



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

Docteur en Géosciences

de l'Université de Lorraine

Ecole Doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

Par Cécile THION

Influence des interactions Bactéries- Champignons sur la dissipation des HAP dans la rhizosphère

Soutenance publique prévue le 30 Mars 2012, devant le jury :

Rapporteurs : Dr Pascal SIMONET, CNRS, Lyon
Dr Christian STEINBERG, INRA, Dijon

Examineurs : Pr Eric GELHAYE, Université de Lorraine, Nancy
Dr Catherine RAFIN, ULCO, Dunkerque

Directrice de Thèse : Dr Corinne LEYVAL, CNRS, Nancy

Co-directrice de Thèse : Dr Aurélie CEBRON, CNRS, Nancy

Laboratoire des Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière
Organique dans les Sols (LIMOS)
UMR 7137 CNRS-Université de Lorraine

"To live in the world without becoming aware of the meaning of
the world is like wandering about a great library without
touching the books"

Manly P Hall

*A ma grand-mère, Marie-Madeleine,
dont la force et la douceur ne m'ont jamais quittée.*

MeRCi !

Certaines des personnes citées se retrouveront plusieurs fois dans ces remerciements. C'est normal ! Ceci est juste une illustration de la complexité des réseaux d'interactions ~~entre les microorganismes, les plantes et~~ (Oups, j'ai du mal à décrocher !) entre humains...

Avant toute chose, je remercie sincèrement les membres du jury. Merci à Pascal Simonet et Christian Steinberg d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse ainsi qu'à Catherine Rafin d'avoir accepté d'en être examinatrice. Merci beaucoup également à Eric Gelhaye de bien vouloir présider ce jury de thèse. J'espère que le travail présenté dans ce manuscrit sera à la hauteur de vos attentes.

Je souhaiterais remercier Corinne Leyval pour son soutien et sa disponibilité durant toute la durée de la rédaction de ce manuscrit et de l'ensemble du travail qui a permis d'y aboutir. Merci également de m'avoir laissé la liberté de développer les axes de recherche qui m'intéressaient, tout en m'apportant les nombreux conseils et connaissances nécessaires à ces recherches. J'aimerais aussi remercier chaleureusement Aurélie Cébron, pour sa fiabilité et sa confiance, pour ses conseils toujours avisés, mais aussi pour avoir répondu à mes 352 456 questions, parmi lesquelles 352 451 idiotes (dont une seule et même question, posée 51 713 fois), ces trois dernières années, y compris ces derniers mois. De plus, bien qu'il ait été impossible pour de bêtes raisons administratives que Thierry Beguiristain demeure officiellement mon co-directeur de thèse, j'aimerais le remercier de tout cœur pour son soutien et son aide précieuse tout au long de ce travail, en particulier pour tous les aspects pratiques, techniques et tac(ataca)tiques.

Pour leur aide indispensable dans les parties techniques de ce travail, j'aimerais remercier Geneviève Magnin et Christine Friry, notamment d'avoir accepté de couler pour moi 51 713 boîtes et de compter 352 456 spores, à s'en brûler les yeux. Merci également à David Billet pour ses conseils pratiques concernant les HAP et sa redoutable rapidité à doser les 352 451 échantillons que je lui ai confiés. J'aimerais également adresser un grand merci à l'ensemble du LIMOS, d'aujourd'hui et d'avant, pour avoir supporté mes cris(es) de joie et de colère : Alexis, Anne, Brice, Cécile (mais non, l'autre !), Chantal, Christian, Clarisse, Colette, Djihad (on te garde une vidéo, c'est promis !), Emile, Fabien, Fabrice, Florent (dernier arrivé, et c'est bien dommage), Géraldine, Hervé, Jeanne, Jean-Pierre, Jess, Laëtitia, Marie, Norbert, Olivier, Patrick (pour m'avoir ouvert les portes de l'enseignement), Paulo, Remi, Romain et Sylvie D. (Oui, mais laquelle ? Ben les deux !).

Rien n'aurait été possible sans le soutien infaillible de mes copains et amis ! A Adeline, ma Doune (J'ai surkiffé ces 16 années de jérémiades et de fous rires et j'espère très sincèrement que 16 nouvelles, au moins, sont à venir), à ma Choop-Choop Chéwie (Les carottes sont cuites. Je répète : les carottes sont cuites), à Damien (Cuillère !), à Emmamounette (T'as vu, la couverture est... en carton !! +1), à Fabinounet, mon jumeau de thèse (Lyonnais !), à JP (merci d'avance pour l'accueil à Scarpone !), à la Petite Marie (2012 sera une année de chance !), à Norbert dit le King (la force tranquille), à Olivia, la Choupinette Internationale (Au pot, il y aura du poulet. Et des patates ! Et des saucisses !), à Olivier, dit la grande chiche, dit mon chichon, dit la chichounette, dit le bougnat (Coucou toi...), à Pierre Richard, à Thomas (et son fils Goan), à Remi (Mon ! Il est fou ce vosgien) et à Romain (Courage, ce n'est que le début !) : A tous, merci d'avoir toléré ma folie

douce, ma maladresse cauchemardesque, mon incapacité à mentir faisant capoter les coups en douce et surtout d'avoir été présents dans les moments les plus drôles comme les plus difficiles.

A Jessica : merci d'avoir été là depuis notre re-rencontre, de m'épauler, de me faire courir (euh... enfin ça, je ne suis pas sûre quand même ;o), de me consoler, de me faire rire, de me rassurer, de me faire rêver. Merci, tout simplement, d'être toi.

J'adresse un immense MERCI à ma famille, agrandie par la vie, pour m'avoir soutenue et pour avoir cru en moi toutes ces années. Merci à mes parents, tous les quatre, sans qui je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui : votre confiance a été ma force. Merci à mon frère, mon fréron, Davidus Maximus, mais n'oublie pas : ne vendons pas la peau du bœuf avant de l'avoir tiré par les cornes. Merci aussi à Caroline, Daniel, Elisabeth, Héloïse & Maé, Jocelyne, Julius & Estebona, Geneviève, Ophélie & toute sa famille, Sophie, Stelli et Tamara et à tous ceux qui ne sont plus là.

Pour finir, un gros merci d'amour à mes loulous, Marius, la fine oreille, et Gabin, les yeux de lynx, pour avoir partagé votre maman avec ce bébé de papier, pour avoir semé les traces de vos jolies présences partout dans ma vie. Continuez, tous les jours du monde, à demander : « Pourquoi ? », même si je n'ai pas les réponses à toutes vos questions. Vous êtes la réponse aux miennes.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : Etat de l'Art et Objectifs.....	3
1. Caractéristiques générales des HAP.....	5
1.1. Caractéristiques physico-chimiques des HAP	5
1.2. Origine des HAP	5
1.3. Toxicité des HAP	8
1.3.1. Toxicité des HAP à l'échelle de l'organisme	8
1.3.2. Ecotoxicité des HAP	10
2. Biodégradation des HAP par les microorganismes.....	11
2.1. Dégradation des HAP par les bactéries	12
2.1.1. Voies métaboliques de la dégradation des HAP par les bactéries	12
2.1.1.1. <i>En aérobiose</i>	12
• Voie haute	14
• Voie basse	14
2.1.1.2. <i>En anaérobiose</i>	16
2.1.2. HAP Dioxygénases (PAH-RHD)	18
2.1.2.1. <i>Variabilité et spécificité</i>	18
2.1.2.2. <i>Induction par les HAP</i>	19
2.2. Dégradation des HAP par les champignons	20
2.2.1. Généralités	20
2.2.2. Cytochrome P450 mono-oxygénases	22
2.2.3. Lignin-Modifying Enzymes (LME)	23
2.2.4. Espèces réactives de l'oxygène	25
2.2.5. Adsorption, absorption et stockage	25
3. Devenir des HAP dans les Sols.....	27
3.1. Processus abiotiques	27
3.1.1. Adsorption et séquestration par les particules de sol	27
3.1.2. Lessivage	28
3.1.3. Dégradation abiotique	28
3.2. Effet des HAP sur les communautés microbiennes des sols	29
3.2.1. Méthodes d'étude de la diversité et de l'abondance des microorganismes dans les sols	29
3.2.2. Communautés bactériennes dans les sols contaminés en HAP	31
3.2.3. Communautés fongiques dans les sols contaminés	33

3.3. Biodégradation et dissipation des HAP dans les sols	35
3.3.1. Effets des caractéristiques physico-chimiques du sol sur la biodégradation des HAP	35
3.3.1.1. <i>Effets indirects via l'altération de la croissance, de l'activité globale ou de la structure des communautés microbiennes</i>	35
3.3.1.2. <i>Effets directs sur les potentiels de biodégradation des HAP</i>	37
3.3.2. Biodisponibilité des HAP	38
3.3.2.1. <i>Mesure de la part de HAP biodisponibles</i>	38
3.3.2.2. <i>Biodisponibilité et biodégradation des HAP</i>	39
3.3.3. Interactions microbiennes et biodégradation des HAP	40
4. Dissipation des HAP dans la rhizosphère	41
4.1. La rhizosphère : définition et propriétés	41
4.2. Devenir des HAP dans la rhizosphère	42
5. Les techniques biologiques de remédiation des sols contaminés par les HAP	45
6. Objectifs de la thèse	47

CHAPITRE II : Matériels et Méthodes.....49

1. Matériels.....	51
1.1. Sols et sable	51
1.1.1. Sol de friche industrielle (NM) et sol thermo-désorbé (TD)	51
1.1.1.1. <i>Origine et caractéristiques physico-chimiques</i>	51
1.1.1.2. <i>Dispositif expérimental in situ</i>	53
1.1.1.2.1. <i>Parcelles lysimétriques</i>	53
1.1.1.2.2. <i>Echantillonnage et paramètres testés</i>	53
1.1.2. Sol agricole (La Bouzule)	54
1.1.2.1. <i>Origine et caractéristiques physico-chimiques</i>	54
1.1.2.2. <i>Préparation du sol pour les dispositifs de culture stérile</i>	55
1.1.3. Mélange de sables pour les microcosmes stériles	55
1.2. Microorganismes et conditions de cultures	56
1.2.1. Microorganismes	56
1.2.2. Milieux et conduite des cultures de microorganismes	56
• Milieu Malt-Extract (ME)	56
• Milieu Luria-Bertoni (LB)	56
• Milieu Büshnell-Haas (BH)	56
• Basal Salt Medium (BSM)	57
• Ajout des HAP dans les milieux de culture liquides	57
1.2.3. Préparation des inocula microbiens	57
1.2.3.1. <i>Champignons filamenteux</i>	57

2.3. Analyses Statistiques	74
----------------------------	----

CHAPITRE III : Résultats.....	75
-------------------------------	----

1 ^{ère} partie.....	77
------------------------------	----

Dynamique des communautés fongiques dans un sol multipollué aux HAP et ETM : effet des plantes et d'un traitement de dépollution par désorption thermique.

