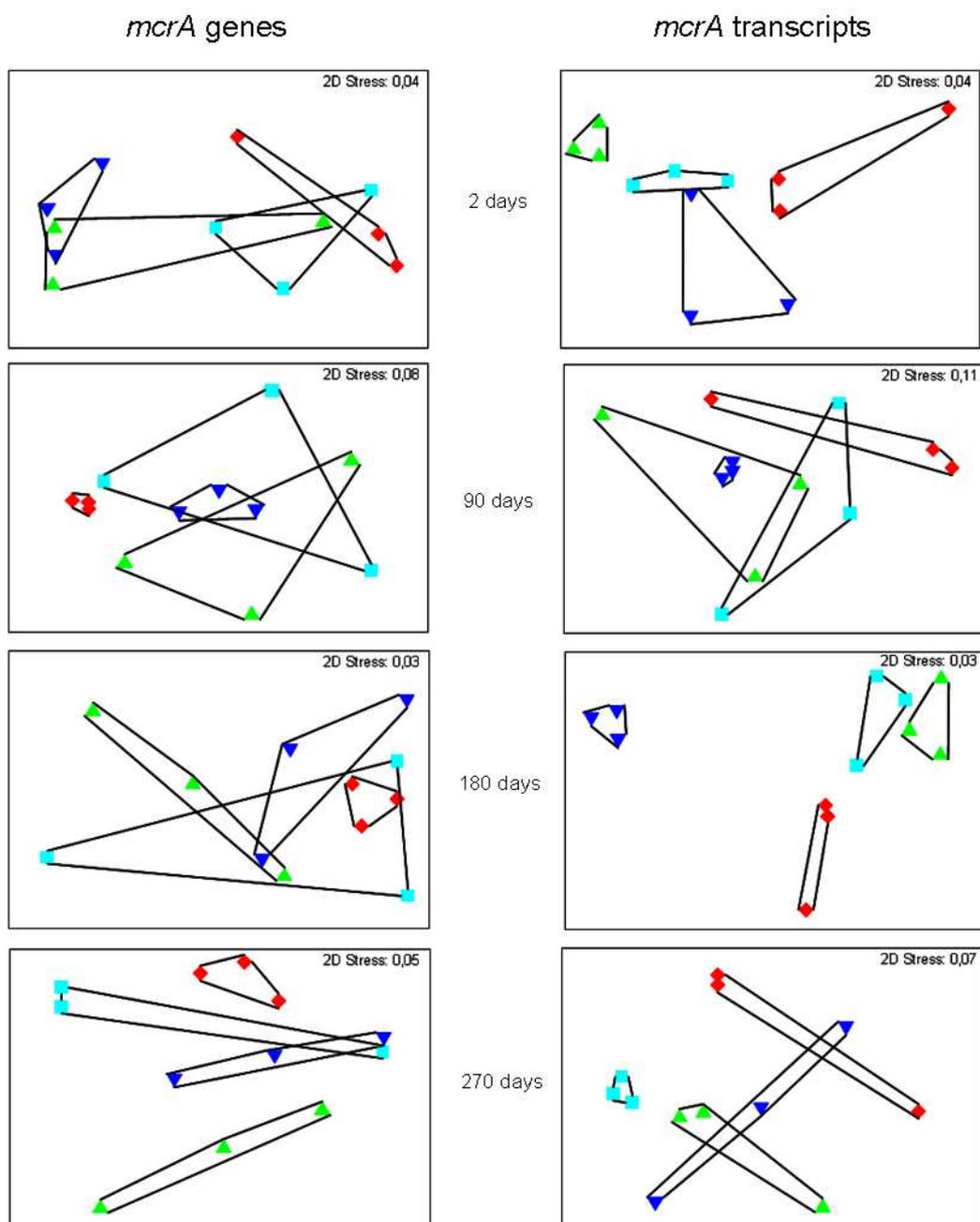


Figure IV-3: Comparison of methanogenic archaeal community structures
MDS-plot analyses are based on replicate T-RFLP profiles (digested with *MspI* and *Sau96I*) from *mcrA* gene (left) and *mcrA* transcripts (right) extracted from sediment microcosms sampled at 2, 90, 180 and 270 days of incubation. CTRL: ▲; BAL: ▼; NEREIS: ■; NEREIS+BAL: ◆.

In contrast to that observed with the DNA-based analysis, *mcrA* transcript analysis (Figure IV-3, right) showed marked differences between the four treatments from the second day of incubation suggesting that the alteration of methanogenic community occurred quickly after starting the experiment. The fact that specific methanogenic community structures take place in each treatment suggested that specific responses were followed. Although the

observed overlapping between community structures during experiment (NEREIS_{90d} and NEREIS+BAL_{90d} for example, Figure IV-3 right), it is important to notice that NEREIS+BAL community never showed an overlapping with CTRL community and was clearly distinct with the BAL community structures all along the experiment except at 270 days. Additionally, this community exhibited the most important modification (77.6% dissimilarity between NEREIS+BAL_{270d} and NEREIS+BAL_{2d} communities with SIMPER analysis) while in the other conditions, the dissimilarities were about 66%. At 270 days, a specific methanogenic community structure was observed for the NEREIS condition, the only community that showed a significant increase of the Simpson diversity index (from $D_{2d}=0.725\pm 0.104$ to $D_{270d}=0.884\pm 0.014$, $p=0.026$ with Duncan test).

Figure IV-4 shows the distribution of *mcrA* cDNA-based T-RFs (OTUs) from T-RFLP profiles with Sau96I digestion. We observed that several OTUs were shared between different treatments. For example three dominant OTUs (356 bp, 370 bp and 387 bp) were observed all along the experiment, occurring in different relative abundances within the four conditions. Interestingly, at 180 days a dominant OTU, representing more than 50%, was observed in all conditions (CTRL, 356 bp: 74.8%; BAL, 387 bp: 60%; NEREIS: 356 bp: 64.1%), except for NEREIS+BAL. This last condition showed the highest diversity at 180 days and a dominant OTU 391 bp (70.4%) at 270 days which was different to that observed on the other conditions (OTU 356 pb).

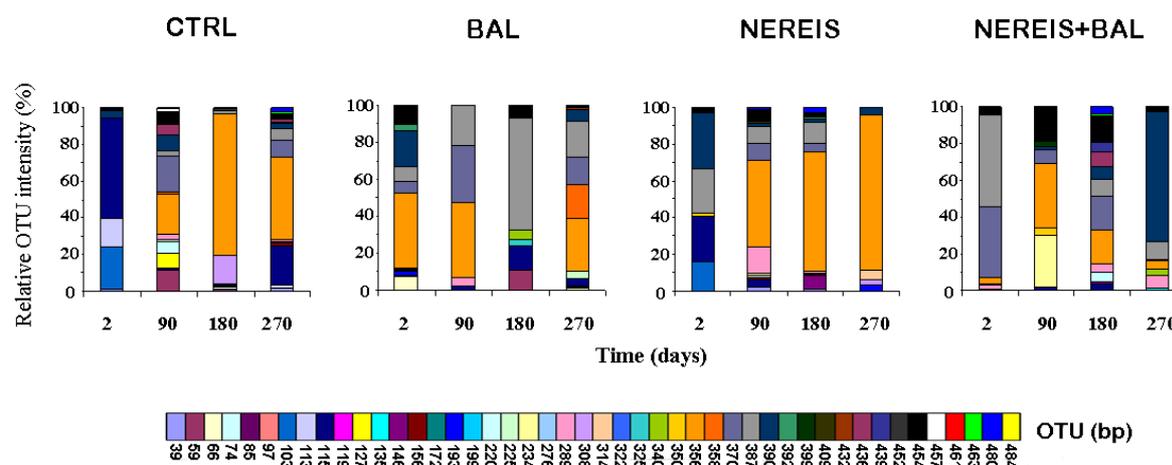


Figure IV-4: Comparison of metabolically active methanogenic archaeal communities during the incubation period for the four conditions (CTRL, BAL, NEREIS and NEREIS+BAL). The methanogenic archaeal OTU distribution (%) was followed by T-RFLP based on the analysis of *mcrA* transcripts digested with *Sau96I* enzyme.

2.4. Discussions

The comparison between oil polluted conditions BAL and NEREIS+BAL, showed that both archaeal communities exhibited distinct structures. In presence of oil, addition of *Hediste (Nereis) diversicolor* significantly increased the archaeal diversity as demonstrated by T-RFLP and library analyses at both rRNA gene and transcript levels. Overall treatments, the addition of *H. diversicolor* induced the more pronounced modifications on archaeal communities. To the best of our knowledge, the effect of the macrofauna on archaeal community structure has not been studied previously. Most studies focusing on macrofauna effect on sediments was related to pollutant degradation or/and bacterial community reporting an increase of bacterial diversity due to reworking macroorganisms (36), as with hydrocarbons pollutants (55), or herbicide (46).

2.4.1. Impact of *H. diversicolor* addition on archaeal community

In this study, we showed a higher abundance and diversity of *Thaumarchaeota* when polychaetes were added. The *Thaumarchaeota* phylum (the former Marine Group I) includes marine symbionts (9, 50) and ammonia-oxidizing microorganisms (33). The dominance of this phylum, in presence of polychaetes, suggested an active aerobic nitrification, although it is difficult to correlate the sequence abundance to the microbial activity. It is well established now that the irrigation of burrows by reworking activity of macrofauna introduces fresh oxygenated water into deeper sediment layers and allows the exchange of solutes between the sediment and the water column (18, 34). Burrows can effectively extend the oxic/anoxic interface into deeper sediment layers, thus providing a unique environment for nitrogen-cycling microbial communities (20). Interestingly, Porat et al. (49) observed a high number of sequences related to *Thaumarchaeota* in an environment exhibiting high concentrations of nitrate. All these considerations together suggested that the nitrogen cycle was active in the bioturbated microcosms; the *Archaea* playing a crucial role. This positive effect of *H. diversicolor* on *Thaumarchaeota* abundance was prevented by oil addition despite the highest reworking activity found in the oiled condition (55). It is important to notice that *Thaumarchaeota* were not detected in BAL treatment. This result was not surprising since the sensitivity of ammonia-oxidizing *Archaea* to petroleum was already demonstrated (63). Furthermore, it is well known that the presence of oil diminish oxygen flux decreasing the redox potential in sediment resulting in more favourable conditions for anaerobic metabolisms such as sulfate-reduction (7). It is likely that environmental conditions became less favourable

for aerobic nitrifying *Archaea*. This observation was consistent with a previous study on bacterial communities from the same incubated sediments showing a high abundance of sulfate-reducing *Bacteria* in oil-contaminated microcosms even with added of polychaetes (55).

2.4.2. Oil impact on archaeal community

For the first time the impact of oil on metabolically active archaeal community (RNA level analysis) was observed in presence of polychaetes. The active community structure was modified after 180 days of incubation, when the oil removal started. At the end of experiment (270 days), when more than 60% of TPH were removed, T-RFLP and 16S RNA transcript library analyses showed that archaeal community from BAL condition was closely related to the initial community. This “go back to square one”, commonly observed with bacterial communities in oil-contaminated sediment (8), suggested that it may also be a common process for *Archaea* after TPH removal. The physiological flexibility of microorganisms, allowing archaeal communities to recover their initial structure, could explain this process. The involvement of *Archaea* in TPH degradation still to be demonstrated in our study.

Sequences related to *Crenarchaeota* MCG were exclusively detected in BAL_{270d} and T_{2d} libraries suggesting that these microorganisms have the capacity to adapt their metabolism to environmental changes. Indeed, the *Crenarchaeota* MCG are known to occur in a wide range of marine and terrestrial environments (58, 59). Without assigning metabolic function to this group, Inagaki and co-workers demonstrated that MCG was dominant in organic-rich sediments compared to organic-poor sediments (29). Marine environment, being a reservoir of organic matter (65), is a favorable environment for MCG growth, explaining their dominance observed in all libraries. However, they were found less dominant when *H. diversicolor* was added, especially in NEREIS condition. This observation may be explained by the fact that oxygen introduction into sediment by the reworking activity of *H. diversicolor* created a less favourable environment for MCG. This group was frequently found in anoxic habitats such as deep subsurface marine sediments (6) or well-defined redoxcline oligotrophic lake (39). Interestingly, in NEREIS+BAL microcosm the MCG community was maintained suggesting that the presence of oil restore favourable conditions for their growth.

2.4.3. Methanogen behaviour in oiled bioturbated sediment

Euryarchaeota, especially methanogens, were mainly found in the oil-contaminated NEREIS+BAL library using archaeal domain specific primers. They were not or weakly detected under the other conditions which were dominated by *Crenarchaeota* (except for NEREIS condition). In contrast, several studies have reported the dominance of *Euryarchaeota* (37, 44, 51) and the presence of methanogens in various oil-contaminated environments (32, 64, 67). Their association with the degradation of petroleum compounds has also been shown (31, 52). In this study the methanogens were detected in all conditions with specific primers targeting the *mcrA* genes and transcripts. The *mcrA* gene, encoding α subunit of the methyl-coenzyme M reductase (MCR) was used as specific marker for the detection and differentiation of methanogen communities (41, 42). The discrepancy observed between the use of 16S archaeal rRNA and *mcrA* primers could be explained by the difficulties to detect minor groups in prokaryotic communities. Of course the low specificity of primers targeting the *Archaea* domain for methanogens could not be excluded. Our results showed that total methanogenic communities were impacted when *H. diversicolor* was added in oil contaminated microcosms. Similarly, the methanogen metabolically active communities showed specific response to each treatment that was observed from the beginning of the experiment. In the NEREIS condition, the polychaetes induced a negative effect on total methanogens diversity (DNA analysis) but the active methanogenic archaea diversity (RNA analysis) was increased. Despite the oxygen introduction by the macrofauna reworking activity, active methanogens were detected. Their presence could be explained by formation of anoxic micro-niches (27, 60, 61), as well as by seeding from either body's worm or faecal pellets of *H. diversicolor* (24, 40, 66). Interestingly, in presence of oil (NEREIS+BAL) a specific community, different to that observed in the NEREIS condition, was selected showing that methanogens found an ecological niche. So far, the syntrophic interactions have been demonstrated as the only role of methanogens in hydrocarbon degradation (19, 68). Although microorganisms involved in these interactions play an important role on the organic matter mineralisation in marine sediments, the ecological factors driving syntrophic interactions are still limited. Further studies on this phenomenon will provide better knowledge to understand the impact of oil spill on microbial communities and their response.

Until recently, little information was available on *Archaea* mainly because they are difficult to cultivate. It was established that they were found only in extreme environments

with elevated temperature, low pH or high salinity. However, new groups of abundant, uncultivated *Archaea* have been found to be widespread in more biotopes. To date, a large part of *Archaea* remains uncultured, thus they are largely unknown for their ecological role in environment. The present study brings new insight into archaeal ecology and it is the first report on the impact of oil pollution and macrofauna on *Archaea*, especially methanogens. Our results demonstrated that macrofauna increased *Euryarchaeota* and *Thaumarchaeota* diversity in oil-contaminated sediment. Methanogens were positively affected by macrofauna and we detected mRNA of *mcrA* genes up to 270 days indicating a methanogenic activity in sediments. The dynamic of *Archaea* in bioturbated and oil-contaminated sediments highlighted the important impact of macrofauna on microbial communities showing the necessity to take into account the macrofauna and its activities in environmental bioremediation studies.

2.5. Acknowledgements

This work was supported by ANR (DHYVA project 06-SEST-009). We thank all partners of the DHYVA project for their useful discussions. We also thank NORMANDIE APPÂTS, particularly Michel LOPUSZANSKI, who kindly provided the polychaetes.

2.6. References

1. **Al-Mailem, D. M., N. A. Sorkhoh, H. Al-Awadhi, M. Eliyas, and S. S. Radwan.** 2010. Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. *Extremophiles* **14**:321-328.
2. **Aller, R. C.** 1994. Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation. *Chemical Geology* **114**:331-345.
3. **Aller, R. C., N. E. Blair, Q. Xia, and P. D. Rude.** 1996. Remineralization rates, recycling, and storage of carbon in Amazon shelf sediments. *Continental Shelf Research* **16**:753-786.
4. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**:3389-3402.

5. **Anderson, R. T., and D. R. Lovley.** 2000. Hexadecane decay by methanogenesis. *Nature* **404**:722-723.
6. **Biddle, J. F., J. S. Lipp, M. A. Lever, K. G. Lloyd, K. B. Sørensen, R. Anderson, H. F. Fredricks, M. Elvert, T. J. Kelly, D. P. Schrag, M. L. Sogin, J. E. Brenchley, A. Teske, C. H. House, and K. U. Hinrichs.** 2006. Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:3846-3851.
7. **Bonin, P., M. Gilewicz, E. Rambeloarisoa, G. Mille, and J. C. Bertrand.** 1990. Effect of crude oil on denitrification and sulfate reduction in marine sediments. *Biogeochemistry* **10**:161-174.
8. **Bordenave, S., M. S. Goñi-Urriza, P. Caumette, and R. Duran.** 2007. Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:6089-6097.
9. **Brochier-Armanet, C., B. Boussau, S. Gribaldo, and P. Forterre.** 2008. Mesophilic crenarchaeota: Proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology* **6**:245-252.
10. **Cetecioglu, Z., B. K. Ince, M. Kolukirik, and O. Ince.** 2009. Biogeographical distribution and diversity of bacterial and archaeal communities within highly polluted anoxic marine sediments from the marmara sea. *Marine Pollution Bulletin* **58**:384-395.
11. **Chaban, B., S. Y. M. Ng, and K. F. Jarrell.** 2006. Archaeal habitats - From the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology* **52**:73-116.
12. **Chang, W., Y. Um, and T. R. P. Holoman.** 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation coupled to methanogenesis. *Biotechnology Letters* **28**:425-430.
13. **Christensen, M., G. T. Banta, and O. Andersen.** 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.
14. **Chung, W. K., and G. M. King.** 1999. Biogeochemical transformations and potential polyaromatic hydrocarbon degradation in macrofaunal burrow sediments. *Aquatic Microbial Ecology* **19**:285-295.
15. **DeLong, E. F.** 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:5685-5689.
16. **DeLong, E. F.** 1998. Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles'. *Current Opinion in Genetics and Development* **8**:649-654.

17. **Dollhopf, S. L., J. H. Hyun, A. C. Smith, H. J. Adams, S. O'Brien, and J. E. Kostka.** 2005. Quantification of ammonia-oxidizing bacteria and factors controlling nitrification in salt marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:240-246.
18. **Fenchel, T.** 1996. Worm burrows and oxic microniches in marine sediments. 1. Spatial and temporal scales. *Marine Biology* **127**:289-295.
19. **Ficker, M., K. Krastel, S. Orlicky, and E. Edwards.** 1999. Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium. *Applied and Environmental Microbiology* **65**:5576-5585.
20. **Gilbert, F., G. Stora, and P. Bonin.** 1998. Influence of bioturbation on denitrification activity in Mediterranean coastal sediments: An in situ experimental approach. *Marine Ecology Progress Series* **163**:99-107.
21. **Gilbert, F., G. Stora, G. Desrosiers, B. Deflandre, J. C. Bertrand, J. C. Poggiale, and J. P. Gagné.** 2001. Alteration and release of aliphatic compounds by the polychaete *Nereis virens* (Sars) experimentally fed with hydrocarbons. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **256**:199-213.
22. **Good, I. J.** 1953. The population frequencies of species and the estimation of the population parameters. *Biometrika* **40**:237-264.
23. **Hales, B. A., C. Edwards, D. A. Ritchie, G. Hall, R. W. Pickup, and J. R. Saunders.** 1996. Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:668-675.
24. **Harris, J. M.** 1993. The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis. *Microbial Ecology* **25**:195-231.
25. **Heijs, S. K., R. R. Haese, P. W. J. J. Van Der Wielen, L. J. Forney, and J. D. Van Elsas.** 2007. Use of 16S rRNA gene based clone libraries to assess microbial communities potentially involved in anaerobic methane oxidation in a Mediterranean cold seep. *Microbial Ecology* **53**:384-398.
26. **Hickman, Z. A., and B. J. Reid.** 2008. Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. *Environment International* **34**:1072-1081.
27. **Hirasawa, J. S., A. Sarti, N. K. S. Del Aguila, and M. B. A. Varesche.** 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.

28. **Holmer, M., V. E. Forbes, and T. L. Forbes.** 1997. Impact of the polychaete *Capitella* sp. I on microbial activity in an organic-rich marine sediment contaminated with the polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene. *Marine Biology* **128**:679-688.
29. **Inagaki, F., T. Nunoura, S. Nakagawa, A. Teske, M. Lever, A. Lauer, M. Suzuki, K. Takai, M. Delwiche, F. S. Colwell, K. H. Nealson, K. Horikoshi, S. D'Hondt, and B. B. Jørgensen.** 2006. Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:2815-2820.
30. **Jarrell, K. F., A. D. Walters, C. Bochiwal, J. M. Borgia, T. Dickinson, and J. P. J. Chong.** 2011. Major players on the microbial stage: Why Archaea are important. *Microbiology* **157**:919-936.
31. **Jones, D. M., I. M. Head, N. D. Gray, J. J. Adams, A. K. Rowan, C. M. Aitken, B. Bennett, H. Huang, A. Brown, B. F. J. Bowler, T. Oldenburg, M. Erdmann, and S. R. Larter.** 2008. Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature* **451**:176-180.
32. **Kasai, Y., Y. Takahata, T. Hoaki, and K. Watanabe.** 2005. Physiological and molecular characterization of a microbial community established in unsaturated, petroleum-contaminated soil. *Environmental Microbiology* **7**:806-818.
33. **Könneke, M., A. E. Bernhard, J. R. De La Torre, C. B. Walker, J. B. Waterbury, and D. A. Stahl.** 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**:543-546.
34. **Kristensen, E.** 1984. Effect of natural concentrations on nutrient exchange between a polychaete burrow in estuarine sediment and the overlying water. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **75**:171-190.
35. **Laverock, B., J. A. Gilbert, K. Tait, A. M. Osborn, and S. Widdicombe.** 2011. Bioturbation: Impact on the marine nitrogen cycle. *Biochemical Society Transactions* **39**:315-320.
36. **Laverock, B., C. J. Smith, K. Tait, A. M. Osborn, S. Widdicombe, and J. A. Gilbert.** 2010. Bioturbating shrimp alter the structure and diversity of bacterial communities in coastal marine sediments. *ISME Journal*.
37. **Liu, R., Y. Zhang, R. Ding, D. Li, Y. Gao, and M. Yang.** 2009. Comparison of archaeal and bacterial community structures in heavily oil-contaminated and pristine soils. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **108**:400-407.

38. **Liu, Y. J., A. Zaprasis, S. J. Liu, H. L. Drake, and M. A. Horn.** 2011. The earthworm *Aporrectodea caliginosa* stimulates abundance and activity of phenoxyalkanoic acid herbicide degraders. *ISME Journal* **5**:473-485.
39. **Llirós, M., F. Gich, A. Plasencia, J. C. Auguet, F. Darchambeau, E. O. Casamayor, J. P. Descy, and C. Borrego.** 2010. Vertical distribution of ammonia-oxidizing crenarchaeota and methanogens in the epipelagic waters of lake kivu (rwanda-democratic republi of the congo). *Applied and Environmental Microbiology* **76**:6853-6863.
40. **Lucas, F. S., G. Bertru, and M. G. Höfle.** 2003. Characterization of free-living and attached bacteria in sediments colonized by *Hediste diversicolor*. *Aquatic Microbial Ecology* **32**:165-174.
41. **Lueders, T., K. J. Chin, R. Conrad, and M. Friedrich.** 2001. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase α -subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environmental Microbiology* **3**:194-204.
42. **Luton, P. E., J. M. Wayne, R. J. Sharp, and P. W. Riley.** 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* **148**:3521-3530.
43. **Mermillod-Blondin, F., R. Rosenberg, F. François-Carcaillet, K. Norling, and L. Mauclair.** 2004. Influence of bioturbation by three benthic infaunal species on microbial communities and biogeochemical processes in marine sediment. *Aquatic Microbial Ecology* **36**:271-284.
44. **Miralles, G., M. Acquaviva, J. C. Bertrand, and P. Cuny.** 2010. Response of an archaeal community from anoxic coastal marine sediments To experimental petroleum contamination. *Aquatic Microbial Ecology* **59**:25-31.
45. **Monard, C., F. Martin-Laurent, C. Vecchiato, A. J. Francez, P. Vandenkoornhuys, and F. Binet.** 2008. Combined effect of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **40**:2253-2259.
46. **Monard, C., P. Vandenkoornhuys, B. Le Bot, and F. Binet.** 2010. Relationship between bacterial diversity and function under biotic control: the soil pesticide degraders as a case study. *ISME Journal*.

47. **Näslund, J., F. J. Nascimento, and J. S. Gunnarsson.** 2010. Meiofauna reduces bacterial mineralization of naphthalene in marine sediment. *ISME Journal* **4**:1421-1430.
48. **Orcutt, B. N., S. B. Joye, S. Kleindienst, K. Knittel, A. Ramette, A. Reitz, V. Samarkin, T. Treude, and A. Boetius.** 2010. Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **57**:2008-2021.
49. **Porat, I., T. A. Vishnivetskaya, J. J. Mosher, C. C. Brandt, Z. K. Yang, S. C. Brooks, L. Liang, M. M. Drake, M. Podar, S. D. Brown, and A. V. Palumbo.** 2010. Characterization of archaeal community in contaminated and uncontaminated surface stream sediments. *Microbial Ecology* **60**:784-795.
50. **Preston, C. M., K. Y. Wu, T. F. Molinski, and E. F. Delong.** 1996. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:6241-6246.
51. **Röling, W. F. M., I. R. Couto De Brito, R. P. J. Swannell, and I. M. Head.** 2004. Response of archaeal communities in beach sediments to spilled oil and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* **70**:2614-2620.
52. **Siddique, T., T. Penner, K. Semple, and J. M. Foght.** 2011. Anaerobic biodegradation of longer-chain n-alkanes coupled to methane production in oil sands tailings. *Environmental Science and Technology* **45**:5892-5899.
53. **Singleton, D. R., M. A. Furlong, S. L. Rathbun, and W. B. Whitman.** 2001. Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* **67**:4374-4376.
54. **Sowers, K. R., and J. G. Ferry.** 1983. Isolation and characterization of a methylotrophic marine methanogen, *Methanococcoides methylutens* gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* **45**:684-690.
55. **Stauffert, M., Cravo-Laureau C., Jézéquel, R., Cuny P., Gilbert, F., Militon C., Amouroux, D., Mahdaoui F., Bouyssiére, B., Stora, G., Merlin, F-X., Duran, R.** Impact of crude oil on bacterial communities' structure in bioturbated sediments submitted to *Applied and Environmental Microbiology* for publication.

56. **Taketani, R. G., N. O. Franco, A. S. Rosado, and J. D. van Elsas.** 2010. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. *Journal of Microbiology* **48**:7-15.
57. **Tapilatu, Y. H., V. Grossi, M. Acquaviva, C. Militon, J. C. Bertrand, and P. Cuny.** 2010. Isolation of hydrocarbon-degrading extremely halophilic archaea from an uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France). *Extremophiles* **14**:225-231.
58. **Teske, A., and K. B. Sørensen.** 2008. Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: Have we caught them all? *ISME Journal* **2**:3-18.
59. **Teske, A. P.** 2006. Microbial communities of deep marine subsurface sediments: Molecular and cultivation surveys, p. 357-368, *Handbook of Environmental Chemistry, Volume 5: Water Pollution*, vol. 23.
60. **Thauer, R. K.** 1998. 140th Ordinary Meeting of the Society for General Microbiology, 31 March 1998: Biochemistry of methanogenesis: A tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* **144**:2377-2406.
61. **Tholen, A., M. Pester, and A. Brune.** 2007. Simultaneous methanogenesis and oxygen reduction by *Methanobrevibacter cuticularis* at low oxygen fluxes. *FEMS Microbiology Ecology* **62**:303-312.
62. **Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins.** 1997. The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**:4876-4882.
63. **Urakawa, H., J. C. Garcia, P. D. Barreto, G. A. Molina, and J. C. Barreto.** 2012. A sensitive crude oil bioassay indicates that oil spills potentially induce a change of major nitrifying prokaryotes from the Archaea to the Bacteria. *Environ Pollut* **164C**:42-45.
64. **Watanabe, K., Y. Kodama, N. Hamamura, and N. Kaku.** 2002. Diversity, abundance, and activity of archaeal populations in oil-contaminated groundwater accumulated at the bottom of an underground crude oil storage cavity. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:3899-3907.
65. **Watson, A. J., and J. C. Orr.** 2003. Carbon dioxide fluxes in the global ocean. *Ocean Biogeochemistry*:123-143.
66. **Wilde, S. B., and C. J. Plante.** 2002. Spatial heterogeneity of bacterial assemblages in marine sediments: The influence of deposit feeding by *Balanoglossus aurantiacus*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **55**:97-107.

67. **Yoshida, N., K. Yagi, D. Sato, N. Watanabe, T. Kuroishi, K. Nishimoto, A. Yanagida, T. Katsuragi, T. Kanagawa, R. Kurane, and Y. Tani.** 2005. Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **99**:143-149.
68. **Zengler, K., H. H. Richnow, R. Rossello-Mora, W. Michaelis, and F. Widdel.** 1999. Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* **401**:266-269.

3. ANALYSE COMPLEMENTAIRE

Afin de préciser la dynamique des archées au sein des sédiments, les séquences des banques BAL et NEREIS+BAL ont subi une restriction *in silico* avec les enzymes HaeIII et TaqI. Les T-RFs générés ont ensuite été recherchés dans les profils T-RFLP. Les résultats obtenus avec l'enzyme HaeIII sont présentés dans le tableau IV-1.

Tableau IV-1: Correspondance entre les fragments de digestion générés *in silico* à partir des séquences des banques de clones et les données T-RFLP (HaeIII). MCG : Miscellaneous Crenarchaeotic Group ; MBG : Marine Benthic Group ; NHG : Novel Halobacteriales. Les T-RF générés *in silico* non assignés au profil T-RFLP ont été notifiés comme non déterminés (n.d.).

Phylums	Groupes	T-RFs attendus (pb)	T-RFs observés dans les profils T-RFLP (pb)
CRENARCHAEOTA	MCG	220 / 233 / 240 / 270 / 299	221 / 235 / 241 / n.d. / n.d.
	MBG-B	169 / 293	n.d. / 294
	MBG-C	110 / 237	107 / 237
EURYARCHAEOTA	NHG	217 / 324	216 / n.d.
	MBG-D	n.d.	n.d.
	Méthanogènes	319	316
THAUMARCHAEOTA		214	214

Mis à part les séquences affiliées au Marine Benthic Group D (*Euryarchaeota*), nous avons pu assigner les T-RFs *in silico* pour tous les autres membres de la communauté archéenne détectés dans les banques. Bien que l'identification de ces T-RFs reste hypothétique nous les avons suivis au fil du temps dans les deux communautés issues des sédiments contaminés (Figure IV-6).

Les assignations effectuées ont permis de représenter entre 35,5% à 76,9% des profils. Malgré la nature hypothétique de cette analyse, les résultats obtenus sont pour la plupart en accord avec les données issues des banques. Ainsi, les T-RFs assignés aux MCG dominent la communauté dans les deux types de sédiment et particulièrement dans le profil BAL_{270j} (70%) pour lequel la somme des abondances relatives des T-RFs assignés atteint 76,9%. Les T-RFs assignés aux *Euryarchaeota* sont minoritaires au sein des profils et ne sont détectés qu'à 180 jours pour la communauté BAL (< 1%) et 270 jours pour la communauté NEREIS+BAL (3,5%). Enfin, les *Thaumarchaeota* (archées nitrifiantes, AOA) correspondraient à un seul T-RF (214 pb) détectés à partir de 180 jours dans les deux conditions contaminées.

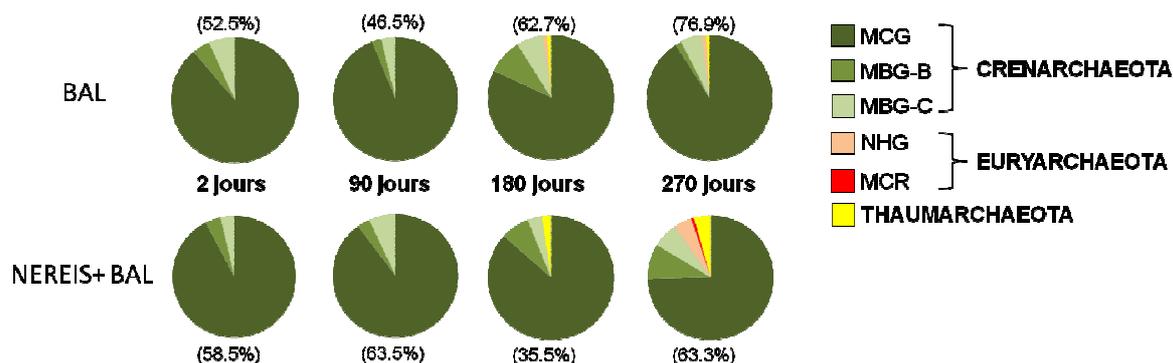


Figure IV-5 : Suivi temporel de l'abondance des T-RFs assignés aux différents groupes d'archées. Les pourcentages notés entre parenthèse indiquent la somme de l'abondance relative totale de ces T-RFs.

4. PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION

Cette étude a montré que suite à la contamination pétrolière, aucune perturbation majeure de la communauté archéenne n'était observée sur une période de 90 jours au niveau génomique, les premières modifications ayant été détectées seulement au bout de 180 jours. Cette période pourrait être assimilée à une forme de **résistance de la communauté archéenne** qui tente de maintenir sa structure dans son ensemble face à la perturbation qu'elle subit. A 270 jours, un retour à la structure initiale de la communauté a été observé. Ainsi, pendant la période de biodégradation (180-270 jours) la communauté a subi une forte restructuration. Il semblerait que les *Crenarchaeota* appartenant au MCG soient à l'origine de cet évènement. Ces résultats suggèrent une **résilience de la communauté archéenne** (retour de la communauté à son état initial après s'être modifiée suite à un changement environnemental). Néanmoins, il paraît difficile de l'affirmer car (i) la communauté initiale de référence correspond à 2 jours d'incubation, nous ne pouvons donc pas exclure qu'elle ait déjà subi des altérations structurales ; et (ii) le terme de résilience reflète un état qui perdure dans le temps et ce phénomène n'a été observé qu'au point final de l'incubation. *A contrario*, la structure de la communauté métaboliquement active a été altérée dès 2 jours d'incubation mais a présenté également un retour de la communauté à sa structure initiale. Ce phénomène a déjà été observé chez les bactéries (Girvan et al., 2005 ; Bordenave et al., 2007a). Il peut s'expliquer (i) par une grande flexibilité métabolique de certains micro-organismes, (ii) par

une adaptation liée à des transferts horizontaux ou (iii) par le fait que les MCG devenus minoritaires à 180 jours consomment les métabolites issus de la dégradation des hydrocarbures pour redevenir majoritaires dans la communauté en fin d'expérimentation (Allison and Martiny, 2008). A ce jour, aucune souche archée cultivable n'est apparentée au groupe des MCG, il paraît donc difficile de déterminer leur implication dans la dégradation des hydrocarbures, cependant **nos résultats suggèrent qu'ils seraient impliqués dans les étapes secondaires de la dégradation des hydrocarbures.**

Dans les sédiments bio-augmentés en polychaetes, la communauté archéenne a montré un comportement similaire dans les premiers temps de la contamination pétrolière. Des modifications majeures de la communauté ont été observées à partir de 180 jours d'incubation conduisant à une communauté très divergente et présentant une plus grande diversité que la communauté initiale. Ainsi, **le retour à l'état initial décrit précédemment n'est pas observé dans le sédiment fortement bioturbé.** L'analyse de la composition de la communauté archéenne indique que dans un premier temps, les MCG maintiendraient la structure de la communauté face à la contamination, puis dans un deuxième temps sous l'action des polychaetes, des archées appartenant essentiellement aux *Euryarchaeota* et aux *Crenarchaeota* des groupes *MBG-B* et *-C* émergeraient. Dans le chapitre III nous avons démontré que ces modifications de la communauté ne confèrent pas un avantage pour la dégradation des hydrocarbures. Cette communauté serait donc plus adaptée aux conditions physico-chimiques fluctuantes de ces sédiments liées à la forte activité de remaniement des polychaetes (Aller and Aller, 1998). Cette nouvelle communauté est également caractérisée par la présence d'archées affiliées aux *Thaumarchaeota*, impliquées dans le cycle de l'azote (archées nitrifiantes aérobies) et dont la présence semble être affectée par le pétrole. Par conséquent, **l'activité de bioturbation des polychaetes favoriserait la nitrification au sein des sédiments contaminés, alors qu'elle serait inhibée par la présence de pétrole.** Cela peut s'expliquer par l'apport d'oxygène au sein du sédiment, lié à la présence de terriers, aux activités de remaniement sédimentaire et de bio-irrigation des polychaetes, qui réduisent l'anoxie engendrée par le pétrole, favorisant ainsi les métabolismes aérobies. La forte richesse spécifique observée pour cette communauté confirme cela indiquant des conditions favorables aux archées dans ces sédiments.

La forte représentativité des *Thaumarchaeota* retrouvée dans la communauté NEREIS (62,5%) est en accord avec les résultats obtenus pour les bactéries dans le chapitre précédent. **L'impact de la bioturbation sur la communauté microbienne consiste en la sélection de micro-organismes aérobies**, dans cette étude, les archées nitrifiantes. D'ailleurs, nous pouvons corrélérer ces résultats à d'autres études réalisées sur des sédiments marins en présence d'organismes bioturbateurs qui confirment la stimulation de l'activité nitrifiante au sein de sédiments bioturbés (Gilbert et al., 1997b ; Svensson et al., 2001 ; Laverock et al., 2011).

Enfin, lors de l'analyse basée sur le gène codant pour l'*ARNr 16S Archaea*, les archées méthanogènes n'ont été détectées que dans un seul traitement, elles représenteraient donc une fraction minoritaire de la communauté archéenne. Cependant, en ciblant le gène codant pour la Méthyl Coenzyme réductase A, *mcrA*, nous avons pu dans un premier temps détecter les gènes ainsi que les transcrits *mcrA* dans tous les traitements, et dans un deuxième temps, préciser leur comportement face à la contamination pétrolière. Au niveau génomique, nous avons mis en évidence un maintien de la structure de la communauté méthanogène suite à la contamination pétrolière, ainsi que des modifications importantes et rapides au niveau transcriptionnel. *A contrario*, dans les sédiments bioturbés, une succession écologique des communautés méthanogènes a été observée, indiquant de plus amples modifications de la communauté dans ces sédiments. **En fin d'incubation, chaque traitement a présenté une communauté méthanogène spécifique présentant des diversités distinctes**. Ainsi, les analyses réalisées ont permis de mettre en évidence que le pétrole maintenait la diversité des communautés méthanogènes des deux types de sédiment. De plus, dans les sédiments fortement bioturbés non contaminés, les archées méthanogènes métaboliquement actives ont montré une forte augmentation de leur diversité. Ceci peut être corrélé à une forte activité de dégradation de la matière organique des communautés aérobies en présence des polychaetes générant une grande quantité de substrats potentiels pour les méthanogènes. Une autre explication pourrait être une inoculation d'archées méthanogènes par la macrofaune au sein des sédiments.