Article soumis (*FEMS Microbiology Ecology* en janvier 2012)

« Long-term *in situ* dynamic of fungal communities in a heavy-metal and PAH polluted soil with various plants and impact of thermal desorption treatment »

Résumé	79
Abstract	80
Introduction	81
Material & Methods	82
1. Experimental device, sampling, soils and vegetation	82
<i>In situ</i> experimental device	82
Soil characteristics and plant parameters	84
2. DNA extraction	84
3. Fungal abundance by real-time PCR	84
4. Fungal diversity by PCR-TTGE	85
5. Phylogenetic analysis	86
6. Statistical Analysis	86
Results	86
1. Dynamic of fungal abundance	86
2. Fungal community structure	88
3. Identification of dominant fungal species	90
Discussion	93
Fungal communities in the multicontaminated soil under the influence of plants	93
Influence of the thermal desorption treatment	94
Long term dynamic of the fungal community structure	95
Conclusion	96
Supplemental Data	97

2 ^{ème} partie.....	99
------------------------------	----

Isolement de souches microbiennes à partir d'un sol pollué aux HAP et ETM et test *in vitro* de leur potentiel de dissipation des HAP.

Résumé	101
Introduction	102

Matériels & Méthodes	102
1. Isolement de souches fongiques	102
2. Isolement de souches bactériennes	103
3. Dissipation des HAP par les souches modèles	103
Résultats	104
1. Isolement de souches fongiques	104
2. Isolement de souches bactériennes	105
3. Dissipation du PHE, PYR et DBA par les souches isolées	106
Discussion	108
Diversité des champignons cultivables dans le sol de Neuves-Maisons	108
Potentiel de dissipation des HAP des souches isolées	108
Conclusion	112

3^{ème} partie.....115

Biotransformation et sorption des HAP par *Fusarium solani* et *Arthrobacter oxydans*, isolés à partir d'un sol pollué, en cultures axéniques et en cocultures mixtes.

Article publié dans *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2012, n°68(1): 28-35

« PAH biotransformation and sorption by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* in axenic cultures or mixed cocultures »

Résumé	117
Abstract	118
Introduction	119
Material & Methods	120
1. Isolation, conservation and inoculation of microbial strains	120
2. Culture conditions with PAHs	121
3. PAH dissipation experiments	121
4. Estimation of sorption and biotransformation	122
5. PAH analysis	122
6. pH and glucose measurements	122
7. Microbial growth	123
8. Real-time PCR assays	123
9. Microscopic observations	123
10. Statistical analysis	124
Results	124
1. PAH dissipation in pure cultures with or without glucose	124
2. PAH dissipation kinetics in buffered and unbuffered medium	124
3. PAH adsorption, absorption and biotransformation in <i>F. solani</i> pure cultures and cocultures with <i>A. oxydans</i>	127

Discussion	130
Conclusion	132

4^{ème} partie :.....133

Etude de la dissipation des HAP en microcosmes stériles de luzerne (*Medicago sativa*), inoculés par *Fusarium solani* et/ou *Arthrobacter oxydans*.

Résumé	135
Introduction	136
Matériels & Méthodes	136

1. Tests d'innocuité des microorganismes et de toxicité des HAP sur la croissance de la luzerne 136
2. Stérilisation des graines de luzerne 137
3. Mise au point et présentation du dispositif de culture stérile 137
4. Etude de la dissipation des HAP en microcosmes stériles plantés et inoculés avec *F. solani* et/ou *A. oxydans* 138

Résultats	139
-----------	-----

1. Tests préliminaires 139
 - Stérilisation et germination des graines 139
 - Effet des HAP, de *F. solani* et d'*A. oxydans* sur la croissance de la luzerne 140
2. Dissipation des HAP par les souches microbiennes en présence de luzerne dans les microcosmes stériles 143
 - Survie et croissance des microorganismes dans les dispositifs 143
 - Teneurs en HAP après 21 jours 146

Discussion	146
Conclusion	151

5^{ème} partie :.....153

Etude de la dissipation des HAP dans un sol non stérile, planté avec de la luzerne (*Medicago sativa*) et inoculé par *Fusarium solani* et/ou *Arthrobacter oxydans*.

Résumé	155
Introduction	156
Matériels & Méthodes	156
Résultats	159

1. Paramètres végétaux 159
2. Communautés microbiennes et survie des microorganismes inoculés 160
 - Abondance des populations microbiennes mesurées en UFC et par PCR en temps réel 160
 - Structure des communautés microbiennes 163
3. Devenir des HAP 171

Discussion	171
Méthodes de détection des inocula bactériens et fongiques	172
Suivi de l'inoculation et de la colonisation du sol par les inocula	174
Structuration des communautés bactériennes et fongiques : effet de la luzerne et de l'inoculation	177
Devenir des HAP	178
Conclusion	179

CHAPITRE IV : Discussion générale.....181

Discussion générale	183
Dissipation des HAP par <i>F. solani</i> et <i>A. oxydans</i> : influence des conditions de culture et des sources de carbone disponibles	184
Ecologie des communautés bactériennes et fongiques dans les sols contaminés aux HAP : influence des plantes et du traitement par désorption thermique	186
Limites de l'étude et perspectives de recherche	102
Conclusion générale	192

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....195

ANNEXES.....227

- Thion C.¹, Cébron A., Beguiristain T. et Leyval C. (2012) *PAH biotransformation and sorption by Fusarium solani and Arthrobacter oxydans in axenic cultures or mixed cocultures*. International Biodeterioration and Biodegradation, **68**(1): 28-35
- Cébron A., Cortet J., Criquet S., Biaz A., Calvert V., Caupert C.¹, Pernin P. et Leyval C. (2011) *Biological functioning of PAH-polluted and thermal desorption-treated soils assessed by fauna and microbial bioindicators*. Research in Microbiology, **162**(9):896-907
- Ouvrard S., Barnier C., Bauda P., Beguiristain T., Biache C., Bonnard M., Caupert C.¹, Cébron A., Cortet J., Cotellet S., Dazy M., Faure F., Masfaraud J.F., Nahmani J., Palais F., Poupin P., Raoult N., Vasseur P., Morel J.L. et Leyval C. (2011) *In situ assessment of phytotechnologies for multicontaminated soil management*. International Journal of Phytoremediation, **13**(S1):245–263

¹ Caupert et Thion sont respectivement mon nom d'épouse et mon nom patronymique. Ce dernier sera conservé à l'avenir pour toutes les publications scientifiques.

Liste des Tableaux et Figures

Chapitre I : Etat de l'Art

Tableau 1 : Propriétés physicochimiques des 16 HAP prioritaires de l'US-EPA.....	6
Tableau 2 : Exemples d'espèces de champignons dégradant les HAP dans différentes conditions expérimentales et voies métaboliques impliquées.....	21
Figure 1 : Nombre de tonnes de HAP introduits dans l'atmosphère par année en France.....	7
Figure 2 : Mécanisme de l'induction du cytochrome P450 chez le poisson.....	9
Figure 3 : Voies métaboliques hautes proposées pour la dégradation du naphtalène, du phénanthrène et de l'anthracène par les bactéries.....	13
Figure 4 : Voie métabolique haute proposée pour la dégradation du BaP par les bactéries.....	14
Figure 5 : Voies métaboliques basses proposées pour la dégradation du naphtalène, du phénanthrène et de l'anthracène par les bactéries.....	15
Figure 6 : Voies métaboliques anaérobies proposées pour la dégradation du naphtalène et du 2-méthylnaphtalène en conditions sulfato-réductrices.....	17
Figure 7 : Arbre phylogénétique des sous-unités α des dioxygénases, dont les (PAH-RHD) α , construit sur la base des séquences protéiques.....	19
Figure 8 : Synthèse des mécanismes moléculaires de la dégradation des HAP impliquant des champignons.....	20
Figure 9 : Activation des HAP par le cytochrome P450, exemple du PHE.....	22
Figure 10 : Oxydation des HAP par les lignin-modifying enzymes (LME) fongiques.....	24
Figure 11 : HAP dissous, adsorbés et séquestrés dans le sol	27
Figure 12 : Effet des ETM sur la biodégradation des polluants organiques	37
Figure 13 : Quelques exemples de métabolites secondaires produits par les plantes	42
Figure 14 : Les différents mécanismes impliqués dans la phytoremédiation des polluants.....	46

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Tableau 3 : Caractéristiques physico-chimiques du sol de Neuves-Maisons non traité (NM) et traité par désorption thermique (TD).....	52
Tableau 4 : Caractéristiques physico-chimiques du sol de La Bouzule.....	54
Tableau 5 : Composition de la solution nutritive pour arrosage de la luzerne selon Criquet (2000).....	60
Tableau 6 : Composition de la solution nutritive solution nutritive de Hewitt modifiée pour l'arrosage de la luzerne.....	61
Tableau 7 : Amorces, températures d'hybridation, nombres de cycles et taille attendue des fragments des différentes PCR	64

Tableau 8 : Nom et taxonomie des souches bactériennes dont les ADN génomiques ont été utilisés pour tester la spécificité du couple d'amorces F243/R513.....	66
Tableau 9 : Nom et taxonomie des souches fongiques dont les ADN génomiques ont été utilisés pour tester la spécificité du couple d'amorces ITS-Fu-F/ITS-Fu-R.....	67
Tableau 10 : Conditions de migration des gels de TTGE.....	70
Tableau 11 : Programmes ASE utilisés pour l'extraction de HAP à partir de matrices solides.....	73
Figure 15 : Distribution des traitements des parcelles du dispositif expérimental <i>in situ</i>	54
Figure 16 : Stérilisation et germination des graines pour les dispositifs de culture stérile.....	59
Figure 17 : Sites d'hybridation des amorces ciblant les gènes codant les ARN ribosomiques 16S des bactéries.....	64
Figure 18 : Sites d'hybridation des amorces ciblant l'opéron ribosomique des champignons.....	65
Figure 19 : Courbes d'amplification, de fusion (melting curve) et courbe standard des PCR en temps réel ciblant les ITS des <i>Fusarium</i>	68
Figure 20 : Courbes d'amplification, de fusion (melting curve) et courbe standard des PCR en temps réel ciblant les ARNr 16S des Actinobactéries.....	69
Figure 21 : Coloration de mycélium de <i>Fusarium solani</i> MM1 au FUN®1.....	72

Chapitre III-1: (Communautés fongiques dans les sols pollués *in situ*)

Tableau 12 : Characteristics of NM and TD soils at T0 and T9.....	83
Tableau 13 : Phylogeny of dominant fungal ribotypes.....	91
Figure 22 : Fungal 18 rRNA gene copy number determined by real-time PCR for the four treatments from Sept. 2005 (T0) to Sept 2010 (T10).....	87
Figure 23 : Structure of the fungal communities for the four treatments.....	88
Figure 24 : Shannon diversity indexes (H') estimated from TTGE profiles in the four treatments from Sept. 2005 (T0) to Sept. 2010 (T10).....	90
Figure 25 : Phylogenetic Neighbor Joining tree showing sequences of ribotypes.....	92
Figure 26 : Supplemental data: Structure of the fungal communities for the four treatments.....	98

Chapitre III-2 : (Isolement de souches microbiennes dissipant les HAP)

Tableau 14 : Identification des 22 souches fongiques isolées.....	105
Tableau 15 : Exemples de résultats de la littérature.....	110
Figure 27 : Démarche d'isolement des souches fongiques à partir du sol NM.....	103
Figure 28 : Photographies de colonies sur boîtes de milieu ME gélosé.....	104
Figure 29 : Halo de dégradation des HAP autour d'une colonie bactérienne.....	105
Figure 30 : Croissance des souches microbiennes après 14 jours de culture en présence de HAP, sans et avec glucose.....	106
Figure 31 : Pourcentage de PHE, PYR et DBA extraits des cultures microbiennes après 14 jours sans et avec glucose.....	107

Chapitre III-3: (Dissipation des Hap par *F. solani* et *A. oxydans* in vitro)

Tableau 16 : Percentage of residual PAHs after 14 days of axenic culture of <i>F. solani</i> and <i>A. oxydans</i> in liquid BSM compared to abiotic treatment.....	125
Tableau 17 : DNA extraction yields and 18S and 16S rRNA gene copy number, determined by real-time PCR, in 28 days-old <i>F. solani</i> axenic cultures and cocultures with <i>A. oxydans</i>	127
Figure 32 : Percentage of PHE, PYR, DBA and glucose recovery and microbial growth in pure culture of <i>F. solani</i> , <i>A. oxydans</i> and fungal-bacterial cocultures.....	126
Figure 33 : Epifluorescence microphotographs of <i>F. solani</i> in pure culture or in coculture with <i>A. oxydans</i> after 28 days with PAHs.....	128
Figure 34 : Distribution between biotransformed, absorbed and residual PAHs in 28-days old cultures of <i>F. solani</i> or cocultures of <i>F. solani</i> with <i>A. oxydans</i> , unbuffered or buffered to pH 6.8.....	129

Chapitre III-4 : (Dispositifs de culture stérile de luzerne)

Tableau 18 : Résultats des tests de sterilization des graines de luzerne.....	140
Tableau 19 : Nombre d'UFC fongiques et bactériennes par g de sable dans les pots non inoculés et inoculés respectivement par <i>F. solani</i> et <i>A. oxydans</i> et plantés avec de la luzerne.....	141
Figure 35 : Photographie et schéma du dispositif expérimental de cultures stérile de plantes après mise au point.....	139
Figure 36 : Biomasses de luzerne après 28 jours de culture en conditions non stériles.....	141
Figure 37 : Biomasses de luzerne après 28 jours de culture dans les dispositifs stériles.....	142
Figure 38 : Photographies de plantes de luzerne après 21 jours dans le dispositif de culture stérile.....	143
Figure 39 : Log du nombre d'UFC et de copies de gènes codant les ARNr 16S et 18S bactériens et fongiques par g de sable dans les dispositifs au temps initial (J0) et après 21 jours dans les dispositifs inoculés par <i>A. oxydans</i> et/ou <i>F. solani</i>	144
Figure 40 : Observations microscopiques de <i>F. solani</i> après 21 jours de culture dans les dispositifs stériles.....	145
Figure 41 : Teneurs en PHE, PYR et DBA dans le sable planté avec la luzerne au début de l'expérience et après 21 jours dans les dispositifs inoculés avec <i>F. solani</i> et/ou <i>A. oxydans</i> ou non inoculés.....	146
Figure 42 : Exemples de dispositifs expérimentaux de culture axénique/monoxénique de plantes.....	149

Chapitre III-5 : (Microcosmes de sol non stérile planté)

Tableau 20 : Synthèse des tests statistiques effectués sur les abondances relatives et absolues des différentes populations microbiennes.....	163
Tableau 21 : Identification des ribotypes bactériens majoritaires.....	165
Tableau 22 : Identifications des ribotypes d'Actinobactéries majoritaires.....	168
Figure 43 : Schéma des différentes étapes de la préparation des microcosmes de sol.....	157
Figure 44 : Biomasses aériennes et racinaires des luzernes après 46 jours de culture dans le mélange sol-sable pollué aux HAP et non inoculé ou inoculé avec <i>F. solani</i> et/ou <i>A. oxydans</i>	159

Figure 45 : Abondances absolues et relatives des différentes populations microbiennes, déterminées par PCR en temps réel, dans les pots non plantés ou plantés et non inoculés ou inoculés avec <i>F. solani</i> et/ou <i>A. oxydans</i>	162
Figure 46 : Indice de diversité de Shannon et ACP de la structure des communautés bactériennes dans les pots plantés et non plantés et non inoculés ou inoculés avec <i>F. solani</i> et/ou <i>A. oxydans</i>	165
Figure 47 : Gels de TTGE ciblant les gènes codant les ARNr 16S totaux dans les pots plantés et non plantés et non inoculés ou inoculés avec <i>F. solani</i> et/ou <i>A. oxydans</i>	166
Figure 48 : Gels de TTGE ciblant les gènes codant les ARNr 16S totaux dans les pots plantés et non plantés et non inoculés ou inoculés avec <i>F. solani</i> et/ou <i>A. oxydans</i>	167
Figure 49 : Indice de diversité de Shannon et ACP de la structure des communautés fongiques dans les pots plantés et non plantés et non inoculés ou inoculés avec <i>F. solani</i> et/ou <i>A. oxydans</i>	169
Figure 50 : Gels de TTGE ciblant les gènes codant les ARNr 18S totaux dans les pots plantés et non plantés et non inoculés ou inoculés avec <i>F. solani</i> et/ou <i>A. oxydans</i>	170
Figure 51 : Teneurs en PHE, PYR et DBA dans les pots plantés et non plantés et non inoculés ou inoculés avec <i>F. solani</i> et/ou <i>A. oxydans</i>	171

Chapitre IV : Discussion générale

Figure 52 : Schéma conceptuel illustrant l'effet des conditions expérimentales sur la dissipation des HAP par <i>F. solani</i> MM1 et <i>A. oxydans</i> Pyr2MsHM11, cultivées ensemble ou séparément.....	185
Figure 53 : Schéma conceptuel illustrant la dynamique de l'abondance et de la structure des communautés fongiques dans le sol NM historiquement multipollué aux HAP et aux ETM.....	187

Liste des Abréviations

ACE	Acénaphène
ACL	Acénaphylène
ACP	Analyse en Composantes Principales
ADEME	Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie
AH-R	Aryl hydrocarbon receptor
ANOVA	Analyse de la variance
ANT	Anthracène
ARNr	ARN ribosomique
ASE	Accelerated Solvent Extraction
BaA	Benzo(a)anthracène
BaP	Benzo(a)pyrène
BbF	Benzo(b)fluoranthène
BghiP	Dibenzo(g,h,i)pérylène
BkF	Benzo(k)fluoranthène
CE _x /CL _x	Concentrations inhibitrices/léthales pour x % des individus testés
CIVS	Cylindrical Intra-Vacuolar Structures
CHR	Chrysène
DBA	Dibenzo(a,h)anthracene
DCM	Dichlorométhane
EcM	Champignons ectomycorhiziens
ETM	Eléments en Traces Métalliques
FL	Fluorène
FLA	Fluoranthène
FSSC	<i>Fusarium solani</i> Species Complex
GISFI	Groupeement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles
GST	Gluthation-S-transférase
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HM	Heavy Metals
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IP	Indénol[1,2,3-c d]pyrène
LiP	Lignin-péroxydase
LME	Lignin-Modifying Enzymes
MnP	Manganèse-péroxydase
MOS	Matière Organique du Sol
NAP	Naphtalène
NM	Sol de Neuves-Maisons, anciennement multicontaminé aux HAP et ETM (+ « BS » : terre nue, « SV » : spontaneous vegetation, « Msm » : planté avec <i>Medicago sativa</i> et inoculé avec <i>Glomus</i>)
P450	Cytochrome P450
PAH	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

PCB	Polychlorobiphényles
PCR	Polymerase Chain Reaction
(PAH-RHD)	PAH-ring hydroxylating dioxygenase (sous-unités α ou β)
PHE	Phénanthrène
PYL	Pérylène
PYR	Pyrène
ROS	Reactive Oxygen Species (espèces réactives d'oxygène)
TD	Sol NM traité par désorption thermique (+ « Msm » : planté avec <i>Medicago sativa</i> et inoculé avec <i>Glomus</i>)
TTGE	Temporal Temperature Gradient Electrophoresis
UFC	Unité Formatrice de Colonie
US-EPA	Agence pour la Protection Environnementale Américaine
VOC	Volatile Organic Compounds
WRB	White-Rot Basidiomycètes

Introduction générale

Durant les deux derniers siècles, les activités anthropiques et notamment l'industrialisation des pays du Nord, puis des pays en voie de développement, ont conduit à une pollution massive des sols. En 2011, l'inventaire BASOL (basol.ecologie.gouv.fr), mis à disposition par le Ministère de l'Écologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement, recense 4 555 sites et sols pollués ou potentiellement pollués en France, dont 380 sites en région Lorraine. La quasi-totalité de ces derniers sont des friches industrielles, laissées à l'abandon à la cessation des activités industrielles, principalement liées à l'exploitation des mines de charbon (cokeries, fabrication de créosote et de gaz naturel) ou à l'utilisation du charbon dans des fours (cristalleries) ou hauts fourneaux (sidérurgie). En conséquence, les sols de ces friches sont particulièrement contaminés en hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), constituants naturels du charbon et formés par ailleurs lors de la combustion des matières organiques fossiles. De surcroît, ces friches présentent très souvent de fortes teneurs en éléments en traces métalliques (ETM), tels que le zinc, le cuivre, le plomb, le chrome, l'arsenic, le nickel et le cadmium. Dans ce contexte, le Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles (www.gisfi.fr), réunissant 12 laboratoires de recherche, dont le LIMOS, de disciplines scientifiques variées (science du sol, agronomie, génie des procédés, géosciences, écotoxicologie, chimie, psychologie sociale, santé humaine) a notamment pour objectif de comprendre les mécanismes qui contrôlent la dynamique des HAP dans les sols de friches industrielles.