Grâce à cette étude nous avons pu apporter de nouvelles connaissances sur la dynamique des archées suite à une contamination pétrolière. Nous avons clairement défini que ces micro-organismes montraient un comportement totalement différent de celui des bactéries vis-à-vis du pétrole, confirmant donc des capacités métaboliques clairement distinctes entre ces deux domaines procaryotiques.

CHAPITRE V

SUIVI DE LA DYNAMIQUE ET DE L'ABONDANCE DES MICRO-ORGANISMES SULFATO-REDUCTEURS

CHAPITRE V: Suivi de la dynamique et de l'abondance des micro-organismes sulfato-réducteurs

1. INTRODUCTION

Les travaux présentés dans le chapitre IV ont permis l'acquisition de nouvelles connaissances sur la réponse de la communauté archéenne face à une contamination pétrolière. Grâce à l'utilisation d'un marqueur fonctionnel, nous avons également pu préciser l'impact de la contamination ainsi que les effets de la bioturbation sur les archées méthanogènes. Ainsi, ces travaux soulignent que les approches moléculaires basées sur le gène codant l'ARNr 16S pour l'étude de la diversité microbienne ne sont pas appropriées pour l'étude de groupes métaboliques.

Dans le chapitre III, l'étude basée sur le gène codant l'ARNr 16S *Bacteria* a mis en évidence que suite à la contamination pétrolière, une fraction importante de la communauté bactérienne était phylogénétiquement affiliée à des bactéries sulfato-réductrices (*Desulfobacteraceae*) indépendamment de la présence des organismes fousseurs. L'implication des membres de ce groupe métabolique dans la dégradation anaérobie des hydrocarbures a été largement démontrée chez des souches pures mais également dans des sédiments côtiers (Coate et al., 1997 ; Cravo-Laureau et al., 2004b). D'ailleurs certains membres des communautés issues des microcosmes ont montré une forte similarité phylogénétique avec des souches sulfato-réductrices hydrocarbonocastes. Nos travaux ont également suggéré que les polychaetes favoriseraient la présence de certaines de ces bactéries.

Par conséquent, afin de confirmer ces observations, nous avons entrepris l'étude de la diversité, de l'abondance et de la dynamique des micro-organismes sulfato-réducteurs au sein des microcosmes. Nous avons choisi de cibler un gène fonctionnel de cette communauté, le gène codant pour la Sulfite réductase dissimilatrice, une enzyme clé de la respiration anaérobie du sulfate (Klein et al., 2001).

2. PUBLICATION 3: Dynamic of sulfate-reducing microorganisms in petroleum-contaminated marine sediment inhabited by the polychaete *Hediste diversicolor*

Magalie Stauffert, Cristiana Cravo-Laureau, Robert Duran**

Equipe Environnement et Microbiologie, Université de Pau et des Pays de l'Adour, IPREM UMR CNRS 5254, BP 1155, 64013 Pau Cedex, France, ** robert.duran@univ-pau.fr

Ces travaux sont présentés sous forme d'un article en préparation pour soumission dans la revue *Marine pollution Bulletin*.

ABSTRACT

The behaviour of sulfate-reducing microbial community was investigated at the oxic-anoxic interface (0-2cm) of marine sediment when submitted to oil and enhanced bioturbation activities by the addition of *Hediste diversicolor*. Although total hydrocarbon removal was not improved by the addition of *H. Diversicolor*, T-RFLP analyses based on *dsrAB* (dissimilatory sulfite reductase) genes and transcripts showed different patterns according to the presence of *H. diversicolor* which favoured the early abundance of *dsrB* genes. cDNA *dsrAB* libraries revealed that in presence of *H. diversicolor*, most *dsrAB* sequences belonged to hydrocarbonoclastic *Desulfobacteraceae* suggesting that sulfate-reducing microorganisms (SRM) may play an active role in hydrocarbon biodegradation in sediment with high reworking activity. Furthermore, the presence of *dsrAB* sequences related to sequences found associated to environments with high dinitrogen fixation activity suggested potential N₂ fixation by SRM in highly bioturbated-polluted sediments.

Keywords: oil pollution, bioturbation, sulfate-reducing community, T-RFLP fingerprint, *dsrAB* genes

2.1. Introduction

Hydrocarbons are widespread in the environment and they are the main constituents of crude oil (Holliger and Zehnder, 1996). Their abundant use in industry for energy make them the most important group of chemical compounds. Anthropogenic activities (urbanisation, industry, transport) lead to the dispersion and accumulation of hydrocarbons in the environment, causing changes in air quality, soil and aquatic environments with serious consequences for ecosystems and human health (Halpern et al., 2007; Head and Swannell, 1999). Marine coastal sediments are frequently polluted with hydrocarbon contaminants derived from fuel spills. Hydrocarbonoclastic bacteria, which are ubiquitous in marine environments (Leahy and Colwell, 1990), are able to degrade aliphatic and aromatic hydrocarbons through diverse pathways under oxic or anoxic conditions (Atlas, 1981; Widdel and Rabus, 2001). Coastal sediments are characterised by a very thin oxic surface layer with molecular oxygen diffusion confined to the top few millimetres layer (Canfield and Des Marais, 1993). Hence, the bulk of marine sediments are expected to be anoxic, where various anaerobic processes occurs with others electron acceptors for the mineralisation of organic matter (Froelich et al., 1979).

Sulfate-reduction is the most relevant anaerobic process in marine environment, sulfate being the more abundant electron acceptor in coastal seawater (Coates et al., 1996; Kleikemper et al., 2002). Organic matter degradation coupled to sulfate-reduction may account for up to 50% of the total degradation of the organic matter in marine sediments (Jørgensen and Fenchel, 1974). Thus, the potential of coastal marine sediments for anaerobic hydrocarbon degradation under sulfate-reducing conditions has been extensively studied (Coates et al., 1997; Kolukirik et al., 2011; Townsend et al., 2003). Several sulfate-reducing microorganisms (SRM) have been shown to degrade a wide variety of petroleum-based contaminants as short- and long-chain alkanes, complex aromatics, toluene or benzene (Cravo-Laureau et al., 2005; Kniemeyer et al., 2003; So and Young, 1999; Widdel and Rabus, 2001). SRM play a key role in hydrocarbon degradation and they were found dominant in oil contaminated sediments (Miralles et al., 2007b; Paissé et al., 2008), their activity being stimulated by the presence of hydrocarbon (Kleikemper et al., 2002). Nevertheless, waves, currents and macrofaunal bioturbation activity disrupt the micro topography of the sediment (Graf and Rosenberg, 1997; Jørgensen and Revsbech, 1985). Bioturbation processes play an important role in burial and degradation of oil hydrocarbons (Gilbert et al., 1996), polyaromatic (Christensen et al., 2002) and acyclic hydrocarbons (Grossi et al., 2002). Sediment mixing caused by burrowing activity of macrofauna by modifying the distribution

of electron acceptors and affecting the microbial community structure (Bertics and Ziebis, 2009; Satoh et al., 2007) greatly stimulate some microbial activities (Findlay and White, 1983; Kogure and Wada, 2005).. Macrofaunal burrows irrigates anoxic sediment and provides a large surface area for diffusive exchange (Boudreau and Marinelli, 1994). Although, SRM have been classically described as obligate anaerobes (Postgate, 1984), they have been detected in macrofaunal burrows (Matsui et al., 2004) where sulfate-reduction activity has been measured (Banta et al., 1999; Mermillod-Blondin et al., 2004). Although a reduction of sulfate-reduction activity has been reported in bioturbated sediment (Heilskov and Holmer, 2001), the existence of reduced microniches enhance sulfate-reduction rates, supporting that SRM can maintain activity in such environments (Bertics and Ziebis, 2010). Nevertheless, the SRM diversity and structure dynamic have been rarely studied in these environments, especially when exposed to oil contamination.

Recently, we showed that 16S rRNA sequences related to SRM, especially sulfate-reducing hydrocarbons-degraders were well represented in oil-contaminated sediment irrespective to the presence of macrofauna (Stauffert et al., (a), submitted). However, 16S rRNA-based analysis does not provide a best link with the metabolic capabilities. In the present study, we examined the behavior of total and active SRM communities in oil-polluted sediment, with and without polychaetes addition by targeting the (bi)sulfite reductase genes (*dsrAB*). T-RFLP fingerprint, quantitative PCR and libraries analyses were performed in order to follow the SRM community dynamic in bioturbated mudflat sediments submitted to oil pollution.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Sampling area and experimental setup

Twelve marine sediment microcosm boxes were setup and connected with a device supplying natural sand filtered and UV-treated seawater. Sediment was obtained from Aber-Benoît (Treglonou, 48° 33'12.40"N; 4° 32'8.69"W) a tidal basin located in Brittany (France). Tidal cycles of 12 hours were applied each day with seawater, which was renewed at each tidal cycle (20 L of water per box). Crude oil (BAL 110, 25.6 mg/g wet sediment) and polychaetes *Hediste diversicolor* (initial biomass increased 10x) were added to microcosms as previously described (Stauffert et al., (a), submitted). Four conditions were applied in triplicate as follows: (i) CTRL: control condition, (ii) BAL: oil addition, (iii) NEREIS: addition of *N. diversicolor* and (iv) NEREIS+BAL, addition of oil and *N. diversicolor*.

Samplings were done at 2, 7, 30, 90, 180 and 270 days of incubation for molecular and chemical analysis. At each sampling time two independent samples were taken from a single microcosm box for molecular analyses and subjected to DNA and RNA extraction.

2.2.2. Total DNA extraction of microbial communities from microcosms sediment

DNA was extracted from six replicates (two replicates per box) of 250 mg of sediments using the UltraClean Soil DNA kit (MoBio Laboratories) according to the manufacturer's recommendations. Protocol was modified as following: sediment was previously centrifuged at 5000 g for 15 min, to remove water phase; and the initial step of horizontally vortex was performed during 30 min. DNA was eluted in 50µl and stored at -20°C.

2.2.3. RNA extraction and reverse transcription

Total RNA extraction from 2 g of sediments was performed from six replicates, using the RNA Power Soil kit (MoBio Laboratories) according to the manufacturer's recommendations. Only RNase-free certified plastic-ware was used and all solutions were prepared with sterile diethyl pyrocarbonate-treated (DEPC) water. DNA was removed from the total nucleic acid extraction by DNase digestion, using Turbo DNA-free™ protocols (Ambion). The complete removal of DNA was verified by a control PCR using primers of 16S bacteria (PCR conditions described in amplification section). cDNA from RNA was obtained using murine leukemia reverse transcriptase (M-MLV RT, USB Corporation) with random hexamers (0,1U A260, Roche) according to the manufacturer's recommendations. RT products were used immediately for PCR amplifications and the remaining products were stored at -20°C.

2.2.4. PCR amplification of *dsrAB* genes and transcripts

dsrAB genes were amplified using the primers pair 619AF (5-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3) and 1905BR (5-GGGCGGWGTGTAACAAGGC-3) (Giloteaux et al., 2010). PCR conditions were as follows: initial denaturation (94°C for 5 min) followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 45 s), annealing (54°C for 45 s), and extension (72°C for 60 s) and a terminal extension (72°C for 10 min). The reaction mix (50 µL final volume) contained 50 mM buffer, 0.2 mM dNTP, 0.2 µM of each primer and 1.25 U of Taq polymerase (Ozyme). A nested-PCR approach was used to amplify cDNA. A first

round of PCR was performed with *dsr1F* (5-ACS CAC TGG AAG CAC G-3) and *dsr4R* (5-GTG TAG CAG TTA CCG CA-3) primer pair (Wagner et al., 1998). PCR conditions were as follows: initial denaturation (94°C for 5 min) followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 30 s), annealing (54°C for 60 s), and extension (72°C for 1m 30 s) and a terminal extension (72°C for 10 min). The reaction mix was similar to previously described but the final volume was 25 µl. 1 µl of PCR product from the first PCR was used in the second round (50 µL final volume, 619AF / 1905BR primers).

2.2.5. T-RFLP procedure

For T-RFLP analysis, forward primer *dsr619AF* was labeled at the 5' end with the phosphoramidite fluorochrome carboxyfluorescein (FAM). PCR products were purified with the PCR purification kit (GE Healthcare). Restriction digests of PCR products were performed in a total volume of 10 µl containing between 50 and 100 ng of PCR amplicons with 3 U of restriction enzyme. *RsaI* and *TaqI* (New England Biolabs) enzymes were used for amplicon digestion (3h at 37°C and 65°C respectively). 1 µl of digested amplicons were mixed with 10 µl of deionised formamide (Applied Biosystems) and 0.25 µl of the GeneScan-500 size standard (35-500 bp; Applied Biosystems). They were denatured by heating at 95°C for 5 min before analyses on an ABI Prism 310 capillary sequencer in GeneScan mode. Injection was performed electrokinetically at 15 kV for 30 s and the runs at 15 kV were completed within 30 min. T-RFLP profiles were analysed using GENSCAN version 3.1 software (Applied Biosystems). Data sets were constructed by using peak height thresholds of at least 30 fluorescence units.

2.2.6. Treatment of T-RFLP data

T-RFLP raw data were normalised by dividing each peak height by the total signal intensity of the corresponding profile, and peak less than 0.5% were eliminated to avoid PCR biases. Sampling replicate (replicate from a microcosm) T-RFLP profiles were averaged reaching to three profiles per conditions for each time and peak less than 0.5%, which were considered as non-significant, were eliminated. T-RFs found in only one replicate (i.e. better found in 2 samples from the 6 replicates) were eliminated.

2.2.7. Quantitative real-time PCR

For quantification of *dsr* genes copies, (bi)sulfite reductase gene was targeted using primers *Dsrp2060f* and *Dsr4R* (Geets et al., 2006). $10^1 - 7$ copies of the standard sequences

were used to obtain the calibration curves. Amplification and detection of DNA were performed using the Stratagene Mx3005P Real-Time QPCR System and the Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene) following manufacturer's instructions. Reaction mixes contained 1 µl of template DNA and 0.5 µM of each primer (25µl final volume). The following thermocycling program was applied: 95°C for 10 min, 40 cycles of 20 s at 95°C, 20 s at 55°C, 30 s at 72°C. A melt-curve analysis was performed from 55°C to 95°C to determine if only one amplified product was generated during quantitative realtime PCR (Q-PCR). It was also verified by agarose gel visualisation. The efficiencies were between 1.8 and 2.0, and the correlation factors (r^2) were not lower than 0.97 in all reactions.

2.2.8. Clone library generation and phylogenetic analysis

Dsr cDNA library was constructed from NEREIS+BAL samples from the six replicates obtained at 270 days. PCR products of the six replicates samples were pooled and were cloned using pCR2.1 Topo TA cloning kit (Invitrogen Inc.). The resulting clones were selected and cloned inserts were amplified by PCR using vector primers (M13f and M13R). 96 positive clones were selected for sequencing (GATC Biotech SARL; Konstanz, Germany). The DOTUR program (Schloss and Handelsman, 2005) was used to determine Operational taxonomic units (OTUs) defined as sequence groups in which sequences differed by 10% in order to be conceptually consistent with the 97% threshold for grouping 16S rRNA gene sequences (Loy et al., 2004). After translation in amino acids, *dsr* sequences were aligned using ClustalX v2 before drawing the design of phylogenetic trees with Mega v4 (Tamura et al., 2007). The tree was inferred using the Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987). Coverage of cDNA library was calculated using the equation $C_X = 1 - (N_X / n)$, where N_X is the number of unique sequences (singletons) and n is the total number of sequences (Good, 1953). For simulation of T-RFs lengths in the clones, the mobile web page was used with restrict function (Rice et al., 2000).

2.2.9. Statistical analysis

Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) tested significance among the experimental factors (treatment and time) with T-RFLP datasets of total and active sulfate-reducing microorganisms. PERMANOVA analyses were performed in R with the *adonis* function in the *vegan* package with the default parameters. Relative abundance data were used for microbial communities. Community composition of total and active sulfate

reducers, which consisted of *dsrAB* T-RFLP data were analyzed using non-metric multidimensional scaling (NMS) implemented in the MASS packages of R. For all NMS ordinations, the Bray-Curtis distance measure was used to generate dissimilarity matrices. Confidence ellipses based on standard deviation of replicates at the 0.95 level for sample treatments were included in ordinations to examine the variability of sample positions within each ordination. Mantel tests (5000 randomized runs) were carried out to determine the degree of correlation between distance matrixes generated from the rDNA- and rRNA-based fingerprint data sets, hydrocarbons data and genes abundance. For this purpose, community composition dissimilarity matrices were obtained by Bray-Curtis distance measure, whereas others values parameters were transformed to dissimilarity matrices using Euclidian distance measure. The tests were performed using Pearson's product-moment correlation coefficient. Gene abundances data were analysed by ANOVA, followed by TukeyHSD post hoc test. If necessary, data were transformed (square root) to reach normality and homogeneity of variance.

2.3. Results and discussion

We previously showed that alkanes biodegradation in the 0-2 cm layer started between 180 and 270 days of contamination with similar hydrocarbon removal rates irrespective of the presence of *Hediste diversicolor*. 16S rRNA gene based analysis demonstrated different bacterial community structures according to the presence of *N. diversicolor* which was explained by higher reworking activities due to the presence of *N. diversicolor* (Stauffert et al., 2011a unpublished). We focus here on the behaviour of SRM communities after oil addition in bioturbated mudflat sediments.

2.3.1. SRM Abundance

We first examined the effect of treatments on the abundance of SRM by estimating the copy number of *dsrB* genes by quantitative PCR. The *dsrB* gene copy number increased in BAL microcosm during the biodegradation period i.e. between the days 180 and 270 after oil addition (Figure V-1). In the NEREIS+BAL microcosm *dsrB* gene copies number increased from the day 180 day and it was maintained until the day 270 indicating that the presence of *N. diversicolor* favoured an early development of SRM (increased 17 fold at 180 days) by probably providing favorable condition for SRM growth. Nevertheless, at 270 days the SRM abundance in the NEREIS+BAL microbial community represented only 25% of that observed in the BAL microbial community.

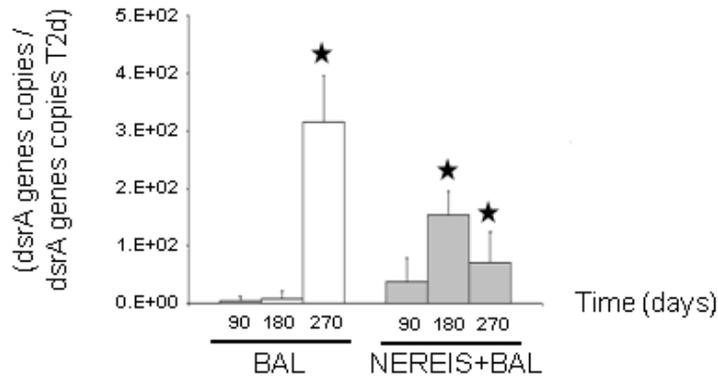


Figure V-1: Gene copy numbers per nanogram of DNA of *dsrB* gene in both BAL (white) and NEREIS+BAL (grey) in comparison with initial value (2 days) during the time (90, 180 and 270 days). Values are mean±s.d. (n=3). Stars show significant difference obtained by Tukey post hoc test of a one-way ANOVA (p -value<0.05) compared to 2 days value.

Several studies have demonstrated the negative impact of macrofauna on both sulfate reduction activity rates (Heilskov and Holmer, 2001; Papaspyrou et al., 2010) and SRM abundances in sediment upper layers (Mermillod-Blondin et al., 2005; Nielsen et al., 2003). These negative impacts were explained by the fact that macrofauna burrowing and ventilation increased oxidation and induced a progressive switch to carbon mineralisation through aerobic respiration (Papaspyrou, 2010). Macrofauna stimulation or inhibition of anaerobic organic matter decomposition processes may depend on the balance between the stimulation caused by an increased supply of electron acceptors and labile organic material to anaerobic layers, and the inhibition caused by more oxidized conditions (Heilskov and Holmer, 2001). The decrease of redox potential due to crude oil addition (Bonin et al., 1990) and the presence of anoxic microniches into inhabited sediment (Bertics and Ziebis, 2010) may stimulate the SRM growth. Because the number of cells does not necessarily reflect cellular activity (Röling, 2007) we cannot conclude that the different treatments had distinct sulfate-reduction rates. The proportion of SRM in total bacterial community increased from 0.1% to 2% in both treatments corresponding to the minimal estimations of SRM abundance which was estimated between 2% and 10% in marine sediments (Kondo et al., 2004; Leloup et al., 2004; Ravensschlag et al., 2000).

2.3.2. SRM community structure

The SRM community structure was examined by T-RFLP analysis in order to determine if the impact of treatment on the SRM abundance was also accompanied by a modification of the SRM community structure. Comparison of *dsrAB* T-RFLP fingerprints showed different SRM community structures according to the incubation time and the treatment.

This result was further supported by PERMANOVA analysis of standardised T-RFLP data considering T-RFs relative abundances which showed a significant difference between treatments ($R^2 = 0.25$ and 0.23 ; $p = 0.001$) and between sampling times ($R^2 = 0.11$ and 0.15 ; $p = 0.001$) for both *dsrAB* gene and transcript analyses. It also indicated that the largest source of variance in SRM communities came from the treatment (treatment* time interactions: $R^2 = 0.37$ and 0.39 ; $p = 0.001$). Thereby, at 270 days, the difference in SRM abundance of BAL and NEREIS+BAL was correlated with the difference observed between both SRM community structures ($r = 0.73$, $p = 0.025$), based on Mantel test.

T-RFLP analysis considered 99 and 93 T-RFs or operational taxonomic units (OTUs) for both gene (DNA) and transcripts (RNA) analysis respectively when combining two restriction enzymes. Most of RNA-OTUs (about 85%) were not found in DNA profiles indicating that metabolically active SRM structures (RNA analysis) were clearly distinct from total community structure (DNA analysis) which was supported by PERMANOVA analysis performed on presence/absence matrix ($R^2 = 0.28$; $p = 0.001$). Mantel test, evaluating the congruence between the composition of total and active fractions, showed a significant correlation ($r = 0.37$, $p < 0.001$) indicating that the differences observed between total SRM community structures (DNA analysis) were correlated with those observed between active SRM community structures (RNA analysis). Mantel test also demonstrated a strong correlation between both total and active community structures at 180 and 270 days ($r = 0.6$, $p < 0.05$).

Comparison of both total (DNA analyses, Figure V-2A) and active (RNA analyses, Figure V-2B) SRM community structures was realized according to sampling time by non-metric multidimensional scaling (NMDS). Considering the 95% confidence ellipsis that takes into account the standard deviation of replicates, we were able to follow the SRM community structure dynamics.

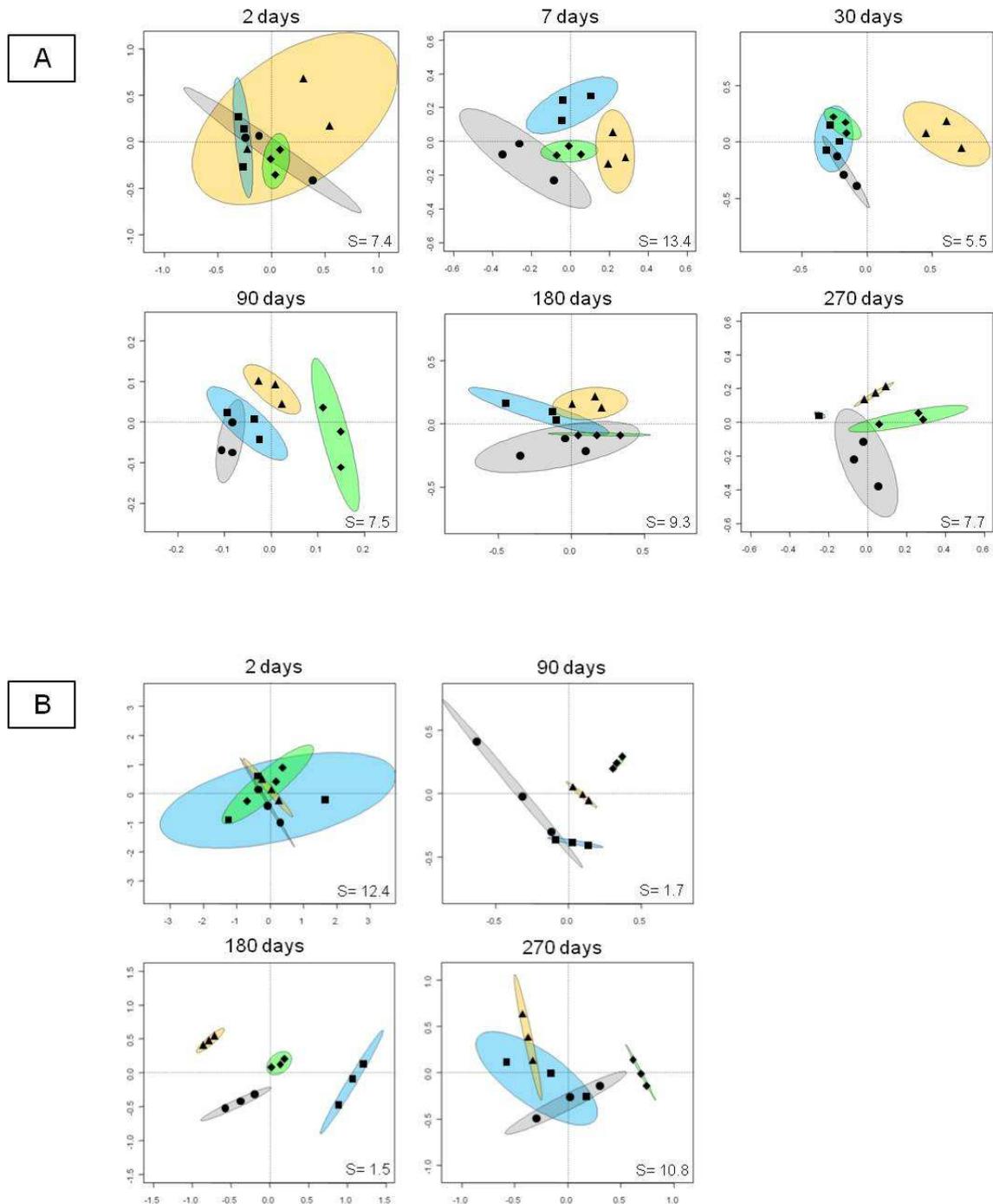


Figure V-2: Non-metric multidimensional scaling analysis of treatment effects on sulfate-reducing microorganisms fingerprinted by T-RFLP of (A) *dsrAB* genes at each sampling time (2, 7, 30, 90, 180 and 270 days) and (B) *dsrAB* transcripts at 2, 90, 180 and 270 days. Ellipses indicate 95% confidence interval for replicates. Stress values (*S*) are indicated for each analysis. CTRL (circle); BAL (square); NEREIS (lozenge); NEREIS+BAL (triangle).

At the beginning of experiment (2 days) all treatments were grouped together indicating that SRM communities were similar in the different microcosms. It is important to notice that the same observation was made with both DNA and RNA analyses indicating that

metabolically active SRM community structures were not altered during this period. From the 7th day, the different SRM communities were progressively separated testifying the impact of the treatments. The more pronounced effect was observed with the NEREIS+BAL treatment which SRM community structure was clearly separated and remained separated from the other SRM communities until the end of experiment (Figure V-2A). Noteworthy, similar NMDS plots were obtained with both DNA and RNA analyses at 90 days where NEREIS SRM communities were separated from the other SRM communities showing clearly the effect of the NEREIS treatment (Figure V-2A and V-2B). Interestingly, at 180 days the SRM communities were grouped together in the DNA NMDS plot whereas they were completely separated in the RNA NMDS plot indicating that although all treatments presented similar SRM communities structures, their metabolically active fractions were different. But at 270 days RNA analysis showed that only the NEREIS SRM communities was separated from the other SRM communities, BAL and NEREIS+BAL being close. In contrast, DNA analysis showed specific communities for each treatment. It is likely that similar trends were observed with both DNA and RNA analyses but RNA analysis showing earlier the treatment effect. According to the presence of *N. diversicolor* different SRM communities were obtained after oil addition. This observation was also supported by clustering analysis showing that SRM community structure in BAL treatment at the end of experiment and that observed at 2 days in the same treatment had the lowest dissimilarity Bray-Curtis index (30%) while the NEREIS+BAL and NEREIS treatments showed respectively 60% and 50% dissimilarity Bray-Curtis index between the communities at 270 days with that observed at 2 days.

The involvement of SRM in hydrocarbon degradation has been established (Rothermich et al., 2002; Suárez-Suárez et al., 2011) and their spatial distribution described (Leloup et al., 2006; Zhang et al., 2008) in polluted environments. It has been demonstrated that the addition of a carbon source (lactate, naphthalene, acetate, oil) induced modifications in cultivable SRM community structure (Kleikemper et al., 2002) but the few studies conducted in chronically contaminated sites did not observed changes in SRM community structure after an oil addition (Taketani et al., 2010). Nevertheless, structural community changes were observed when specific sulfate reducing bacterial groups such as *Desulfococcus*-, *Desulfonema*- and *Desulfosarcina*-like group and *Desulfovibrio*-*Desulfomicrobium*-like group were analyzed (Miralles et al., 2007a). The different behaviors may be explained by the presence of well adapted and stable bacterial communities in chronically oil polluted sites. In our study, sediments were characterized by the presence of biogenic hydrocarbons with thus non-adapted microbial communities for oil hydrocarbon

degradation (Stauffert et al., (a) submitted) that resulted on specific SRM communities with similar hydrocarbon degradation capacities when submitted to oil addition.

Comparison of BAL and NEREIS+BAL T-RFLP profiles during the biodegradation period (between 180 and 270 days) showed the presence of OTUs common to all T-RFLP profiles as for example OTUs with 92 bp, 287 bp and 60b bp, but they were found with different abundances (Figure V-3).

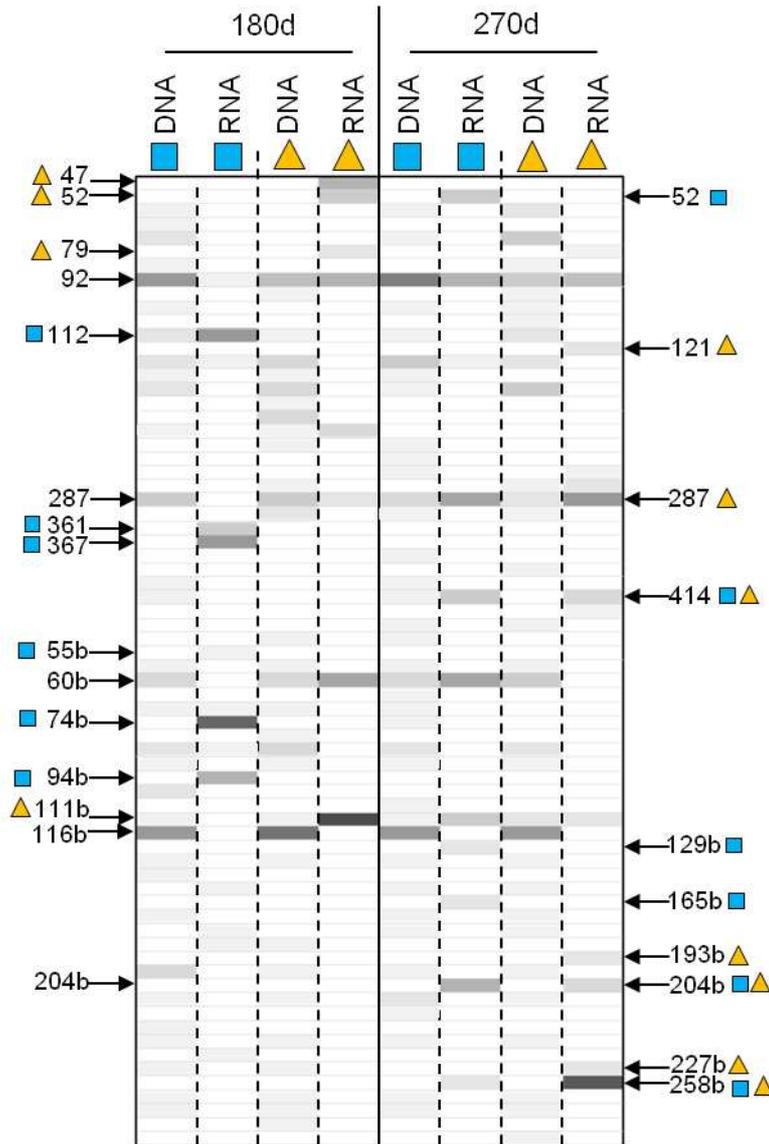


Figure V-3: Distribution and abundance of OTUs from T-RFLP fingerprint of BAL and NEREIS+BAL treatment during 180-270 days time. The heatmap to the right indicates the relative abundance of each unique sequence type according to the scale. Most active OTUs were indicated by arrow on the left (180 days) and on the right (270 days) of heatmap. BAL (square); NEREIS+BAL (triangle).

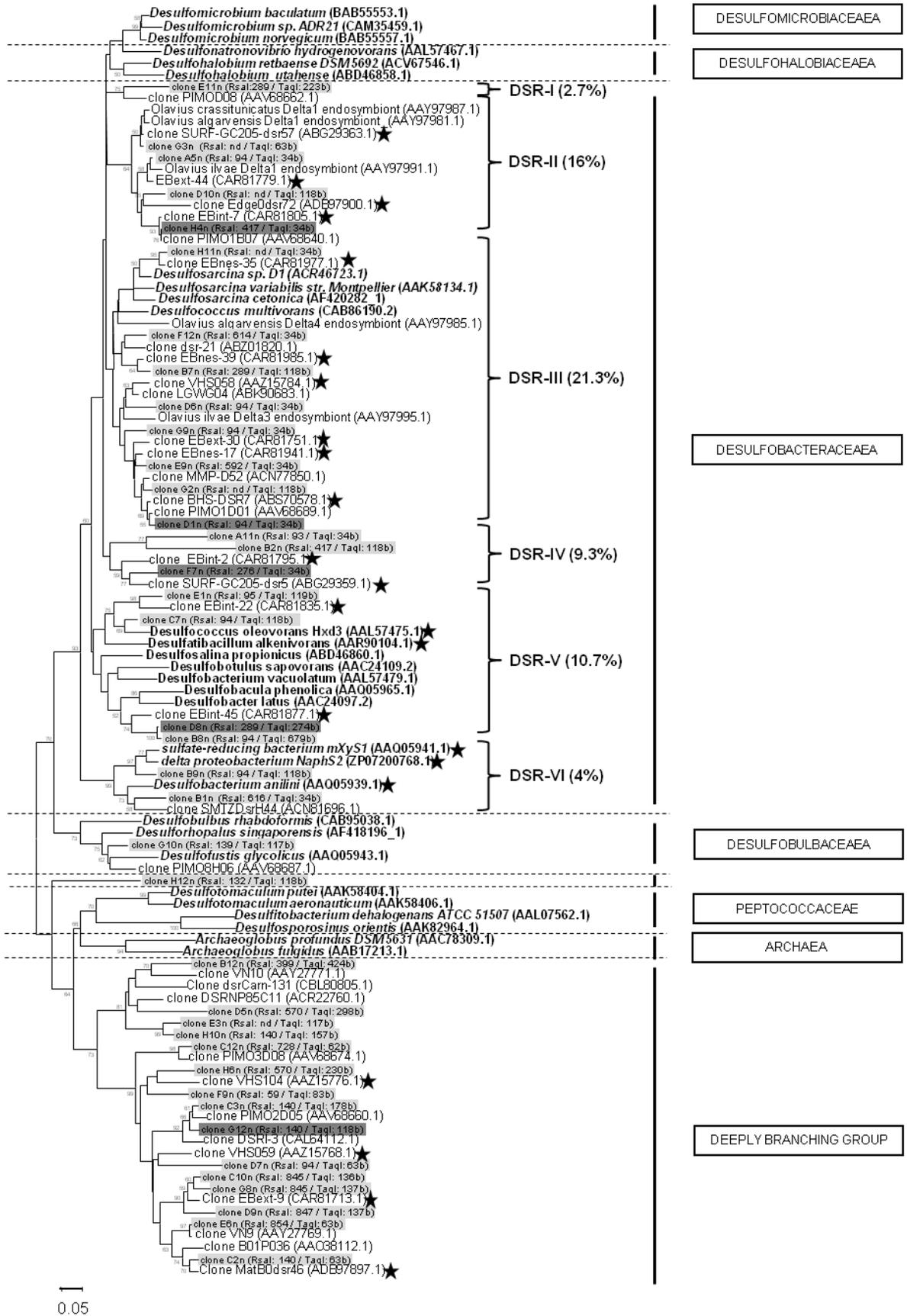
Interestingly, fingerprint profiles clearly showed that DNA dominant OTUs were distinct from RNA dominant OTUs indicating that the most active OTUs were not the most

represented in DNA profiles. This observation highlighted the relevance of the metabolically active approach for the description of the microbial dynamics as previously reported (Kamke et al., 2010; Rodríguez-Blanco et al., 2010). At 180 days the active OTUs in BAL were different to that observed in NEREIS+BAL with only 1 OTU shared (92 bp) among 13 and 8 OTUs for BAL and NEREIS+BAL respectively (Figure V-3) indicating that different SRM dominated in both treatments before the beginning of biodegradation. At 270 days, both communities appeared closer sharing 6 OTUs (92 bp, 287 bp, 414 bp, 116b bp, 204b bp, 258b bp) among 11 for BAL and 13 OTUs for NEREIS+BAL (Figure V-3). Comparison of T-RFLP profiles between 180 and 270 days showed that active OTUs were distinct for each treatment (2 common OTUs for BAL and 4 for NEREIS+BAL), demonstrating that both communities changed during this biodegradation period. Nevertheless, both treatments exhibited dissimilar OTUs at 270 days such as OTUs with 52 bp, 129b bp and 165 bp specific for BAL and OTUs with 121 bp, 287 bp, 193b bp and 227b bp for NEREIS+BAL.

2.3.3. SRM composition of NEREIS+BAL community at 270 days

In order to further characterize the SRM communities and identify the SRM inhabiting the studied sediment, we constructed a *dsrAB* cDNA library from NEREIS+BAL sediment because it presented the largest diversity. A total of 75 sequences from NEREIS+BAL *dsrAB* cDNA library were analysed representing 69.3% coverage. They were assigned into 39 OTUs based on a 10% similarity cut off (Figure V-4).

Figure V-4: Phylogenetic tree based on the translated (α subunit) amino acid sequences of PCR-amplified *dsrAB* cDNA from the NEREIS+BAL microcosm at 270 days. The tree was inferred using the Neighbor-Joining method and evolutionary distances were computed using the Poisson correction method. There were a total of 195 positions in the final dataset. The scale bar corresponds to 0.05 substitutions per site. Percentages of 100 bootstrap resamplings that supported the branching orders in each analysis are shown above or near the relevant nodes. Bootstrap values are shown for branches with more than 50% bootstrap support. Cultivable strains database sequences are shown in bold, with Genbank accession numbers in brackets. Representative clones of OTUs are highlighted in light grey and dominant OTUs in dark grey.



They were affiliated to the sulfate-reducing *Bacteria* (SRB) families *Desulfobacteraceae*, *Desulfobulbaceae*, and to the deeply branching *dsrAB* group. Sequences affiliated to the complete-oxidisers *Desulfobacteraceae* family, were found dominant representing 64% of sequences (22 OTUs). Members of this family were often found abundant in marine sediments, probably due to their capacities to oxidize a large variety of electron donors (Leloup et al., 2006; Purdy et al., 2001; Raskin et al., 1996). Furthermore, almost all *Desulfobacteraceae* related-sequences were associated with sequences of hydrocarbon degraders and with those of uncultured SRB inhabiting petroleum-contaminated sediments suggesting that SRB play a key role on hydrocarbons degradation in our sediment. *Desulfobacteraceae* sequences fell in six sub-clusters named DSR-I to -VI (Figure V-4).

Members related to DSR-I, -II and -IV sub-clusters were related to sequences of uncultured SRM. Sequences of the DSR-II group were related to *dsrAB* sequences of endosymbiotic sulfate-reducers and DSR-IV sequences were found in petroleum-contaminated sediments (Lloyd et al., 2010). DSR-III sub-cluster, representing 8% of the library, contained 8 OTUs mainly related to sequences of *Desulfococcus multivorans* strain and 1 OTU related to sequence of *Desulfosarcina* genus. Interestingly, strain *Desulfococcus multivorans* has been demonstrated to reduce oxygen (Dannenberg et al., 1992; Dilling and Cypionka, 1990) and several related sequences have been detected in sediment oxic zone (Minz et al., 1999). OTUs from DSR-V and -VI sub-clusters were affiliated to sequences of known hydrocarbonoclastic sulfate-reducing bacteria able to degrade alkanes, xylene and other aromatic compounds. DSR-V sequences were related to strain *Desulfococcus oleovorans Hxd3* (Aeckersberg et al., 1991) while DSR-VI sequences were affiliated to strain *mXyS1* and *Desulfobacterium anilini* (Harms et al., 1999) (Harms et al., 1999) which couples dissimilatory reduction of sulfate with the degradation of various aromatic hydrocarbons and other organic substrates (Harms et al., 1999; Kniemeyer et al., 2003).

The deeply-branching group, previously annotated SRP lineage Group IV (Dhillon et al., 2003), was the second more abundant group in the NEREIS+BAL library representing 32% of sequences dispatched into 15 OTUs. Sequences were not directly related to *dsrAB* sequences of known cultured SRM but they were closely related to environmental sequences found in diverse habitats such as estuarine sediment (Bahr et al., 2005), estuarine mudflat (Leloup et al., 2006), marine sediment (Lloyd et al., 2010), petroleum-contaminated marine sediments (Giloteaux et al., 2010; Zhang et al., 2008), hydrothermal site (Dhillon et al., 2003)

and phreatic limestone sinkholes. Little is known about this group, nevertheless its members were mainly obtained from organic-rich environments and this group could play an important role in the hydrocarbons degradation (Jiang et al., 2009). Furthermore, the deeply-branching group abundance was found insensitive to the physical–chemical changes along the sediment depth (oxygen, sulfide, sulfate or methane concentrations) suggesting a versatile lifestyle, which could be compatible with the presence of polychaetes in the sediment. *Desulfobulbaceae* family, the incomplete-oxidizers, was also represented but accounted for 1.3% of total sequences with only one OTU.

Some relevant T-RFLP OTUs detected specifically at 270 days could be related to sequences found on the cDNA library (Table V-1). They were mainly associated to sequences related to the *Desulfobacteraceae* family but they could be affiliated to sequences from different sub-clusters indicating that T-RF identification could not be confident.

Table V-1: T-RFLP OTUs affiliation to *dsr* clone library based on *RsaI* and *TaqI* restriction enzymes.

OTU from T-RFLP profile	Corresponding T-RF from clone library (<i>RsaI</i> / <i>TaqI</i>)	Related clone	Family group / cluster
287 bp	288 / 223b	clone E11n	<i>Desulfobacteraceae</i> / DSR-I
	289 / 118b	clone B7n	<i>Desulfobacteraceae</i> / DSR-III
	289 / 274b	clone D8n	<i>Desulfobacteraceae</i> / DSR-V
414 bp	417 / 34b	clone H4n	<i>Desulfobacteraceae</i> / DSR-II
	417 / 118b	clone B2n	<i>Desulfobacteraceae</i> / DSR-IV
227b bp	289 / 223b	clone E11n	<i>Desulfobacteraceae</i> / DSR-I
	570 / 230b	clone H6n	deeply branching group

Among the five most dominant OTUs in *dsrAB* cDNA library, four were related to the *Desulfobacteraceae* family and one to the deeply-branching group (Table V-2). They were related to sequences detected either in hydrocarbon-polluted sediments or in rich-organic compounds sediments associated with the rhizosphere.

This observation suggested that SRM may play an important role on hydrocarbon degradation in our microcosms. Interestingly, *dsrAB* sequences affiliated to SRM found in salt marsh rhizospheres which have the capacity to perform dinitrogen fixation (Hines et al., 1989; Rooney-Varga et al., 1997; Teal et al., 1979) suggested that SRM may also had a role in dinitrogen fixation in our microcosms. Indeed the dinitrogen fixation capacity of sulfate reducers has been largely described (Nielsen et al., 2001; Riederer-Henderson and Wilson,

1970; Steppe and Paerl, 2005; Widdel, 1987). Furthermore, a recent study demonstrated that dinitrogen fixation by SRB was strongly associated with reworking activity and burrows of *Nereis californiensis* (Bertics et al., 2010). Dinitrogen fixation was also observed in petroleum-polluted environments (Musat et al., 2006; Taketani et al., 2009).

Table V-2: Identification of phylogenetic groups of dominant OTUs (> 5%) from *dsr* cDNA NEREIS+BAL_{270d} library.

Family group / cluster	Clone name	OTU abundance (% of total clones)	Closest match (% of identity)	Isolation source
<i>Desulfobacteraceae</i> / DSR-II	clone H4n	10.7%	clone PIM01B07 (97%)	salt marsh sediment - rhizosphere
			clone EBint-7 (97%)	petroleum contaminated marine sediment
<i>Desulfobacteraceae</i> / DSR-III	clone D1n	8%	clone BHS-DSR7 (99%)	petroleum-contaminated marine sediments
			clone PIM01D01 (98%)	salt marsh sediment - rhizosphere
<i>Desulfobacteraceae</i> / DSR-IV	clone F7n	6.7%	clone SURF-GC205-dsr5 (86%)	gulf of Mexico sediments
<i>Desulfobacteraceae</i> / DSR-V	clone D8n	5.3%	clone EBint-45 (90%)	petroleum contaminated marine sediment
deeply branching group	clone G12n	6.7%	clone PIM02D05 (97%)	salt marsh sediment - rhizosphere

2.4. Conclusion

In this study, we analyzed SRM community structure and composition using the *dsrAB* genes and transcripts. Our results showed that the SRM behavior and dynamic was influenced by both oil pollution and bioturbation activity by *N. diversicolor* indicating that SRM community may play a significant role in hydrocarbon degradation. Enhancing the bioturbation activity by the addition of *N. diversicolor* resulted in a distinct SRM community structure composed by different OTUs. Several *dsrAB* gene sequences were related to SRB able of dinitrogen fixation suggesting that SRM may play not only a direct role in hydrocarbon degradation but also an indirect role by enriching sediments with nitrogen especially when *N. diversicolor* was present. Nevertheless, further studies are still required to fully understand the role of SRM communities in the whole degradation process taking into account the structuring effect of reworking activity by burrowing organisms on microbial communities. Metagenomics approaches will be valuable to analyze in depth these processes.

2.5. Acknowledgements

This work was supported by the French program ANR DHYVA (project ANR-06-SEST-09). We would like to thank Jerome Gury for their useful discussion.

2.6. References

- Aeckersberg, F., Bak, F., Widdel, F., 1991. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Archives of Microbiology* 156, 5-14.
- Atlas, R.M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiological Reviews* 45, 180-209.
- Bahr, M., Crump, B.C., Klepac-Ceraj, V., Teske, A., Sogin, M.L., Hobbie, J.E., 2005. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in a New England salt marsh. *Environmental Microbiology* 7, 1175-1185.
- Banta, G.T., Holmer, M., Jensen, M.H., Kristensen, E., 1999. Effects of two polychaete worms, *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*, on aerobic and anaerobic decomposition in a sandy marine sediment. *Aquatic Microbial Ecology* 19, 189-204.
- Bertics, V.J., Sohm, J.A., Treude, T., Chow, C.E.T., Capone, D.G., Fuhrman, J.A., Ziebis, W., 2010. Burrowing deeper into benthic nitrogen cycling: The impact of Bioturbation on nitrogen fixation coupled to sulfate reduction. *Marine Ecology Progress Series* 409, 1-15.
- Bertics, V.J., 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., Ziebis, W., 2010. Bioturbation and the role of microniches for sulfate reduction in coastal marine sediments. *Environmental Microbiology* 12, 3022-3034.
- Birch, L., Bachofen, R., 1988. Microbial production of hydrocarbons. *Biotechnology* 6 B, 71-99.
- Bonin, P., Gilewicz, M., Rambeloarisoa, E., Mille, G., Bertrand, J.C., 1990. Effect of crude oil on denitrification and sulfate reduction in marine sediments. *Biogeochemistry* 10, 161-174.
- Boudreau, B.P., Marinelli, R.L., 1994. A modelling study of discontinuous biological irrigation. *J.MAR.RES.* 52, 947-968.
- Canfield, D.E., Des Marais, D.J., 1993. Biogeochemical cycles of carbon, sulfur, and free oxygen in a microbial mat. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 57, 3971-3984.
- Christensen, M., Banta, G.T., 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.
- Coates, J.D., Anderson, R.T., Woodward, J.C., Phillips, E.J.P., Lovley, D.R., 1996. Anaerobic hydrocarbon degradation in petroleum-contaminated harbor sediments under sulfate-reducing

and artificially imposed iron-reducing conditions. *Environmental Science and Technology* 30, 2784-2789.

Coates, J.D., Woodward, J., Allen, J., Philp, P., Lovley, D.R., 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3589-3593.

Cravo-Laureau, C., Grossi, V., Raphel, D., Matheron, R., Hirschler-Réa, A., 2005. Anaerobic n-alkane metabolism by a sulfate-reducing bacterium, *Desulfatibacillum aliphaticivorans* strain CV2803T. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3458-3467.

Dannenberg, S., Kroder, M., Dilling, W., 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.

Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., 2003. Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas basin. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 2765-2772.

Dilling, W., Cypionka, H., 1990. Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 71, 123-128.

Eichler, S., Christen, R., Höltje, C., Westphal, P., Bötel, J., Brettar, I., Mehling, A., Höfle, M.G., 2006. Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1858-1872.

Findlay, R.H., White, D.C., 1983. The effects of feeding by the sand dollar *Mellita quinquesperforata* (Leske) on the benthic microbial community. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 72, 25-41.

Froelich, P.N., Klinkhammer, G.P., Bender, M.L., Luedtke, N.A., Heath, G.R., Cullen, D., Dauphin, P., Hammond, D., Hartman, B., Maynard, V., 1979. Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 43, 1075-1090.

Geets, J., Borremans, B., Diels, L., Springael, D., Vangronsveld, J., van der Lelie, D., Vanbroekhoven, K., 2006. DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 66, 194-205.

Gilbert, F., Stora, G., Bertrand, J.C., 1996. In situ bioturbation and hydrocarbon fate in an experimental contaminated mediterranean coastal ecosystem. *Chemosphere* 33, 1449-1458.

- Giloteaux, L., Goñi-Urriza, M., Duran, R., 2010. Nested PCR and new primers for analysis of sulfate-reducing bacteria in low-cell-biomass environments. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 2856-2865.
- Good, I.J., 1953. The population frequencies of species and the estimation of the population parameters. *Biometrika* 40, 237-264.
- Graf, G., Rosenberg, R., 1997. Bioresuspension and biodeposition: A review. *Journal of Marine Systems* 11, 269-278.
- Grossi, V., Massias, D., Stora, G., Bertrand, J.C., 2002. Burial, exportation and degradation of acyclic petroleum hydrocarbons following a simulated oil spill in bioturbated Mediterranean coastal sediments. *Chemosphere* 48, 947-954.
- Halpern, B.S., Selkoe, K.A., Micheli, F., Kappel, C.V., 2007. Evaluating and ranking the vulnerability of global marine ecosystems to anthropogenic threats. *Conservation Biology* 21, 1301-1315.
- Harms, G., Zengler, K., Rabus, R., Aeckersberg, F., Minz, D., Rossell- \tilde{A} ³-Mora, R., Widdel, F., 1999. Anaerobic oxidation of o-xylene, m-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 999-1004.
- Head, I.M., Swannell, R.P.J., 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Current Opinion in Biotechnology* 10, 234-239.
- Heilskov, A.C., Holmer, M., 2001. Effects of benthic fauna on organic matter mineralization in fish-farm sediments: Importance of size and abundance. *ICES Journal of Marine Science* 58, 427-434.
- Hines, M.E., Knollmeyer, S.L., Tugel, J.B., 1989. Sulfate reduction and other sedimentary biogeochemistry in a northern New England salt marsh. *Limnology & Oceanography* 34, 578-590.
- Holliger, C., Zehnder, A.J.B., 1996. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 7, 326-330.
- Jiang, L., Zheng, Y., Peng, X., Zhou, H., Zhang, C., Xiao, X., Wang, F., 2009. Vertical distribution and diversity of sulfate-reducing prokaryotes in the Pearl River estuarine sediments, Southern China. *FEMS Microbiology Ecology* 70, 249-262.
- Jørgensen, B.B., Fenchel, T., 1974. The sulfur cycle of a marine sediment model system. *Marine Biology* 24, 189-201.
- Jørgensen, B.B., Revsbech, N.P., 1985. Diffusive boundary layers and the oxygen uptake of sediments and detritus. *Limnol. Oceanogr.* 30, 111-122.

- Kamke, J., Taylor, M.W., Schmitt, S., 2010. Activity profiles for marine sponge-associated bacteria obtained by 16S rRNA vs 16S rRNA gene comparisons. *ISME Journal* 4, 498-508.
- Kleikemper, J., Schroth, M.H., Sigler, W.V., Schmucki, M., Bernasconi, S.M., Zeyer, J., 2002. Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1516-1523.
- Kniemeyer, O., Fischer, T., Wilkes, H., Glöckner, F.O., Widdell, F., 2003. Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 760-768.
- Kogure, K., Wada, M., 2005. Impacts of macrobenthic bioturbation in marine sediment on bacterial metabolic activity. *Microbes and Environment* 20, 191-199.
- Kolukirik, M., Ince, O., Ince, B.K., 2011. Increment in Anaerobic Hydrocarbon Degradation Activity of Halic Bay Sediments via Nutrient Amendment. *Microbial Ecology* 61, 871-884.
- Kondo, R., Nedwell, D.B., Purdy, K.J., de Queiroz Silva, S., 2004. Detection and enumeration of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments by competitive PCR. *Geomicrobiology Journal* 21, 145-157.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 54, 305-315.
- Leloup, J., Quillet, L., Berthe, T., Petit, F., 2006. Diversity of the *dsrAB* (dissimilatory sulfite reductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, France. *FEMS Microbiology Ecology* 55, 230-238.
- Leloup, J., Quillet, L., Oger, C., Boust, D., Petit, F., 2004. Molecular quantification of sulfate-reducing microorganisms (carrying *dsrAB* genes) by competitive PCR in estuarine sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 47, 207-214.
- Lloyd, K.G., Albert, D.B., Biddle, J.F., Chanton, J.P., Pizarro, O., Teske, A., 2010. Spatial structure and activity of sedimentary microbial communities underlying a *Beggiatoa* spp. mat in a Gulf of Mexico hydrocarbon seep. *PLoS ONE* 5.
- Loy, A., Küsel, K., Lehner, A., Drake, H.L., Wagner, M., 2004. Microarray and functional gene analyses of sulfate-reducing prokaryotes in low-sulfate, acidic fens reveal cooccurrence of recognized genera and novel lineages. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 6998-7009.
- Matsui, G.Y., Ringelberg, D.B., Lovell, C.R., 2004. Sulfate-reducing bacteria in tubes constructed by the marine infaunal polychaete *Diopatra cuprea*. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 7053-7065.

- Mermillod-Blondin, F., François-Carcaillet, F., Rosenberg, R., 2005. Biodiversity of benthic invertebrates and organic matter processing in shallow marine sediments: An experimental study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 315, 187-209.
- Mermillod-Blondin, F., Rosenberg, R., François-Carcaillet, F., Norling, K., 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.
- Minz, D., Flax, J.L., Green, S.J., Muyzer, G., Cohen, Y., Wagner, M., Rittmann, B.E., Stahl, D.A., 1999. Diversity of sulfate-reducing bacteria in oxic and anoxic regions of a microbial mat characterized by comparative analysis of dissimilatory sulfite reductase genes. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4666-4671.
- Miralles, G., Grossi, V., Acquaviva, M., Duran, R., Claude Bertrand, J., Cuny, P., 2007a. 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.
- Miralles, G., Nérini, D., Manté, C., Acquaviva, M., Doumenq, P., Michotey, V., Nazaret, S., Bertrand, J.C., Cuny, P., 2007b. Effects of spilled oil on bacterial communities of Mediterranean coastal anoxic sediments chronically subjected to oil hydrocarbon contamination. *Microbial Ecology* 54, 646-661.
- Musat, F., Harder, J., Widdel, F., 2006. Study of nitrogen fixation in microbial communities of oil-contaminated marine sediment microcosms. *Environmental Microbiology* 8, 1834-1843.
- Nielsen, L.B., Finster, K., Welsh, D.T., Donnelly, A., Herbert, R.A., De Wit, R., Lomstein, B.A.A., 2001. Sulphate reduction and nitrogen fixation rates associated with roots, rhizomes and sediments from *Zostera noltii* and *Spartina maritima* meadows. *Environmental Microbiology* 3, 63-71.
- Nielsen, O.I., Kristensen, E., Holmer, M., 2003. Impact of *Arenicola marina* (Polychaeta) on sediment sulfur dynamics. *Aquatic Microbial Ecology* 33, 95-105.
- Paissé, S., Coulon, F., Goni-Urriza, M., Peperzak, L., McGenity, T.J., Duran, R., 2008. Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 66, 295-305.
- Papaspyrou, S., Thessalou-Legaki, M., Kristensen, E., 2010. The influence of infaunal (*Nereis diversicolor*) abundance on degradation of organic matter in sandy sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 393, 148-157.

- Postgate, J.R., 1984. The sulfate-reducing bacteria. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Purdy, K.J., Nedwell, D.B., Martin Embley, T., Takii, S., 2001. Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the distribution of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 36, 165-168.
- Raskin, L., Rittmann, B.E., Stahl, D.A., 1996. Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 3847-3857.
- Ravenschlag, K., Sahn, K., Knoblauch, C., Jorgensen, B.B., Amann, R., 2000. Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine Arctic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 3592-3602.
- Rice, P., Longden, L., Bleasby, A., 2000. EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* 16, 276-277.
- Riederer-Henderson, M.A., Wilson, P.W., 1970. Nitrogen fixation by sulphate-reducing bacteria. *Journal of General Microbiology* 61, 27-31.
- Rodríguez-Blanco, A., Antoine, V., Pelletier, E., Delille, D., Ghiglione, J.F., 2010. Effects of temperature and fertilization on total vs. active bacterial communities exposed to crude and diesel oil pollution in NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution* 158, 663-673.
- Röling, W.F.M., 2007. Do microbial numbers count? Quantifying the regulation of biogeochemical fluxes by population size and cellular activity. *FEMS Microbiology Ecology* 62, 202-210.
- Rooney-Varga, J.N., Devereux, R., Evans, R.S., Hines, M.E., 1997. Seasonal changes in the relative abundance of uncultivated sulfate-reducing bacteria in a salt marsh sediment and in the rhizosphere of *Spartina alterniflora*. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3895-3901.
- Rothermich, M.M., Hayes, L.A., Lovley, D.R., 2002. Anaerobic, sulfate-dependent degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum-contaminated harbor sediment. *Environmental Science and Technology* 36, 4811-4817.
- Roy, C.S., Talbot, G., Topp, E., Beaulieu, C., Palin, M.F., Massé, D.I., 2009. Bacterial community dynamics in an anaerobic plug-flow type bioreactor treating swine manure. *Water Research* 43, 21-32.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4, 406-425.

- Satoh, H., Nakamura, Y., Okabe, S., 2007. Influences of infaunal burrows on the community structure and activity of ammonia-oxidizing bacteria in intertidal sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1341-1348.
- Schloss, P.D., Handelsman, J., 2005. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1501-1506.
- So, C.M., Young, L.Y., 1999. Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2969-2976.
- Stauffert, M., C., C.-L., Jézéquel, R., Cuny, P., Gilbert, F., Militon, C., Amouroux, D., Mahdaoui, F., Bouyssiere, B., Stora, G., Merlin, F.-X., Duran, R., (a) unpublished. Impact of crude oil on bacterial communities' structure in bioturbated sediments
- Steppe, T.F., Paerl, H.W., 2005. Nitrogenase activity and nifH expression in a marine intertidal microbial mat. *Microbial Ecology* 49, 315-324.
- Suárez-Suárez, A., López-López, A., Tovar-Sánchez, A., Yarza, P., Orfila, A., Terrados, J., Arnds, J., Marqués, S., Niemann, H., Schmitt-Kopplin, P., Amann, R., Rosselló-Móra, R., 2011. Response of sulfate-reducing bacteria to an artificial oil-spill in a coastal marine sediment. *Environmental Microbiology* 13, 1488-1499.
- Taketani, R.G., dos Santos, H.F., van Elsas, J.D., Rosado, A.S., 2009. Characterisation of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 96, 343-354.
- Taketani, R.G., Franco, N.O., Rosado, A.S., van Elsas, J.D., 2010. Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. *Journal of Microbiology* 48, 7-15.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
- Teal, J.M., Valiela, I., Berlo, D., 1979. Nitrogen fixation by rhizosphere and free-living bacteria in salt marsh sediments. *Limnol. Oceanogr.* 24, 126-132.
- Townsend, G.T., Prince, R.C., Suflita, J.M., 2003. Anaerobic Oxidation of Crude Oil Hydrocarbons by the Resident Microorganisms of a Contaminated Anoxic Aquifer. *Environmental Science and Technology* 37, 5213-5218.

Wagner, M., Roger, A.J., Flax, J.L., Brusseau, G.A., Stahl, D.A., 1998. Phylogeny of dissimilatory sulfite reductases supports an early origin of sulfate respiration. *Journal of Bacteriology* 180, 2975-2982.

Widdel, F., 1987. New types of acetate-oxidizing, sulfate-reducing *Desulfobacter* species, *D. hydrogenophilus* sp. nov., *D. latus* sp. nov., and *D. curvatus* sp. nov. *Archives of Microbiology* 148, 286-291.

Widdel, F., Rabus, R., 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* 12, 259-276.

Zhang, W., Song, L.s., Ki, J.S., Lau, C.K., Li, X.D., Qian, P.Y., 2008. Microbial diversity in polluted harbor sediments II: Sulfate-reducing bacterial community assessment using terminal restriction fragment length polymorphism and clone library of *dsrAB* gene. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76, 682-691.

3. PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude présentée a permis de mettre en évidence que la réponse de la communauté sulfato-réductrice à la contamination pétrolière était fortement modifiée au sein des sédiments bioturbés. Ainsi la dynamique, la diversité ainsi que l'abondance des micro-organismes sulfato-réducteurs (MSR) sont affectées dans ces sédiments.

Les activités de bioturbation induisent de grands remaniements structuraux se traduisant par une succession de communautés au fil du temps et aboutissant à une communauté spécifique à cet environnement. **Les modifications observées au niveau génomique ont pu être corrélées aux variations de l'abondance relative du gène *dsrB*.** Une augmentation du nombre de ces gènes a été observée dans les deux sédiments contaminés, à 270 jours pour les sédiments faiblement bioturbés et à 180 jours pour les sédiments fortement bioturbés. Ainsi, dans le chapitre III, par une analyse phylogénétique basée sur le gène codant l'ARNr 16S, nous avons vu que la contamination pétrolière favorise la présence des MSR dans les deux types de sédiments. Dans ce chapitre-ci nous avons pu confirmer cette augmentation par PCR quantitative et déterminer que **les activités de bioturbation accélèrent leur émergence au sein de la communauté microbienne.** La création de micro-niches anoxiques, ou l'apport de composés oxydés (sulfate) lié aux activités de bioturbation accélèreraient donc ce processus. Cependant, nous avons également constaté qu'en fin d'expérimentation, les MSR étaient moins nombreux dans les sédiments fortement bioturbés comparé aux sédiments peu bioturbés. Par conséquent, **à long terme (270 jours), la bioturbation aurait un effet négatif sur l'abondance des MSR dans les sédiments.** Ce phénomène témoignerait d'un passage progressif vers des processus aérobie de la minéralisation du carbone dans ces sédiments et indique donc une plus forte oxygénation des sédiments contaminés enrichis en polychaetes.

Nous avons également recensés les MSR les plus actifs au sein de la communauté dans les microcosmes contaminés. Ainsi, **nous avons décrit deux communautés métaboliquement distinctes avant (180 jours) et pendant (270 jours) les processus de biodégradation.** Nous avons confirmé que la plupart des MSR issus des sédiments fortement bioturbés appartiennent à la famille des *Desulfobacteraceae*, et que la majorité des MSR sont affiliés à des séquences issues d'un environnement chroniquement contaminé aux hydrocarbures. Par conséquent **ces résultats suggèrent que cette communauté sulfato-réductrice est dominée par des MSR hydrocarbonoclastes, et de ce fait, que la sulfato-**

réduction serait un processus important dans la bioremédiation de ce type d'environnement. De plus, parmi les *Desulfobacteraceae*, certaines MSR sont affiliées à la souche *Desulfococcus multivorans* une souche capable de respirer l'oxygène, ainsi qu'à des séquences issues de la zone oxique de certains sédiments. Leur présence conforte les résultats obtenus par PCR quantitative, car elles peuvent (i) témoigner de l'apport d'oxygène lié aux polychaetes au sein des sédiments et/ou (ii) suggérer que les MSR présents dans ces sédiments possèdent des capacités d'adaptation à l'oxygène.

Parmi les MSR majoritaires, certains ont montré une affiliation à des séquences recueillies dans des sédiments associés à la rhizosphère. Cette information nous a paru intéressante, car ce type d'environnement supporte une forte activité sulfato-réductrice, mais également de fixation de l'azote, ces deux processus pouvant être couplés. Ainsi, la présence majoritaire de ces MSR pourrait indiquer une activité de fixation de l'azote couplée à la sulfato-réduction au sein des sédiments contaminés en présence des polychaetes.

CHAPITRE VI

ETUDE DE LA REPONSE ET DU ROLE DES BACTERIES NITRATE-REDUCTRICES DANS LA DEGRADATION DES HYDROCARBURES PETROLIERS DANS DES SEDIMENTS BIOTURBES

CHAPITRE VI: Réponse et rôle des bactéries nitrate-réductrices dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers dans des sédiments bioturbés

1. INTRODUCTION

Jusqu'à présent, la dégradation anaérobie des hydrocarbures a été démontrée sous trois conditions : la dénitrification, la sulfato-réduction et la méthanogénèse. Dans les deux chapitres précédents nos études ont porté sur les micro-organismes sulfato-réducteurs et méthanogènes. Ces micro-organismes sont retrouvés communément dans la zone anoxique des sédiments marins et ont longtemps été considérés comme des organismes anaérobies stricts. Cependant, de plus en plus d'études relatent leur tolérance à l'oxygène, voire leur capacité à le respirer. Au contraire, les micro-organismes dénitrifiants sont situés dans la zone suboxique du sédiment, entre la zone oxique et anoxique, et présentent la particularité de respirer les nitrites ainsi que l'oxygène. En outre, par comparaison à la sulfato-réduction et la méthanogénèse, la dénitrification est le métabolisme anaérobie le plus favorable énergétiquement.

La particularité métabolique des micro-organismes dénitrifiants a suscité un grand intérêt et l'étude de leur diversité a été largement entreprise au sein de l'environnement. Ces études ont essentiellement portées sur des sites présentant des fluctuations de paramètres physico-chimiques (oxygène, sulfures). Les bactéries dénitrifiantes ont également été préférentiellement utilisées comme modèles pour les études liées à la dégradation des hydrocarbures. Elles ont la capacité de dégrader des composés aliphatiques tels que les alcanes ainsi que des composés aromatiques, notamment les BTEX (mono-aromatiques), et les HAPs de 2 à 3 cycles. Jusqu'à présent la dégradation de molécules aromatiques de plus de trois cycles n'a pas été démontrée.

Dans le chapitre III nous avons émis l'hypothèse que l'oxygénation intermittente permettait la sélection de bactéries tolérantes à des phases anoxiques ou possédant un métabolisme versatile leur conférant un avantage dans ce type d'environnement. Nous avons donc envisagé que les sédiments fortement bioturbés présentaient une communauté dénitrifiante totale spécifique à ces conditions fluctuantes, comportant des micro-organismes

dénitrifiants hydrocarbonoclastes propre à cet environnement. Afin de préciser cela, nous avons suivi la dynamique des bactéries dénitrifiantes au niveau génomique en ciblant le gène *nirS* codant pour la Nitrite réductase. Cette étude a été complétée par la mise en place de cultures d'enrichissement en présence de nitrate et en absence d'oxygène. Ces cultures ont été réalisées sur des hydrocarbures aromatiques à haut poids moléculaires (chrysène, pyrène, fluoranthène) et sur un composé organo-soufré (dibenzothiophène).

Ce chapitre a pour objectif de

- fournir des informations sur les processus structuraux mis en œuvre par la communauté dénitrifiante lors d'une contamination aux hydrocarbures pétroliers,
- déterminer l'impact de la macrofaune sur cette communauté dans ces sédiments,
- démontrer les capacités de dégradation de la communauté dénitrifiante présentes dans les sédiments
- de caractériser les communautés dégradantes

Ces travaux sont présentés sous forme d'un article en préparation pour soumission dans le journal *FEMS Microbiology Ecology*.

2. PUBLICATION 4: Response of nitrate-reducing bacteria to oil-pollution in bioturbated marine sediments

Magalie Stauffert, Cristiana Cravo-Laureau, Robert Duran

Equipe Environnement et Microbiologie, Université de Pau et des Pays de l'Adour, IPREM UMR CNRS 5254, BP 1155, 64013 Pau Cedex, France, robert.duran@univ-pau.fr

Keywords: nitrate-reducing bacteria, oil-pollution, bioturbation, marine sediments, PAH biodegradation

Running title: Denitrifying bacteria in oil-polluted bioturbated sediments

Cette étude est présentée sous forme d'article pour soumission dans le journal *FEMS Microbiology Ecology* sous le titre :

ABSTRACT

The effect of oil on denitrifying microorganisms was investigated in oil-polluted bioturbated sediments maintained close to environmental conditions in large scale microcosms. T-RFLP and gene libraries analyses targeting *nirS* gene showed that denitrifying microbial communities structure was not affected neither by bioturbation activity of *Hediste diversicolor* nor oil revealing the metabolic versatility of denitrifying microorganisms. From oil-polluted sediments, distinct denitrifying hydrocarbonoclastic bacterial consortia were obtained by enrichment culture on high molecular weight PAHs (dibenzothiophene, fluoranthene, pyrene and chrysene) under nitrate-reducing conditions. Interestingly, molecular characterization of the consortia showed that the denitrifying communities obtained from oiled microcosms containing *H. diversicolor* were different to that without *H. diversicolor*, especially with fluoranthene and chrysene revealing the functional redundancy for the degradation of these PAHs. Molecular and culture-dependent approaches revealed that members of the *Gammaproteobacteria* were abundant in oil-polluted and bioturbated sediment suggesting a key role of these microorganisms in hydrocarbon degradation in the environment.

2.1. Introduction

Oil pollution constitute a major environmental problem, especially in marine environments where it represent the most important organic pollutant (Spormann & Widdel, 2000). During an oil spill, sedimentation of crude oil results on the accumulation of undegraded hydrocarbons, in sediments. With the exception of the most superficial layer, the bulk marine sediments contaminated by hydrocarbons are assumed to be anoxic (Canfield *et al.*, 1993). Anaerobic biodegradation of hydrocarbons by hydrocarbonoclastic bacteria is an important process in the environment (Holliger & Zehnder, 1996). It has been reported under sulfate- (Cravo-Laureau *et al.*, 2005; Higashioka *et al.*, 2009), nitrate- (Davidova *et al.*, 2006; Callaghan *et al.*, 2009), iron (Fe(III))- (Lovley *et al.*, 1993) and methanogenic conditions (Anderson & Lovley, 2000; Jones *et al.*, 2008). Among the different anaerobic processes, hydrocarbon degradation coupled to sulfate-reduction is the most important and well documented (Kniemeyer *et al.*, 2003; Cravo-Laureau *et al.*, 2005) because sulfate is found in abundant proportion (Jørgensen, 1982), whereas nitrate concentrations are typically low and Fe(III) is often only sparsely available, especially in heavily contaminated sediments (Rothermich *et al.*, 2002). Nevertheless, denitrification is considered as an important process in marine environments because nitrate is the most favourable electron acceptor when oxygen is depleted with an energy yield close to that of oxygen (Canfield *et al.*, 2005)

Denitrification occurs within a few millimetres depth from the sediment/water interface. Several studies using the nitrite reductase genes (*nirS* or *nirK*) as functional molecular markers have demonstrated the ubiquity and diversity of denitrifying bacteria in a variety of habitats including soils (Wolsing & Priemé, 2004; Throbäck *et al.*, 2007), estuarine sediments (Nogales *et al.*, 2002; Santoro *et al.*, 2006), marine sediments (Liu *et al.*, 2003; Falk *et al.*, 2007) and seawater (Oakley *et al.*, 2007). NirS, considered as the key enzyme of denitrification (Zumft, 1997), is responsible of the conversion of nitrite to nitric oxide (or nitrous oxide), the crucial step in the reaction sequence because it leads to gas formation. A variety of microorganisms, mainly facultative anaerobes belonging to both *Bacteria* and *Archaea*, are able to perform denitrification (Zumft, 1997). Few studies investigated the impact of oil on denitrification; they highlighted an inhibition of denitrification activity after oil addition in pristine sediments (Bonin *et al.*, 1990) while they demonstrated that the denitrification potential was not affected by petroleum input in chronically contaminated sediments (Bonin *et al.*, 1994). These observations suggest that denitrifying community response is dependent on the contamination history. Surprisingly little is known about denitrifying microbial community structure in oil-polluted environments.

The presence and activity of burrowing macrofauna (bioturbators) in sediments can significantly affect microbial processes by altering physical-chemical properties of sediments (Banta & Andersen, 2003). The effects of bioturbation on the nitrogen cycle and more particularly on denitrification have been extensively examined showing that bioturbators affected positively denitrification in coastal sediments (Svensson *et al.*, 2001; Gilbert *et al.*, 2003; Laverock *et al.*, 2011). Numerous works have demonstrated an enhancement of nitrate (Kristensen *et al.*, 1991) and oxygen supply stimulating the nitrification-denitrification coupling (Laverock *et al.*, 2011). Oxygen inhibits enzymes involved on denitrification but also stimulates sedimentary nitrification which usually provides the major source of nitrate for denitrification (Herbert, 1999). Bioturbation can promote microbial activities (Kogure & Wada, 2005; Satoh *et al.*, 2007) and modify microbial communities structures (Laverock *et al.*, 2010) associated with different aerobic processes and anaerobic organic matter degradation (Berthe-Corti & Höpner, 2005; Grossi *et al.*, 2006; Papaspyrou *et al.*, 2007) as also demonstrated by 16S rRNA-based studies in hydrocarbon, oil or pesticide-contaminated sediments (Cuny *et al.*, 2007; Monard *et al.*, 2008). To the best of our knowledge, only one study revealed the concomitant effect of oil and bioturbation (Gilbert *et al.*, 1997). Authors showed that the reworking activity of polychaetes induced a burying of oil in deeper sediment layers leading to a denitrification inhibition. Although various works have focused on the influence of hydrocarbons on microbial communities structures in marine sediments, little is known about processes underpinning microbial communities organisation in response to oil in bioturbated sediments (Cuny *et al.*, 2007; Näslund; *et al.*, 2010) and even less when considering denitrifying communities. In order to provide new insights on the mechanisms structuring microbial communities in response to oil, we developed a microcosm approach maintaining sediments as close as possible to environmental conditions including tidal cycles (Stauffert *et al.*, unpublished (a)). Sediments were submitted to oil pollution, and the effect of oil on microbial communities was examined with and without enhancing bioturbation activity by the addition of *Hediste diversicolor*. We previously demonstrated that the presence of *N. diversicolor* resulted on a microbial community structure different to that observed without the addition of *N. diversicolor* but with similar degradation capacities revealing the functional redundancy for oil degradation (Stauffert, *et al.*, unpublished (a)). The presence of *N. diversicolor* induced a Gamma-shift in bacterial community which was accompanied with an increased diversity of sulfur-oxidising *Bacteria* and ammonia-oxidising *Archaea* while active methanogenic *Archaea* were negatively affected (Stauffert, *et al.*, unpublished (b)). We report here the dynamic of denitrifying communities followed by Terminal- Restriction Fragment

Length Polymorphism (T-RFLP) analysis during the 270 days of microcosms incubation. The composition of denitrifying communities was determined combining *nirS* gene library analyses and culture dependent approaches that allowed to obtain hydrocarbonoclastic nitrate-reducing consortia able to degrade poly-aromatic hydrocarbons (PAHs) with 2-, 3- and 4-aromatic rings.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Microcosms set-up

A microcosm system miming the tidal cycles was setup with marine sediments. Four conditions were applied in triplicate (i) CTRL: control condition, (ii) BAL: oil addition, (iii) NEREIS: addition of *Hediste diversicolor* and (iv) NEREIS+BAL, addition of oil and *N. diversicolor*. This system was previously described (Stauffert, *et al.*, unpublished (a)). Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) was followed by GC-MS and concentration was significantly reduced irrespective of conditions after 90 days of incubation leading to a removal of 60% of the initial TPH at the end of experiment (270 days). The macrofaunal activity was also quantified indicating a great reworking activity in presence of polychaetes, which was enhanced by the addition of oil. The increase in macrobenthic population and its related reworking activity clearly allowed a deeper burying of TPH into the sediments (Stauffert, *et al.*, unpublished (a)).