Les HAP sont très persistants dans les sols, en raison de leurs caractéristiques physicochimiques. Leur faible solubilité, inversement proportionnelle à leur poids moléculaire, ainsi que leur tendance à être retenus par les particules de sol, les rendent d'autant moins biodisponibles que la pollution est ancienne (phénomène de vieillissement). Or, la biodisponibilité est un paramètre fondamental pour la biodégradation microbienne des HAP dans les sols. Si les bactéries sont plutôt connues pour dégrader les HAP de faibles poids moléculaires en les utilisant comme source de carbone, les champignons dégraderaient les HAP, y compris de poids moléculaires élevés, par cométabolisme. Cette complémentarité métabolique pourrait constituer un atout dans la mesure où les HAP sont souvent présents dans les friches industrielles sous forme de mélanges complexes. Néanmoins, les interactions microbiennes peuvent également inhiber les potentiels de dégradation des HAP, notamment dans le cas de compétition entre populations. Par ailleurs, les paramètres physico-chimiques des sols, et notamment leurs teneurs en polluants, sont susceptibles d'altérer, directement ou indirectement, la composition des communautés microbiennes. De plus, la présence de plantes peut influencer fortement la composition de ces communautés et conditionner la biodégradation des HAP dans la rhizosphère.

Le devenir des HAP dans les sols est donc contrôlé par les interactions complexes et dynamiques entre les HAP, le sol, les microorganismes et les plantes. Dans une perspective de compréhension de ces

interactions, les programmes INSU EC2CO MicrobiEn « Suivi in situ de la fonctionnalité biologique d'un sol contaminé par des HAP en présence ou non de plante » (2008-2010) et ANR MULTIPOLSITE « Etude *in situ* et à long terme du devenir et des conséquences environnementales de la multipollution d'un sol » (2007-2012) ont été initiés au sein du LIMOS avec des partenaires du GISFI. S'inscrivant dans le cadre de ces deux projets, mon travail de thèse a plus particulièrement porté sur l'étude du potentiel de dissipation des HAP de microorganismes telluriques seuls ou en interactions (axe *in vitro*) et sur la dynamique des communautés fongiques dans un sol multipollué aux HAP et ETM (axe *in situ*).

Le premier chapitre du présent manuscrit propose un état de l'art des travaux scientifiques concernant les HAP et leur devenir dans les sols, en lien avec la microflore tellurique et détaille les objectifs de la thèse. Le second chapitre présente les matériels et méthodes utilisés au cours du présent travail. Le troisième chapitre fait état des résultats obtenus au cours de ce travail et est articulé en cinq parties montrant les résultats et leur interprétation pour chacune des expérimentations. Enfin le quatrième chapitre est une discussion générale autour de l'ensemble des résultats obtenus lors de ce travail de thèse.

Chapitre I :

ÉTAT DE L'ART

ET

OBJECTIFS

L'état de l'art proposé présentera en premier lieu les caractéristiques physicochimiques et la toxicité des HAP (§ 1) ainsi que le métabolisme microbien de la dégradation de ces polluants (§ 2). L'attention sera ensuite portée sur le devenir des HAP dans les sols (§ 3), plus particulièrement sur l'effet des processus abiotiques (§ 3.1) et des interactions entre HAP et microorganismes (§ 3.2 et 3.3), ainsi que sur l'influence des plantes (§ 4). Enfin, les techniques de bioremédiation des HAP seront présentées (§ 5).

1. Caractéristiques générales des HAP

1.1. Caractéristiques physico-chimiques des HAP

Les HAP sont des composés polyaromatiques constitués d'au moins deux cycles benzéniques fusionnés. Toutes les combinaisons de nombre et d'arrangement des cycles aromatiques sont théoriquement possibles, le nombre d'isomères augmentant logiquement avec le nombre de cycles. A l'état pur, les HAP sont solides, de forme cristalline légèrement colorée. Les propriétés physicochimiques des HAP varient selon leur masse moléculaire, le nombre et l'arrangement des cycles aromatiques (Tableau 1).

L'Agence pour la Protection Environnementale américaine (US-EPA) a défini dès 1976 une liste de 16 HAP (Tableau 1) considérés comme polluants prioritaires, sur la base de leur occurrence, de leur persistance dans l'environnement et de leur toxicité, avérée ou suspectée (voir § 1.3.). Par ailleurs, la Directive Cadre sur l'eau de la Commission Européenne (Directive 2000/60/EC) a défini des seuils de concentrations acceptables pour 8 HAP (NAP, ANT, FLA, BbF, BkF, BaP, IP et BghiP) dans les eaux. Toutefois ces seuils n'ont pas été définis en ce qui concerne les sols.

Comme le montre le Tableau 1, la solubilité dans l'eau et la pression de vapeur saturante (caractérisant la volatilité) des HAP sont inversement proportionnelles à leur nombre de cycles et leur poids moléculaire, tandis que leur coefficient de partage octanol/eau (caractérisant l'hydrophobicité) augmente avec ceux-ci.

1.2. Origine des HAP

Les HAP peuvent être classés en trois groupes, présentant des empreintes caractéristiques, selon leurs sources (Wilcke, 2000; Puy-Azurmendi et al., 2010; Essien et al., 2011; Park et al., 2011). La majorité des HAP provient de sources pyrolytiques, c'est-à-dire de la combustion de matière organique, de l'activité industrielle ou des incendies naturels. Ces événements conduisent à la création de mélanges complexes de HAP, caractérisés par une abondance relative très élevée des composés HAP parentaux par rapport aux HAP alkylés dérivés. Le second groupe provient de sources dites pétrogéniques, les HAP faisant partie des hydrocarbures des pétroles, naturellement présents ou déversés par l'homme dans l'environnement. Les mélanges de HAP d'origine pétrogénique présentent de fortes proportions de

HAP alkylés. Enfin, les HAP peuvent être d'origine diagénétique, issus de la transformation naturelle de précurseurs aromatiques. Les mélanges de HAP ainsi formés sont alors généralement très peu diversifiés par rapport aux mélanges issus des autres sources (Essien et al., 2011).

HAP	Ab.	Formule	M (g.mol ⁻¹)	Sol. (mg.l ⁻¹)	log Kow	Vol. (Pa)
naphtalène	NAP		128,2	31	3,4	36,8
acénaphthylène	ACL		152,2	16,6	4	4,14
acénaphthène	ACE		154,2	3,8	3,9	1,52
fluorène	FL		166,2	1,9	4,2	0,715
phénanthrène	PHE		178,2	1,1	4,6	0,113
anthracène	ANT		178,2	0,05	4,5	0,078
fluoranthène	FLA		202,3	0,26	5,2	8,7.10 ⁻³
pyrène	PYR		202,3	0,13	5,2	0,012
benzo(a)anthracène	BaA		228,3	0,01	5,9	6,1.10 ⁻⁴
chrysène	CHR		228,3	0,002	5,6	8,4.10 ⁻⁷
benzo(b)fluoranthène	BbF		252,3	0,002	5,8	6,7.10 ⁻⁵
benzo(k)fluoranthène	BkF		252,3	0,001	6	4,2.10 ⁻⁶
benzo(a)pyrène	BaP		252,3	0,004	6	2,3.10 ⁻⁵
dibenzo(a,h)anthracène	DBA		278,4	0,0006	6,8	9,2.10 ⁻⁸
indénol[1,2,3-c d]pyrène	IP		276,3	0,062	6,6	1,3.10 ⁻⁸
dibenzo(g,h,i)pérylène	BghiP		268,4	0,0003	6,5	2,2.10 ⁻⁵

Tableau 1. Propriétés physicochimiques des 16 HAP prioritaires de l'US-EPA, d'après MacKay et al. (1992). Ab.: abréviation, M. : masse molaire, Sol.: solubilité dans l'eau à 25°C, log Kow: coefficient de partage octanol/eau, Vol.: pression de vapeur saturante (volatilité).

Il est donc possible de déterminer les origines d'une pollution aux HAP en étudiant les rapports des teneurs en différents HAP et dérivés. Puy-Azurmendi et al. (2010) admettent par exemple que, en théorie, un mélange de HAP d'origine pétrogénique présente des ratios PHE/ANT>50, FL/PYR<1 et BaA/CHR<1, alors que ces mêmes ratios pour un mélange d'origine pyrolytique sont respectivement <10, >1 et >1. Naturellement, identifier la source d'une pollution aux HAP dans un sol ou un sédiment n'est pas toujours aussi simple en pratique, dans la mesure où l'origine de cette pollution peut être mixte, pyrolytique et pétrogénique par exemple (Puy-Azurmendi et al., 2010; Essien et al., 2011).

De nombreuses activités anthropiques conduisent à l'introduction de HAP dans l'atmosphère, les eaux, les sols et les sédiments. Le rapport de 2011 du Centre Interprofessionnel d'Etude de la Pollution Atmosphérique (CITEPA) mentionne une baisse d'environ 50% depuis les années 90 des émissions atmosphériques de HAP, résultant en très grande majorité de la combustion de matière organique notamment pour le chauffage domestique (Fig. 1).

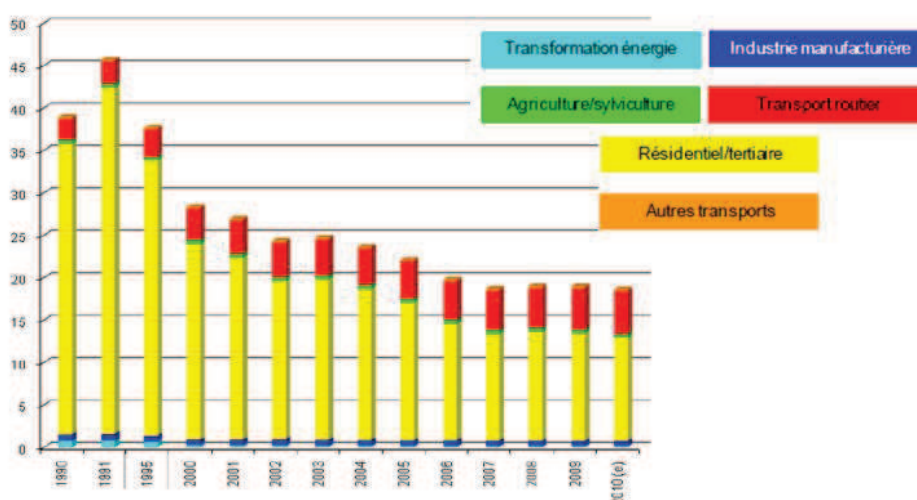


Figure 1. Nombre de tonnes de HAP (BaP, BbF, BkF et Indéno-1,2,3 cd-pyrène) introduits dans l'atmosphère par année en France (Rapport CITEPA 2011).