2.2.2. DNA extraction

Total DNA extractions for all samples were performed with the UltraClean Soil DNA kit (MoBio Laboratories) as previously described (Stauffert, *et al.*, unpublished (a)). DNA from sediment samples was extracted from 0.250 g (uplayer of microcosm, about 2 cm) of frozen sediment. DNA from enrichment cultures was extracted from 15ml of culture collected by filtration.

2.2.3. PCR amplification

Amplification of *nirS* genes was performed with the primer pair nirS1F (5-CCTAYTGGCCGCCRCART-3) and nirS6R (5-CGTTGAACTTRCCGGT-3) with a touchdown program as previously described (Braker, *et al.*, 1998). 16S rRNA gene was amplified using the specific primers 63F (5-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3) and

1387R (5-GGGCGGWGTGTAACAAGGC-3) for *Bacteria* (Marchesi, *et al.*, 1998) PCR conditions were as follows: initial denaturation (94°C for 3 min) followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 30 s), annealing (58°C for 30 s), and extension (72°C for 60 s) and a terminal extension (72°C for 10 min). The reaction mix (50 µL final volume) contained 50 mM buffer, 0.2 mM dNTP, 0.2 µM of each primer and 1.25 U of Taq polymerase (Ozyme). For *nirS* gene amplification BSA 1x (New England Biolabs) was added to reaction mix.

2.2.4. T-RFLP analysis

For T-RFLP analysis, forward primer *nirS1F* was labeled at the 5' end with the phosphoramidite fluorochrome carboxyfluorescein (FAM). PCR products were visualized by agarose gel electrophoresis and purified with the PCR purification kit (GE Healthcare).

Purified amplicons concentrations were determined by gel visualisation. Restriction digests were performed in a total volume of 10 µl containing between 50 and 100 ng of PCR amplicons with 3 U of restriction enzyme. HaeIII and HinfI (New England Biolabs) enzymes were used for 16S bacterial amplicon digestion (3h at 37°C). HhaI and TaqI (New England Biolabs) were used for *nirS* amplicons digestion (3h at 37°C and 65°C respectively). 1 µl of digested amplicons were mixed with 10 µl of deionised formamide (Applied Biosystems) and 0.25 µl of the GeneScan-500 size standard (35-500 bp; Applied Biosystems). They were denatured by heating at 95°C for 5 min before analyses on an ABI Prism 310 capillary sequencer in GeneScan mode. Injection was performed electrokinetically at 15 kV for 30 s and the runs at 15 kV were completed within 30 min. T-RFLP profiles were analyzed using GENSCAN version 3.1 software (Applied Biosystems). Data sets were constructed by using peak height thresholds of at least 30 fluorescence units. Then, raw data were normalized by dividing each peak height by the total signal intensity of the corresponding profile. All the statistical work with T-RFLP profiles was done with the Primer 6 software (Primer E, Plymouth, UK). Similarities were calculated between every pair of samples as the Bray-Curtis similarity coefficient (Bray & Curtis, 1957), using the standardized T-RFLP profiles and the similarityfunction in Primer 6.

2.2.6. Culture media and enrichment procedures

Synthetic culture medium for enrichments had the following composition, in g.l⁻¹: KH₂PO₄, 0.2; NH₄Cl, 0.3; NaCl, 24 ; MgCl₂.6H₂O, 4.46 ; KCl, 0.5 ; CaCl₂.2H₂O, 0.15; supplemented with Na₂S.9H₂O (0.3 g.l⁻¹), NaHCO₃ (1.5 g.l⁻¹), and V7 (Pfennig & Trüper,

1992), modified SL12 (Overmann *et al.*, 1992) and selenite-tungstate sodium (Widdel & Bak, 1992) solutions at 1 ml.l⁻¹, after sterilisation. pH was adjusted to 7.3-7.5, and the medium was flushed with N₂/CO₂ mixture (90/10). Medium was inoculated with sediments from BAL_{270d} and NEREIS+BAL_{270d} microcosm (10% (v/v)). Dibenzothiophene, fluoranthene, chrysene and pyrene (99%) were purchased from Sigma Chemical (St. Louis, MO). Hydrocarbon stock solutions were performed with dichloromethane solution (99%) for degradation assay. Solid PAHs (100 mg.l⁻¹) were added as the sole source of carbon and energy. Microbial consortia were grown under nitrate-reducing conditions (10 mM KNO₃) in a mineral salts medium and were monitored for nitrate consumption. A total of seven successive subcultures were performed (about seven months).

2.2.7. Quantitative analysis of PAHs

Quantitative growth experiments on PAH (100 mg.l⁻¹ of dibenzothiophene, fluoranthene, chrysene or pyrene) were carried out in serum bottles (50 ml) containing 27 ml of synthetic medium. When two hydrocarbons were mixed, each was added at 50 mg.l⁻¹. Medium was inoculated with 3 ml of subculture (10% v/v) and bottles were sealed with Teflon-coated rubber stoppers (West Pharmaceutical Services) and aluminium crimp seals. Abiotic controls, with autoclaved inoculum, were prepared in the same way. Cultures were incubated during 30 days at 30°C, in the dark without shaking. Three replicates of each condition were sacrificed in the beginning and in the end of the experiment.

2.2.8. Chemical analysis and PAHs extraction

Nitrate concentrations were measured colorimetrically (Cataldo *et al.*, 1975). Hydrocarbons were extracted with dichloromethane (10 ml) added with heptamethylnonane (HMN; 3.43 mM) as internal standard. Extracts were analysed with a GC 6850 Agilent Technologies instrument gas chromatograph equipped with a HP-5 type capillary column (30m x 320µm x 0,25µm) and flame ionisation detector. Helium (1.7 ml.min⁻¹) was the carrier gas. Injector temperature was 280°C, initial column temperature was 60°C and increased at a rate of 20°C.min⁻¹ until 180°C, then 5°C.min⁻¹ until 310°C. Results obtained with abiotic replicates were deduced from biotic replicates.

2.2.9. Construction of *nirS* gene libraries

Freshly amplified PCR products were cloned into plasmid pCR2.1-TOPO, according to the instructions of the TOPO TA cloning kit (Invitrogen). The resulting clones were selected according to the manufacturer's recommendations. Cloned inserts were amplified by PCR from selected clones by using vector primers and those products with the expected sizes were subsequently digested independently with restriction endonucleases HhaI and TaqI (New England BioLab). Digested products were separated by electrophoresis in 3% (w/v). Clones exhibiting the same restriction fragment pattern for both restriction enzymes were grouped, and representatives from those groups were sequenced.

2.2.10. Sequencing and phylogenetic analysis

The presence of chimeric sequences was checked with Mallard and Pintail tools. The DOTUR program (Schloss & Handelsman, 2005) was used to determine Operational Taxonomic Units (OTUs) defined as sequence groups in which sequences differed by 5% (948) for *nirS* sequences and 3% for *16S rRNA* sequences. NirS corresponding amino acid sequences were obtained by using the free FastPCR software version 3.8.82 (www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm). Alignments were achieved by using ClustalX v2 before drawing the design of phylogenetic tree with Mega v4 (Thompson *et al.*, 1997; Tamura *et al.*, 2007). The tree was inferred using the Neighbor-Joinin method (Saitou & Nei, 1987). For simulation of T-RFs lengths in the clones, the mobile web page was used with restrict function (Rice *et al.*, 2000). Coverage values were calculated for the libraries (Good, 1953), as well as rarefaction curves and estimates of their diversity using the packages PAST v.1.29 (<http://folk.uio.no/ohammer/past>).

2.3. Results and discussion

2.3.1. Dynamic of denitrifying bacteria based on *nirS* gene analyses

The dynamic of denitrifying communities in CTRL, BAL, NEREIS and NEREIS+BAL microcosms was followed by T-RFLP analysis based on *nirS* gene. T-RFLP patterns showed less than 20% differences between microbial communities of the different treatments. However, several T-RFs were restricted to a microcosm condition (Fig. VI-1) as for example T-RF 245 bp for NEREIS, 480 bp for BAL and 35 bp and 50 bp for

NEREIS+BAL indicating a specific impact of treatment. When comparing the relative abundances of dominant T-RFs presents in all treatments (67 bp, 109 bp, 231 bp, 346 bp, 387 bp and 432 bp) (Fig. VI-1), they were found in different proportions according to the treatments and detected all along the experiment.

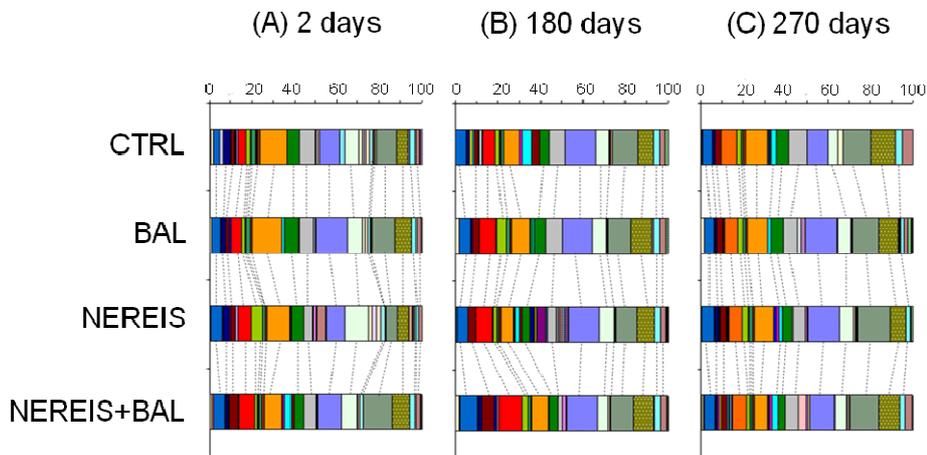


Figure VI-1: Relative abundance (%) of terminal restriction fragments (T-RFs) in *nirS* T-RFLP patterns. The analysis is based on the average profiles ($n=3$) at 2 days, 180 days and 270 days of incubation from CTRL; BAL, NEREIS and NEREIS+BAL microcosms.

These observations suggested that denitrifying communities were slightly affected by hydrocarbons pollution and bioturbation although a succession of minors T-RFs was observed in all incubation conditions along the experiment. Treatments performed in the present study (oil and *H. diversicolor* addition) are known to provoke physical-chemical changes on sediment characteristics. For example, a previous study showed that benthic macrofauna activities, which include mechanical mixing and introduction of oxygen into sediments by burrow ventilation, modified the repartition of electron acceptors and nutrients availability (Banta & Andersen, 2003). It was also demonstrated that oil decreased redox potential resulting in anoxic conditions more favorable for sulfate-reducers microorganisms with increasing sulfide production (Bonin *et al.*, 1990). Although multiple environmental parameters such as O_2 , NO_3^- , NO_2^- and S^{2-} (Castro-González *et al.*, 2005; Dang *et al.*, 2009; Jayakumar *et al.*, 2009) influence the growth of denitrifying microorganisms, their influence on denitrifying communities has not been already observed (Braker *et al.*, 2001). The versatility of denitrifying microorganisms may explain the fact that they were slightly affected by the different treatments in our study. Indeed, recent studies demonstrated the capacity of

denitrification in presence of oxygen (Bateman & Baggs, 2005; Hayatsu *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2010), few strains able to degrade hydrocarbons using oxygen as well as nitrate as electron acceptors were isolated (Shinoda *et al.*, 2004), and more recently, the production of oxygen from nitric oxide molecules, oxidising methane, was demonstrated (Ettwig *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). The metabolic flexibility of denitrifying microorganisms impedes to clearly establish the correlation between structure, abundance and function of denitrifying bacteria in the environment.

2.3.2. Composition of oil-polluted denitrifying communities

In order to characterize the composition of oil-polluted denitrifying communities, *nirS* gene libraries were constructed from BAL and NEREIS+BAL microcosms at 270 days. From the two *nirS* gene libraries, 234 clones were dispatched within 64 NirS OTUs considering 95% sequence similarity (Santoro *et al.*, 2006). Similar coverages were obtained for both libraries (82.5% and 81.3% for BAL and NEREIS+BAL libraries respectively).

In agreement with T-RFLP analyses, libraries from BAL and NEREIS+BAL treatments revealed similar diversity indexes: species richness (40 and 42 OTUs respectively), Simpson index (0.915 and 0.918) and Shannon index (3.148 and 3.110). Among the 64 NirS OTUs, 18 OTUs were detected in both libraries representing the majority of sequences (71.4%; Figure VI-2). Several OTUs were found specifically in a condition 22 OTUs and 24 OTUs were specific for BAL and NEREIS+BAL treatments respectively. Although they represented minor abundant sequences (14.5% BAL and 14.1% NEREIS+BAL), they supported that both treatments exhibited distinct structures.

Phylogenetic analysis showed seven majors clusters (Figure VI-2). All clusters contain NirS sequences from BAL and NEREIS+BAL libraries, except cluster VI that contains exclusively two OTUs from NEREIS+BAL library. NirS sequences were predominantly affiliated within cluster I (71.42% and 77.3% of total sequences for BAL and NEREIS+BAL libraries respectively) and occasionally within others clusters (from II to VII).

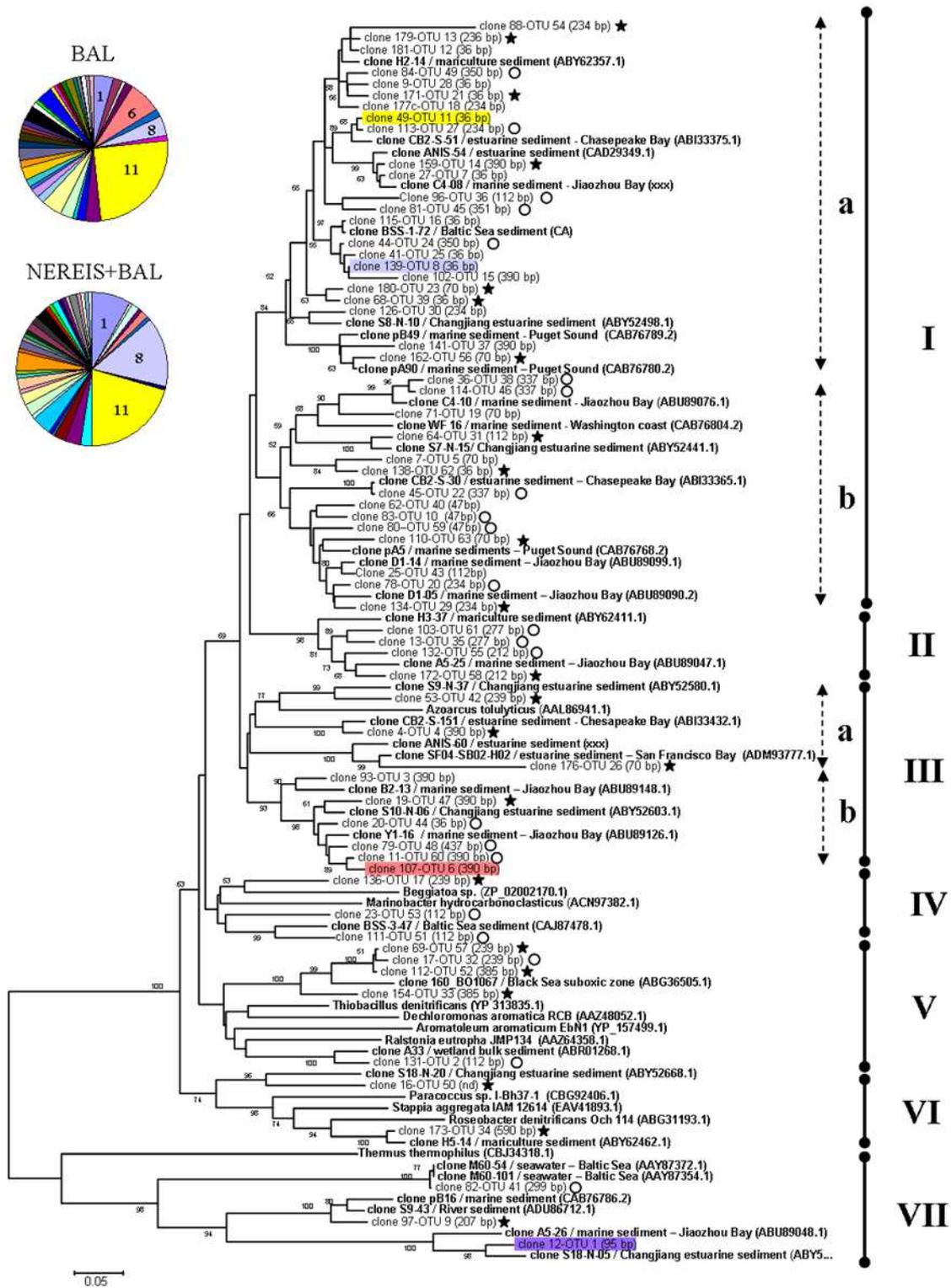


Figure VI-2: Affiliation of NirS deduced amino acid sequences from PCR amplified nirS gene fragments. Phylogenetic tree was constructed with the Neighbor-joining method. Bootstrap values (>50%) for 1,000 replicates are shown at the branch points. Database sequences are shown in bold, with Genbank accession numbers in brackets. White circles indicate sequences found only in BAL library and black stars indicate sequences found only in NEREIS+BAL library. Roman numbers refer to clusters discussed in the text.

Sequences found in cluster I, II, IIIb and VII were not related with isolated nitrite reducer species, they were affiliated to sequences found in marine or estuarine environments (Braker *et al.*, 2000; Falk *et al.*, 2007; Dang *et al.*, 2009). The other NirS sequences were closely related to sequences belonging to *Alphaproteobacteria* (*Paracoccus* sp., *Roseobacter denitrificans* in cluster VI), *Betaproteobacteria* (*Azoarcus tolulycus* in cluster IIIa and *Thiobacillus denitrificans* and *Ralstonia eutropha* in cluster V) and *Gammaproteobacteria* (*Marinobacter hydrocarbonoclasticus* and *Beggiatoa* sp. in cluster IV).

Dominant OTUs (> 5%) were detected in different proportion in both libraries (figure VI-2, pie chart). They were not related to isolated denitrifying bacteria (figure VI-2, clusters Ia, III and VII), their affiliation indicates that these phlotypes are widespread in environment. With *in silico* restriction (HhaI enzyme) analysis, nucleic acid sequences were related to 12 T-RFs (± 5 pb) detected by T-RFLP in oil-contaminated microcosms at 270 days. Interestingly, the 6 dominant T-RFs found in T-RFLP patterns in all treatments were detected in the libraries. T-RF 346 bp was related to sequences of cluster Ia and T-RF 432 bp to a sequence from cluster IIIb while T-RFs 67 bp, 109 bp, 231 bp and 387 bp were related to sequences from several clusters. These observations show the relevance to combine T-RFLP and gene library analyses as well as the necessity to obtain denitrifying isolates with hydrocarbon degradation capacities for a better identification.

2.3.3. Characterisation of nitrate-reducing consortia

Several serial dilutions of nitrate-reducing enrichments resulted in sediment-free consortia, obtained from BAL and NEREIS+BAL microcosm sediments after 270 days of incubation. High molecular weight PAH (dibenzothiophene, an organosulfur compound; fluoranthene, three-ring PAH; pyrene and chrysene, four-ring PAHs) were added as sole carbon source. These consortia were assayed for hydrocarbons and nitrate transformation in liquid cultures. After 30 days, about 10 % (0.3 mg) of PAHs were removed, exception of dibenzothiophene by NEREIS+BAL consortium that showed only 4.9 ± 3.7 % depletion. Nitrate removal was observed for all consortia (Table VI-1).

In order to characterize the overall composition of bacterial communities in the different nitrate-reducing consortia, 16S rRNA libraries were constructed (Figure VI-3). The coverages ranged from 95.1% and 100% (Table VI-1). Most simplified communities were

obtained on chrysene and fluoranthene from BAL and NEREIS+BAL microcosm respectively as indicated by their low number of OTUs and characterized by the lowest diversity index.

Table VI-1: Characteristics of 16S rRNA libraries from enrichment cultures on fluoranthene, dibenzothiophene (DBT), pyrene and chrysene. Hydrocarbons removal and nitrate consumption after 30 days of incubation (relative to the beginning of the experiment).

	BAL				NEREIS+BAL			
	Fluoranthene	DBT	Pyrene	Chrysene	Fluoranthene	DBT	Pyrene	Chrysene
Phlotypes	7	9	8	6	3	8	6	13
Number of clones	88	71	80	75	75	75	69	81
Shannon index	1.179	2.038	1.085	0.791	0.379	1.178	0.962	2.147
Simpson index	0.565	0.855	0.473	0.364	0.193	0.528	0.476	0.856
Coverage (%)	97.7	100	97.5	98.7	98.7	97.3	97.1	95.1
Hydrocarbon removal (%)	13.4 ± 4.7	7.1 ± 2.8	13 ± 5.5	nd	13 ± 3.9	4.9 ± 3.7	10.2 ± 5.5	10.1 ± 5.3
Nitrate consumption (%)	24.9 ± 11.9	23.9 ± 17.2	18.4 ± 12.2	nd	31.1 ± 8.1	23.4 ± 11.4	33.8 ± 16.3	39.9 ± 11.6

A total of 29 different OTUs were found in consortia libraries (ranging from 3 to 13 OTUs per library). *Gammaproteobacteria* were found most abundant (15 OTUs) with sequences related to *Marinobacter* genus the most abundant. *Bacteroidetes*, *Alphaproteobacteria*, and *Epsilonproteobacteria* were represented by 5, 5 and 4 OTUs respectively (Figure VI-3). Most sequences were affiliated (threshold of 97% homology, Figure VI-3) to microorganisms known to perform nitrate and/or nitrite reduction, but none of them were known to degrade hydrocarbons under nitrate-reducing condition. Thus, we selected bacteria for which anaerobic PAHs degradation has never been demonstrated.

Hierarchical clustering based on presence and absence of OTUs revealed that the sediment origin (BAL or NEREIS+BAL sediment) selected different bacterial phlotypes (Figure VI-3). Both consortia isolated on fluoranthene, formed a distinct cluster sharing only 2 OTUs (40% of similarity). On pyrene and chrysene, consortia showed four distinct profiles and both consortia isolated on dibenzothiophene showed the greatest similarity (about 80%).

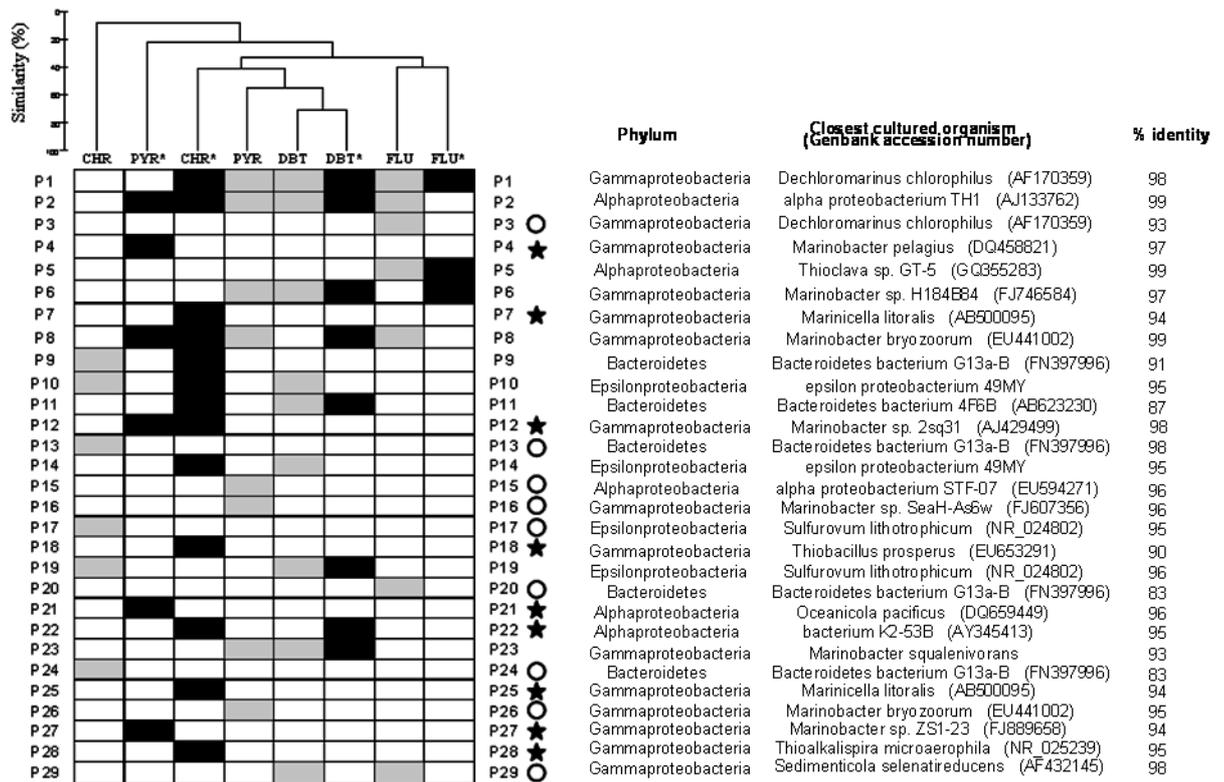


Figure VI-3: Phylogenetic composition and similarity of BAL (grey) and NEREIS+BAL consortia (black). NEREIS+BAL consortia are indicated by (*). The different OTUs are noticed P1 up to P29. (○) indicate sequences found only in BAL library and (★) indicate sequences found only in NEREIS+BAL library. DBT= dibenzothiophene; FLU= fluoranthene; CHR= chrysene; PYR= pyrene.

These observations are in accordance with the results based on 16S cDNA libraries performed on the same samples showing hydrocarbonoclastic functional redundancy between BAL and NEREIS+BAL communities (Stauffert, *et al.*, unpublished (a)). Nevertheless, several OTUs were shared between the different consortia as for example OTUs P1 and P2 (Figure VI-3) related to *Dechloromarinus chlorophilus* (98% identity), a per-chlorate reducing bacteria and *Alphaproteobacterium TH1* (99% identity) (Coates, *et al.*, 1999). OTUs P5 and P9 (Figure VI-3) related to *Thioclava* sp. GT-5 (99% identity) and a *Bacteroidetes* (91% identity) were specifically found respectively in fluoranthene and chrysene consortia irrespective of their origin (BAL or NEREIS+BAL). Interestingly, *Thioclava* is known to be a strictly aerobic bacterium. We hypothesize that the strain represented by OTU P5 is not strictly aerobic but is probably able to perform anaerobic respiration explaining its presence in anaerobic enrichment culture. In addition, the fact that OTU P5 was observed only in fluoranthene consortia suggests that it may have the genetic potential involved on the initial

steps for anaerobic fluoranthene degradation. Similarly, OTU P9 may have the genetic potential involved on the initial steps for anaerobic chrysene degradation since it was detected only in the chrysene consortia.

Among the 29 OTUs, 9 were found specific to BAL consortia. They were related to *Alpha-*, *Gamma-*, *Epsilonproteobacteria* and *Bacteroidetes*. 9 OTUs were also found specific to NEREIS+BAL consortia. Interestingly 7 on 9 OTUs were related to *Gammaproteobacteria* (Figure VI-3), among them 3 were related to *Marinobacter* genus (between 94% and 98% identity). These results are in accordance with the “Gamma-shift” observed previously in the same samples of microcosm at 270 days in presence of *H. diversicolor* (Stauffert, *et al.*, unpublished (a)).

When comparing 16S rRNA gene sequences from enrichment cultures with that of cDNA libraries obtained previously from the same sediments, the OTU P6 related to *Marinobacter* sp. H184B84 (97% identity) was closely related with two sequences detected in cDNA NEREIS+BAL library. This OTU was found in enrichment culture on fluoranthene and dibenzothiophene obtained from NEREIS+BAL sediment, and dibenzothiophene and pyrene obtained from BAL sediment. This result is in accordance with previous results suggesting that bacteria related to *Marinobacter* genus may play an important role in oil-polluted microcosms. *Marinobacter* is well represented among the large number of strains isolated from marine environments for their ability to use alkanes as sole carbon and energy sources (for review see (Duran, 2010)). It was also found in enrichment culture on PAHs and its capacity to degrade PAHs was also demonstrated (Brito *et al.*, 2006; Vila *et al.*, 2010). To date, the ability of *Marinobacter* strains to degrade hydrocarbons was only demonstrated under aerobic and microaerophilic conditions (Bonin & Bertrand, 2000) and to the best of our knowledge PAHs degradation by these strains under nitrate-reducing condition has never been described.

2.3.4. Characterisation of denitrifying community in consortia

The denitrifying communities of the eight consortia were characterized by T-RFLP based on *nirS* gene (Figure VI-4). As previously described with 16S rRNA gene libraries, denitrifying communities from both fluoranthene enrichment cultures (BAL and NEREIS+BAL) formed a cluster but with higher similarity (about 80%) indicating that most denitrifying bacteria were present in both consortia. An important discrepancy between 16S rRNA gene library and *nirS* based T-RFLP was observed for dibenzothiophene enrichment cultures (80% similarity between BAL and NEREIS+BAL with 16S rRNA based analysis *vs.*

less than 10 % similarity with *nirS* based analysis). Although, enrichment cultures were performed under nitrate-reducing conditions implying the presence of nitrate-reducers, microorganisms without *nirS* gene were also detected.

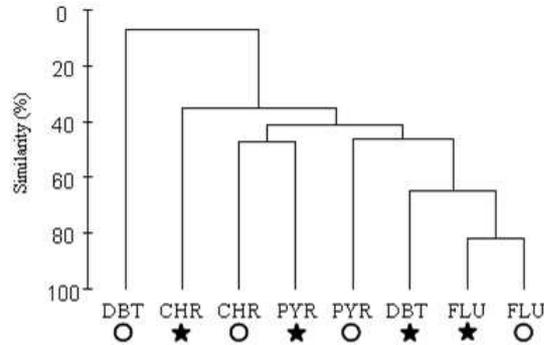


Figure VI-4: Comparison of denitrifying communities in enrichment cultures by clustering analysis based on *nirS* T-RFLP data. (○) BAL enrichments, (★) NEREIS+BAL enrichments. DBT= dibenzothiophene; FLU= fluoranthene; CHR= chrysene; PYR= pyrene.

Comparison of *nirS* based T-RFLP profiles from microcosm sediments (270 days) with *nirS* based T-RFLP profiles from enrichment cultures is shown Figure VI-5. Among the 26 T-RFs obtained from enrichment cultures, 12 were shared with T-RFLP sediment profiles. Among them, 3 T-RFs were exclusively found in fluoranthene enrichment (44 bp, 273 bp and 338 bp), 2 T-RFs on chrysene enrichment (134 bp and 238 bp) and 1 T-RF on pyrene enrichment (108 bp), while in microcosm sediments they were found in all treatments after 270 days. Interestingly, 3 dominant T-RFs detected in all sediment microcosms (67 bp, 108 bp and 385 bp) were common with enrichment cultures. It could explain their persistence at high abundance in microcosms and it could suggest their involvement in anaerobic PAH degradation.

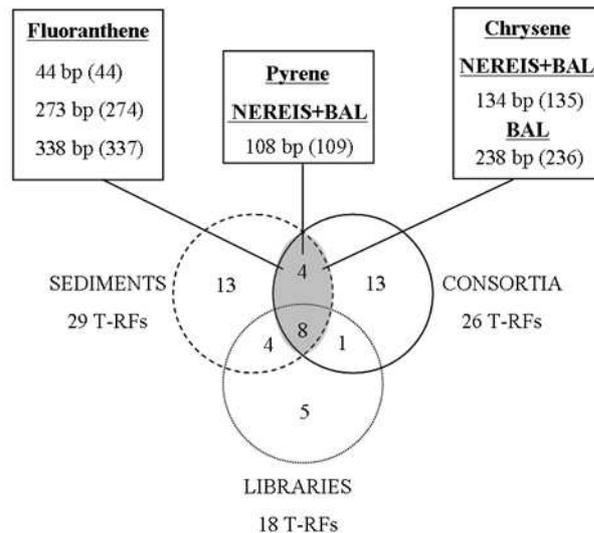


Figure VI-5: Venn diagram from T-RFLP (sediments and consortia) and in silico restriction (libraries) of *nirS* fragments.

To the best of our knowledge, this is the first report investigating denitrifying community structure during oil degradation in bioturbated marine sediment. Obviously the dominant denitrifying populations were not impacted by the presence of neither oil nor *H. diversicolor*. Nevertheless, a succession of low abundant populations was observed along the experiment in all incubation conditions. By combining molecular tools and culture-dependant methods we corroborated functional redundancy and Gamma-shift caused by *H. diversicolor* previously observed by 16S rRNA gene analyses (Stauffert, *et al.*, unpublished (a)). We have obtained, for the first time, nitrate-reducing consortia able to degrade high molecular weight PAHs. The selection of microorganisms was governed by the origin of sediment and by the carbon source resulting in the isolation of different microbial consortia with the capacity to degrade diverse high molecular weight PAHs. Their characterization by metagenomic approaches will allow their in depth comparison providing useful information on microorganisms involved on anaerobic degradation of PAHs under nitrate reducing conditions.

2.4. Acknowledgments

This work was supported by ANR (DHYVA project 06-SEST-009). We thank all partners of the DHYVA project for their useful discussions.

2.6. References

- Anderson RT & Lovley DR (2000) Hexadecane decay by methanogenesis. *Nature* **404**: 722-723.
- Banta GT & Andersen O (2003) Bioturbation and the fate of sediment pollutants- Experimental case studies of selected infauna species. *Vie et Milieu* **53**: 233-248.
- Bateman EJ & Baggs EM (2005) Contributions of nitrification and denitrification to N₂O emissions from soils at different water-filled pore space. *Biology and Fertility of Soils* **41**: 379-388.
- Berthe-Corti L & Höpner T (2005) Geo-biological aspects of coastal oil pollution. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **219**: 171-189.
- Bonin P & Bertrand JC (2000) Influence of oxygen supply on heptadecane mineralization by *Pseudomonas nautica*. *Chemosphere* **41**: 1321-1326.
- Bonin P, Gilewicz M, Rambeloarisoa E, Mille G & Bertrand JC (1990) Effect of crude oil on denitrification and sulfate reduction in marine sediments. *Biogeochemistry* **10**: 161-174.
- Bonin P, Ranaivoson ER, Raymond N, Chalamet A & Bertrand JC (1994) Evidence for denitrification in marine sediment highly contaminated by petroleum products. *Marine Pollution Bulletin* **28**: 89-95.
- Braker G, Fesefeldt A & Witzel KP (1998) Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3769-3775.
- Braker G, Ayala-Del-Río HL, Devol AH, Fesefeldt A & Tiedje JM (2001) Community Structure of Denitrifiers, Bacteria, and Archaea along Redox Gradients in Pacific Northwest Marine Sediments by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Nitrite Reductase (*nirS*) and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1893-1901.
- Bray JR & Curtis JT (1957) An ordination of the upland forest communities in southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* **27**: 249-325.
- Brito EMS, Guyoneaud R, Goñ-Urriza M, *et al.* (2006) Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. *Research in Microbiology* **157**: 752-762.

- Callaghan AV, Tierney M, Phelps CD & Young LY (2009) Anaerobic biodegradation of n-hexadecane by a nitrate-reducing consortium. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 1339-1344.
- Canfield DE, Kristensen E & Thamdrup B (2005) Aquatic geomicrobiology. *Advances in marine biology* **48**: 1-599.
- Canfield DE, Jørgensen BB, Fossing H, *et al.* (1993) Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments. *Marine Geology* **113**: 27-40.
- Castro-González M, Braker G, Farías L & Ulloa O (2005) Communities of nirS-type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific. *Environmental Microbiology* **7**: 1298-1306.
- Coates JD, Michaelidou U, Bruce RA, O'Connor SM, Crespi JN & Achenbach LA (1999) Ubiquity and diversity of dissimilatory (per)chlorate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 5234-5241.
- Cravo-Laureau C, Grossi V, Raphel D, Matheron R & Hirschler-RÃ©a A (2005) Anaerobic n-alkane metabolism by a sulfate-reducing bacterium, *Desulfatibacillum aliphaticivorans* strain CV2803T. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3458-3467.
- 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. *Marine Pollution Bulletin* **54**: 452-459.
- Dang H, Wang C, Li J, *et al.* (2009) Diversity and distribution of sediment nirS-encoding bacterial assemblages in response to environmental gradients in the eutrophied Jiaozhou Bay, China. *Microbial Ecology* **58**: 161-169.
- Davidova IA, Duncan KE, Choi OK & Suflita JM (2006) *Desulfoglaeba alkanexedens* gen. nov., sp. nov. an n-alkane-degrading, sulfate-reducing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 2737-2742.
- Duran R (2010) *Marinobacter*. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N. (ed.). Berlin, Germany: Springer-Verlag pp. 1725-1735.
- Ettwig KF, Butler MK, Le Paslier D, *et al.* Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* **464**: 543-548.
- Falk S, Hannig M, Gliesche C, Wardenga R, Köster M, Jürgens K & Braker G (2007) nirS-containing denitrifier communities in the water column and sediment of the Baltic Sea. *Biogeosciences* **4**: 255-268.
- Gao H, Schreiber F, Collins G, *et al.* (2010) Aerobic denitrification in permeable Wadden Sea sediments. *ISME Journal* **4**: 417-426.

- Gilbert F, Aller RC & 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, Stora G, Bonin P, Ledréau Y, Mille G & Bertrand JC (1997) Hydrocarbon influence on denitrification in bioturbated mediterranean coastal sediments. *Hydrobiologia* **345**: 67-77.
- Good IJ (1953) The population frequencies of species and the estimation of the population parameters. *Biometrika* **40**: 237-264.
- Grossi V, Cuny P, Caradec S, Nerini D, Pancost R & Gilbert F (2006) Impact of feeding by *Arenicola marina* (L.) and ageing of faecal material on fatty acid distribution and bacterial community structure in marine sediments: An experimental approach. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **336**: 54-64.
- Hayatsu M, Tago K & Saito M (2008) Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition* **54**: 33-45.
- Herbert RA (1999) Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* **23**: 563-590.
- Higashioka Y, Kojima H, Sato S & Fukui M (2009) Microbial community analysis at crude oil-contaminated soils targeting the 16S ribosomal RNA, xylM, C23O, and bcr genes. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 126-135.
- Holliger C & Zehnder AJB (1996) Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* **7**: 326-330.
- Jayakumar A, O'Mullan GD, Naqvi SWA & Ward BB (2009) Denitrifying bacterial community composition changes associated with stages of denitrification in oxygen minimum zones. *Microbial Ecology* **58**: 350-362.
- Jones DM, Head IM, Gray ND, *et al.* (2008) Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature* **451**: 176-180.
- Jørgensen BB (1982) Mineralization of organic matter in the sea bed - The role of sulphate reduction. *Nature* **296**: 643-645.
- Kniemeyer O, Fischer T, Wilkes H, Glöckner FO & Widdell F (2003) Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 760-768.
- Kogure K & Wada M (2005) Impacts of macrobenthic bioturbation in marine sediment on bacterial metabolic activity. *Microbes and Environment* **20**: 191-199.

- Kristensen E, Jensen MH & Aller RC (1991) Direct measurement of dissolved inorganic nitrogen exchange and denitrification in individual polychaete (*Nereis virens*) burrows. *Journal of Marine Research* **49**: 355-377.
- Laverock B, Gilbert JA, Tait K, Osborn AM & Widdicombe S (2011) Bioturbation: Impact on the marine nitrogen cycle. *Biochemical Society Transactions* **39**: 315-320.
- Laverock B, Smith CJ, Tait K, Osborn AM, Widdicombe S & Gilbert JA (2010) Bioturbating shrimp alter the structure and diversity of bacterial communities in coastal marine sediments. *ISME Journal*.
- Liu X, Tiquia SM, Holguin G, *et al.* (2003) Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the Pacific coast of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3549-3560.
- Lovley DR, Giovannoni SJ, White DC, Champine JE, Phillips EJP, Gorby YA & Goodwin S (1993) *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Archives of Microbiology* **159**: 336-344.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 795-799.
- Monard C, Martin-Laurent F, Vecchiato C, Francez AJ, Vandenkoornhuyse P & Binet F (2008) Combined effect of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 2253-2259.
- Näslund J, Nascimento FJ & Gunnarsson JS (2010) Meiofauna reduces bacterial mineralization of naphthalene in marine sediment. *ISME Journal* **4**: 1421-1430.
- Nogales B, Timmis KN, Nedwell DB & Osborn AM (2002) Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 5017-5025.
- Oakley BB, Francis CA, Roberts KJ, Fuchsman CA, Srinivasan S & Staley JT (2007) Analysis of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) genes and cultivation reveal depauperate community of denitrifying bacteria in the Black Sea suboxic zone. *Environmental Microbiology* **9**: 118-130.
- Overmann J, Fischer U & Pfennig N (1992) A new purple sulfur bacterium from saline littoral sediments, *Thiorhodovibrio winogradskyi* gen. nov. and sp. nov. *Archives of Microbiology* **157**: 329-335.

- Papaspyrou S, Kristensen E & Christensen B (2007) *Arenicola marina* (Polychaeta) and organic matter mineralisation in sandy marine sediments: In situ and microcosm comparison. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **72**: 213-222.
- Pfennig N & Trüper HG (1992) The family Chromatiaceae. *The Prokaryotes* 3200-3221.
- Rao AMF, McCarthy MJ, Gardner WS & Jahnke RA (2008) Respiration and denitrification in permeable continental shelf deposits on the South Atlantic Bight: N₂:Ar and isotope pairing measurements in sediment column experiments. *Continental Shelf Research* **28**: 602-613.
- Rice P, Longden L & Bleasby A (2000) EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* **16**: 276-277.
- Rothermich MM, Hayes LA & Lovley DR (2002) Anaerobic, sulfate-dependent degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum-contaminated harbor sediment. *Environmental Science and Technology* **36**: 4811-4817.
- Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406-425.
- Santoro AE, Boehm AB & Francis CA (2006) Denitrifier community composition along a nitrate and salinity gradient in a coastal aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2102-2109.
- Satoh H, Nakamura Y & Okabe S (2007) Influences of infaunal burrows on the community structure and activity of ammonia-oxidizing bacteria in intertidal sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 1341-1348.
- Schloss PD & Handelsman J (2005) Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 1501-1506.
- Shinoda Y, Sakai Y, Uenishi H, *et al.* (2004) Aerobic and Anaerobic Toluene Degradation by a Newly Isolated Denitrifying Bacterium, *Thauera* sp. Strain DNT-1. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 1385-1392.
- Spormann AM & Widdel F (2000) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**: 85-105.
- Stauffert, M., Cravo-Laureau C., Jézéquel, R., Cuny P., Gilbert, F., Militon C., Amouroux, D., Mahdaoui F., Bouyssiére, B., Stora, G., Merlin, F-X., Duran, R. Impact of crude oil on bacterial communities' structure in bioturbated sediments. Submitted to *Applied and Environmental Microbiology* for publication (a).

- Stauffert, M., Cravo-Laureau, C., and Duran, R. Response of archaeal communities to oil spill in bioturbated Mudflat sediments. Submitted to *Applied and Environmental Microbiology* for publication (b).
- Svensson JM, Enrich-Prast A & Leonardson L (2001) Nitrification and denitrification in a eutrophic lake sediment bioturbated by oligochaetes. *Aquatic Microbial Ecology* **23**: 177-186.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG (1997) The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876-4882.
- Throbäck IN, Johansson M, Rosenquist M, Pell M, Hansson M & Hallin S (2007) Silver (Ag⁺) reduces denitrification and induces enrichment of novel nirK genotypes in soil. *FEMS Microbiology Letters* **270**: 189-194.
- Vila J, Nieto JM, Mertens J, Springael D & Grifoll M (2010) Microbial community structure of a heavy fuel oil-degrading marine consortium: Linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization. *FEMS Microbiology Ecology* **73**: 349-362.
- Widdel F & Bak F (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. *The Prokaryotes* 3352-3378.
- Wolsing M & Priemé A (2004) Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of nir gene fragments. *FEMS Microbiology Ecology* **48**: 261-271.
- Wu ML, Ettwig KF, Jetten MSM, Strous M, Keltjens JT & Van Niftrik L A new intra-aerobic metabolism in the nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacterium Candidatus 'Methylomirabilis oxyfera'. *Biochemical Society Transactions* **39**: 243-248.
- Zumft WG (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification? *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 533-616.

3. PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION

Dans un premier temps, l'étude de la structure de la communauté dénitrifiante a montré une réponse particulière de ces micro-organismes vis-à-vis des différents traitements appliqués. Ainsi, **les membres majoritaires de la communauté initiale se maintiennent dans le temps face aux perturbations**, et en parallèle, il se produit une succession des membres minoritaires qui maintiennent la diversité globale de la communauté. Par conséquent ces membres majoritaires ne semble pas ou très peu affectés par une perturbation biotique (polychaetes) ou abiotique (pétrole). Bien qu'il soit difficile de corréler la présence du gène *nirS* avec une activité de dénitrification, ces résultats suggèreraient un maintien de cette activité au sein du sédiment suite à chaque traitement. Cependant étant donné la versatilité du métabolisme de ces micro-organismes et le fait que cette analyse ait été réalisée au niveau génomique, il est difficile de déterminer si les membres majoritaires de cette communauté (i) sont réellement actifs et (ii) respirent les nitrates présents dans les sédiments.

La présence spécifique de certaines OTUs minoritaires en fonction des traitements, a également démontré une réponse propre à chaque perturbation. De la même manière, la comparaison phylogénétique des communautés dénitrifiantes issues des traitements contaminés en fin d'incubation, a montré que **la présence des polychaetes modifiait la composition de la communauté dénitrifiante**.

Dans un deuxième temps nous avons sélectionné des communautés dénitrifiantes hydrocarbonoclastes à partir des sédiments contaminés faiblement bioturbés et bio-augmentés en organismes fouisseurs. Nous avons déterminé que les bactéries dénitrifiantes présentes au sein des consortiums étaient des membres représentatifs de la communauté dénitrifiante retrouvées au sein du sédiment. La capacité de biodégradation de ces communautés simplifiées a été évaluée. Ainsi, **nous avons démontré, pour la première fois, la capacité de communautés microbiennes à utiliser des HAPs de haut poids moléculaires (3 et 4 cycles) comme source de carbone et d'énergie couplée à la réduction des nitrates en condition anoxique**. Deux autres consortiums obtenus sur dotriacontane (alcane à 32 atomes de carbone), non intégrés dans cette étude, ont également montré leur capacité à dégrader cet alcane de haut poids moléculaire (Annexe 1). Bien que la composition des communautés issues des deux types de sédiments diffère, ces communautés ont montré des capacités de dégradation similaires. Ainsi, les *Gamma-protéobactéries* ont été largement détectées dans les

communautés simplifiées des sédiments bio-augmentés. Par conséquent, ces résultats supportent non seulement l'hypothèse de redondance fonctionnelle des activités de biodégradation, mais également le « Gamma shift » évoqués dans le chapitre III.

Enfin, nous avons comparé les données phylogénétiques basées sur le gène codant l'ARNr 16S obtenues dans cette étude à celles issues des sédiments (chapitre III). Une forte similarité a été obtenue pour une OTU affiliée au genre *Marinobacter* au sein des sédiments NEREIS+BAL. Ce genre a également été retrouvé en forte abondance au sein des communautés dénitrifiantes, suggérant que **le genre *Marinobacter* interviendrait largement dans les processus de biodégradation au sein de nos microcosmes.**

CHAPITRE VII

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CHAPITRE VII: Conclusions et perspectives

En milieu marin, les micro-organismes sont les principaux intervenants dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers jouant un rôle essentiel dans le devenir de ces composés lors de marées noires. L'aptitude d'atténuation naturelle d'un écosystème dépend de la capacité et de l'efficacité de dégradation des micro-organismes lors d'une contamination pétrolière. Certains facteurs environnementaux biologiques comme la bioturbation modifient ces activités. Les organismes fouisseurs responsables de cette activité réorganisent physiquement et chimiquement leur environnement créant ainsi des micro-habitats qui vont contrôler l'activité, l'abondance et la structure des communautés microbiennes. Leur rôle dans le devenir de certains xénobiotiques dans l'environnement a également été largement démontré (e.g. pesticides, hydrocarbures) (Christensen et al., 2002 ; Monard et al., 2010).

Afin de mieux comprendre les processus de bio-réhabilitation des écosystèmes, il s'avère nécessaire de comprendre également les processus interférant dans la réponse des communautés microbiennes. Ainsi, les organismes fouisseurs ont été choisis comme modèle pour leur activité de bioturbation. Nous avons voulu savoir dans quelle mesure les processus d'atténuation naturelle des hydrocarbures pétroliers pouvaient être modifiés dans des sédiments présentant une forte activité de bioturbation.

Ces travaux ont été axés autour d'une expérimentation en microcosmes sur une durée de 270 jours (9 mois). Afin de se rapprocher au plus des conditions environnementales, le dispositif utilisé intègre les cycles de marée. Les travaux menés ont été centrés sur le suivi de la diversité microbienne de sédiments marins soumis à une pollution pétrolière au sein de sédiments bio-augmentés en organismes fouisseurs. Nous avons porté un intérêt particulier aux micro-organismes anaérobies impliqués dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote et du soufre et qui représentent une fraction biologique importante dans le fonctionnement des écosystèmes marins. Nous nous sommes également efforcés de prendre en compte les fractions totale et métaboliquement active des communautés microbiennes en combinant les analyses au niveau génomique et transcriptionnel de ces communautés. L'ensemble de ces travaux a fait appel à des outils couramment utilisés en écologie

moléculaire combinés à des techniques de microbiologie classique qui ont permis de décrire la biodiversité taxonomique et fonctionnelle des communautés microbiennes.

1. SYNTHÈSE DES RESULTATS / CONNAISSANCES ACQUISES

1.1. Réponse des communautés microbiennes soumises à une contamination pétrolière

Dans un premier temps nous avons mis en évidence le potentiel hydrocarbonoclaste présent dans les sédiments marins étudiés en microcosmes (chapitre III). Bien que la biodégradation ait été détectée tardivement (entre 180 et 270 jours), environ 60% des hydrocarbures pétroliers totaux ont été dégradés au bout de 270 jours. L'expression de la fonction de dégradation des hydrocarbures de la communauté microbienne a donc nécessité une phase de re-structuration importante de la communauté, les plus grandes modifications étant observées à partir de 180 jours. Il semblerait donc, que la communauté étudiée ne présentait pas de pré-disposition particulière à la biodégradation des hydrocarbures pétroliers, ainsi, les hydrocarbures apportés ne constituaient pas une source de carbone préférentielle pour la communauté.

Nous avons ensuite entrepris l'étude de la dynamique et de la diversité de différentes communautés microbiennes et avons pu corréler nos résultats avec certains faits de la littérature. Ainsi, la réponse des communautés microbiennes provenant de la vase de l'Aber-Benoît observée correspond aux schémas théoriques déjà établis. Nous pouvons citer notamment la dominance de *Gamma-proteobactéries* lors de la contamination ou encore l'enrichissement en *Alpha-proteobactéries* lors de la diminution des hydrocarbures aliphatiques à la fin de l'expérimentation (Röling et al., 2002). L'augmentation de la taille de la communauté sulfato-réductrice ainsi que l'abondance des *Euryarchaeota* sont également cohérentes avec plusieurs études réalisées en milieu contaminé (Rothermich et al., 2002; Miralles et al., 2010).

Connaissances acquises sur la diversité et la dynamique des micro-organismes en milieu contaminé

La dynamique des communautés microbiennes a été établie au niveau taxonomique (16S *Bacteria* et *Archaea*) et fonctionnel (*dsrAB*, *nirS*, *mcrA* et *alkB*). Jusqu'à présent, la majorité des études visant à étudier l'impact d'une contamination pétrolière sur les communautés microbiennes se sont essentiellement basées sur l'analyse du gène codant l'ARNr 16S

Bacteria. Les travaux de recherche présentés apportent de nouvelles connaissances sur la dynamique des archées, des micro-organismes sulfato-réducteurs, dénitrifiants et méthanogènes dans le cadre d'une contamination pétrolière.

La comparaison des archées et des bactéries a montré de grandes divergence entre ces deux domaines. **Nous avons mis en évidence un phénomène assimilé à de la résilience de la communauté archéenne et au contraire une succession écologique des communautés bactériennes.** La caractérisation phylogénétique de la communauté archéenne nous a également permis de suggérer **un rôle secondaire des archées du groupe des MCG dans la dégradation des hydrocarbures.**

L'étude des micro-organismes sulfato-réducteurs et méthanogènes a montré une forte similarité dans la dynamique de ces deux groupes métaboliques. Nous pouvons donc suggérer une « relation », un lien métabolique de type syntrophie entre ces deux groupes. Enfin, nous avons déterminé que **les membres majoritaires de la communauté dénitrifiante étaient peu affectés par la contamination pétrolière.**

1.2. Impact de la bioturbation sur cette réponse

- Dégradation des hydrocarbures

Bien que la diversité microbienne soit modifiée au niveau taxonomique et fonctionnel par les polychaetes, les analyses réalisées ont démontré que la biodégradation n'était pas affectée. **Les communautés microbiennes issues des deux types de sédiment présentent donc une redondance fonctionnelle de la fonction de biodégradation** des hydrocarbures. Cette particularité pourrait être liée à la forte quantité de matière organique présente typiquement dans les sédiments marins de type vaseuse. Ainsi, les hydrocarbures pétroliers ne seraient pas la source de carbone préférentielle des communautés autochtones du sédiment. Nous pouvons également évoquer un effet négatif de la macrofaune sur la bio-disponibilité des hydrocarbures dans les sédiments (chapitre III).

- Réponse globale de la communauté microbienne

La dynamique des deux communautés microbiennes a été comparée dans les deux sédiments contaminés afin de déterminer l'impact de la bioturbation sur les processus de structuration des communautés microbiennes liés à la contamination pétrolière. Ces résultats nous ont permis d'établir un schéma global résumant les événements structurant les communautés microbiennes après une contamination pétrolière (Figure VII-1).

Nous avons démontré que suite à la contamination pétrolière, la communauté microbienne présentait une période de résistance des communautés anaérobies totales dans les premiers temps de la contamination. Cette période est également caractérisée par des modifications de l'activité métabolique de certains micro-organismes qui ont pu être mis en évidence lors de l'analyse des communautés métaboliquement actives.

Globalement, la réponse de la communauté microbienne à une contamination pétrolière peut être décrite en trois étapes Figure VII-1A:

(1) Dans les premiers temps de la contamination, les bactéries aérobies, majoritaires dans la couche supérieure du sédiment, seraient fortement affectées. L'acclimatation de la communauté bactérienne aux nouvelles conditions environnementales est supportée par l'expression des gènes *intI* durant cette période suivi par la dissémination des gènes *intI OPS*, impliqués dans la réponse adaptative des micro-organismes. Les changements physico-chimiques du sédiment (e.g. diminution du potentiel rédox (Bonin et al., 1990)), seraient à l'origine de ses modifications. Ainsi, les groupes fonctionnels les plus compétitifs dans les nouvelles conditions environnementales émergent de la communauté, ce qui conduit à une nouvelle structure de la communauté observée à 90 jours.

(2) Les modifications métaboliques de la communauté modifient les interactions entre les micro-organismes présents ainsi que l'environnement sédimentaire, provoquant alors à nouveau des remaniements structuraux de la communauté.

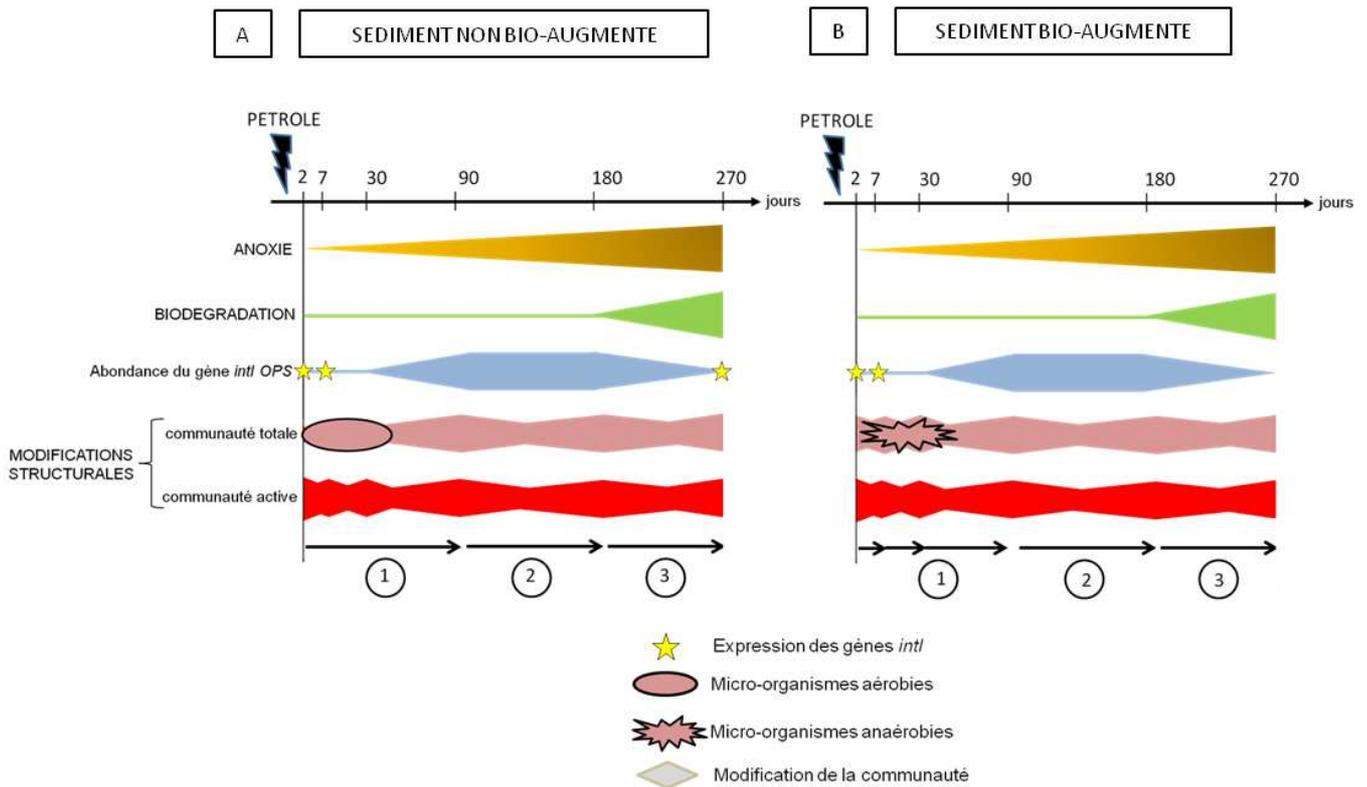


Figure VII-1 : Schéma conceptuel de la réponse des communautés microbiennes suite à la contamination pétrolière dans des sédiments non bio-augmentés (A) et bio-augmenté (B).

(3) Cette nouvelle communauté présente alors une structure et une activité métabolique supportant une activité de dégradation des hydrocarbures pétroliers. La dégradation conduit à la consommation séquentielle des hydrocarbures et entraîne alors une succession de communautés microbiennes liées à la composition du pétrole ainsi qu'aux métabolites issus de la dégradation. Ce phénomène de succession des communautés bactériennes liée à une utilisation séquentielle des substrats au cours du temps a souvent été rapporté (Greene et al., 2000; Kaplan et al., 2004). L'expression des gènes *intI* détectée en fin d'expérience suggèrent une forte adaptation des micro-organismes pendant la période de biodégradation et potentiellement une nouvelle phase de dissémination. Cependant, le rôle de ces gènes reste indéterminé car jusqu'à présent, les études menées au laboratoire n'ont pas permis de relier cet évènement directement à l'activité de biodégradation.

Au sein des sédiments bio-augmentés en polychaetes (figure VII-1B), la communauté a montré le même potentiel de dégradation des hydrocarbures pétroliers dans le temps (entre 180 et 270 jours) avec la même efficacité. Nous avons démontré que cette capacité nécessitait également des modifications de la communauté microbienne qui se sont révélées (i) d'une

plus grande amplitude, (ii) caractérisées par une augmentation globale de la diversité et (iii) aboutissant à des communautés de structures distinctes. Nous avons pu relier ces changements au remaniement sédimentaire induit par les polychaetes. **Cette différence peut être attribuée (entre autres) aux communautés anaérobies** qui n'ont pas montré de phase de résistance dans les premiers temps de la contamination mais au contraire de grands remaniements structuraux. L'augmentation de l'abondance des gènes *intI* *OPS* a également été observée mais de plus grande ampleur, suggérant une plus grande adaptation de la communauté face à la contamination pétrolière dans les sédiments fortement bioturbés.

- Dynamique des différents groupes microbiens étudiés

L'étude temporelle de la biodiversité microbienne de différentes communautés (sulfato-réductrice, méthanogène, dénitrifiante) ainsi que leur caractérisation moléculaire a permis de préciser les processus de re-structuration mis en place par ces communautés au niveau phylogénétique et fonctionnel suite à la contamination pétrolière.

Notre étude a mis en évidence une réponse commune à la contamination pétrolière des communautés issues des sédiments bio-augmentés et non bio-augmentés. En effet, dans les deux types de sédiment, les micro-organismes anaérobies et notamment les sulfato-réducteurs sont favorisés par l'apport en pétrole. Au contraire, les micro-organismes de type aérobie, affiliés aux *Thaumarchaeota* (archées nitrifiantes, AOA) et aux SOB voient leur abondance diminuer. Il semblerait donc que **lors d'une contamination pétrolière, la réponse des communautés microbiennes situées dans la couche supérieure des sédiments est fortement liée au type respiratoire des micro-organismes**, et donc aux accepteurs d'électrons disponibles au sein des sédiments.

Par la suite, nous avons comparé la dynamique de différents groupes phylogénétiques des deux communautés. Les résultats sont schématisés sur la figure VII-2.

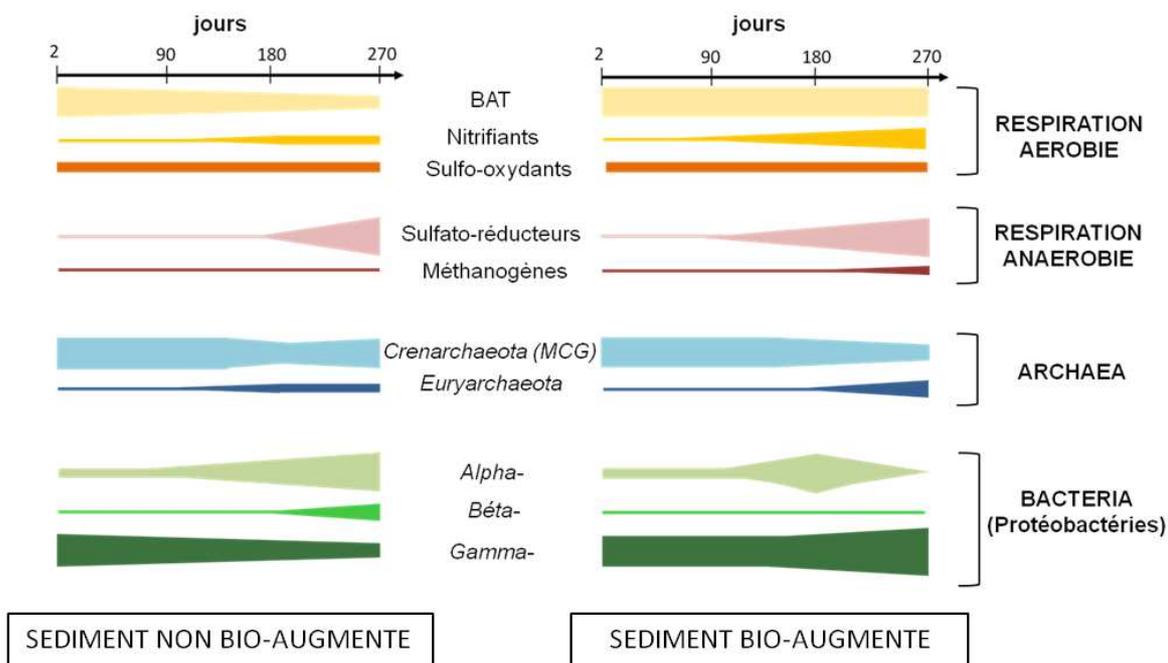


Figure VII-2 : Représentation schématique de la dynamique des membres de la communauté microbienne au sein des sédiments non bio-augmentés et bio-augmentés en polychaetes suite à la contamination pétrolière. BAT : Bactéries Aérobies Totales

Ainsi, nous avons démontré :

- **L'implication des mêmes groupes phylogénétiques et fonctionnels, mais dans des proportions différentes** conduisant à deux organisations de communautés distinctes au fil du temps et pendant la biodégradation. Dans les sédiments bio-augmentés (très bioturbés) les micro-organismes aérobies (archées nitrifiantes et *Cytophagaceae*) ainsi que les *Euryarchaeota* et les *Gamma-protéobactéries* de la famille des *Alteromonadaceae* seraient très actives. Au contraire les archées *MCG* ainsi que les *Alpha-protéobactéries* semblent prédominer au sein des sédiments non bio-augmentés (peu bioturbés).
- La présence de phylotypes spécifiques à chaque type de sédiment souligne une **micro-diversité observée non seulement au sein des différents groupes phylogénétiques mais également au sein des différents groupes fonctionnels.**

- Interactions entre les différents groupes fonctionnels

Le fait que ces deux communautés présentent des traits phylogénétiques et fonctionnels distincts nous a amené à émettre l'hypothèse que les sédiments étudiés possèdent

une **redondance fonctionnelle de l'activité de biodégradation** qui s'exprime différemment en fonction des activités de bioturbation. Cette hypothèse est renforcée par la composition des groupes fonctionnels observée dans les différentes communautés pendant la période de biodégradation à 270 jours qui suggère également un fonctionnement global de la communauté microbienne propre à chaque sédiment (Figure VII-3).

Les sédiments non bio-augmentés sont essentiellement composés de micro-organismes aérobies ou anaérobies facultatifs avec une dominance marquée de bactéries sulfo-oxydantes (SOB) dans la couche 0-2 cm du sédiment (Figure VII-3A). Dans cette strate, les zones oxique et suboxique prédominent, ainsi les activités anaérobies de sulfato-réduction et de méthanogénèse sont faiblement représentées.

L'activité de bioturbation des organismes fousseurs modifie considérablement cette organisation, notamment au niveau de la composante aérobie de la communauté, les archées nitrifiantes (AOA) ainsi que les micro-organismes aérobies étant retrouvés en forte abondance. Cela suggère que la dégradation aérobie de la MO au sein de ces sédiments est très active (Figure VII-3B) (Aller et al., 1985 ; Forster et al., 1992).

La présence majoritaire des AOA suggère également un apport considérable de nitrate au sein des sédiments. De plus, la bioturbation renforce ces flux couplant ainsi la nitrification et la dénitrification (Gilbert et al., 1997). Ce couplage serait favorisé par la présence de micro-niches anoxiques générées par la bioturbation (Laverock et al., 2011). Ainsi, **dans les sédiments très bioturbés, le cycle de l'azote serait particulièrement stimulé.** L'analyse T-RFLP a également démontré une très grande diversité des archées méthanogènes (MCR) métaboliquement actives au sein de ces sédiments, suggérant des conditions favorables pour ces micro-organismes. Cela peut être expliqué, d'une part par la stimulation de la dégradation aérobie de la MO (ainsi que la dénitrification) qui génère des métabolites assimilables par les MCR et d'autre part par une potentielle « inoculation » de méthanogènes par les organismes fousseurs. Par conséquent bien que les MCR soient minoritaires au sein de la communauté, ils participeraient à la dégradation de la MO dans la couche 0-2 cm des sédiments bio-augmentés en polychaetes.

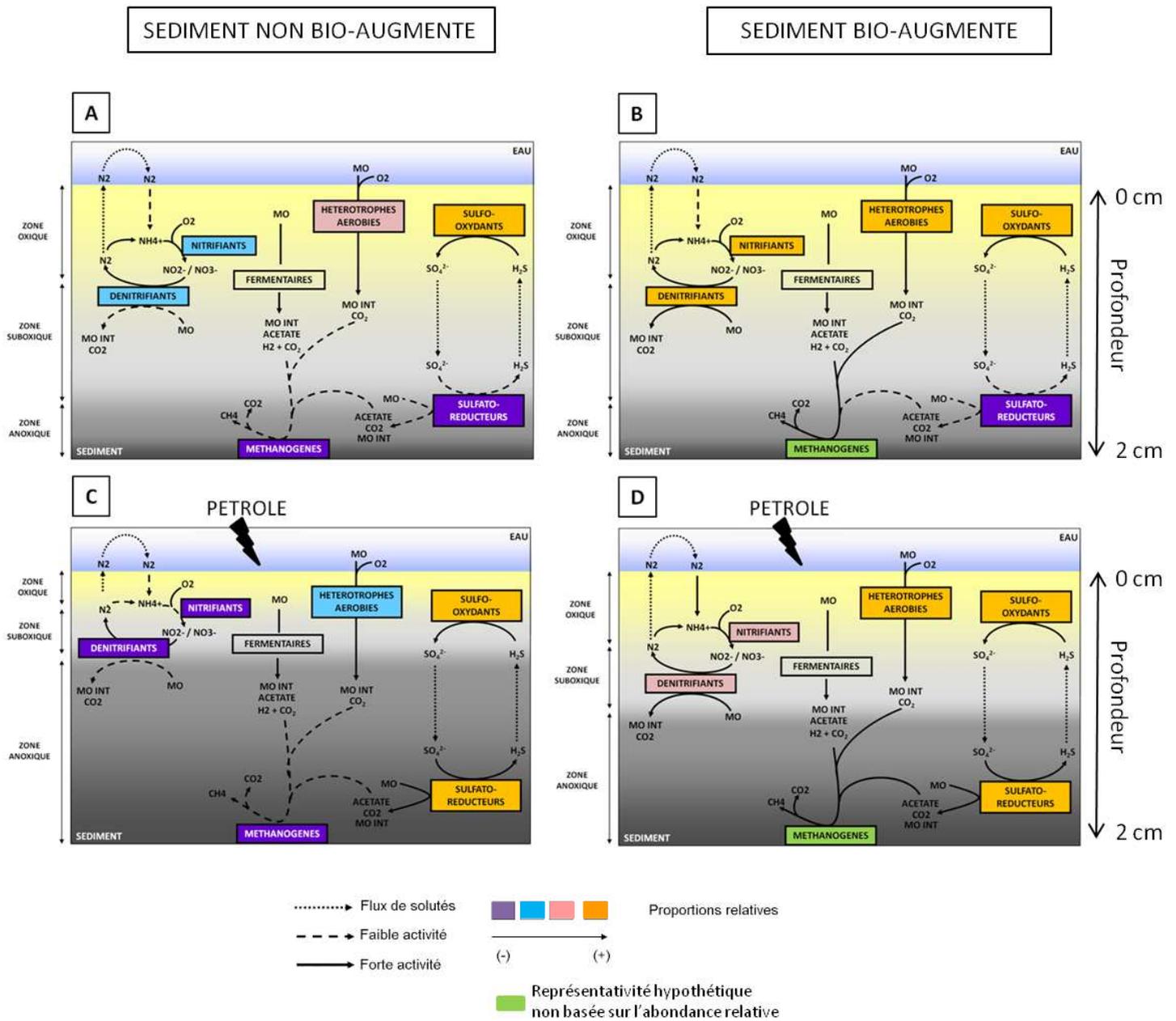


Figure VII-3 : schéma conceptuel des interactions existant au sein des sédiments (tranche 0-2cm) après chaque traitement.

L'ajout de pétrole au sein de ces sédiments (Figure VII-3D) entraîne l'établissement de conditions anoxiques qui affectent les AOA et stimule les MSR. Les SOB ne semblant pas affectées, il semblerait que le cycle du soufre soit stimulé au détriment de celui de l'azote. Les mêmes observations ont pu être faites pour les sédiments peu bioturbés dans lesquels les AOA n'ont pas été détectées (Figure VII-3C). De plus, la présence de MSR potentiellement impliquées dans la fixation de l'azote atmosphérique dans les sédiments bioturbés a été soulevée. Cela pourrait expliquer (en partie) le maintien des

AOA dans ces sédiments après la contamination pétrolière. Enfin, bien qu'une seule séquence de MCR ait été détectée, nous avons supposé une activité méthanogène dans ces sédiments pour les mêmes raisons que citées précédemment (respiration aérobie active).

Ces résultats suggèrent une stimulation de la dégradation aérobie de la MO au sein des sédiments bio-augmentés en polychaetes. Ces conditions sont connues pour être favorables à la dégradation des hydrocarbures, la dégradation aérobie des hydrocarbures étant plus efficace qu'en anaérobiose. Pourtant, l'activité de dégradation des hydrocarbures pétroliers n'a pas été modifiée. Il semblerait donc que ces activités (potentielles) soient liées à la MO apportée au sein des sédiments par les organismes fouisseurs lors de la construction de leur terrier (mucus), aux pelotes fécales connues pour être le lieu d'une forte activité microbienne et enfin aux conditions d'oxygénation intermittente générées par les activités de la macrofaune.

1.3. Etude des communautés hydrocarbonoclastes

Enfin, nous nous sommes intéressés aux communautés hydrocarbonoclastes. Nous n'avons pas pu corréler l'importante richesse spécifique globale de la communauté microbienne observée dans les sédiments bio-augmentés à celle de la communauté hydrocarbonoclaste *alkB*, cette communauté présentant une diversité comparable dans les deux types de sédiments. En nous appuyant sur des analyses moléculaires au niveau taxonomique (ARNr 16S), fonctionnel (AlkB), mais également sur des méthodes de microbiologie classique, il a été possible de déterminer la composition (partielle) de la communauté hydrocarbonoclaste. Les deux communautés hydrocarbonoclastes issues des deux sédiments ont montré des structures distinctes. Cette observation est d'autant plus robuste qu'elle s'appuie sur la capacité de dégradation de composés aromatiques et aliphatiques, en condition oxiqne et anoxique.

Des communautés hydrocarbonoclastes dénitrifiantes ont été sélectionnées sur divers hydrocarbures de haut poids moléculaire à partir des deux types de sédiments. Nous avons montré que les membres de ces communautés sont représentatifs de la communauté présente au sein du sédiment. Néanmoins leur activité au sein des microcosmes et donc leur rôle dans la dégradation des hydrocarbures *in situ* n'a pas été estimé.

Malgré des compositions globales différentes des consortiums dénitrifiants simplifiés, ces communautés ont montré des efficacités de dégradation similaires tendant à conforter l'hypothèse de similarité fonctionnelle dans l'activité de biodégradation observée dans les microcosmes. Cependant, la présence commune de certains phylotypes redondants au sein de ces consortiums pourrait également suggérer l'existence d'une « communauté minimale » essentielle pour la dégradation. La présence des autres membres au sein de la communauté simplifiée serait donc liée aux produits du métabolisme de l'hydrocarbure dégradé pouvant servir de substrats pour d'autres espèces (hydrocarbonoclastes ou non) (Hubert et al., 2005).

Certaines de ces communautés présentaient également des richesses spécifiques très différentes (cas du fluoranthène et du chrysène) ce qui peut soit conforter la théorie de la communauté minimale, soit au contraire démontrer la nécessité d'interactions entre les membres d'une communauté pour la biodégradation des hydrocarbures comme cela a déjà été démontré (Berthe-Corti et al., 2005 ; Onwurah, 2004). Ainsi, les interactions entre les micro-organismes détermineraient l'efficacité de dégradation. 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. Ainsi, la réponse fonctionnelle des bactéries dépend de l'assemblage dont elles font partie (Bell et al., 2005 ; Hansen et al., 2007). Il semble donc pertinent de s'interroger sur la nature de ces interactions et des voies métaboliques impliquées dans la dégradation des hydrocarbures. Ces consortiums se présentent comme de bons supports d'étude dans le cadre de la redondance fonctionnelle et par conséquent du lien existant entre la diversité et la fonction de dégradation.

D'autres travaux non présentés dans ce manuscrit ont également été entrepris pour l'isolement de souches anaérobies dénitrifiantes, mais aussi pour l'obtention de consortiums sulfato-réducteurs et fermentaires issus des sédiments BAL et NEREIS+BAL. Leur caractérisation préliminaire confirme que les communautés hydrocarbonoclastes issues des deux sédiments contaminés présentent des origines phylogénétiques distinctes.