La majorité des HAP présents dans les sols et les eaux peut être attribuée aux dépôts atmosphériques (Wilcke, 2000), le reste provenant des activités industrielles, présentes et passées. Les secteurs industriels principalement impliqués sont la métallurgie (aluminerie, sidérurgie) *via* la combustion de charbon dans les hauts-fourneaux, la raffinerie pétrolière et la cokerie (production de coke par distillation de la houille) (Biache et al., 2008). L'application de créosote, huile extraite de goudron de houille pouvant contenir jusqu'à 85% de HAP, sur les poteaux téléphoniques et traverses des voies ferrées pour la conservation du bois, a également conduit à l'introduction massive de HAP dans les sols (Allard et al., 2000). Par ailleurs, les sols des friches industrielles présentent très souvent une multi-pollution aux hydrocarbures et aux ETM (Sandrin & Maier, 2003; Amezcua-Allieri et al., 2005; Vivas et al., 2008; Cébron et al., 2009). A titre d'exemple, le sol de la friche industrielle de Homécourt (Meurthe-

et-Moselle), sur lequel la cokerie a été en activité pendant 60 ans, présente des teneurs en HAP supérieures à 3 000 mg.kg⁻¹, dont les deux tiers sont des HAP à plus de 4 cycles, ainsi que des concentrations en cuivre, zinc et plomb de respectivement 28, 369 et 128 mg.kg⁻¹ (Norini, 2007). Le sol de l'ancienne cokerie-acière de Neuves-Maisons utilisé dans ce travail est également hautement pollué aux HAP (plus de 1 200 mg.kg⁻¹) et contient de très grandes quantités de cuivre (131 mg.kg⁻¹), de chrome (599 mg.kg⁻¹), de plomb (482 mg.kg⁻¹) et de zinc (2 085 mg.kg⁻¹) (Chapitre II-1).

1.3. Toxicité des HAP

1.3.1. Toxicité des HAP à l'échelle de l'organisme

Les animaux, dont l'homme, sont susceptibles d'être exposés aux HAP via l'alimentation (voir § 1.3.2.), la pollution atmosphérique ou l'ingestion de particules de sol contaminé (pour l'homme, cette dernière voie concerne plus particulièrement les enfants en bas âge) (Vaughan, 1983). La toxicité des HAP chez les animaux, notamment du HAP modèle BaP, mise en évidence par une grande variété de tests *in vitro* et *in vivo*, peut prendre différentes formes :

- Reprotoxicité : L'exposition chronique ou aiguë de rongeurs au BaP a conduit à des pertes, pouvant s'élever à 50%, du nombre de follicules ovariens primordiaux (Hoyer, 2001).
- Mutagénicité/Génotoxicité : La mutagénicité de la pollution atmosphérique a pu être corrélée avec ses teneurs en HAP et nitro-HAP, produits de réactions entre les HAP et les oxydes d'azote atmosphériques (de Kok et al., 2006).
- Immunotoxicité : L'effet des HAP sur l'immunité innée et spécifique des vertébrés, notamment par l'inhibition de la phagocytose et l'induction de l'apoptose des lymphocytes et phagocytes, a été démontré (Reynaud & Deschaux, 2006).
- Cancérogénicité, liée au caractère génotoxique des HAP (Conney, 1982).

Chez les plantes, les HAP d'origine atmosphérique sont susceptibles d'être adsorbés et d'être internalisés dans les parties aériennes (notamment les stomates) (Oguntimehin et al., 2008). Les HAP présents dans le sol peuvent être adsorbés et/ou absorbés dans les racines et transportés vers les parties aériennes (Binet et al., 2000; Samsoe-Petersen et al., 2002). La toxicité des HAP se manifeste alors sous la forme d'inhibition de la germination, de la croissance et de l'activité photosynthétique (Tukaj & Aksmann, 2007; Debiane et al., 2008; Oguntimehin et al., 2008).

Le récepteur intracellulaire AH-R (aryl hydrocarbon receptor) est connu pour être le récepteur des HAP impliqué dans l'activation du cytochrome P450 complexe enzymatique impliqué dans la détoxification

(voir § 2.2.2.)(Reynaud & Deschaux, 2006; Puy-Azurmendi et al., 2010; Essien et al., 2011). Ce récepteur réside dans le cytoplasme sous la forme d'une macromolécule complexe associée à une heat-shock protein HSP90 (Fig. 2). Après liaison avec un ligand « dioxin-like », comme un HAP, le récepteur activé est transloqué vers le noyau où il induit la transcription des gènes de réponse au stress xénobiotique. Le niveau d'activité du régulateur AH-R peut donc être utilisé pour évaluer la toxicité d'un sol, d'un sédiment ou d'une eau. Ainsi, en utilisant une souche de levure exprimant le récepteur AH-R humain et contenant un gène rapporteur de l'activation par ce régulateur, Puy-Azurmendi et al. (2010) ont montré de fortes corrélations entre le niveau d'activation de AH-R et les teneurs en PHE et BaA et BbF dans un sédiment.

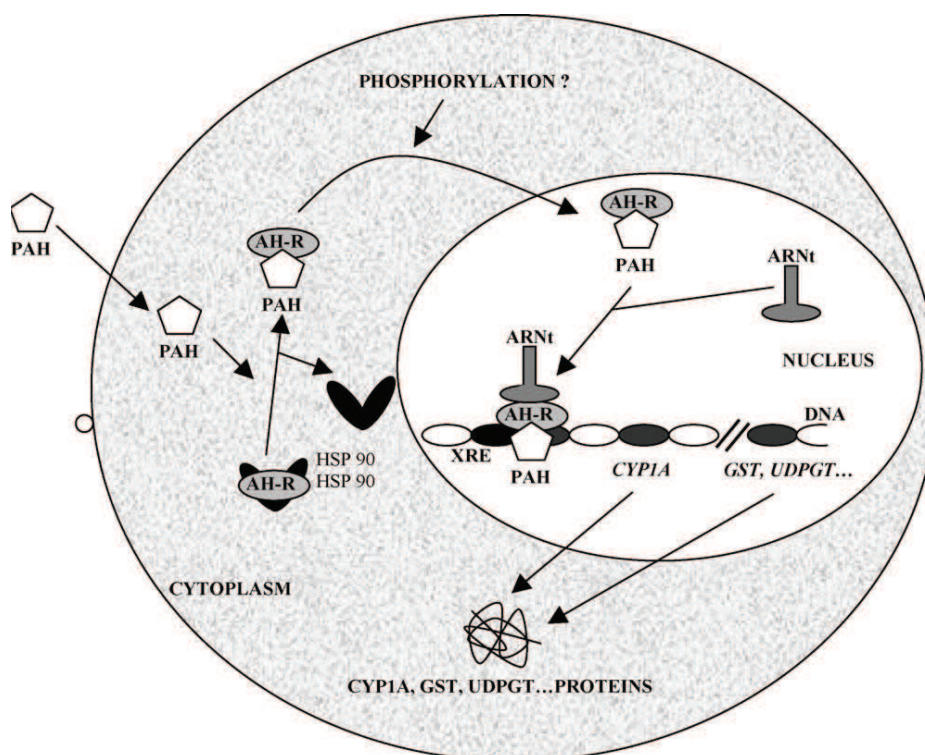


Figure 2. Mécanisme de l'induction du cytochrome P450 chez le poisson, d'après Reynaud et al. (2006). AH-R : aryl hydrocarbon receptor, HSP90 : heat-shock protein 90, ARNt : AhR nuclear translocator, XRE : xenobiotic response elements, CYP1A : gene codant la cytochrome P4501A mono-oxygénase, GST: Glutathion-S-Transférase, UDPTG: UDP-glucuronosyl-transférase.

La toxicité des HAP est indirecte, résultant de leur activation par les systèmes enzymatiques de détoxification communs à toutes les cellules vivantes : le cytochrome P450 et ses mono-oxygénases, l'époxyde hydrolase (EH) et la glutathion-S-transférase (GST) (Shimada, 2006). Ces enzymes catalysent la transformation des HAP en dérivés plus polaires hautement réactifs, époxydes, cétones et quinones, présentant une plus grande solubilité donc une accessibilité plus élevée aux cibles cellulaires.

De nombreuses études, à l'échelle de la cellule comme à celle de l'organisme, ont révélé que les dérivés des HAP étaient souvent aussi toxiques voire plus que les composés parentaux (El-Alawi et al., 2002; Bekki et al., 2009). Par exemple, la cytotoxicité de l'anthraquinone sur les cellules humaines HaCaT et les lymphocytes A3 est équivalente, à concentrations égales, à celle de l'ANT (Hu et al., 2009). El-Alawi et al. (2002) ont montré que la CE₅₀ (concentration effective pour 50% d'inhibition) du PHE était 7 fois plus élevée que celle de la quinone correspondante après 20 heures d'exposition, en utilisant comme indicateur de toxicité l'inhibition de croissance et de l'émission de luminescence par la bactérie *Vibrio fischeri* (Test Microtox). Par ailleurs, dans cette même étude, les auteurs ont démontré une absence de toxicité de l'ACE à l'obscurité alors que le composé était toxique (CE₅₀ = 5 mg.L⁻¹) à la lumière. Ce phénomène est connu sous le terme de toxicité photo-induite et résulte notamment de la photomodification des HAP sous la forme d'oxy-HAP, également plus toxiques que les composés parentaux.

1.3.2. Ecotoxicité des HAP

De nombreux indicateurs biologiques (bioindicateurs) sont utilisés, combinés ou séparément, pour évaluer l'écotoxicité des HAP. Leur utilisation est standardisée par une série de normes, au niveau national par l'Agence Française de Normalisation (AFNOR, www.afnor.org) et international par l'Organisation Internationale de Standardisation (ISO, www.iso.org) et l'Organisation pour la Coopération et le Développement Economiques (OCDE, www.oecd.org). Actuellement, un programme de recherche (Bioindicateurs II, 2009-2012) de l'Agence De l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie (ADEME, www2.ademe.fr) est en cours afin de choisir des batteries de bioindicateurs fiables pour estimer et suivre la qualité des sols. Ces bioindicateurs sont dits d'impact (subissant des modifications morphologiques, histologiques ou cellulaires) ou d'accumulation (voir plus loin).

Certains tests d'écotoxicité, sur plantes et vers de terre notamment, sont réalisés en utilisant différentes dilutions du sol à tester dans un sol « neutre », tandis que les tests sur organismes aquatiques et microorganismes sont plutôt réalisés avec des extraits aqueux de sols contaminés, représentant la fraction biodisponible des HAP (voir § 3.3.2) (Joner et al., 2004; D'Annibale et al., 2005; Eom et al., 2007; Kim & Lee, 2007; Anastasi et al., 2009). Joner et al. (2004) par exemple, ont évalué l'écotoxicité d'un sol pollué au créosote au cours d'un traitement de dépollution par phytoremédiation, avec une combinaison de tests sur bactéries (Microtox, voir paragraphe précédent), sur algues (mesure de l'inhibition de la croissance) et sur des ostracodes, microarthropodes aquatiques (Ostracod Tox Kit F™, mesure de la croissance et de la mortalité). Dans cette expérience, l'inhibition de l'émission de fluorescence par les bactéries bioluminescentes et l'inhibition de la croissance des ostracodes diminuaient en corrélation avec l'abaissement de la teneur en HAP dans le sol, au contraire de la survie des ostracodes et de la croissance algale. De la même manière, Eom et al. (2007) ont évalué l'écotoxicité d'un sol pollué aux HAP en utilisant comme indicateurs la reproduction et la mortalité de

daphnies, de collemboles et de vers de terre, ainsi que la germination et la croissance de la laitue et montré que les CE_{50} et CL_{50} (concentration létale pour 50% des individus testés) étaient très différentes d'un bioindicateur à l'autre. Ces résultats révèlent l'importance du choix de bioindicateurs pertinents et non redondants dans les tests d'écotoxicité.

Par ailleurs, de nombreux travaux ont porté sur l'effet des HAP sur les communautés microbiennes des sols, comme il est développé au paragraphe 3.2.2. Cébron et al. (2011a) ont évalué l'évolution d'un grand nombre de bioindicateurs potentiels de la qualité des sols dans un sol contaminé aux HAP et ETM et le même sol traité par désorption thermique et montré que l'abondance et la diversité des champignons et des bactéries pouvaient être des indicateurs pertinents. Les perturbations des communautés microbiennes pourraient donc être utilisées comme bioindicateurs, bien que les méthodes d'évaluation soient encore loin d'être normalisées (voir § 3.2.1).

D'autres indices que la CE ou la CL peuvent être utilisés pour exprimer l'écotoxicité d'un sol ou d'un sédiment. L'ERL (Effect Range Low) et l'ERM (Effect Range Medium) sont les limites d'une gamme de teneurs auxquelles un polluant est probablement toxique (Long et al., 1995). Schwartz (1999) a évalué la TEC (Threshold Effect Concentration) en dessous de laquelle les effets sont improbables, la MEC (Median Effect Concentration), concentration à laquelle des effets peuvent être observés et la PEC (Probable Effect Concentration), teneur à laquelle les effets sont probables, de différents hydrocarbures polyaromatiques dans des sédiments.

Les HAP accumulés dans les végétaux et les petits animaux peuvent être transférés le long de la chaîne trophique, phénomène connu sous le nom de bioaccumulation (Vaughan, 1983). Or, en raison de leur forte hydrophobicité, les HAP sont susceptibles d'être accumulés par les organismes aquatiques et terrestres, proportionnellement à leurs teneurs en lipides (Samsoe-Petersen et al., 2002; Oguntimehin et al., 2008; Patrolecco et al., 2010; Puy-Azurmendi et al., 2010; Ong et al., 2011; Wang et al., 2011). Par exemple, Ong et al. (2011) ont montré que l'ANT pouvait être accumulé dans les tissus de la crevette, pouvant atteindre des teneurs de plus de $170 \mu\text{g.kg}^{-1}$ en 5 jours et que cette accumulation était fortement corrélée ($r^2=0,99$) à l'exposition au HAP. Par ailleurs, le taux de photooxydation de HAP adsorbés à la surface d'aiguilles de pin est plus faible que dans l'eau, suggérant que la cire végétale est susceptible de stabiliser les HAP qui pourraient ainsi s'accumuler sur les végétaux (Oguntimehin et al., 2008; Wang et al., 2011).

2. Biodégradation des HAP par les microorganismes

Une vue d'ensemble des mécanismes moléculaires impliqués dans la biodégradation des HAP par les microorganismes est essentielle à la compréhension de l'implication des interactions écologiques dans les sols dans cette biodégradation. Plusieurs revues de synthèse existent sur le sujet (Cerniglia, 1997; Juhasz & Naidu, 2000; Rabinovich et al., 2004; Peng et al., 2008). Bactéries, champignons et algues

unicellulaires sont capables de dégrader les HAP. Néanmoins, comme ces dernières ne sont pas ou peu représentées dans le compartiment tellurique, cette section présentera uniquement les mécanismes connus de la dégradation bactérienne et fongique.

2.1. Dégradation des HAP par les bactéries

2.1.1. Voies métaboliques de la dégradation des HAP par les bactéries

2.1.1.1. En aérobiose

De nombreuses souches de bactéries sont connues pour leur capacité à dégrader les HAP et leurs appartenances taxonomiques sont très diverses, des Protéobactéries (parmi les plus étudiées, on trouve des bactéries appartenant aux genres *Sphingomonas*, *Pseudomonas* et *Burkholderia*) (Deziel et al., 1996; Foght & Westlake, 1996; Ye et al., 1996; Kang et al., 2003) aux Firmicutes (*Bacillus* principalement) (Su et al., 2006; Zhao et al., 2011) et aux Actinobactéries (*Arthrobacter*, *Mycobacterium*, ...) (Seo et al., 2006; Kallimanis et al., 2007; Jacques et al., 2008; Kim et al., 2008). Très souvent, ces bactéries sont capables de croissance sur un ou des HAP comme seule source de carbone, indiquant des mécanismes de métabolisme plutôt que de cométabolisme (Peng et al., 2008). Si la plupart du temps ces capacités concernent des HAP de faible poids moléculaire (NAP, PHE, ANT), certaines bactéries, comme l'Actinobactérie *Mycobacterium*, dégradent des HAP plus lourds, tels que le PYR ou le BaP (Juhasz & Naidu, 2000; Kim et al., 2005).

La sécrétion vers le milieu extracellulaire d'enzymes dégradant les HAP n'ayant pas été montrée chez les bactéries jusqu'à présent, il est admis que la dégradation bactérienne des HAP a lieu dans le compartiment intracellulaire. Cependant, il existe très peu de données sur les mécanismes d'internalisation des HAP par les bactéries et elles sont souvent contradictoires. Kallimanis et al. (2007) ont montré que l'absorption du phénanthrène par la bactérie *Arthrobacter* sp. Sphe3 était un phénomène actif induit par l'absence d'une autre source de carbone, le même type de résultats ayant antérieurement été observé chez *Mycobacterium* sp. (Miyata et al., 2004). Par ailleurs, dans cette même étude, les auteurs ont observé des modifications de la composition lipidique de la membrane de la bactérie, qui pourraient avoir altéré sa fluidité et sa perméabilité, notamment aux HAP. En revanche, Bugg et al. (2000) ont montré que l'internalisation des HAP par *Pseudomonas fluorescens* était un mécanisme passif alors que leur efflux vers le milieu extracellulaire impliquait un système de transport actif.

En aérobiose, le catabolisme des HAP par les bactéries peut être décomposé en deux grandes étapes : la voie haute (« Upper »), depuis le HAP parent jusqu'à l'acide carboxylique dérivé, suivie de la voie basse (« Lower ») (Habe & Omori, 2003).