Jusqu'à présent, la capacité de dégradation anaérobie des hydrocarbures n'a jamais été démontrée en condition de fermentation. Ainsi, l'étude approfondie de la capacité de dégradation des différents consortiums obtenus ainsi que leur caractérisation s'avèrent indispensable. Par la suite, l'identification des micro-organismes actifs durant la dégradation pourrait être envisagée par RNA-SIP.

Lors de cette étude, nous avons démontré, pour la première fois, la capacité de communautés microbiennes à dégrader des hydrocarbures aromatiques de haut poids moléculaire couplée à la réduction des nitrates. Actuellement les voies de dégradation des molécules choisies (dotriacontane, pyrène, chrysène, fluoranthène, dibenzothiophène), ainsi que les gènes impliqués sont inconnus. Dans un premier temps, la caractérisation des souches microbiennes isolées ainsi que le séquençage de leur génome apparaissent donc indispensables pour constituer les outils nécessaires à la mise en place d'approches protéomiques et/ou de transcriptomique comme la SSH (Suppression Subtractive hybridization) afin d'identifier les gènes impliqués dans la dégradation. De plus, dans l'environnement, la dégradation des hydrocarbures est rarement le fait d'une seule bactérie mais plutôt liée à l'association entre plusieurs souches ou groupes métaboliques. Les consortiums obtenus permettent donc l'étude de ces interactions pendant la dégradation de ces molécules.

Enfin, parmi les souches aérobies isolées (ANNEXE 2), la souche (DH+2) affiliée au genre *Marinobacter* présente un intérêt particulier. Les résultats préliminaires des expérimentations de dégradation ont mis sa capacité à dégrader le dibenzothiophène en absence et en présence d'oxygène. Ces résultats méritent d'être confirmés car cette souche constituerait un bon modèle pour l'étude de la régulation des mécanismes impliqués dans la dégradation des hydrocarbures sous des régimes d'oxygénation oscillants.

1.4. Rôle structurant de la bioturbation (polychaetes *H. Diversicolor*)

La bioturbation des sédiments par la macrofaune est un facteur de structuration fort des communautés microbiennes vérifié à différents niveaux : taxonomique et fonctionnel. Cet impact a généralement été très marqué avec une modification radicale de la communauté aboutissant à un enrichissement d'un groupe phylogénétique bien précis. Nous l'avons constaté au niveau des archées (62.5% de *Thaumarchaeota*) et des bactéries (90% de *Gamma-protéobactéries*). Cette spécificité semble liée à la présence d'oxygène, les *Thaumarchaeota* étant des archées nitrifiantes aérobies et les *Gamma-protéobactéries* retrouvées en forte abondance sont affiliées au genre *Haliea*, une bactérie aérobie stricte. L'augmentation relative en *Gamma-protéobactéries* a déjà été constatée dans des sédiments bioturbés (Laverock et al., 2010). Les organismes bioturbateurs concernés n'étaient pas des polychaetes, mais des

crevettes, nous supposons donc que **l'effet « sélectif » de la bioturbation n'est pas dépendant de l'organisme bioturbateur**. Ces travaux ont été réalisés à partir de sédiments marins de surface, constituant ainsi un point commun avec notre étude. Il semblerait donc que **cette caractéristique soit liée au « type métabolique » des bactéries initialement présentes au sein des sédiments (zone oxique / suboxique)**.

Nous avons également observé un effet positif sur la diversité de communautés méthanogène métaboliquement active. L'origine de ce phénomène est encore indéterminée, mais nous avons pu présenter quelques hypothèses lorsque nous avons traité des interactions potentielles existant entre les différents groupes métaboliques microbiens étudiés.

2. PERSPECTIVES

Lors de nos travaux, nous avons souligné une augmentation de la diversité des micro-organismes méthanogènes liée à la présence des polychaetes. Nous avons suggéré **une inoculation de micro-organismes dans le milieu environnant par les invertébrés**. Lors de la caractérisation des communautés microbiennes (banques de clones) nous avons également détectés à plusieurs reprises des séquences affiliées à des micro-organismes symbiotiques au sein des sédiments bioturbés. Ainsi, il semble qu'un effort particulier devrait être porté sur la **caractérisation des « transferts » de micro-organismes de la composante animale vers le milieu extérieur et inversement**. En effet, l'introduction d'espèces microbiennes exogènes au sein de l'écosystème peut affecter (e.g. compétition) l'ensemble ou tout du moins une partie de la communauté microbienne autochtone. **Cette flore exogène pourrait donc constituer un facteur important dans l'effet structurant de la macrofaune sur la communauté microbienne autochtone**. Ce sujet est complexe car il rentre dans un tout autre débat, non moins passionnant, qui porte sur l'origine de la microflore des invertébrés marins.

Un autre axe de recherche mérite d'être indiqué, notamment, **l'effet de l'oxygène sur la dégradation des hydrocarbures et les communautés microbiennes**. En effet, l'environnement créé par la macrofaune est soumis à des oscillations intermittentes d'oxygénation (Gilbert et al., 2003). Ces conditions sont couramment rencontrées dans l'environnement (i.e. interfaces eau-sédiment), pourtant, une seule étude, réalisée au laboratoire, a été entreprise dans cette optique (Vitte et al., 2011). Ces travaux ont établi que la fluctuation d'oxygénation influe sur le devenir de la communauté microbienne mais

également sur les activités de biodégradation. Lors de ce travail de thèse, nous avons également suggéré que l'oxygénation des sédiments liée à l'activité bioturbatrice de la macrofaune est un paramètre forçant la structuration de la communauté microbienne. Cependant, nous n'avons pas pu relier cette information à la dégradation des hydrocarbures. Il est donc important de déterminer l'influence de l'oxygène sur le devenir des hydrocarbures dans les écosystèmes marins. Il convient également de se situer à un niveau de complexité des communautés microbiennes élevé pour mieux appréhender cette problématique. C'est dans ce but, que le projet DECAPAGE, dont le laboratoire IPREM-EEM fait partie, a récemment été mis en place. L'objectif étant de déterminer comment les oscillations rédox et les fluctuations d'oxygénation résultant de phénomène biologique (bioturbation) ou mécanique (hersage) influencent les capacités de dégradation microbienne.

Comme cela a déjà été démontré, les organismes fouisseurs sont sources d'hétérogénéité au sein des sédiments. Cette hétérogénéité a été envisagée dans le cadre du projet DHYVA lors de la thèse de Laura Pischedda, par l'étude de la composition des communautés microbiennes au sein de terriers (LMGEM, Pischedda). Ces travaux ont conforté le fait que la paroi des terriers héberge une communauté bactérienne dont la structure diffère de celle des communautés des sédiments de surface et environnants.

Bien que nous ayons apporté de nouvelles informations sur l'impact de la bioturbation sur la dégradation des composés pétroliers et la communauté microbienne, notre étude n'a pas tenu compte de ces micro-sites. Les terriers sont le lieu d'une forte activité microbienne, nous pouvons donc envisager que dans notre étude l'activité de dégradation des hydrocarbures est localement modifiée à une micro-échelle au niveau de « hot spot » d'activité (i.e. terrier, pelotes fécales) et qu'elle ne serait pas visible à une échelle plus globale, au niveau de toute la composante sédimentaire. Ce phénomène a été rapporté notamment pour l'activité de sulfato-réduction qui était nettement plus élevée au sein des terriers que dans les sédiments environnants, mais qui globalement ne montrait pas de différence avec celle obtenue dans des sédiments non bioturbés (Laverock et al., 2010). **Il faudrait donc également envisager ce type d'étude à une autre échelle, et notamment au niveau des terriers.**

Les résultats obtenus ouvrent d'autres axes de recherche. En effet, dans le cadre de cette étude les études moléculaires ont été centrées sur la couche supérieure du sédiment correspondant aux deux premiers centimètres de la colonne sédimentaire. Nous avons montré que les activités de bioturbations modifiaient la répartition des hydrocarbures pétroliers au

sein de cette matrice. En effet, environ 20% des hydrocarbures pétroliers se retrouvaient dans la strate 2-4 cm. Il est donc probable que les communautés microbiennes présentes dans cette couche inférieure aient également subi des modifications. De plus les remaniements sédimentaires provoqués par la macrofaune bouleversent également la répartition verticale des communautés microbiennes dans les sédiments bioturbés. **Il semble donc pertinent d'aborder la réponse des communautés microbiennes à la contamination pétrolière en tenant compte de la stratification des communautés au sein du sédiment.**

Les avancées fondamentales fournies par ce travail nous permettent également de soulever quelques points concernant les stratégies de bioremédiation employées ou envisagées lors de « nettoyage » de sites côtiers ayant subi une marée noire. Nos résultats ont tout d'abord soulevé l'importance de cette action. En effet, nous avons démontré l'existence d'un potentiel hydrocarbonoclaste dans les sédiments marins étudiés, cependant il n'a été détecté qu'entre 180 et 270 jours. Ensuite, nous avons supposé un effet stimulant des polychaetes sur la biodégradation des hydrocarbures, notamment par une action mécanique d'oxygénation, ce qui n'a pas été vérifié. Ainsi, l'utilisation d'organismes bioturbateurs comme bio-stimulant de la microflore autochtone ne serait pas envisageable. Par extrapolation, nos résultats suggèrent également que les techniques comme le brassage mécanique des sédiments est inefficace. Enfin nous avons démontré que la diversité microbienne n'était pas corrélée à la fonction de dégradation des hydrocarbures. Par conséquent, on peut supposer que la bio-augmentation en micro-organismes dans les sédiments étudiés aurait également échoué. De plus, si cette technique avait été envisagée dans les sédiments bioturbés, il est judicieux de se demander si la microflore exogène serait capable de se maintenir dans les sédiments en présence d'organismes « brouteurs » tels que les polychaetes. **Un effort sur l'étude de nouvelles techniques de bioremédiation des environnements marins côtiers doit donc être fourni.**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- 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.
- Aeckersberg, F., Rainey, F.A., and Widdel, F. (1998)** Growth, natural relationships, cellular fatty acids and metabolic adaptation of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. *Archives of Microbiology* **170**: 361-369.
- Ahrens, M.J., Hertz, J., Lamoureux, E.M., Lopez, G.R., McElroy, A.E., and Brownawell, B.J. (2001)** The role of digestive surfactants in determining bioavailability of sediment-bound hydrophobic organic contaminants to 2 deposit-feeding polychaetes. *Marine Ecology Progress Series* **212**: 145-157.
- Al-Bashir, B., Cseh, T., Leduc, R., and Samson, R. (1990)** Effect of soil/contaminant interactions on the biodegradation of naphthalene in flooded soil under denitrifying conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology* **34**: 414-419.
- Al-Mailem, D.M., Sorkhoh, N.A., Al-Awadhi, H., Eliyas, M., and Radwan, S.S. (2010)** Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. *Extremophiles* **14**: 321-328.
- Aller, R.C. (1994)** Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation. *Chemical Geology* **114**: 331-345.
- Aller, R.C., and Yingst, J.Y. (1978)** Biogeochemistry of tube-dwellings: A study of the sedentary polychaete *Amphitrite ornata* (Leidy). *Journal of Marine Research* **36**: 201-254.
- Aller, R.C., and Yingst, J.Y. (1985)** Effects of the marine deposit-feeders *Heteromastus filiformis* (Polychaeta), *Macoma balthica* (Bivalvia), and *Tellina texana* (Bivalvia) 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 of diagenetic reaction rates in marine sediments. *Journal of Marine Research* **56**: 905-936.
- Aller, R.C., Yingst, J.Y., and Ullman, W.J. (1983)** Comparative biogeochemistry of water in intertidal *Onuphis* (Polychaeta) and *Upogebia* (Crustacea) burrows: temporal patterns and causes. *Journal of Marine Research* **41**: 571-604.
- Aller, R.C., Aller, J.Y., and Kemp, P.F. (2001)** Effects of particle and solute transport on rates and extent of remineralization in bioturbated sediments. *Organism-Sediment Interactions* **21**: 315-333.
- Aller, R.C., Blair, N.E., Xia, Q., and Rude, P.D. (1996)** Remineralization rates, recycling, and storage of carbon in Amazon shelf sediments. *Continental Shelf Research* **16**: 753-786.
- Allison, S.D., and Martiny, J.B.H. (2008)** Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 11512-11519.
- Alongi, D.M. (1985)** Effect of physical disturbance on population dynamics and trophic interactions among microbes and meiofauna. *Journal of Marine Research* **43**: 351-364.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.

- Alzaga, R., Montuori, P., Ortiz, L., Bayona, J.M., and Albaigés, J. (2004)** Fast solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry procedure for oil fingerprinting: Application to the Prestige oil spill. *Journal of Chromatography A* **1025**: 133-138.
- Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995)** Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* **59**: 143-169.
- Amorim, F.A.C., Welz, B., Costa, A.C.S., Lepri, F.G., Vale, M.G.R., and Ferreira, S.L.C. (2007)** Determination of vanadium in petroleum and petroleum products using atomic spectrometric techniques. *Talanta* **72**: 349-359.
- Anderson, M.J. (2001)** Permutation tests for univariate or multivariate analysis of variance and regression. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **58**: 626-639.
- Anderson, M.J. (2005)** PERMANOVA: A FORTRAN computer program for permutational multivariate analysis of variance. *Department of Statistics University of Auckland Auckland*.
- Anderson, R.T., and Lovley, D.R. (2000)** Hexadecane decay by methanogenesis. *Nature* **404**: 722-723.
- Annweiler, E., Michaelis, W., and Meckjenstock, R.U. (2001)** Anaerobic Cometary Conversion of Benzothiophene by a Sulfate-Reducing Enrichment Culture and in a Tar-Oil-Contaminated Aquifer 1. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5077-5083.
- Ashelford, K.E., Chuzhanova, N.A., Fry, J.C., Jones, A.J., and Weightman, A.J. (2005)** At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7724-7736.
- Ashelford, K.E., Chuzhanova, N.A., Fry, J.C., Jones, A.J., and Weightman, A.J. (2006)** New screening software shows that most recent large 16S rRNA gene clone libraries contain chimeras. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 5734-5741.
- Atlas, R.M. (1981)** Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiological Reviews* **45**: 180-209.
- Atlas, R.M., and Bartha, R. (1972)** Biodegradation of petroleum in seawater at low temperatures. *Canadian Journal of Microbiology* **18**: 1851-1855.
- Auguet, J.C., Barberan, A., and Casamayor, E.O. (2010)** Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME Journal* **4**: 182-190.

B

- Baas-Becking, L.G.M. (1934)** Geobiologie of inleiding tot de milieukunde. *WP Van Stockum & Zoon*.
- Bachoon, D.S., Hodson, R.E., and Araujo, R. (2001)** Microbial community assessment in oil-impacted salt marsh sediment microcosms by traditional and nucleic acid-based indices. *Journal of Microbiological Methods* **46**: 37-49.
- 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. *Environmental Microbiology* **7**: 1175-1185.
- Bamforth, S.M., and Singleton, I. (2005)** Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **80**: 723-736.
- Banta, G.T., and Andersen, O. (2003)** Bioturbation and the fate of sediment pollutants-Experimental case studies of selected infauna species. *Vie et Milieu* **53**: 233-248.

- Banta, G.T., Holmer, M., Jensen, M.H., and Kristensen, E. (1999)** Effects of two polychaete worms, *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*, on aerobic and anaerobic decomposition in a sandy marine sediment. *Aquatic Microbial Ecology* **19**: 189-204.
- Bateman, E.J., and Baggs, E.M. (2005)** Contributions of nitrification and denitrification to N₂O emissions from soils at different water-filled pore space. *Biology and Fertility of Soils* **41**: 379-388.
- Bauer, J.E., Kerr, R.P., Bautista, M.F., Decker, C.J., and Capone, D.G. (1988)** Stimulation of microbial activities and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in marine sediments inhabited by *Capitella capitata*. *Marine Environmental Research* **25**: 63-84.
- 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., and Spormann, A.M. (1997a)** Anaerobic activation of toluene and o-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *Journal of Bacteriology* **179**: 670-676.
- Beller, H.R., and Spormann, A.M. (1997b)** Benzylsuccinate formation as a means of anaerobic toluene activation by sulfate-reducing strain PRTOL1. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3729-3731.
- Beller, H.R., and Spormann, A.M. (1999)** Substrate range of benzylsuccinate synthase from *Azoarcus* sp. strain T. *FEMS Microbiology Letters* **178**: 147-153.
- Beller, H.R., and Edwards, E.A. (2000)** Anaerobic toluene activation by benzylsuccinate synthase in a highly enriched methanogenic culture. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 5503-5505.
- 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.
- Bergmann, F.D., Selesi, D., and Meckenstock, R.U. (2011)** Identification of new enzymes potentially involved in anaerobic naphthalene degradation by the sulfate-reducing enrichment culture N47. *Archives of Microbiology*: 1-10.
- Berner, R.A. (1980)** Early diagenesis: A theoretical approach. *Princeton N J*.
- 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. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N. (ed.). Berlin, Germany: Springer-Verlag: pp. 2350–2359.
- 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. *Environmental Microbiology* **12**: 3022-3034.
- Bertics, V.J., Sohm, J.A., Treude, T., Chow, C.E.T., Capone, D.G., Fuhrman, J.A., and Ziebis, W. (2010)** Burrowing deeper into benthic nitrogen cycling: The impact of Bioturbation on nitrogen fixation coupled to sulfate reduction. *Marine Ecology Progress Series* **409**: 1-15.
- Bertrand, J.C., Mille, G., Bianchi, M., Marty, D., Caumette, P., and Etgauthier, M.J. (1989)** Devenir de la matière organique exogène. un modèle: Les hydrocarbures. *Microorganismes dans les Écosystèmes Océaniques, Chapitre 13*: 85-343.
- Biddle, J.F., Lipp, J.S., Lever, M.A., Lloyd, K.G., Sørensen, K.B., Anderson, R. et al. (2006)** Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 3846-3851.

- Biebl, H., and Pfennig, N. (1977)** Growth of sulfate reducing bacteria with sulfur as electron acceptor. *Archives of Microbiology* **112**: 115-117.
- Biegert, T., Fuchs, G., and Heider, J. (1996)** Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *European Journal of Biochemistry* **238**: 661-668.
- Birch, L., and Bachofen, R. (1988)** Microbial production of hydrocarbons. *Biotechnology* **6 B**: 71-99.
- Bird, F.L., Boon, P.I., and Nichols, P.D. (2000)** Physicochemical and microbial properties of burrows of the deposit-feeding Thalassinidean ghost shrimp *Biffarius arenosus* (Decapoda: Callianassidae). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **51**: 279-291.
- Blackburn, T.H., and Blackburn, N.D. (1993)** Coupling of cycles and global significance of sediment diagenesis. *Marine Geology* **113**: 101-110.
- Blackwood, C.B., Marsh, T., Kim, S.H., and Paul, E.A. (2003)** Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 926-932.
- Bloesch, J. (1988)** Mesocosm studies - Introduction to a series of papers given in a special session at the XXIII congress of the international association of limnology (SIL), 8-14 February 1987, Hamilton, New Zealand. *Hydrobiologia* **159**: 221-222.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gleseke, A. et al. (2000)** A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation methane. *Nature* **407**: 623-626.
- Bonin, P., and Bertrand, J.C. (2000)** Influence of oxygen supply on heptadecane mineralization by *Pseudomonas nautica*. *Chemosphere* **41**: 1321-1326.
- Bonin, P., Cravo-Laureau, C., Michotey, V., and Hirschler-Réa, A. (2004)** The anaerobic hydrocarbon biodegrading bacteria: An overview. *Ophelia* **58**: 243-254.
- Bonin, P., Gilewicz, M., Rambeloarisoa, E., Mille, G., and Bertrand, J.C. (1990)** Effect of crude oil on denitrification and sulfate reduction in marine sediments. *Biogeochemistry* **10**: 161-174.
- Bonin, P., Ranaivoson, E.R., Raymond, N., Chalamet, A., and Bertrand, J.C. (1994)** Evidence for denitrification in marine sediment highly contaminated by petroleum products. *Marine Pollution Bulletin* **28**: 89-95.
- Bordenave, S., Goñi-Urriza, M.S., Caumette, P., and Duran, R. (2007)** Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology* **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.
- Boszczyk-Maleszak, H., Zabost, A., Wolicka, D., and Kaciszczenko, J. (2006)** Effectiveness of biodegradation of petroleum products by mixed bacterial populations in liquid medium at different pH values. *Polish Journal of Microbiology* **55**: 69-73.
- Bothe, H., Ferguson, S.J., and Newton, W.E. (2007)** Biology of the nitrogen cycle. *Elsevier*: 283.
- Boudreau, B.P., and Marinelli, R.L. (1994)** A modelling study of discontinuous biological irrigation. *J.MAR.RES.* **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. *Applied and Environmental Microbiology* **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. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2096-2104.

- Braker, G., Ayala-Del-Río, H.L., Devol, A.H., Fesefeldt, A., and Tiedje, J.M. (2001)** Community Structure of Denitrifiers, Bacteria, and Archaea along Redox Gradients in Pacific Northwest Marine Sediments by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Nitrite Reductase (*nirS*) and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1893-1901.
- Bray, J.R., and Curtis, J.T. (1957)** An ordination of the upland forest communities in southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* **27**: 249-325.
- Bregnard, T.P.A., Höhener, P., Häner, A., and Zeyer, J. (1996)** Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**: 299-307.
- 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.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., and Forterre, P. (2008)** Mesophilic crenarchaeota: Proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 245-252.
- Brune, A., Frenzel, P., and Cypionka, H. (2000)** Life at the oxic-anoxic interface: Microbial activities and adaptations. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 691-710.
- Brussaard, C.P.D., Peperzak, L., Witte, Y., and Huisman, J. (2010)** An experimental oil spill at sea. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N. (ed.). Berlin, Germany: Springer-Verlag: pp. 3492-3502.
- Buckel, W., and Golding, B.T. (2006)** Radical enzymes in anaerobes. In *Annual Review of Microbiology*. Ornston, L.N., Balows, A., Gottesman, S., and Harwood, C.S. (eds), pp. 27-49.

C

- Callaghan, A.V., Tierney, M., Phelps, C.D., and Young, L.Y. (2009)** Anaerobic biodegradation of n-hexadecane by a nitrate-reducing consortium. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 1339-1344.
- Callaghan, A.V., Gieg, L.M., Kropp, K.G., Suflita, J.M., and Young, L.Y. (2006)** Comparison of mechanisms of alkane metabolism under sulfate-reducing conditions among two bacterial isolates and a bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4274-4282.
- Callaghan, A.V., Wawrik, B., Ní Chadhain, S.M., Young, L.Y., and Zylstra, G.J. (2008)** Anaerobic alkane-degrading strain AK-01 contains two alkylsuccinate synthase genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **366**: 142-148.
- 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. *Environmental Science and Technology* **44**: 7287-7294.
- Canfield, D.E., and Des Marais, D.J. (1993)** Biogeochemical cycles of carbon, sulfur, and free oxygen in a microbial mat. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **57**: 3971-3984.
- Canfield, D.E., Kristensen, E., and Thamdrup, B. (2005)** Aquatic geomicrobiology. *Advances in marine biology* **48**: 1-599.

- Canfield, D.E., Jørgensen, B.B., Fossing, H., Glud, R., Gundersen, J., Ramsing, N.B. et al. (1993) Pathways of organic carbon oxidation in three continental margin sediments. *Marine Geology* **113**: 27-40.
- Capone, D.G., and Bauer, J.E. (1992) Microbial processes in coastal pollution. *Environmental Microbiology*: 191-237.
- Cappello, S., Denaro, R., Genovese, M., Giuliano, L., and Yakimov, M.M. (2007b) Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on "oil spill bioremediation" in mesocosms. *Microbiological Research* **162**: 185-190.
- Cappello, S., Caruso, G., Zampino, D., Monticelli, L.S., Maimone, G., Denaro, R. et al. (2007) Microbial community dynamics during assays of harbour oil spill bioremediation: A microscale simulation study. *Journal of Applied Microbiology* **102**: 184-194.
- Caradec, S., Grossi, V., Hulth, S., Stora, G., and Gilbert, F. (2004) Macrofaunal reworking activities and hydrocarbon redistribution in an experimental sediment system. *Journal of Sea Research* **52**: 199-210.
- Carman, K.R., Means, J.C., and Pomarico, S.C. (1996) Response of sedimentary bacteria in a Louisiana salt marsh to contamination by diesel fuel. *Aquatic Microbial Ecology* **10**: 231-241.
- Castro-González, M., Braker, G., Farías, L., and Ulloa, O. (2005) Communities of nirS-type denitrifiers in the water column of the oxygen minimum zone in the eastern South Pacific. *Environmental Microbiology* **7**: 1298-1306.
- Castro, H.F., Williams, N.H., and Ogram, A. (2000) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **31**: 1-9.
- Caumette, G., Lienemann, C.P., Merdrignac, I., Paucot, H., Bouyssiere, B., and Lobinski, R. (2009) Sensitivity improvement in ICP MS analysis of fuels and light petroleum matrices using a microflow nebulizer and heated spray chamber sample introduction. *Talanta* **80**: 1039-1043.
- Cetecioglu, Z., Ince, B.K., Kolukirik, M., and Ince, O. (2009) Biogeographical distribution and diversity of bacterial and archaeal communities within highly polluted anoxic marine sediments from the marmara sea. *Marine Pollution Bulletin* **58**: 384-395.
- Chaban, B., Ng, S.Y.M., and Jarrell, K.F. (2006) Archaeal habitats - From the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology* **52**: 73-116.
- Chang, W., Um, Y., and Holoman, T.R.P. (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation coupled to methanogenesis. *Biotechnology Letters* **28**: 425-430.
- Chen, G., and White, P.A. (2004) The mutagenic hazards of aquatic sediments: A review. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research* **567**: 151-225.
- Cheong, C.J., and Okada, M. (2001) Effects of spilled oil on the tidal flat ecosystem - evaluation of wave and tidal actions using a tidal flat simulator *Water Science & Technology* **43** 171-177.
- Christensen, B., Vedel, A., and Kristensen, E. (2000) Carbon and nitrogen fluxes in sediment inhabited by suspension-feeding (*Nereis diversicolor*) and non-suspension-feeding (*N. virens*) polychaetes. *Marine Ecology Progress Series* **192**: 203-217.
- 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.
- Christensen, M., Andersen, O., and Banta, G.T. (2002b) Metabolism of pyrene by the polychaetes *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*. *Aquatic Toxicology* **58**: 15-25.
- Chung, I.Y., Cho, K.J., Hiraoka, K., Mukai, T., Nishijima, W., Takimoto, K., and Okada, M. (2004) Effects of oil spill on seawater infiltration and macrobenthic community in tidal flats. *Marine Pollution Bulletin* **49**: 959-963.

- Chung, W.K., and King, G.M. (1999)** Biogeochemical transformations and potential polyaromatic hydrocarbon degradation in macrofaunal burrow sediments. *Aquatic Microbial Ecology* **19**: 285-295.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5585-5592.
- Chung, Y.C., Chen, H.C., Shyu, Y.T., and Hua, J. (2000)** Temperature and water effects on the biodeterioration for marine fuel oil. *Fuel* **79**: 1525-1532.
- Clay, E. (1967)** Literature survey of the common fauna of estuaries. *Nereis Diversicolor* **1**: 1-28.
- Clement, B.G., Kehl, L.E., DeBord, K.L., and Kitts, C.L. (1998)** Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *Journal of Microbiological Methods* **31**: 135-142.
- Cline, J.D. (1969)** Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **14**: 454-458.
- Cloern, J.E. (2001)** Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine Ecology Progress Series* **210**: 223-253.
- Coates, J.B., 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.
- 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 and 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. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3589-3593.
- Coates, J.D., Michaelidou, U., Bruce, R.A., O'Connor, S.M., Crespi, J.N., and Achenbach, L.A. (1999)** Ubiquity and diversity of dissimilatory (per)chlorate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 5234-5241.
- Colwell, F.S., Boyd, S., Delwiche, M.E., Reed, D.W., Phelps, T.J., and Newby, D.T. (2008)** Estimates of biogenic methane production rates in deep marine sediments at Hydrate Ridge, Cascadia margin. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 3444-3452.
- Costanza, R., D'Arge, R., De Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B. et al. (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* **387**: 253-260.
- Coulter, E.D., and Kurtz D.M, Jr. (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. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 2924-2931.
- Crain, C.M., Kroecker, K., and Halpern, B.S. (2008)** Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecology Letters* **11**: 1304-1315.
- Cravo-Laureau, C., Matheron, R., Cayol, J.L., Joulain, C., and Hirschler-Réa, A. (2004b)** *Desulfatibacillum aliphaticivorans* gen. nov., sp. nov., an n-alkane- and n-alkene-degrading, sulfate-reducing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 77-83.

- Cravo-Laureau, C., Grossi, V., Raphel, D., Matheron, R., and Hirschler-Réa, A. (2005)** Anaerobic n-alkane metabolism by a sulfate-reducing bacterium, *Desulfatibacillum aliphaticivorans* strain CV2803T. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3458-3467.
- 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. *Marine Pollution Bulletin* **54**: 452-459.
- Cypionka, H. (1994)** Novel metabolic capacities of sulfate-reducing bacteria, and their activities in microbial mats. *Microbial Mats: Structure, Development, and Environmental Significance*.
- Cypionka, H. (2000)** Oxygen respiration by *Desulfovibrio* species. In *Annual Review of Microbiology*, pp. 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 Microbiology Letters* **31**: 39-45.

D

- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 291-297.
- Dang, H., Wang, C., Li, J., Li, T., Tian, F., Jin, W. et al. (2009)** Diversity and distribution of sediment nirS-encoding bacterial assemblages in response to environmental gradients in the eutrophied Jiaozhou Bay, China. *Microbial Ecology* **58**: 161-169.
- 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.
- Davey, J.T. (1994)** The architecture of the burrow of *Nereis diversicolor* and its quantification in relation to sediment-water exchange. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **179**: 115-129.
- Davidova, I.A., and Suflita, J.M. (2005)** Enrichment and isolation of anaerobic hydrocarbon-degrading bacteria. In *Methods in Enzymology*, pp. 17-34.
- Davidova, I.A., Duncan, K.E., Choi, O.K., and Suflita, J.M. (2006)** *Desulfoglaeba alkanexedens* gen. nov., sp. nov. an n-alkane-degrading, sulfate-reducing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**: 2737-2742.
- Davis, W.R. (1993)** The role of bioturbation in sediment resuspension and its interaction with physical shearing. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **171**: 187-200.
- De Langhe, J.E. (1978) L'origine des mots slikke, schorre et polder. *Natura Mosana*, **31** **1**: pp. 18-21.
- 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.
- Del Giorgio, P.A., and Bouvier, T.C. (2002)** Linking the physiologic and phylogenetic successions in free-living bacterial communities along an estuarine salinity gradient. *Limnology and Oceanography* **47**: 471-486.
- DeLong, E.F. (1992)** Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 5685-5689.
- DeLong, E.F. (1998)** Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles'. *Current Opinion in Genetics and Development* **8**: 649-654.

- DeMaster, D.J., McKee, B.A., Nittrouer, C.A., Brewster, D.C., and Biscaye, P.E. (1985)** Rates of sediment reworking at the HEBBLE site based on measurements of Th-234, Cs-137 and Pb-210. *Marine Geology* **66**: 133-148.
- Dhillon, A., Teske, A., Dillon, J., Stahl, D.A., and Sogin, M.L. (2003)** Molecular characterization of sulfate-reducing bacteria in the Guaymas basin. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 2765-2772.
- Dilling, W., and Cypionka, H. (1990)** Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **71**: 123-128.
- Dolla, A., Fournier, M., and Dermoun, Z. (2006)** Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Biotechnology* **126**: 87-100.
- Dollhopf, S.L., Hyun, J.H., Smith, A.C., Adams, H.J., O'Brien, S., and Kostka, J.E. (2005)** Quantification of ammonia-oxidizing bacteria and factors controlling nitrification in salt marsh sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 240-246.
- Doyle, E., Muckian, L., Hickey, A.M., and Clipson, N. (2008)** Chapter 2 Microbial PAH Degradation. In *Advances in Applied Microbiology*. Laskin, A.I., Sariaslani, S., and Gadd, G.M. (eds), pp. 27-66.
- Dubiller, N., Mülders, C., Ferdelman, T., De Beer, D., Pernthaler, A., Klein, M. et al. (2001)** Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm. *Nature* **411**: 298-302.
- Dunbar, J., Ticknor, L.O., and Kuske, C.R. (2001)** Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 190-197.
- Duport, E., Stora, G., Tremblay, P., and Gilbert, F. (2006)** Effects of population density on the sediment mixing induced by the gallery-diffuser *Hediste* (*Nereis*) *diversicolor* O.F. Müller, 1776. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **336**: 33-41.
- Duran, R. (2010)** *Marinobacter*. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N. (ed.). Berlin, Germany: Springer-Verlag: pp. 1725-1735.
- 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. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 116-123.

E

- Eaton, R.W. (1994)** Organization and evolution of naphthalene catabolic pathways: Sequence of the DNA encoding 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase and trans-o-hydroxybenzylidenepyruvate hydratase-aldolase from the NAH7 plasmid. *Journal of Bacteriology* **176**: 7757-7762.
- Ehrenreich, P., Behrends, A., Harder, J., and Widdel, F. (2000)** Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology* **173**: 58-64.
- Eichler, S., Christen, R., Höltje, C., Westphal, P., Bötzel, J., Brettar, I. et al. (2006)** Composition and dynamics of bacterial communities of a drinking water supply system as assessed by RNA- and DNA-based 16S rRNA gene fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1858-1872.
- Esselink, P., and Zwarts, L. (1989)** Seasonal trend in burrow depth and tidal variation in feeding activity of *Nereis diversicolor*. *Marine Ecology Progress Series* **56**: 243-254.

- Ettwig, K.F., Butler, M.K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M.M.M. et al. (2010)** Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature* **464**: 543-548.
- Evans, F.F., Rosado, A.S., Sebastian, G.V., Casella, R., Machado, P.L.O.A., Holmström, C. et al. (2004)** Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* **49**: 295-305.

F

- Fahy, A., and McKew, B. (2010)** Microcosms. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N. (ed.). Berlin, Germany: Springer-Verlag: pp. 3524-3527.
- Falk, S., Hannig, M., Gliesche, C., Wardenga, R., Köster, M., Jürgens, K., and Braker, G. (2007)** nirS-containing denitrifier communities in the water column and sediment of the Baltic Sea. *Biogeosciences* **4**: 255-268.
- Fenchel, T. (1996)** Worm burrows and oxic microniches in marine sediments. 1. Spatial and temporal scales. *Marine Biology* **127**: 289-295.
- Fenchel, T.M. (1999)** Mud, Microbes, and Mineralization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **22**: 439-448.
- Findlay, R.H., and White, D.C. (1983)** The effects of feeding by the sand dollar *Mellita quinquesperforata* (Leske) on the benthic microbial community. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **72**: 25-41.
- 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* **85**: 3997-4006.
- Foght, J. (2008)** Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: Pathways and prospects. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **15**: 93-120.
- Forbes, V.E., Andreassen, M.S.H., and Christensen, L. (2001)** Metabolism of the polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene by the polychaete *Capitella capitata* species I. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**: 1012-1021.
- Forster, S., and Graf, G. (1992)** Continuously measured changes in redox potential influenced by oxygen penetrating from burrows of *Callianassa subterranea*. *Hydrobiologia* **235-236**: 527-532.
- Forterre, P., Brochier, C., and Philippe, H. (2002)** Evolution of the Archaea. *Theoretical Population Biology* **61**: 409-422.
- François, 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.
- François, F., Dalègre, 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*. *Variabilite spécifique a l'interieur des groupes fonctionnels. Etude du remaniement sédimentaire de deux bivalves Veneridae, Ruditapes decussatus et Venerupis aurea* **322**: 339-345.
- Froelich, P.N., Klinkhammer, G.P., Bender, M.L., Luedtke, N.A., Heath, G.R., Cullen, D. et al. (1979)** Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **43**: 1075-1090.
- Fuchs, G. (2008)** Anaerobic metabolism of aromatic compounds. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 82-99.
- Fuhrman, J.A. (2009)** Microbial community structure and its functional implications. *Nature* **459**: 193-199.

- Fukuhara, H., and Sakamoto, M. (1987)** Enhancement of inorganic nitrogen and phosphate release from lake sediment by tubificid worms and chironomid larvae. *Oikos* **48**: 312-320.
- Fukui, M., and Takii, S. (1990)** Survival of sulfate-reducing bacteria in oxic surface sediment of a seawater lake. *FEMS Microbiology Ecology* **73**: 317-322.

G

- Galaktionov O.S., Meysman F.J.R., and J.J., M. (2003)** Bio-irrigation induced by *Arenicola marina*: classical assumptions vs. numerical modeling. *Berichte-Forschungszentrum Terramare* **12**: pp. 59-62.
- Gao, H., Schreiber, F., Collins, G., Jensen, M.M., Kostka, J.E., Lavik, G. et al. (2010)** Aerobic denitrification in permeable Wadden Sea sediments. *ISME Journal* **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.
- Gardner, W.S., Lee, R.F., Tenore, K.R., and Smith, L.W. (1979)** Degradation of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in coastal sediments: Importance of microbes and polychaete worms. *Water, Air, and Soil Pollution* **11**: 339-347.
- Gaston, K.J., and Spicer, J.I. (1998)** Biodiversity: An introduction. *Blackwell Science*.
- Gauthier, M.J., Lafay, B., Christen, R., Fernandez, L., Acquaviva, M., Bonin, P., and **Bertrand, J.C. (1992)** *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbon-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **42**: 568-576.
- 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. *Journal of Microbiological Methods* **66**: 194-205.
- Gerino, M., and Stora, G. (1991)** In vitro quantitative analysis of the bioturbation induced by the polychaete *Nereis diversicolor*. *ANALYSE QUANTITATIVE IN VITRO DE LA BIOTURBATION INDUITE PAR LA POLYCHETE NEREIS DIVERSICOLOR* **313**: 489-494.
- Gerino, M., Stora, G., and Weber, O. (1999)** Evidence of bioturbation in the Cap-Ferret Canyon in the deep northeastern Atlantic. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **46**: 2289-2307.
- Gerino, M., Stora, G., François-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* **53**: 221-232.
- Gérino, M. (1992)** Etude expérimentale de la bioturbation en milieux littoral et profond : Quantification des structures de bioturbation et modélisation du remaniement biologique du sédiment. *Thèse de doctorat de l'Université de Aix-Marseille II*.
- Gilbert, F., Rivet, L., and Bertrand, J.C. (1994)** The in vitro influence of the burrowing polychaete *Nereis diversicolor* on the fate of petroleum hydrocarbons in marine sediments. *Chemosphere* **29**: 1-12.
- 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., Stora, G., and Bonin, P. (1998)** Influence of bioturbation on denitrification activity in Mediterranean coastal sediments: An in situ experimental approach. *Marine Ecology Progress Series* **163**: 99-107.