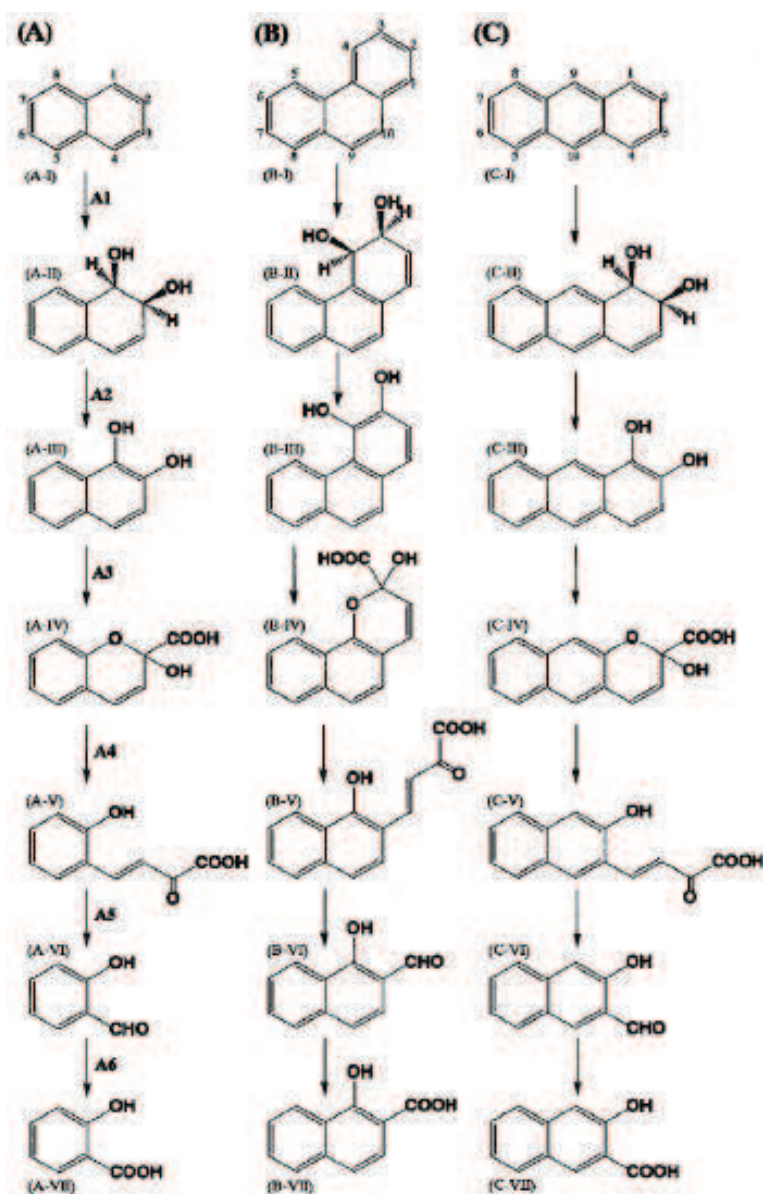


Figure 3. Voies métaboliques hautes proposées pour la dégradation du NAP (A), du PHE (B) et de l'ANT (C) par les bactéries, d'après Habe & Omori (2003). Les composés sont : A-I : NAP, A-II : cis-naphtalène dihydrodiol, A-III : 1,2-dihydroxynaphtalène, A-IV : acide 2-hydroxy-2H-chromène-2-carboxylique, A-V : acide trans-o-hydroxybenzylidene-pyruvique, A-VI : salicyl-aldéhyde, A-VII : acide salicylique, B-I : PHE, B-II : cis-3,4-dihydroxy-3,4-dihydro-phenanthrene, B-III : 3,4-dihydroxyphenanthrène, B-IV : acide 2-hydroxy-2H-benzo(h)chromène-carboxylique, B-V : acide trans-4-(1-hydroxynaph-2-yl)-2-oxobut-3-énoïque, B-VI : 1-hydroxy-2-naphtoaldéhyde, B-VII : acide 1-hydroxy-2-naphtoïque, C-I : ANT, C-II : cis-1,2-dihydroxy-1,2-dihydroanthracène, C-III : 1,2-dihydroxyanthracène, C-IV : acide 2-hydroxy-2H-benzo(f)chromène-2-carboxylique, C-V : acide trans-4-(2-hydroxynaph-3-yl)-2-oxobut-3-énoïque C-VI : 2-hydroxy-3-naphtoaldéhyde et C-VII : acide 2-hydroxy-3-naphtoïque. Les enzymes impliquées sont (nom des enzymes chez *Pseudomonas* pour la voie de dégradation du naphtalène) : A1 : dioxygénase (NahA ou NDO pour la naphtalène dioxygénase chez les bactéries à Gram négatif), A2 : déshydrogénase (NahB), A3 : dioxygénase (NahC), A4 : isomérase (NahD), A5 : hydratase-aldolase (NahE), déshydrogénase (NahF).

- Voie haute :

La dégradation débute par l'ouverture d'un cycle par l'ajout d'un atome d'oxygène. Cette étape est catalysée par une « PAH-ring hydroxylating dioxygenase » ou (PAH-RHD) (voir § 2.1.2) et aboutit à la formation de *cis*-dihydrodiol (Habe & Omori, 2003; Peng et al., 2008). Le cycle est ensuite ré-aromatisé par une déshydrogénase pour former un intermédiaire di-hydroxyle transformé par une cascade enzymatique en acide carboxylique (Fig. 3). Lorsque le HAP présente un nombre de cycles plus important, plusieurs voies de dégradation existent, menant à différents intermédiaires métaboliques possibles, dont certains sont non dégradables, comme présenté par exemple pour le BaP (Fig. 4) (Juhász & Naidu, 2000).

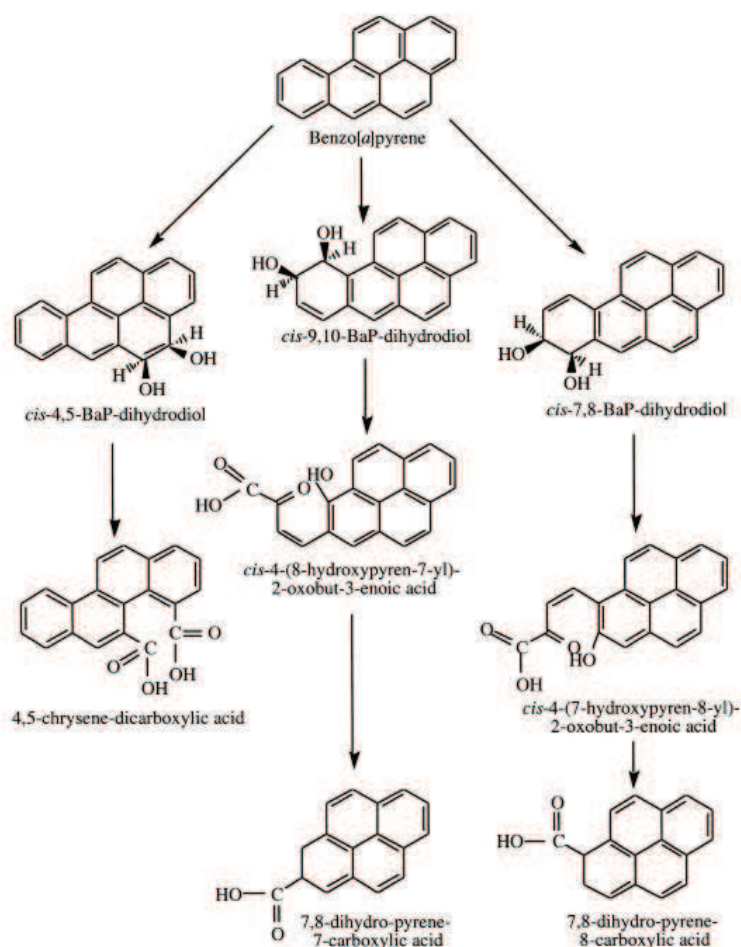


Figure 4. Voie métabolique haute proposée pour la dégradation du BaP par les bactéries, selon Juhász & Naidu (2000).

- Voie basse :

Dans la voie basse, l'acide carboxylique issu de la voie haute de dégradation du HAP (par exemple, l'acide salicylique pour le NAP) est ensuite transformé en catéchol, dont le cycle aromatique est clivé par une catéchol-dioxygénase selon la voie dite « méta » (catéchol-2,3-dioxygénase) ou la voie dite « ortho » (catéchol-1,2-dioxygénase) (Civilini et al., 1999; Habe & Omori, 2003; Peng et al., 2008). Les

cascades métaboliques subséquentes aboutissent à la formation de pyruvate, succinyl-CoA et acétyl-CoA, entrant dans le cycle de Krebs (Fig. 5). S'il existe peu d'information détaillant la voie basse pour les HAP de poids moléculaires plus élevés que le PHE (Peng et al., 2008), il est très probable que les enzymes et métabolites soient similaires ou même rejoignent les voies décrites pour les HAP de faible poids moléculaires.

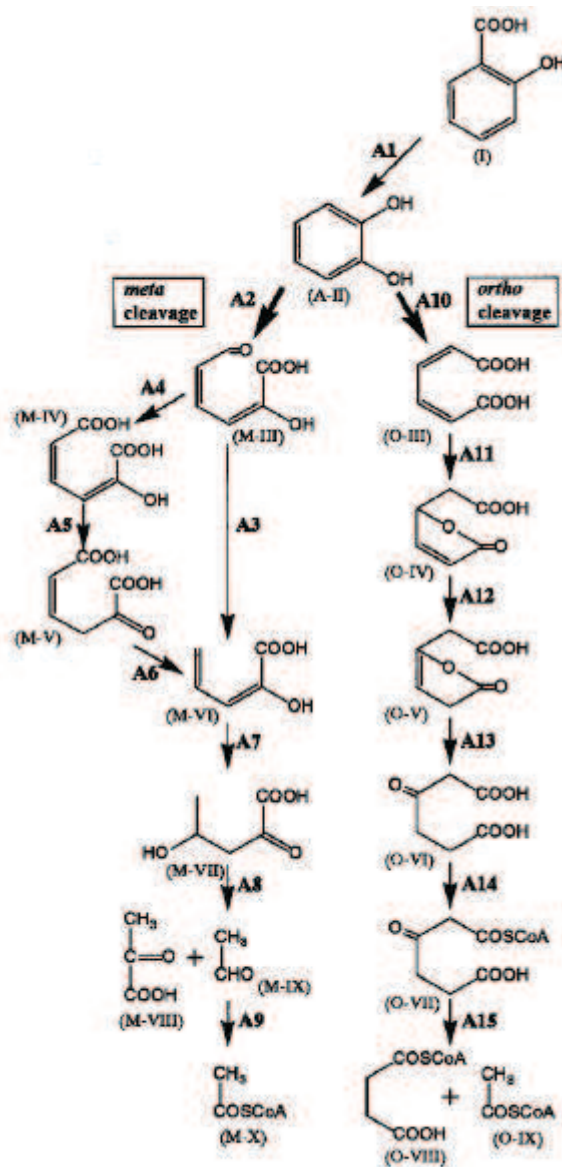


Figure 5. Voies métaboliques basses proposées pour la dégradation du NAP, du PHE et de l'ANT, d'après Habe & Omori (2003). Les composés sont : I : acide salicylique, A-II : catéchol, M-III : semialdéhyde 2-hydroxymuconique, M-IV : acide 2-hydroxymuconique, M-V : acide 4-oxalocrotonique, M-VI : acide 2-oxo-4-penténoïque, M-VII : acide 4-hydroxy-2-oxovalérique, M-VIII : acide pyruvique, M-IX : acétaldéhyde, M-X : acétyl-CoA, O-III : acide cis-cis-muconique, O-IV : muconolactone, O-V : acide β-kéoadipate-énol-lactone, O-VI : acide β-kéoadipique, O-VII : β-kéoadipyl-CoA, O-VIII : succinyl-CoA. Les enzymes impliquées sont (nom des enzymes chez *Pseudomonas* pour la voie de dégradation du naphthalène) : A1 : hydrolase (NahG), A2 : une catéchol-dioxygénase (NahH), A3 : hydrolase (NahN), A4 : déshydrogénase (NahI), A5 : isomérase (NahJ), A6 : décarbocylase (NahK), A7 : hydratase (NahL), A8 : aldolase (NahM), A9 : déshydrogénase (NahO), A10 : catéchol-dioxygénase, A11 : lactonase, A12 : isomérase, A13 : hydrolase, A14 : CoA transférase, A15 : thiolase.

Les gènes codant pour les enzymes de dégradation impliquées dans la voie haute sont bien étudiés, en particulier les gènes dits *nah*-like, codant les dioxygénases (PAH-RHD), identifiés en premier lieu chez la souche modèle *Pseudomonas putida* G7 (Habe & Omori, 2003). Ces gènes sont organisés en opérons et souvent portés par des plasmides, tels que les NAH-plasmids modèles de *P. putida* (Habe & Omori, 2003; Johnsen et al., 2005; Obayori & Salam, 2010). Ces plasmides peuvent être échangés par conjugaison, y compris dans les sols, et les gènes codant pour la dégradation des HAP sont donc susceptibles d'être transférés horizontalement (Akhmetov et al., 2008). L'importance du transfert horizontal de gènes dans l'apparition et l'évolution de nouvelles voies cataboliques face à une pression de sélection imposée par l'introduction massive d'un polluant est reconnue (Obayori & Salam, 2010). De plus, les opérons cataboliques sont souvent entourés de séquences d'insertion (IS) et/ou de transposons (Van der Meer et al., 1992; Foght & Westlake, 1996). Les gènes sont ainsi susceptibles d'être échangés entre chromosome et plasmide, augmentant encore la plasticité des marqueurs génétiques de la dégradation des HAP, garante d'une adaptation rapide à la pollution.