- 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., François, F., Stora, G., and Bertrand, J.C. (1997a)** Inhibition of denitrification by hydrocarbons in marine sediments. Role of *Nereis diversicolor*. *Inhibition de la dénitrification par les hydrocarbures dans les sédiments marins. Role de Nereis diversicolor* **320**: 819-824.
- Gilbert, F., Stora, G., Bonin, P., Ledréau, Y., Mille, G., and Bertrand, J.C. (1997b)** Hydrocarbon influence on denitrification in bioturbated mediterranean coastal sediments. *Hydrobiologia* **345**: 67-77.
- Gilbert, F., Stora, G., Desrosiers, G., Deflandre, B., Bertrand, J.C., Poggiale, J.C., and Gagné, J.P. (2001)** Alteration and release of aliphatic compounds by the polychaete *Nereis virens* (Sars) experimentally fed with hydrocarbons. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **256**: 199-213.
- 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.
- Giller, P.S., Hillebrand, H., Berninger, U.G., Gessner, M.O., Hawkins, S., Inchausti, P. et al. (2004)** Biodiversity effects on ecosystem functioning: Emerging issues and their experimental test in aquatic environments. *Oikos* **104**: 423-436.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **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. *Environmental Microbiology* **7**: 301-313.
- Giusti, P., Nuevo Ordonez, Y., Philippe Lienemann, C., Schaumlöffel, D., Bouyssièrè, B., and Lobinski, R. (2007)** μ Flow-injection-ICP collision cell MS determination of molybdenum, nickel and vanadium in petroleum samples using a modified total consumption micronebulizer. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **22**: 88-92.
- Glud, R.N., Gundersen, J.K., Røy, H., and Jørgensen, B.B. (2003)** Seasonal dynamics of benthic O₂ uptake in a semienclosed bay: Importance of diffusion and faunal activity. *Limnology and Oceanography* **48**: 1265-1276.
- Golyshin, P.N., Chernikova, T.N., Abraham, W.R., Långsdorf, H., Timmis, K.N., and Yakimov, M.M. (2002)** Oleiphilaceae fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 901-911.
- Good, I.J. (1953)** The population frequencies of species and the estimation of the population parameters. *Biometrika* **40**: 237-264.
- Gordon D.C, Jr., Dale, J., and Keizer, P.D. (1978)** Importance of sediment working by the deposit-feeding polychaete *Arenicola marina* on the weathering rate of sediment-bound oil. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **35**: 591-603.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **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.
- Gremion, F., Chatzinotas, A., Kaufmann, K., Von Sigler, W., and Harms, H. (2004)** Impacts of heavy metal contamination and phytoremediation on a microbial community during a twelve-month microcosm experiment. *FEMS Microbiology Ecology* **48**: 273-283.
- Gribsholt, B., and Kristensen, E. (2003)** Benthic metabolism and sulfur cycling along an inundation gradient in a tidal *Spartina anglica* salt marsh. *Limnology and Oceanography* **48**: 2151-2162.
- Griffiths, B.S., Kuan, H.L., Ritz, K., Glover, L.A., McCaig, A.E., and Fenwick, C. (2004)** The relationship between microbial community structure and functional stability, tested experimentally in an upland pasture soil. *Microbial Ecology* **47**: 104-113.
- Grishchenkov, V.G., Townsend, R.T., McDonald, T.J., Autenrieth, R.L., Bonner, J.S., and Boronin, A.M. (2000)** Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process Biochemistry* **35**: 889-896.
- Grossi, V., Massias, D., Stora, G., and Bertrand, J.C. (2002)** Burial, exportation and degradation of acyclic petroleum hydrocarbons following a simulated oil spill in bioturbated Mediterranean coastal sediments. *Chemosphere* **48**: 947-954.
- Grossi, V., Cravo-Laureau, C., Guyoneaud, R., Ranchou-Peyruse, A., and Hirschler-Réa, A. (2008)** Metabolism of n-alkanes and n-alkenes by anaerobic bacteria: A summary. *Organic Geochemistry* **39**: 1197-1203.
- Grossi, V., Cuny, P., Caradec, S., Nerini, D., Pancost, R., and Gilbert, F. (2006)** Impact of feeding by *Arenicola marina* (L.) and ageing of faecal material on fatty acid distribution and bacterial community structure in marine sediments: An experimental approach. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **336**: 54-64.

H

- Habe, H., and Omori, T. (2003)** Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **67**: 225-243.
- Haines, J.R., Wrenn, B.A., Holder, E.L., and Strohmeier, K.L. (1996)** Measurement of hydrocarbon-degrading microbial populations by a 96-well plate most-probable-number procedure. *Journal of Industrial Microbiology* **16**: 36-41.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 668-675.
- 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., and Kristensen, E. (1998)** The impact of the polychaete *Nereis diversicolor* and enrichment with macroalgal (*Chaetomorpha linum*) detritus on benthic metabolism and nutrient dynamics in organic-poor and organic-rich sediment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **231**: 201-223.
- 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., Haagenen, J.A.J., and Molin, S. (2007)** Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature* **445**: 533-536.

- Hara, A., Baik, S.H., Sytsubo, K., Misawa, N., Smits, T.H.M., Van Beilen, J.B., and Harayama, S. (2004) Cloning and functional analysis of alkB genes in *Alcanivorax borkumensis* SK2. *Environmental Microbiology* **6**: 191-197.
- 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, G., Zengler, K., Rabus, R., Aeckersberg, F., Minz, D., Rosselló-Mora, R., and Widdel, F. (1999) Anaerobic oxidation of o-xylene, m-xylene, and homologous alkylbenzenes by new types of sulfate-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 999-1004.
- Harris, J.M. (1993) The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: A synthesis. *Microbial Ecology* **25**: 195-231.
- Hartmann, M., and Widmer, F. (2008) Reliability for detecting composition and changes of microbial communities by T-RFLP genetic profiling. *FEMS Microbiology Ecology* **63**: 249-260.
- Harwood, C.S., Burchhardt, G., Herrmann, H., and Fuchs, G. (1998) Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiology Reviews* **22**: 439-458.
- Hayatsu, M., Tago, K., and Saito, M. (2008) Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition* **54**: 33-45.
- Hayes, L.A., and Lovley, D.R. (2002) Specific 16S rDNA sequences associated with naphthalene degradation under sulfate-reducing conditions in harbor sediments. *Microbial Ecology* **43**: 134-145.
- Hayes, L.A., Nevin, K.P., and Lovley, D.R. (1999) Role of prior exposure on anaerobic degradation of naphthalene and phenanthrene in marine harbor sediments. *Organic Geochemistry* **30**: 937-945.
- Head, I., Gray, N., Aitken, C., Sherry, A., Jones, M., and Larter, S. (2010) Hydrocarbon activation under sulfate-reducing and methanogenic conditions proceeds by different mechanisms. *Geophysical Research Abstracts* **12**.
- Head, I.M., and Swannell, R.P.J. (1999) Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Current Opinion in Biotechnology* **10**: 234-239.
- Head, I.M., Jones, D.M., and Röling, W.F. (2006) Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature reviews. Microbiology*. **4**: 173-182.
- Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R., and Widdel, F. (1999) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. In *FEMS Microbiology Reviews*, pp. 459-473.
- Heijs, S.K., Haese, R.R., Van Der Wielen, P.W.J.J., Forney, L.J., and Van Elsas, J.D. (2007) Use of 16S rRNA gene based clone libraries to assess microbial communities potentially involved in anaerobic methane oxidation in a Mediterranean cold seep. *Microbial Ecology* **53**: 384-398.
- Heilskov, A.C., and Holmer, M. (2001) Effects of benthic fauna on organic matter mineralization in fish-farm sediments: Importance of size and abundance. *ICES Journal of Marine Science* **58**: 427-434.
- Heiss-Blanquet, S., Benoit, Y., Maréchaux, C., and Monot, F. (2005) Assessing the role of alkane hydroxylase genotypes in environmental samples by competitive PCR. *Journal of Applied Microbiology* **99**: 1392-1403.
- Henrichs, S.M. (1992) Early diagenesis of organic matter in marine sediments: progress and perplexity. *Marine Chemistry* **39**: 119-149.
- Herbert, R.A. (1999) Nitrogen cycling in coastal marine ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* **23**: 563-590.

- Hickman, Z.A., and Reid, B.J. (2008)** Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. *Environment International* **34**: 1072-1081.
- Higashioka, Y., Kojima, H., Sato, S., and Fukui, M. (2009)** Microbial community analysis at crude oil-contaminated soils targeting the 16S ribosomal RNA, xylM, C23O, and bcr genes. *Journal of Applied Microbiology* **107**: 126-135.
- Hikes, M.E., Evans, R.S., Sharak Genthner, B.R., Willis, S.G., Friedman, S., Rooney-Varga, J.N., and Devereux, R. (1999)** Molecular phylogenetic and biogeochemical studies of sulfate-reducing bacteria in the rhizosphere of *Spartina alterniflora*. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2209-2216.
- Hines, M.E., Knollmeyer, S.L., and Tugel, J.B. (1989)** Sulfate reduction and other sedimentary biogeochemistry in a northern New England salt marsh. *Limnology & Oceanography* **34**: 578-590.
- 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.
- Hochstein, L.I., Betlach, M., and Kritikos, G. (1984)** The effect of oxygen on denitrification during steady-state growth of *Paracoccus halodenitrificans*. *Archives of Microbiology* **137**: 74-78.
- Holliger, C., and Zehnder, A.J.B. (1996)** Anaerobic biodegradation of hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* **7**: 326-330.
- Holmer, M., Forbes, V.E., and Forbes, T.L. (1997)** Impact of the polychaete *Capitella* sp. I on microbial activity in an organic-rich marine sediment contaminated with the polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene. *Marine Biology* **128**: 679-688.
- Hooper, D.U., Chapin III, F.S., Ewel, J.J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S. et al. (2005)** Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. *Ecological Monographs* **75**: 3-35.
- Hosoda, A., Kasai, Y., Hamamura, N., Takahata, Y., and Watanabe, K. (2005)** Development of a PCR method for the detection and quantification of benzoyl-CoA reductase genes and its application to monitored natural attenuation. *Biodegradation* **16**: 591-601.
- Huang, L., Cagnon, C., Caumette, P. and Duran, R. (2009)** First gene cassettes of integrons as targets in finding adaptive genes in metagenomes. *Applied and Environmental Microbiology* **75** (11): 3823-3825.
- Huang, L. (2010)** Implication des éléments génétiques mobiles dans l'adaptation des communautés bactériennes. *Thèse de Doctorat de l'université de Pau et des Pays de l'Adour*.
- 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

- Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A. et al. (2006)** Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 2815-2820.
- Itoh, T., Suzuki, K.I., 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

- Jansen, S., Walpersdorf, E., Werner, U., Billerbeck, M., Böttcher, M.E., and De Beer, D. (2009)** Functioning of intertidal flats inferred from temporal and spatial dynamics of O₂, H₂S and pH in their surface sediment. *Ocean Dynamics* **59**: 317-332.
- Jarrell, K.F., Walters, A.D., Bochiwal, C., Borgia, J.M., Dickinson, T., and Chong, J.P.J. (2011)** Major players on the microbial stage: Why Archaea are important. *Microbiology* **157**: 919-936.
- Jayakumar, A., O'Mullan, G.D., Naqvi, S.W.A., and Ward, B.B. (2009)** Denitrifying bacterial community composition changes associated with stages of denitrification in oxygen minimum zones. *Microbial Ecology* **58**: 350-362.
- Jeanthon, C., L'Haridon, S., Cuff, V., Banta, A., Reysenbach, A.L., and Prieur, D. (2002)** Thermodesulfobacterium hydrogeniphilum sp. nov., a thermophilic, chemolithoautotrophic, sulfate-reducing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent at Guaymas Basin, and emendation of the genus Thermodesulfobacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 765-772.
- Jensen, K., Revsbech, N.P., and Nielsen, L.P. (1993)** Microscale distribution of nitrification activity in sediment determined with a shielded microsensor for nitrate. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 3287-3296.
- Jeter, R.M., and Ingraham, J.L. (1981)** The denitrifying prokaryotes. *The Prokaryotes* **1**: 913-925.
- Jetten, M.S.M. (2008)** The microbial nitrogen cycle. *Environmental Microbiology* **10**: 2903-2909.
- 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 Microbiology Ecology* **70**: 249-262.
- Johnsen, A.R., Bendixen, K., and Karlson, U. (2002)** Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator WST-1. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 2683-2689.
- Jones, C.G., Lawton, J.H., and Shachak, M. (1994)** Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* **69**: 373-386.
- Jones, C.G., Lawton, J.H., and Shachak, M. (1997)** Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology* **78**: 1946-1957.
- Jones, D.M., Head, I.M., Gray, N.D., Adams, J.J., Rowan, A.K., Aitken, C.M. et al. (2008)** Crude-oil biodegradation via methanogenesis in subsurface petroleum reservoirs. *Nature* **451**: 176-180.
- Jørgensen, B.B. (1977)** The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). *Limnol. Oceanogr.* **22**: 814-832.
- Jørgensen, B.B. (1982)** Mineralization of organic matter in the sea bed - The role of sulphate reduction. *Nature* **296**: 643-645.
- Jørgensen, B.B. (1983)** Processes at the sediment-water interface. *The Major Biogeochemical Cycles and Their Interactions*: 477-509.
- Jørgensen, B.B., and Fenchel, T. (1974)** The sulfur cycle of a marine sediment model system. *Marine Biology* **24**: 189-201.
- Jørgensen, B.B., and Revsbech, N.P. (1985)** Diffusive boundary layers and the oxygen uptake of sediments and detritus. *Limnol. Oceanogr.* **30**: 111-122.
- Jumars, P.A., Nowell, A.R.M., and Self, R.F.L. (1981)** A simple model of flow-Sediment-Organism interaction. *Marine Geology* **42**: 155-172.

K

- Kamke, J., Taylor, M.W., and Schmitt, S. (2010)** Activity profiles for marine sponge-associated bacteria obtained by 16S rRNA vs 16S rRNA gene comparisons. *ISME Journal* **4**: 498-508.
- Kane Driscoll, S.B., and McElroy, A.E. (1997)** Elimination of sediment-associated benzo[a]pyrene and its metabolites by polychaete worms exposed to 3-methylcholanthrene. *Aquatic Toxicology* **39**: 77-91.
- Kane, S.R., Beller, H.R., Legler, T.C., and Anderson, R.T. (2002)** Biochemical and genetic evidence of benzylsuccinate synthase in toluene-degrading, ferric iron-reducing *Geobacter metallireducens*. *Biodegradation* **13**: 149-154.
- Kaplan, C.W., and Kitts, C.L. (2004)** Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 1777-1786.
- Karkhoff-Schweizer, R.R., Huber, D.P.W., and Voordouw, G. (1995)** Conservation of the genes for dissimilatory sulfite reductase from *Desulfovibrio vulgaris* and *Archaeoglobus fulgidus* allows their detection by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 290-296.
- Kasai, Y., Takahata, Y., Hoaki, T., and Watanabe, K. (2005)** Physiological and molecular characterization of a microbial community established in unsaturated, petroleum-contaminated soil. *Environmental Microbiology* **7**: 806-818.
- Kasai, Y., Takahata, Y., Manefield, M., and Watanabe, K. (2006)** RNA-based stable isotope probing and isolation of anaerobic benzene-degrading bacteria from gasoline-contaminated groundwater. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 3586-3592.
- 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. *Syst Appl Microbiol* **4**: 305-312.
- Kirby, T.W., Lancaster Jr, 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 and Technology* **38**: 2038-2043.
- Kleikemper, J., Schroth, M.H., Sigler, W.V., Schmucki, M., Bernasconi, S.M., and Zeyer, J. (2002)** Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1516-1523.
- Kleikemper, J., Pombo, S.A., Schroth, M.H., Sigler, W.V., Pesaro, M., and Zeyer, J. (2005)** Activity and diversity of methanogens in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 149-158.
- 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.
- Klemps, R., Cypionka, H., Widdel, F., and Pfennig, N. (1985)** Growth with hydrogen, and further physiological characteristics of *Desulfotomaculum* species. *Archives of Microbiology* **143**: 203-208.
- Kniemeyer, O., Fischer, T., Wilkes, H., Glöckner, F.O., and Widdel, F. (2003)** Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 760-768.

- 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**: 898-901.
- Knittel, K., Boetius, A., Lemke, A., Eilers, H., Lochte, K., Pfannkuche, O. et al. (2003)** Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia margin, Oregon). *Geomicrobiology Journal* **20**: 269-294.
- Knowles, R. (1982)** Denitrification. *Microbiological Reviews* **46**: 43-70.
- Kogure, K., and Wada, M. (2005)** Impacts of macrobenthic bioturbation in marine sediment on bacterial metabolic activity. *Microbes and Environment* **20**: 191-199.
- Kolukirik, M., Ince, O., and Ince, B.K. (2011)** Increment in Anaerobic Hydrocarbon Degradation Activity of Halic Bay Sediments via Nutrient Amendment. *Microbial Ecology* **61**: 871-884.
- Kondo, R., Nedwell, D.B., Purdy, K.J., and de Queiroz Silva, S. (2004)** Detection and enumeration of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments by competitive PCR. *Geomicrobiology Journal* **21**: 145-157.
- Könneke, M., Bernhard, A.E., De La Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., and Stahl, D.A. (2005)** Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**: 543-546.
- Konopka, A. (2009)** What is microbial community ecology. *ISME Journal* **3**: 1223-1230.
- Köpke, B., Wilms, R., Engelen, B., Cypionka, H., and Sass, H. (2005)** Microbial diversity in coastal subsurface sediments: A cultivation approach using various electron acceptors and substrate gradients. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7819-7830.
- Krantzberg, G. (1985)** The influence of bioturbation on physical, chemical and biological parameters in aquatic environments: A review. *Environmental Pollution Series A: Ecological and Biological* **39**: 99-122.
- Krekeler, D., Teske, A., and Cypionka, H. (1998)** Strategies of sulfate-reducing bacteria to escape oxygen stress in a cyanobacterial mat. *FEMS Microbiology Ecology* **25**: 89-96.
- Kristensen, E. (1984)** Effect of natural concentrations on nutrient exchange between a polychaete burrow in estuarine sediment and the overlying water. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **75**: 171-190.
- Kristensen, E. (1988b)** 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.
- Kristensen, E., and Kostka, J.E. (2005)** Macrofaunal burrows and irrigation in marine sediment: microbiological and biogeochemical interactions. *Interactions Between Macro- and Microorganisms in Marine Sediments*: 125-157.
- Kristensen, E., Jensen, M.H., and Aller, R.C. (1991)** Direct measurement of dissolved inorganic nitrogen exchange and denitrification in individual polychaete (*Nereis virens*) burrows. *Journal of Marine Research* **49**: 355-377.
- Kuhn, E., Bellicanta, G.S., and Pellizari, V.H. (2009)** New alk genes detected in Antarctic marine sediments. *Environmental Microbiology* **11**: 669-673.
- Kusel, K., and Drake, H.L. (1995)** Effects of environmental parameters on the formation and turnover of acetate by forest soils. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 3667-3675.

L

- Labbe, D., R. Margesin, F. Schinner, L.G. Whyte, and Greer, C.W. (2007)** Comparative phylogenetic analysis of microbial communities in pristine and hydrocarbon-contaminated alpine soils. *FEMS Microbiology Ecology* **59**: 466-475.
- Ladygina, N., Dedyukhina, E.G., and Vainshtein, M.B. (2006)** A review on microbial synthesis of hydrocarbons. *Process Biochemistry* **41**: 1001-1014.
- Langenheim, J.H. (1994)** Higher plant terpenoids: A phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* **20**: 1223-1280.
- Lanoil, B.D., Sassen, R., La Duc, M.T., Sweet, S.T., and Nealson, K.H. (2001)** Bacteria and Archaea Physically Associated with Gulf of Mexico Gas Hydrates. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 5143-5153.
- 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.
- Laverock, B., Smith, C.J., Tait, K., Osborn, A.M., Widdicombe, S., and Gilbert, J.A. (2010)** Bioturbating shrimp alter the structure and diversity of bacterial communities in coastal marine sediments. *ISME Journal*.
- Leahy, J.G., and Colwell, R.R. (1990)** Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* **54**: 305-315.
- Lee, J., Lee, T.K., Löffler, F.E., and Park, J. (2011)** Characterization of microbial community structure and population dynamics of tetrachloroethene-dechlorinating tidal mudflat communities. *Biodegradation* **22**: 687-698.
- Legendre, P., and Anderson, M.J. (1999)** Distance-based redundancy analysis: Testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. *Ecological Monographs* **48**: 505-519.
- Leloup, J., Quillet, L., Berthe, T., and Petit, F. (2006)** Diversity of the *dsrAB* (dissimilatory sulfite reductase) gene sequences retrieved from two contrasting mudflats of the Seine estuary, France. *FEMS Microbiology Ecology* **55**: 230-238.
- Leloup, J., Quillet, L., Oger, C., Boust, D., and Petit, F. (2004)** Molecular quantification of sulfate-reducing microorganisms (carrying *dsrAB* genes) by competitive PCR in estuarine sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **47**: 207-214.
- Leloup, J., Loy, A., Knab, N.J., Borowski, C., Wagner, M., and Jørgensen, B.B. (2007)** Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environmental Microbiology* **9**: 131-142.
- Leutwein, C., and Heider, J. (2002)** (R)-Benzylsuccinyl-CoA dehydrogenase of *Thauera aromatica*, an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway. *Archives of Microbiology* **178**: 517-524.
- Lewandowski, J., Laskov, C., and Hupfer, M. (2007)** The relationship between *Chironomus plumosus* burrows and the spatial distribution of pore-water phosphate, iron and ammonium in lake sediments. *Freshwater Biology* **52**: 331-343.
- Liu, R., Zhang, Y., Ding, R., Li, D., Gao, Y., and Yang, M. (2009)** Comparison of archaeal and bacterial community structures in heavily oil-contaminated and pristine soils. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **108**: 400-407.
- Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H., and Forney, L.J. (1997)** Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4516-4522.
- Liu, X., Tiquia, S.M., Holguin, G., Wu, L., Nold, S.C., Devol, A.H. et al. (2003)** Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient

- zone off the Pacific coast of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 3549-3560.
- Liu, Y., and Whitman, W.B. (2008)** Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 171-189.
- Liu C., Wang W., Wu Y., Zhou Z., Lai Q., Shao Z. (2011)** Multiple alkane hydroxylase systems in a marine alkane degrader, *Alcanivorax dieselolei* B-5. *Environmental Microbiology* **13**:1168-1178.
- Liu, Y.J., Zaprasis, A., Liu, S.J., Drake, H.L., and Horn, M.A. (2011)** The earthworm *Aporrectodea caliginosa* stimulates abundance and activity of phenoxyalkanoic acid herbicide degraders. *ISME Journal* **5**: 473-485.
- Llirós, M., Gich, F., Plasencia, A., Auguet, J.C., Darchambeau, F., Casamayor, E.O. et al. (2010)** Vertical distribution of ammonia-oxidizing crenarchaeota and methanogens in the epipelagic waters of lake Kivu (Rwanda-Democratic Republic of the Congo). *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 6853-6863.
- Lloyd, K.G., Lapham, L., and Teske, A. (2006)** An anaerobic methane-oxidizing community of ANME-1b archaea in hypersaline Gulf of Mexico sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 7218-7230.
- Lloyd, K.G., Albert, D.B., Biddle, J.F., Chanton, J.P., Pizarro, O., and Teske, A. (2010)** Spatial structure and activity of sedimentary microbial communities underlying a *Beggiatoa* spp. mat in a Gulf of Mexico hydrocarbon seep. *PLoS ONE* **5**.
- Löhner, A.M., Thrush, S.F., and Gibbs, M.M. (2004)** Bioturbators enhance ecosystem function through complex biogeochemical interactions. *Nature* **431**: 1092-1095.
- Lombard, M., Fontecave, M., Touati, D., and Nivière, 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.
- Loreau, M., Naeem, S., and Inchausti, P. (2002)** Biodiversity and Ecosystem Functioning: Synthesis and Perspectives. *Oxford University Press, New York, NY*, 294 pp. .
- Loreau, M., Mouquet, N., and Gonzalez, A. (2003)** Biodiversity as spatial insurance in heterogeneous landscapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 12765-12770.
- Lösekan, T., Knittel, K., Nadalig, T., Fuchs, B., Niemann, H., Boetius, A., and Amann, R. (2007)** Diversity and abundance of aerobic and anaerobic methane oxidizers at the Haakon Mosby Mud Volcano, Barents Sea. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 3348-3362.
- Lovley, D.R., Giovannoni, S.J., White, D.C., Champine, J.E., Phillips, E.J.P., Gorby, Y.A., and Goodwin, S. (1993)** *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron and other metals. *Archives of Microbiology* **159**: 336-344.
- Loy, A., Küsel, K., Lehner, A., Drake, H.L., and Wagner, M. (2004)** Microarray and functional gene analyses of sulfate-reducing prokaryotes in low-sulfate, acidic fens reveal cooccurrence of recognized genera and novel lineages. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 6998-7009.
- Lucas, F.S., Bertru, G., and Höfle, M.G. (2003)** Characterization of free-living and attached bacteria in sediments colonized by *Hediste diversicolor*. *Aquatic Microbial Ecology* **32**: 165-174.
- Lueders, T., Chin, K.J., Conrad, R., and Friedrich, M. (2001)** Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase α -subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environmental Microbiology* **3**: 194-204.

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. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 3566-3574.

Madigan, M., and Martinko, J. (2007) Ecologie microbienne - chapitre 19. *Brock Biologie des microorganismes*, Pearson Education, France: 648.

Madsen, E.L. (1991) Determining in situ biodegradation - Facts and challenges. *Environmental Science and Technology* **25**: 1663-1673.

Madsen, S.D., Forbes, T.L., and Forbes, V.E. (1997) Particle mixing by the polychaete *Capitella* species 1: Coupling fate and effect of a particle-bound organic contaminant (fluoranthene) in a marine sediment. *Marine Ecology Progress Series* **147**: 129-142.

Magot, M., Ollivier, B., and Patel, B.K.C. (2000) Microbiology of petroleum reservoirs. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **77**: 103-116.

Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., and Wade, W.G. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 795-799.

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.

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.

Matisoff, G. (1995) Effects of bioturbation on solute and particle transport in sediments. *Metal Contaminated Aquatic Sediments*: 201-272.

Matisoff, G., and Wang, X. (2000) Particle mixing by freshwater infaunal bioirrigators: Midges (Chironomidae: Diptera) and mayflies (Ephemeroidea: Ephemeroptera). *Journal of Great Lakes Research* **26**: 174-182.

Matsui, G.Y., Ringelberg, D.B., and Lovell, C.R. (2004) Sulfate-reducing bacteria in tubes constructed by the marine infaunal polychaete *Diopatra cuprea*. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 7053-7065.

Mayer, L.M., Schick, L.L., Self, R.F.L., Jumars, P.A., Findlay, R.H., Chen, Z., and Sampson, S. (1997) Digestive environments of benthic macroinvertebrate guts: Enzymes, surfactants and dissolved organic matter. *Journal of Marine Research* **55**: 785-812.

Mayer, L.M., Chen, Z., Findlay, R.H., Fang, J., Sampson, S., Self, R.F.L. et al. (1996) Bioavailability of sedimentary contaminants subject to deposit-feeder digestion. *Environmental Science and Technology* **30**: 2641-2645.

Mazoch, J., and Kučera, I. (2002) Detection, with a pH indicator, of bacterial mutants unable to denitrify. *Journal of Microbiological Methods* **51**: 105-109.

Mbadanga, S.M., Wang, L.Y., Zhou, L., Liu, J.F., Gu, J.D., and Mu, B.Z. (2011) Microbial communities involved in anaerobic degradation of alkanes. *International Biodeterioration and Biodegradation* **65**: 1-13.

McElroy, A.E. (1990) Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in the polychaete *Nereis virens*. *Aquatic Toxicology* **18**: 35-49.

- 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., Osborn, A.M., Timmis, K.N., and McGenity, T.J. (2007)** Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environmental Microbiology* **9**: 165-176.
- McLusky, D.S. (1989)** The estuarine ecosystem. *Chapman & Hall, New York*: 215 pp
- Meckenstock, R.U., Safinowski, M., and Griebler, C. (2004) Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology* **49**: 27-36.
- Mehboob, F., Junca, H., Schraa, G., and Stams, A.J.M. (2009)** Growth of *Pseudomonas chloritidismutans* AW-1T on n-alkanes with chlorate as electron acceptor. *Applied Microbiology and Biotechnology* **83**: 739-747.
- Mermillod-Blondin, F., and Rosenberg, R. (2006)** Ecosystem engineering: The impact of bioturbation on biogeochemical processes in marine and freshwater benthic habitats. *Aquatic Sciences* **68**: 434-442.
- Mermillod-Blondin, F., Creuzé des Châtelliers, M., and Gérino, M. (2003a)** Effects of the interaction between tubificid worms on the functioning of hyporheic sediments: An experimental study in sediment columns. *Archiv für Hydrobiologie* **156**: 203-223.
- Mermillod-Blondin, F., François-Carcaillet, F., and Rosenberg, R. (2005)** Biodiversity of benthic invertebrates and organic matter processing in shallow marine sediments: An experimental study. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **315**: 187-209.
- Mermillod-Blondin, F., Gérino, M., Des Châtelliers, M.C., and Degrange, V. (2002)** Functional diversity among 3 detritivorous hyporheic invertebrates: An experimental study in microcosms. *Journal of the North American Benthological Society* **21**: 132-149.
- Mermillod-Blondin, F., Gaudet, J.P., Gérino, M., Desrosiers, G., and Creuzé des Châtelliers, M. (2003b)** Influence of macroinvertebrates on physico-chemical and microbial processes in hyporheic sediments. *Hydrological Processes* **17**: 779-794.
- Mermillod-Blondin, F., Rosenberg, R., François-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 and 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.
- Middelburg, J.J., Vlug, T., Jaco, F., and van der Nat, W.A. (1993)** Organic matter mineralization in marine systems. *Global and Planetary Change* **8**: 47-58.
- Mills, H.J., Martinez, R.J., Story, S., and Sobczyk, P.A. (2005)** Characterization of microbial community structure in Gulf of Mexico gas hydrates: Comparative analysis of DNA- and RNA-derived clone libraries. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 3235-3247.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 4666-4671.
- Miralles, G., Acquaviva, M., Bertrand, J.C., and Cuny, P. (2010)** Response of an archaeal community from anoxic coastal marine sediments To experimental petroleum contamination. *Aquatic Microbial Ecology* **59**: 25-31.

- Miralles, G., Grossi, V., Acquaviva, M., Duran, R., Claude Bertrand, J., and Cuny, P. (2007a) 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.
- Miralles, G., Nérini, D., Manté, C., Acquaviva, M., Doumenq, P., Michotey, V. et al. (2007b) Effects of spilled oil on bacterial communities of Mediterranean coastal anoxic sediments chronically subjected to oil hydrocarbon contamination. *Microbial Ecology* **54**: 646-661.
- Moeseneder, M.M., Arrieta, J.M., and Herndl, G.J. (2005) A comparison of DNA- and RNA-based clone libraries from the same marine bacterioplankton community. *FEMS Microbiology Ecology* **51**: 341-352.
- Monard, C., Vandenkoornhuise, P., Le Bot, B., and Binet, F. (2010) Relationship between bacterial diversity and function under biotic control: the soil pesticide degraders as a case study. *ISME Journal*.
- Monard, C., Martin-Laurent, F., Vecchiato, C., Francez, A.J., Vandenkoornhuise, P., and Binet, F. (2008) Combined effect of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 2253-2259.
- Morasch, B., and Meckenstock, R.U. (2005) Anaerobic degradation of p-xylene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Current Microbiology* **51**: 127-130.
- Mullis, K., Faloona, F., and Scharf, S. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**: 263-273.
- Musat, F., Harder, J., and Widdel, F. (2006) Study of nitrogen fixation in microbial communities of oil-contaminated marine sediment microcosms. *Environmental Microbiology* **8**: 1834-1843.
- Musat, F., Galushko, A., Jacob, J., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R. et al. (2009) Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria. *Environmental Microbiology* **11**: 209-219.
- Muschenheim, D.K., and Lee, K. (2002) Removal of oil from the sea surface through particulate interactions: Review and prospectus. *Spill Science and Technology Bulletin* **8**: 9-18.
- Mussmann, 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. *Environmental Microbiology* **7**: 405-418.
- Muyzer, G., and Stams, A.J.M. (2008) The ecology and biotechnology of sulphate-reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 441-454.

N

- Näslund, J., Nascimento, F.J., and Gunnarsson, J.S. (2010) Meiofauna reduces bacterial mineralization of naphthalene in marine sediment. *ISME Journal* **4**: 1421-1430.
- Nedwell, D.B. (1984) The input and mineralization of organic carbon in anaerobic aquatic sediments. *Adv. Microb. Ecol.* **7**: 93-131.
- Nielsen, L.B., Finster, K., Welsh, D.T., Donnelly, A., Herbert, R.A., De Wit, R., and Lomstein, B.A.A. (2001) Sulphate reduction and nitrogen fixation rates associated with roots, rhizomes and sediments from *Zostera noltii* and *Spartina maritima* meadows. *Environmental Microbiology* **3**: 63-71.
- Nielsen, O.I., Kristensen, E., and Holmer, M. (2003) Impact of *Arenicola marina* (Polychaeta) on sediment sulfur dynamics. *Aquatic Microbial Ecology* **33**: 95-105.

- Nogales, B., Timmis, K.N., Nedwell, D.B., and Osborn, A.M. (2002)** Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 5017-5025.
- Nogales, B., Lanfranconi, M.P., Piña-Villalonga, J.M., and Bosch, R. (2010)** Anthropogenic perturbations in marine microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews* **35**: 275-298.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Valett, M.H., François-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.
- Noll, M., Matthies, D., Frenzel, P., Derakshani, M., and Liesack, W. (2005)** Succession of bacterial community structure and diversity in a paddy soil oxygen gradient. *Environmental Microbiology* **7**: 382-395.

O

- O'Rourke, D., and Connolly, S. (2003)** Just oil? The distribution of environmental and social impacts of oil production and consumption. In *Annual Review of Environment and Resources*, pp. 587-617.
- Oakley, B.B., Francis, C.A., Roberts, K.J., Fuchsman, C.A., Srinivasan, S., and Staley, J.T. (2007)** Analysis of nitrite reductase (nirK and nirS) genes and cultivation reveal depauperate community of denitrifying bacteria in the Black Sea suboxic zone. *Environmental Microbiology* **9**: 118-130.
- Ogino, A., Koshikawa, H., Nakahara, T., and Uchiyama, H. (2001)** Succession of microbial communities during a biostimulation process as evaluated by DGGE and clone library analyses. *Journal of Applied Microbiology* **91**: 625-635.
- Orcutt, B.N., Joye, S.B., Kleindienst, S., Knittel, K., Ramette, A., Reitz, A. et al. (2010)** Impact of natural oil and higher hydrocarbons on microbial diversity, distribution, and activity in Gulf of Mexico cold-seep sediments. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **57**: 2008-2021.
- Overmann, J., Fischer, U., and Pfennig, N. (1992)** A new purple sulfur bacterium from saline littoral sediments, *Thiorhodovibrio winogradskyi* gen. nov. and sp. nov. *Archives of Microbiology* **157**: 329-335.
- Ovreas, L. (2000)** Population and community level approaches for analysing microbial diversity in natural environments. *Ecology Letters* **3**: 236-251.

P

- Paerl, H.W., Valdes, L.M., Peierls, B.L., Adolf, J.E., and Harding Jr, L.W. (2006)** Anthropogenic and climatic influences on the eutrophication of large estuarine ecosystems. *Limnology and Oceanography* **51**: 448-462.
- Paisse, S., Duran, R., Coulon, F., and Goñi-Urriza, M. (2011)** Are alkane hydroxylase genes (alkB) relevant to assess petroleum bioremediation processes in chronically polluted coastal sediments? *Applied Microbiology and Biotechnology*: 1-10.
- Paissé, 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 Microbiology Ecology* **66**: 295-305.

- Païssé, S., Goñi-Urriza, M., Coulon, F., and Duran, R. (2010)** How a Bacterial Community Originating from a Contaminated Coastal Sediment Responds to an Oil Input. *Microbial Ecology* **60**: 394-405.
- Palmroth, M.R.T., Koskinen, P.E.P., Kaksonen, A.H., Münster, U., Pichtel, J., and Puhakka, J.A. (2007)** Metabolic and phylogenetic analysis of microbial communities during phytoremediation of soil contaminated with weathered hydrocarbons and heavy metals. *Biodegradation* **18**: 769-782.
- Papaspyrou, S., Kristensen, E., and Christensen, B. (2007)** Arenicola marina (Polychaeta) and organic matter mineralisation in sandy marine sediments: In situ and microcosm comparison. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **72**: 213-222.
- Papaspyrou, S., Thessalou-Legaki, M., and Kristensen, E. (2010)** The influence of infaunal (*Nereis diversicolor*) abundance on degradation of organic matter in sandy sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **393**: 148-157.
- Papaspyrou, S., Gregersen, T., Kristensen, E., Christensen, B., and Cox, R.P. (2006)** Microbial reaction rates and bacterial communities in sediment surrounding burrows of two nereidid polychaetes (*Nereis diversicolor* and *N. virens*). *Marine Biology* **148**: 541-550.
- Park, J.W., and Crowley, D.E. (2006)** Dynamic changes in nahAc gene copy numbers during degradation of naphthalene in PAH-contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology* **72**: 1322-1329.
- Park, S.S., and Jaffé, P.R. (1996)** Development of a sediment redox potential model for the assessment of postdepositional metal mobility. *Ecological Modelling* **91**: 169-181.
- Payne, J.R., Clayton Jr, J.R., and Kirstein, B.E. (2003)** Oil/suspended particulate material interactions and sedimentation. *Spill Science and Technology Bulletin* **8**: 201-221.
- Penry, D.L., and Weston, D.P. (1998)** Digestive determinants of benzo[a]pyrene and phenanthrene bioaccumulation by a deposit-feeding polychaete. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**: 2254-2265.
- Perez-Jimenez, J.R. and L.J. Kerkhof. (2005)** Phylogeography of sulfate-reducing bacteria among disturbed sediments, disclosed by analysis of the dissimilatory sulfite reductase genes (*dsrAB*). *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 1004-1011.
- Pérez-Pantoja, D., Gonzalez, B., and Pieper, D.H. (2010)** Aerobic degradation of aromatic hydrocarbons. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N. (ed.). Berlin, Germany: Springer-Verlag: pp. 800-837.
- Perry, J.A., and Troelstrup Jr, N.H. (1988)** Whole ecosystem manipulation: A productive avenue for test system research? *Environmental Toxicology and Chemistry* **7**: 941-951.
- Peter, H., Beier, S., Bertilsson, S., Lindström, E.S., Langenheder, S., and Tranvik, L.J. (2011)** Function-specific response to depletion of microbial diversity. *ISME Journal* **5**: 351-361.
- Pfennig, N., and Trüper, H.G. (1992)** The family Chromatiaceae. *The Prokaryotes*: 3200-3221.
- Phelps, C.D., Kerkhof, L.J., and Young, L.Y. (1998)** Molecular characterization of a sulfate-reducing consortium which mineralizes benzene. *FEMS Microbiology Ecology* **27**: 269-279.
- Philippot, L., Cregut, M., Chèneby, 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 Microbiology Letters* **285**: 51-57.
- Pischedda, L. (2009)** Bioturbation et hétérogénéité de l'oxygène dans les sédiments marins appréhendées par une méthode optique de quantification 2D. Incidence sur les communautés microbiennes sédimentaires. *Thèse de Doctorat de la Méditerranée*.

- 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 Biotheoretica* **56**: 123-135.
- Pischedda, L., Milton, C., Gilbert, F. and Cuny, P. (2011)** Characterization of the specificity of bacterial community structure within the burrow environment of the marine polychaetes Hediste (Nereis) diversicolor. *Research in Microbiology* **162**: 1033-1042.
- Pischedda, L., Cuny, P., Poggiale, J.C. and Gilbert, F. (2012)** Spatial oxygen heterogeneity in a Nereis diversicolor irrigated burrow. *Hydrobiologia* **680**: 109-124.
- Pontes, D.S., Lima-Bittencourt, C.I., Chartone-Souza, E., and Amaral Nascimento, A.M. (2007)** Molecular approaches: Advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **34**: 463-473.
- Porat, I., Vishnivetskaya, T.A., Mosher, J.J., Brandt, C.C., Yang, Z.K., Brooks, S.C. et al. (2010)** Characterization of archaeal community in contaminated and uncontaminated surface stream sediments. *Microbial Ecology* **60**: 784-795.
- Postgate, J.R. (1984)** The sulfate-reducing bacteria. 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Preston, C.M., Wu, K.Y., Molinski, T.F., and Delong, E.F. (1996)** A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: Cenarchaeum symbiosum gen. nov., sp. nov. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 6241-6246.
- Prince, R.C., Lessard, R.R., and Clark, J.R. (2003)** Bioremediation of marine oil spills. *Bioremédiation des pollutions maritimes pétrolières* **58**: 463-468.
- Purdy, K.J., Nedwell, D.B., Martin Embley, T., and Takii, S. (2001)** Use of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes to investigate the distribution of sulphate-reducing bacteria in estuarine sediments. *FEMS Microbiology Ecology* **36**: 165-168.

Q

- Quintana, C.O., Tang, M., and Kristensen, E. (2007)** Simultaneous study of particle reworking, irrigation transport and reaction rates in sediment bioturbated by the polychaetes Heteromastus and Marenzelleria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **352**: 392-406.

R

- Rabus, R., and Widdel, F. (1995)** Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology* **163**: 96-103.
- Rabus, R., Hansen, T., and Widdel, F. (2000)** Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*.
- Rabus, R., Hansen, T.A., and Widdel, F. (2006)** Dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing prokaryotes. *The Prokaryotes* **2**: 659-768.
- Rabus, R., Nordhaus, R., Ludwig, W., and Widdel, F. (1993)** Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **59**: 1444-1451.

- Rabus, R., Jarling, R., Lahme, S., Kühner, S., Heider, J., Widdel, F., and Wilkes, H. (2011)** Co-metabolic conversion of toluene in anaerobic n-alkane-degrading bacteria. *Environmental Microbiology* **13**: 2576-2586.
- Ramette, A., and Tiedje, J.M. (2007)** Biogeography: An emerging cornerstone for understanding prokaryotic diversity, ecology, and evolution. *Microbial Ecology* **53**: 197-207.
- Rao, A.M.F., McCarthy, M.J., Gardner, W.S., and Jahnke, R.A. (2008)** Respiration and denitrification in permeable continental shelf deposits on the South Atlantic Bight: N₂:Ar and isotope pairing measurements in sediment column experiments. *Continental Shelf Research* **28**: 602-613.
- Raskin, L., Rittmann, B.E., and Stahl, D.A. (1996)** Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 3847-3857.
- Ravenschlag, K., Sahm, K., Knoblauch, C., Jorgensen, B.B., and Amann, R. (2000)** Community structure, cellular rRNA content, and activity of sulfate-reducing bacteria in marine Arctic sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 3592-3602.
- Rees, G.N., Harfoot, C.G., and Sheehy, A.J. (1998)** Amino acid degradation by the mesophilic sulfate-reducing bacterium *Desulfobacterium vacuolatum*. *Archives of Microbiology* **169**: 76-80.
- Reeve, J.N., Nölling, J., Morgan, R.M., and Smith, D.R. (1997)** Methanogenesis: Genes, genomes, and who's on first? *Journal of Bacteriology* **179**: 5975-5986.
- Reichardt, W. T. (1988)** Impact of bioturbation by *Arenicola marina* on microbiological parameters in intertidal sediments. *Marine Ecology Progress Series* **44**: 149-158.
- Reichert, A.C. (1991)** Environmental effects of meiofaunal burrowing. *The Environmental Impact of Burrowing Animals and Animal Burrows* **63**: 33-52.
- Renken, H. (2010)** Global trends in ship sourced marine pollution (ITOPF). *presented at the Oil in the Sea Conference, Hamburg, Germany.*
- 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.
- Revsbech, N.P., Jorgensen, B.B., Blackburn, T.H., and Cohen, Y. (1983)** Microelectrode studies of the photosynthesis and O₂, H₂S, and pH profiles of a microbial mat. *Limnology & Oceanography* **28**: 1062-1074.
- Rhoads, D.C. (1974)** Organism-sediment relations on the muddy sea floor. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* **273**: 1-22.
- Rice, P., Longden, L., and Bleasby, A. (2000)** EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* **16**: 276-277.
- Riederer-Henderson, M.A., and Wilson, P.W. (1970)** Nitrogen fixation by sulphate-reducing bacteria. *Journal of General Microbiology* **61**: 27-31.
- Riisgard, H.U. (1991)** Suspension feeding in the polychaete *Nereis diversicolor*. *Marine Ecology Progress Series* **70**: 29-37.
- Risatti, J.B., Capman, W.C., and Stahl, D.A. (1994)** Community structure of a microbial mat: The phylogenetic dimension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 10173-10177.
- Ritchie, D.A., Edwards, C., McDonald, I.R., and Murrell, J.C. (1997)** Detection of methanogens and methanotrophs in natural environments. *Global Change Biology* **3**: 339-350.
- Robbins, J.A., McCall, P.L., Fisher, J.B., and Krezoski, J.R. (1979)** Effect of deposit feeders on migration of ¹³⁷Cs in lake sediments. *Earth and Planetary Science Letters* **42**: 277-287.
- Robertson, L.A., and Kuenen, J.G. (1984)** Aerobic denitrification: a controversy revived. *Archives of Microbiology* **139**: 351-354.

- Rockne, K.J., and Strand, S.E. (2001)** Anaerobic biodegradation of naphthalene, phenanthrene, and biphenyl by a denitrifying enrichment culture. *Water Research* **35**: 291-299.
- Rockne, K.J., Chee-Sanford, J.C., Sanford, R.A., Hedlund, B.P., Staley, J.T., and Strand, S.E. (2000)** Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 1595-1601.
- Rodríguez-Blanco, A., Ghiglione, J.F., Catala, P., Casamayor, E.O., and Lebaron, P. (2009)** Spatial comparison of total vs. active bacterial populations by coupling genetic fingerprinting and clone library analyses in the NW Mediterranean Sea. *FEMS Microbiology Ecology* **67**: 30-42.
- Rodríguez-Blanco, A., Antoine, V., Pelletier, E., Delille, D., and Ghiglione, J.F. (2010)** Effects of temperature and fertilization on total vs. active bacterial communities exposed to crude and diesel oil pollution in NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution* **158**: 663-673.
- Roeselers, G., Zippel, B., Staal, M., Van Loosdrecht, M., and Muyzer, G. (2006)** On the reproducibility of microcosm experiments - Different community composition in parallel phototrophic biofilm microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* **58**: 169-178.
- Rojo, F. (2010)** Enzymes for aerobic degradation of alkanes. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N. (ed.). Berlin, Germany: Springer-Verlag: pp. 781-797.
- Röling, W.F.M. (2007)** Do microbial numbers count? Quantifying the regulation of biogeochemical fluxes by population size and cellular activity. *FEMS Microbiology Ecology* **62**: 202-210.
- Röling, W.F.M., Couto De Brito, I.R., Swannell, R.P.J., and Head, I.M. (2004)** Response of archaeal communities in beach sediments to spilled oil and bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 2614-2620.
- Röling, W.F.M., Van Breukelen, B.M., Braster, M., Lin, B., and Van Verseveld, H.W. (2001)** Relationships between Microbial Community Structure and Hydrochemistry in a Landfill Leachate-Polluted Aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4619-4629.
- Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J.P., and Head, I.M. (2002)** Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 5537-5548.
- Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Fratepietro, F., Swannell, R.P.J., Daniel, F., and Head, I.M. (2004b)** Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 2603-2613.
- Ron, E.Z., and Rosenberg, E. (2002)** Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* **13**: 249-252.
- Rooney-Varga, J.N., Devereux, R., Evans, R.S., and Hines, M.E. (1997)** Seasonal changes in the relative abundance of uncultivated sulfate-reducing bacteria in a salt marsh sediment and in the rhizosphere of *Spartina alterniflora*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3895-3901.
- Rosenberg, E., Legman, R., Kushmaro, A., Adler, E., Abir, H., and Ron, E.Z. (1996)** Oil bioremediation using insoluble nitrogen source. *Journal of Biotechnology* **51**: 273-278.
- 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 and Technology* **36**: 4811-4817.
- Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D (2002)** Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Molecular Microbiology* **43**: 1657-1669.

Roy, C.S., Talbot, G., Topp, E., Beaulieu, C., Palin, M.F., and Massé, D.I. (2009) Bacterial community dynamics in an anaerobic plug-flow type bioreactor treating swine manure. *Water Research* **43**: 21-32.

Rueter, P., Rabus, R., Wilkes, H., Aeckersberg, F., Rainey, F.A., Jannasch, H.W., and

S

Sabirova, J.S., Ferrer, M., Regenhardt, D., Timmis, K.N., and Golyshin, P.N. (2006) Proteomic insights into metabolic adaptations in *Alcanivorax borkumensis* induced by alkane utilization. *Journal of Bacteriology* **188**: 3763-3773.

Safinowski, M., and Meckenstock, R.U. (2006) Methylation is the initial reaction in anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Environmental Microbiology* **8**: 347-352.

Sahm, K., MacGregor, B.J., Jørgensen, 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. *Environmental Microbiology* **1**: 65-74.

Said, O.B., Goni-Urriza, M., Bour, M.E., Aissa, P., and Duran, R. (2010) Bacterial community structure of sediments of the bizerte lagoon (Tunisia), a southern mediterranean coastal anthropized lagoon. *Microbial Ecology* **59**: 445-456.

Saiki, R.K., Scharf, S., and Faloona, F. (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.

Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* **4**: 406-425.

Saiz-Salinas, J.I. (1997) Evaluation of adverse biological effects induced by pollution in the Bilbao Estuary (Spain). *Environmental Pollution* **96**: 351-359.

Samanta, S.K., Singh, O.V., and Jain, R.K. (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons: Environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology* **20**: 243-248.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5463-5467.

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.

Santoro, A.E., Boehm, A.B., and Francis, C.A. (2006) Denitrifier community composition along a nitrate and salinity gradient in a coastal aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 2102-2109.

Sasaki, T., Maki, H., Ishihara, M., and Harayama, S. (1998) Vanadium as an internal marker to evaluate microbial degradation of crude oil. *Environmental Science and Technology* **32**: 3618-3621.

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. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 1341-1348.

Schaffner, L.C., Dickhut, R.M., Mitra, S., Lay, P.W., and Brouwer-Riel, C. (1997) Effects of physical chemistry and bioturbation by estuarine macrofauna on the transport of hydrophobic organic contaminants in the benthos. *Environmental Science and Technology* **31**: 3120-3125.

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

- Schink, B. (1985)** Degradation of unsaturated hydrocarbons by methanogenic enrichment cultures. *FEMS Microbiology Ecology* **31**: 69-77.
- Schloss, P.D., and Handelsman, J. (2005)** Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 1501-1506.
- Schneiker, S., Dos Santos, V.A.P.M., Bartels, D., Bekel, T., Brecht, M., Buhrmester, J. et al. (2006)** Genome sequence of the ubiquitous hydrocarbon-degrading marine bacterium *Alcanivorax borkumensis*. *Nature Biotechnology* **24**: 997-1004.
- Seewald, J.S. (2003)** Organic-inorganic interactions in petroleum-producing sedimentary basins. *Nature* **426**: 327-333.
- 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. *Environmental Microbiology* **5**: 517-522.
- Sen, A.M., and Johnson, B. (1999)** Acidophilic sulphate-reducing bacteria: candidates for bioremediation of acid mine drainage. In *Process Metallurgy*, pp. 709-718.
- Seo, J.S., Keum, Y.S., and Li, Q.X. (2009)** Bacterial degradation of aromatic compounds. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **6**: 278-309.
- Shao, M.F., Zhang, T., and Fang, H.H.P. (2010)** Sulfur-driven autotrophic denitrification: Diversity, biochemistry, and engineering applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **88**: 1027-1042.
- Sherr, B.F., Del Giorgio, P., and Sherr, E.B. (1999)** Estimating abundance and single-cell characteristics of respiring bacteria via the redox dye CTC. *Aquatic Microbial Ecology* **18**: 117-131.
- Shinoda, Y., Sakai, Y., Uenishi, H., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H. et al. (2004)** Aerobic and Anaerobic Toluene Degradation by a Newly Isolated Denitrifying Bacterium, *Thauera* sp. Strain DNT-1. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 1385-1392.
- Shinoda, Y., Akagi, J., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H. et al. (2005)** Anaerobic degradation of aromatic compounds by *Magnetospirillum* strains: Isolation and degradation genes. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **69**: 1483-1491.
- Siddique, T., Penner, T., Semple, K., and Foght, J.M. (2011)** Anaerobic biodegradation of longer-chain n-alkanes coupled to methane production in oil sands tailings. *Environmental Science and Technology* **45**: 5892-5899.
- Simberloff, D.S. (1972)** Properties of the rarefaction diversity measurement. *The American Naturalist* **106**: 414-418.
- Singleton, D.R., Furlong, M.A., Rathbun, S.L., and Whitman, W.B. (2001)** Quantitative Comparisons of 16S rRNA Gene Sequence Libraries from Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4374-4376.
- Singleton Jr, R. (1993)** The sulfate-reducing bacteria: An overview. *The Sulfate Reducing Bacteria: Contemporary Perspectives*: 1-20.
- Smith, C.J., and Osborn, A.M. (2009)** Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **67**: 6-20.
- Smith, C.R., Jumars, P.A., and Demaster, D.J. (1986)** In situ studies of megafaunal mounds indicate rapid sediment turnover and community response at the deep-sea floor. *Nature* **323**: 251-253.
- So, C.M., and Young, L.Y. (1999a)** Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 2969-2976.
- So, C.M., and Young, L.Y. (1999b)** Initial reactions in anaerobic alkane degradation by a sulfate reducer, strain AK-01. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 5532-5540.

- Song, B., and Ward, B.B. (2005)** Genetic diversity of benzoyl coenzyme a reductase genes detected in denitrifying isolates and estuarine sediment communities. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 2036-2045.
- Song, B., Haggblom, M.M., Zhou, J., Tiedje, J.M., and Palleroni, N.J. (1999)** Taxonomic characterization of denitrifying bacteria that degrade aromatic compounds and description of *Azoarcus toluvorans* sp. nov. and *Azoarcus toluclasticus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**: 1129-1140.
- Sørensen, J., Jørgensen, B.B., and Revsbech, N.P. (1979)** A comparison of oxygen, nitrate, and sulfate respiration in coastal marine sediments. *Microbial Ecology* **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*. *Applied and Environmental Microbiology* **39**: 105-108.
- Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Bezoudnova, E.Y., Pol, A., and Muyzer, G. (2007)** Denitrification in a binary culture and thiocyanate metabolism in *Thiohalophilus thiocyanoxidans* gen. nov. sp. nov. - A moderately halophilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing Gammaproteobacterium from hypersaline lakes. *Archives of Microbiology* **187**: 441-450.
- Sorokin, D.Y., Lysenko, A.M., Mityushina, L.L., Tourova, T.P., Jones, B.E., Rainey, F.A. et al. (2001)** *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalimicrobium sibericum* sp. nov., and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov. and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**: 565-580.
- Sowers, K. R., and J. G. Ferry. (1983)** Isolation and characterization of a methylotrophic marine methanogen, *Methanococcoides methylutens* gen. nov., sp. nov. *Applied and Environmental Microbiology* **45**:684-690.
- Spormann, A.M., and Widdel, F. (2000)** Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**: 85-105.
- Stahl, D.A., Fishbain, S., Klein, M., Baker, B.J., and Wagner, M. (2002)** Origins and diversification of sulfate-respiring microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **81**: 189-195.
- Stauffert, M., Cravo-Laureau C., Jézéquel, R., Cuny P., Gilbert, F., Milton C., Amouroux, D., Mahdaoui F., Bouyssièrè, B., Stora, G., Merlin, F-X., Duran, R.** Impact of crude oil on bacterial communities' structure in bioturbated sediments. Submitted to *Applied and Environmental Microbiology* for publication.
- Stauffert, M., Cravo-Laureau, C., and Duran, R.** Response of archaeal communities to oil spill in bioturbated Mudflat sediments. Submitted to *Applied and Environmental Microbiology* for publication.
- Steppe, T.F., and Paerl, H.W. (2005)** Nitrogenase activity and *nifH* expression in a marine intertidal microbial mat. *Microbial Ecology* **49**: 315-324.
- Steward, C.C., Nold, S.C., Ringelberg, D.B., White, D.C., and Lovell, C.R. (1996)** Microbial biomass and community structures in the burrows of bromophenol producing and non-producing marine worms and surrounding sediments. *Marine Ecology Progress Series* **133**: 149-165.
- 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.
- Stief, P., and De Beer, D. (2006)** Probing the microenvironment of freshwater sediment macrofauna: Implications of deposit-feeding and bioirrigation for nitrogen cycling. *Limnology and Oceanography* **51**: 2538-2548.

- Stief, P., Nazarova, L., and De Beer, D. (2005)** Chimney construction by *Chironomus riparius* larvae in response to hypoxia: Microbial implications for freshwater sediments. *Journal of the North American Benthological Society* **24**: 858-871.
- Stres, B., DanevÄ□iÄ, T., Pal, L., Fuka, M.M., Resman, L., Leskovec, S. et al. (2008)** Influence of temperature and soil water content on bacterial, archaeal and denitrifying microbial communities in drained fen grassland soil microcosms. *FEMS Microbiology Ecology* **66**: 110-122.
- Suárez-Suárez, A., López-López, A., Tovar-Sánchez, A., Yarza, P., Orfila, A., Terrados, J. et al. (2011)** Response of sulfate-reducing bacteria to an artificial oil-spill in a coastal marine sediment. *Environmental Microbiology* **13**: 1488-1499.
- 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.
- Svensson, J.M., Enrich-Prast, A., and Leonardson, L. (2001)** Nitrification and denitrification in a eutrophic lake sediment bioturbated by oligochaetes. *Aquatic Microbial Ecology* **23**: 177-186.
- 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 and Environment* **104**: 113-134.
- Syutsubo, K., Kishira, H., and Harayama, S. (2001)** Development of specific oligonucleotide probes for the identification and in situ detection of hydrocarbon-degrading *Alcanivorax* strains. *Environmental Microbiology* **3**: 371-379.

T

- Taghon, G.L. (1989)** Modeling deposit feeding. *Ecology of Marine Deposit Feeders*: 223-246.
- Taketani, R.G., dos Santos, H.F., van Elsas, J.D., and Rosado, A.S. (2009)** Characterisation of the effect of a simulated hydrocarbon spill on diazotrophs in mangrove sediment mesocosm. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **96**: 343-354.
- Taketani, R.G., Franco, N.O., Rosado, A.S., and van Elsas, J.D. (2010)** Microbial community response to a simulated hydrocarbon spill in mangrove sediments. *Journal of Microbiology* **48**: 7-15.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007)** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1596-1599.
- Tapilatu, Y.H., Grossi, V., Acquaviva, M., Milton, C., Bertrand, J.C., and Cuny, P. (2010)** Isolation of hydrocarbon-degrading extremely halophilic archaea from an uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France). *Extremophiles* **14**: 225-231.
- Teal, J.M., Valiela, I., and Berlo, D. (1979)** Nitrogen fixation by rhizosphere and free-living bacteria in salt marsh sediments. *Limnol. Oceanogr.* **24**: 126-132.
- Teske, A., and Sørensen, K.B. (2008)** Uncultured archaea in deep marine subsurface sediments: Have we caught them all? *ISME Journal* **2**: 3-18.
- Teske, A.P. (2006)** Microbial communities of deep marine subsurface sediments: Molecular and cultivation surveys. In *Handbook of Environmental Chemistry, Volume 5: Water Pollution*, pp. 357-368.

- Thamdrup, B., and Dalsgaard, T. (2002)** Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1312-1318.
- Thauer, R.K. (2011)** Anaerobic oxidation of methane with sulfate: on the reversibility of the reactions that are catalyzed by enzymes also involved in methanogenesis from CO₂. *Current Opinion in Microbiology*, **14**:292–299.
- Thauer, R.K. (1998)** 140th Ordinary Meeting of the Society for General Microbiology, 31 March 1998: Biochemistry of methanogenesis: A tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* **144**: 2377-2406.
- Tholen, A., Pester, M., and Brune, A. (2007)** Simultaneous methanogenesis and oxygen reduction by *Methanobrevibacter cuticularis* at low oxygen fluxes. *FEMS Microbiology Ecology* **62**: 303-312.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D.G. (1997)** The CLUSTAL X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**: 4876-4882.
- Throbäck, I.N., Johansson, M., Rosenquist, M., Pell, M., Hansson, M., and Hallin, S. (2007)** Silver (Ag⁺) reduces denitrification and induces enrichment of novel nirK genotypes in soil. *FEMS Microbiology Letters* **270**: 189-194.
- Timmermann, K., Banta, G.T., Johnsen, A.R., and Andersen, O. (2008)** Effects of the polychaetes *Arenicola marina* and *Nereis diversicolor* on microbial pyrene mineralization. *Aquatic Microbial Ecology* **50**: 197-207.
- Timmermann, K., Banta, G.T., Klinge, L., and Andersen, O. (2011)** Effects of bioturbation on the fate of oil in coastal sandy sediments - An in situ experiment. *Chemosphere*.
- Tobor-Kaplon, M.A., Bloem, J., Römkens, 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.
- Torsvik, V., Ovreas, L., and Thingstad, T.F. (2002)** Prokaryotic diversity - Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* **296**: 1064-1066.
- Townsend, G.T., Prince, R.C., and Suflita, J.M. (2003)** Anaerobic Oxidation of Crude Oil Hydrocarbons by the Resident Microorganisms of a Contaminated Anoxic Aquifer. *Environmental Science and Technology* **37**: 5213-5218.
- Troussellier, M., Schäfer, H., Batailler, N., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P. et al. (2002)** Bacterial activity and genetic richness along an estuarine gradient (Rhône River plume, France). *Aquatic Microbial Ecology* **28**: 13-24.

U

- Ulrich, A.C., Beller, H.R., and Edwards, E.A. (2005)** Metabolites detected during biodegradation of ¹³C 6-benzene in nitrate-reducing and methanogenic enrichment cultures. *Environmental Science and Technology* **39**: 6681-6691.
- Urakawa, H., Yoshida, T., Nishimura, M., and Ohwada, K. (2000)** Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone profiling. *Environmental Microbiology* **2**: 542-554.
- Urakawa, H., J. C. Garcia, P. D. Barreto, G. A. Molina, and J. C. Barreto. (2012)** A sensitive crude oil bioassay indicates that oil spills potentially induce a change of major nitrifying prokaryotes from the Archaea to the Bacteria. *Environnemental Pollution* **164C**:42-45.

V

- Van Beilen, J.B., and Funhoff, E.G. (2007)** Alkane hydroxylases involved in microbial alkane degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**: 13-21.
- Van Beilen, J.B., Li, Z., Duetz, W.A., Smits, T.H.M., and Witholt, B. (2003)** Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Diversité des systèmes alcane hydroxylase dans l'environnement* **58**: 427-440.
- Van der Meer JR, Ravatn R, Sentchilo V (2001)** The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrases. *Archives of Microbiology* **175**: 79-85.
- Van Hamme, J.D., Singh, A., and Ward, O.P. (2003)** Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**: 503-549.
- Vandecasteele, J.P. (2005)** Biodégradation des hydrocarbures aliphatiques et alycycloïques. *Technip, IFP publications (eds) Microbiologie pétrolière*: pp. 173-239.
- Venosa, A.D., and Zhu, X. (2003)** Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Science and Technology Bulletin* **8**: 163-178.
- Vercraene-Eairmal, M., Lauga, B., Saint Laurent, S., Mazzella, N., Boutry, S., Simon, M. et al.** Diuron biotransformation and its effects on biofilm bacterial community structure. *Chemosphere* **81**: 837-843.
- Verger, F. (1995)** Slikkes et Schorres : milieux et aménagement. *Norois*. http://www.persee.fr/web/revues/home/prescript/article/noroi_0029-182X_1995_num_165_1_6622 **165**: pp. 235-245.
- Verhamme, D.T., Prosser, J.I., and Nicol, G.W. (2011)** Ammonia concentration determines differential growth of ammonia-oxidising archaea and bacteria in soil microcosms. *ISME Journal* **5**: 1067-1071.
- Vila, J., Nieto, J.M., Mertens, J., Springael, D., and Grifoll, M. (2010)** Microbial community structure of a heavy fuel oil-degrading marine consortium: Linking microbial dynamics with polycyclic aromatic hydrocarbon utilization. *FEMS Microbiology Ecology* **73**: 349-362.
- Von Klein, D., Arab, H., Völker, H., and Thomm, M. (2002)** *Methanosarcina baltica*, sp. nov., a novel methanogen isolated from the Gotland Deep of the Baltic Sea. *Extremophiles* **6**: 103-110.

W

- Wagner, C., Griebhammer, A., and Drake, H.L. (1996)** Acetogenic capacities and the anaerobic turnover of carbon in a Kansas prairie soil. *Applied and Environmental Microbiology* **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.
- Wakeham, S.G., and Canuel, E.A. (2006)** Degradation and preservation of organic matter in marine sediments. In *Handbook of Environmental Chemistry, Volume 2: Reactions and Processes*. Volkman, J. (ed), pp. 295-321.
- Wang, F., Tessier, A., and Hare, L. (2001)** Oxygen measurements in the burrows of freshwater insects. *Freshwater Biology* **46**: 317-327.

- Watanabe, K. (2001)** Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 237-241.
- Watanabe, K., Kodama, Y., Hamamura, N., and Kaku, N. (2002)** Diversity, abundance, and activity of archaeal populations in oil-contaminated groundwater accumulated at the bottom of an underground crude oil storage cavity. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3899-3907.
- Watson, A.J., and Orr, J.C. (2003)** Carbon dioxide fluxes in the global ocean. *Ocean Biogeochemistry*: 123-143.
- Wentzel, A., Ellingsen, T.E., Kotlar, H.K., Zotchev, S.B., and Throne-Holst, M. (2007)** Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**: 1209-1221.
- Westermann, P., and Ahring, B.K. (1987)** Dynamics of methane production, sulfate reduction, and denitrification in a permanently waterlogged alder swamp. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2554-2559.
- Weston, D.P., and Mayer, L.M. (1998)** In vitro digestive fluid extraction as a measure of the bioavailability of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources of variation and implications for partitioning models. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**: 820-829.
- Whitman, W.B., Bowen, T.L., and Boone, D.R. (2006)** The methanogenic bacteria. *The Prokaryotes* **3**: 165-207.
- Whyte, L.G., Bourbonnière, 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.
- Whyte, L.G., Schultz, A., Van Beilen, J.B., Luz, A.P., Pellizari, V., Labbé, D., and Greer, C.W. (2002)** Prevalence of alkane monooxygenase genes in Arctic and Antarctic hydrocarbon-contaminated and pristine soils. *FEMS Microbiology Ecology* **41**: 141-150.
- Widdel, F. (1987)** New types of acetate-oxidizing, sulfate-reducing *Desulfobacter* species, *D. hydrogenophilus* sp. nov., *D. latus* sp. nov., and *D. curvatus* sp. nov. *Archives of Microbiology* **148**: 286-291.
- Widdel, F. (1988)** Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. *Biology of Anaerobic Microorganisms*: 469-585.
- Widdel, F., and Bak, F. (1992)** Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. *The Prokaryotes*: 3352-3378.
- Widdel, F., and Hansen, T.A. (1992)** The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria. *The Prokaryotes*: 583-624.
- Widdel, F. (1994)** Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate reducing bacteria. *Nature* **372**: 455-458.
- Widdel, F., and Rabus, R. (2001)** Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 259-276.
- Widdel, F., and Grundmann, O. (2010)** Biochemistry of the anerobic degradation of non-metal alkanes. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Timmis, K.N. (ed.). Berlin, Germany: Springer-Verlag: pp. 910-924.
- Widenfalk, A., Bertilsson, S., Sundh, I., and Goedkoop, W. (2008)** Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes - responses at various levels of microbial community organization. *Environmental Pollution* **152**: 576-584.
- Wilde, S.B., and Plante, C.J. (2002)** Spatial heterogeneity of bacterial assemblages in marine sediments: The influence of deposit feeding by *Balanoglossus aurantiacus*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **55**: 97-107.

- Wollast, R. (1991)** The coastal organic carbon cycles: fluxes, sources and sinks. *In: Martin JM, Wollast R (eds) Ocean margin processes in global change*, Wiley
- Wolsing, M., and Priemé, A. (2004)** Observation of high seasonal variation in community structure of denitrifying bacteria in arable soil receiving artificial fertilizer and cattle manure by determining T-RFLP of nir gene fragments. *FEMS Microbiology Ecology* **48**: 261-271.
- Wright, A.L., Weaver, R.W., and Webb, J.W. (1997)** Oil bioremediation in salt marsh mesocosms as influenced by N and P fertilization, flooding, and season. *Water, Air, and Soil Pollution* **95**: 179-191.
- Wu, M.L., Ettwig, K.F., Jetten, M.S.M., Strous, M., Keltjens, J.T., and Van Niftrik, L. (2011)** A new intra-aerobic metabolism in the nitrite-dependent anaerobic methane-oxidizing bacterium Candidatus 'Methylomirabilis oxyfera'. *Biochemical Society Transactions* **39**: 243-248.

Y

- Yakimov, M.M., Golyshin, P.N., Lang, S., Moore, E.R.B., Abraham, W.R., Lunsdorf, H., and Timmis, K.N. (1998)** *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 339-348.
- Yakimov, M.M., Gentile, G., Bruni, V., Cappello, S., D'Auria, G., Golyshin, P.N., and Giuliano, L. (2004)** Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **49**: 419-432.
- Yakimov, M.M., Giuliano, L., Gentile, G., Crisafi, E., Chernikova, T.N., Abraham, W.R. et al. (2003)** *Oleispira antarctica* gen. nov., sp. nov., a novel hydrocarbonoclastic marine bacterium isolated from Antarctic coastal sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**: 779-785.
- Yakimov, M.M., Denaro, R., Genovese, M., Cappello, S., D'Auria, G., Chernikova, T.N. et al. (2005)** Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environmental Microbiology* **7**: 1426-1441.
- 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 Biotechnology* **6**: 315-337.
- Yoshida, A., Nomura, H., Toyoda, K., Nishino, T., Seo, Y., Yamada, M. et al. (2006)** Microbial responses using denaturing gradient gel electrophoresis to oil and chemical dispersant in enclosed ecosystems. *Marine Pollution Bulletin* **52**: 89-95.
- Yoshida, N., Yagi, K., Sato, D., Watanabe, N., Kuroishi, T., Nishimoto, K. et al. (2005)** Bacterial communities in petroleum oil in stockpiles. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **99**: 143-149.

Z

- Zedelius, J., Rabus, R., Grundmann, O., Werner, I., Brodkorb, D., Schreiber, F. et al. (2011)** Alkane degradation under anoxic conditions by a nitrate-reducing bacterium with

- possible involvement of the electron acceptor in substrate activation. *Environmental Microbiology Reports* **3**: 125-135.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1015-1024.
- Zengler, K., Heider, J., Rossello-Mora, R., and Widdel, F. (1999b)** Phototrophic utilization of toluene under anoxic conditions by a new strain of Blastochloris sulfoviridis. *Archives of Microbiology* **172**: 204-212.
- Zengler, K., Richnow, H.H., Rossello-Mora, R., Michaelis, W., and Widdel, F. (1999)** Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* **401**: 266-269.
- Zhang, W., Song, L.s., Ki, J.S., Lau, C.K., Li, X.D., and Qian, P.Y. (2008)** Microbial diversity in polluted harbor sediments II: Sulfate-reducing bacterial community assessment using terminal restriction fragment length polymorphism and clone library of dsrAB gene. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **76**: 682-691.
- Zhang, X., and Young, L.Y. (1997)** Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 4759-4764.
- Zhilina, T.N. (1972)** Dying-off of methanosarcina exposed to air. *Otmiranie metabosartsiny na vozdukhie*. **41**: 1105-1106.
- Zumft, W.G. (1993)** The biological role of nitric oxide in bacteria. *Archives of Microbiology* **160**: 253-264.
- Zumft, W.G. (1997)** Cell biology and molecular basis of denitrification? *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**: 533-616.
- 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.

ANNEXES

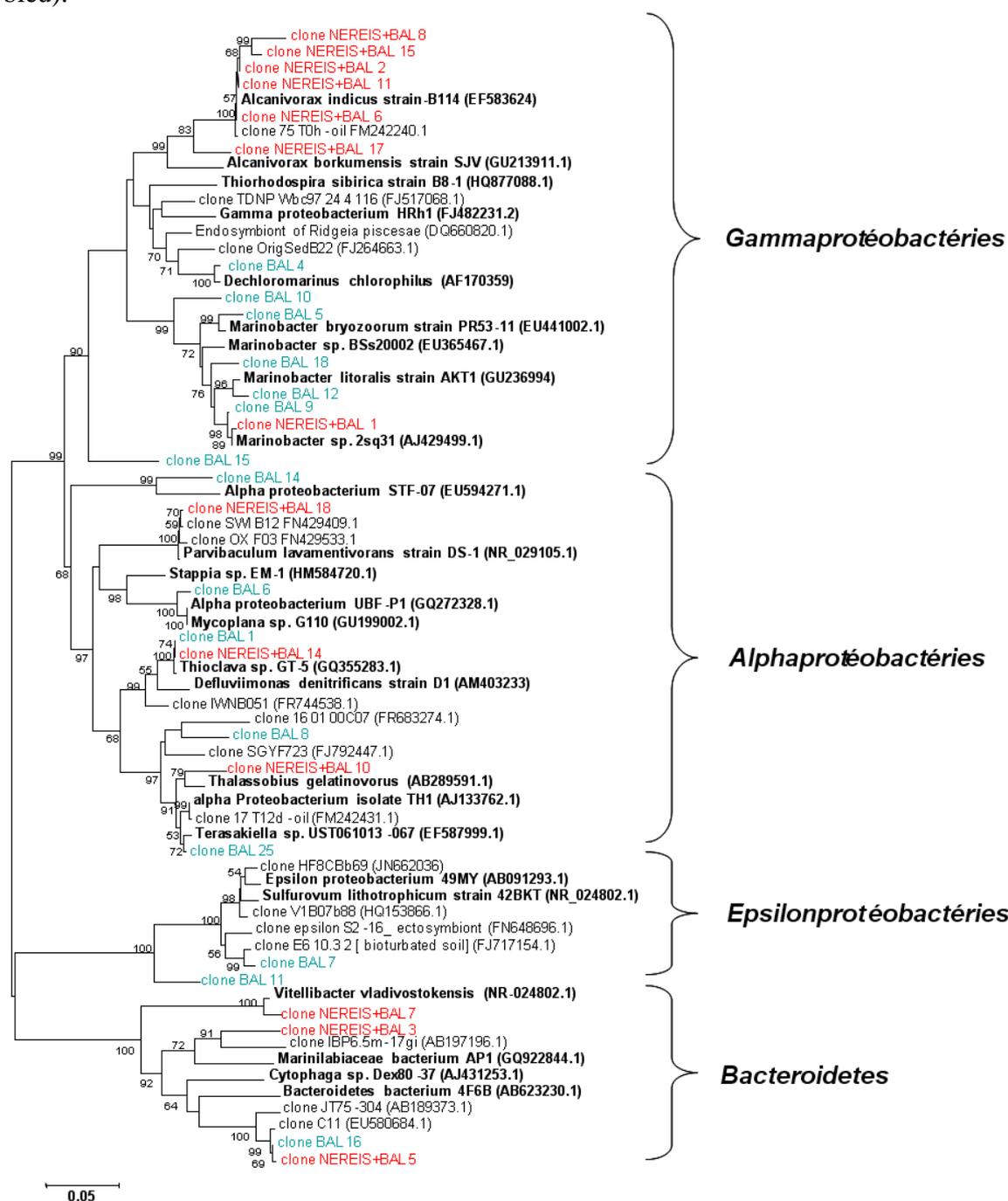


ANNEXES

ANNEXE 1 :

Composition des communautés dénitrifiantes hydrocarbonoclastes obtenus sur dotriacontane à partir des sédiments BAL et NEREIS+BAL T270j

(les clones NEREIS+BAL sont en rouge; les clones BAL sont en bleu).



ANNEXE 2 :

Distribution phylogénétique des souches aérobies isolées sur des hydrocarbures aromatiques

Les souches isolées à partir des sédiments BAL sont indiquées en vert ; les souches NEREIS+BAL sont indiquées en orange. DBT: Dibenzothiophène ; FLUO : Fluoranthène ; BAP : Benzo(a)pyrène; IND: Indénopyrène