Brezna et al. (2006) ont identifié chez *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 trois gènes codant pour des cytochrome P450 mono-oxygénases (*cyp51*, *cyp150* et *cyp151*), enzymes capables de métaboliser le PYR en pyrène-oxyde et hydroxy-pyrène. Selon les auteurs, les membres du genre *Mycobacterium* sont les premiers organismes chez qui la présence concomitante de dioxygénases et de mono-oxygénases capables d'oxyder les HAP a pu être prouvée. De fait, il n'existe à notre connaissance pas d'autres études concernant l'implication des cytochrome P450 mono-oxygénases dans la dégradation des HAP chez des bactéries.

2.1.1.2. En anaérobiose

En absence d'oxygène, d'autres accepteurs finaux d'électrons, notamment le fer(III), le sulfate, le manganèse et le nitrate sont utilisés par les bactéries pour l'oxydation des HAP (Meckenstock & Mouttaki, 2011). Le verrou majeur à l'observation des mécanismes moléculaires de l'oxydation anaérobie des HAP sur des souches modèles reste leur temps de génération très long, qui peut s'étendre à plusieurs semaines, voire plusieurs mois. La plupart des données existantes résultent donc d'expériences réalisées en microcosmes sur des sédiments ou des consortia bactériens et non sur des cultures pures (Coates et al., 1997; Zhang & Young, 1997; Safinowski et al., 2006; Davidova et al., 2007; Selesi et al., 2010). Les membres des consortia étudiés pour l'oxydation des HAP en conditions sulfato-réductrices appartiennent aux δ -Protéobactéries, proches de la famille des *Desulfobacteriaceae* et *Spirochaetes* (Davidova et al., 2007; Selesi et al., 2010; Meckenstock & Mouttaki, 2011). Par ailleurs, Rockne et al. (2000) ont isolé 2 souches bactériennes à partir de sédiments contaminés aux HAP, capables d'oxyder le NAP en anaérobiose en conditions nitrate-réductrices, appartenant aux genres *Pseudomonas* et *Vibrio*.

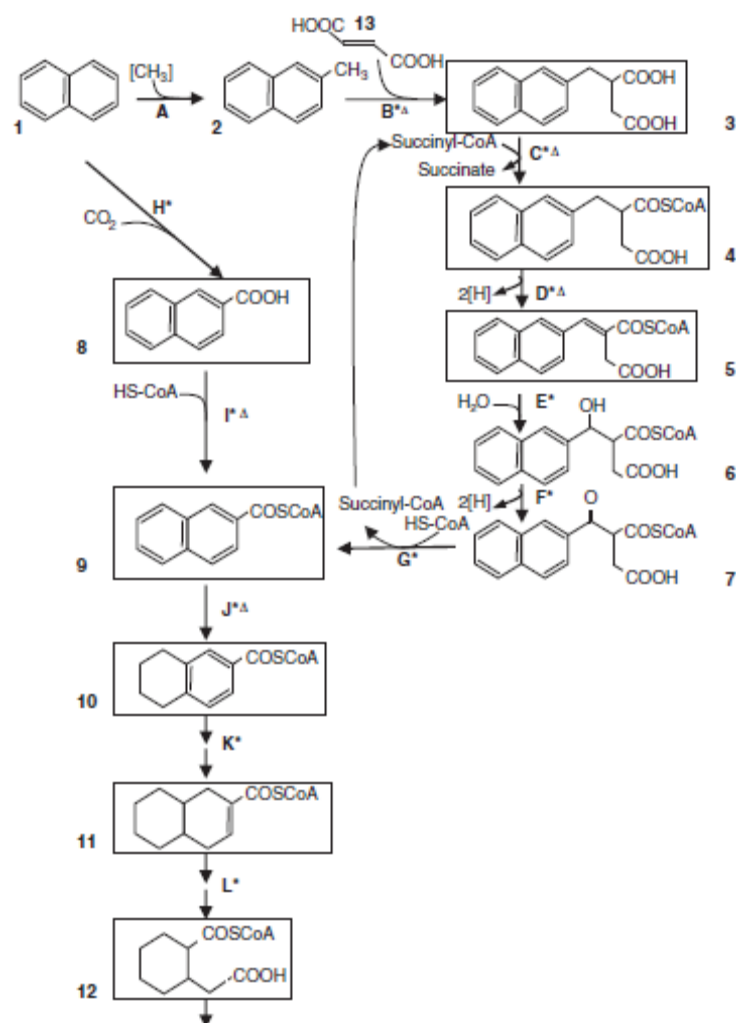


Figure 6. Voies métaboliques anaérobies proposées pour la dégradation du NAP et du 2-méthylnaphtalène en conditions sulfato-réductrices, d'après Meckenstock et Mouttaki (2011). (1) naphthalène, (2) 2-méthylnaphtalène, (3) naphthyl-2-méthyl-succinic acid, (4) naphthyl-2-méthyl-succinyl-CoA, (5) naphthyl-2-méthylène-succinyl-CoA, (6) naphthyl-2-hydroxyméthyl-succinyl-CoA, (7) naphthyl-2-oxométhyl-succinyl-CoA, (8) acides naphthoïque, (9) 2-naphthoyl-CoA, (10) 5,6,7,8-tetrahydro-2-naphthoyl-CoA, (11) octahydro-2-naphthoyl-CoA, (12) cis-2-carboxycyclo-hexylacétyl-CoA, (13) fumarate. Les enzymes impliquées sont les suivantes : G, naphthalène carboxylase, H, naphthoyl-CoA ligase, (A) naphthalène méthyl-transferase, (B) naphthyl-2-méthylsuccinylsynthase, (C) naphthyl-2-méthyl-succinyl-CoA transférase, (D) naphthyl-2-méthyl-succinyl-CoA dehydrogénase, (E) naphthyl-2-méthylènesuccinyl-CoA hydratase, (F) naphthyl-2-hydroxyméthyl-succinyl-CoA dehydrogénase, (G) naphthyl-2-oxométhyl-succinyl-CoA thiolase, (H) naphthoate-carboxylase, (I) naphthoyl-CoA ligase, (J and K) 2-naphthoyl-CoA réductase, (L) enoyl-CoA hydratase. Le cis-2-carboxycyclo-hexylacétyl-CoA (12) est ensuite dégradé pour former de l'Acétyl-CoA et du CO₂.

Les deux voies principales de la dégradation du NAP en conditions sulfato-réductrices sont (1) la carboxylation, aboutissant à la formation d'acide naphthoïque (Zhang & Young, 1997) et (2) la méthylation, produisant le 2-méthylnaphtalène (Safinowski et al., 2006) (Fig. 6). Il semble que l'oxydation anaérobie du phénanthrène implique des mécanismes moléculaires comparables,

notamment la carboxylation (Zhang & Young, 1997; Davidova et al., 2007). Cependant, il n'existe à ce jour aucune étude montrant l'oxydation anaérobie de HAP de poids moléculaires plus élevés que le PHE.

2.1.2. HAP Dioxygénases (PAH-RHD)

2.1.2.1. Variabilité et spécificité

Le complexe enzymatique dioxygénase est constitué d'une ferredoxine, d'une ferredoxine-réductase et d'une protéine ISP (iron-sulfur protein) formée de deux sous-unités asymétriques (PAH-RHD) α et (PAH-RHD) β (Habe & Omori, 2003). La figure 7 montre un arbre phylogénétique construit sur la base des séquences protéiques des sous-unités α de dioxygénases, dont les (PAH-RHD) α . Deux groupes distincts d'enzymes homologues (PAH-RHD) α peuvent être discriminés, correspondant à la dichotomie taxonomique entre bactéries à Gram positif (Actinobactéries) et bactéries à Gram négatif (Protéobactéries), sans corrélation avec l'affinité des enzymes pour les différents HAP.

En effet, les affinités des (PAH-RHD) pour les HAP et donc les taux de transformation de ces différents HAP varient d'une enzyme homologue à l'autre. La bactérie modèle *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1, étudiée depuis plusieurs décennies par l'équipe de C.E. Cerniglia, possède quatre copies du gène (à l'extrémité 3' de l'opéron catabolique) codant pour des dioxygénases différentes, avec chacune des spécificités de substrat (Kim et al., 2006). La dioxygénase NidA3B3 présente par exemple une forte affinité pour les HAP de haut poids moléculaire comme le FLA et une faible affinité pour le NAP, alors que son homologue NidAB métabolise préférentiellement le PHE et le PYR.

Différents jeux d'amorces ont été dessinés pour la recherche par PCR (Polymerase Chain Reaction) quantitative ou semi-quantitative des gènes codant les enzymes impliquées dans la dégradation des HAP, indicateurs du potentiel de dégradation des HAP d'une microflore. Certains de ces couples ciblent les catéchol-dioxygénases intervenant au début de la voie basse (voir § 2.1.1.1) (Sei et al., 2004; El Azhari et al., 2010). Cependant, la très grande majorité de ces couples d'amorces ciblent des gènes codant pour des HAP-dioxygénases et possèdent souvent un spectre de spécificité relativement faible (Widada et al., 2002; Baldwin et al., 2003; Brezna et al., 2003; Johnsen et al., 2007). Cébron et al. (2008) ont mis au point deux jeux d'amorces spécifiques des (PAH-RHD) α des bactéries à Gram négatif d'une part (gènes *nahAc* des *Pseudomonas* mais aussi *nagAc*, *phnAc* et *bphA1* des autres Protéobactéries) et à Gram positif d'autre part (gènes *nidA*, *pdoA* et *narA*), spécifiques malgré la divergence évolutive des séquences cibles. D'autres amorces ciblant les 2 groupes en même temps ont été développées récemment mais sont moins spécifiques des HAP-dioxygénases (Ding et al., 2010).



Figure 7. Arbre phylogénétique des sous-unités α des dioxygénases, dont les (PAH-RHD) α , construit sur la base des séquences protéiques, d'après Habe & Omori (2003).

2.1.2.2. Induction par les HAP

L'expression des (PAH-RHD) est induite par la présence de HAP (Peng et al., 2008). Kim et al. (2004) ont étudié par électrophorèse 2D le profil d'expression protéique de *M. vanbaalenii* PYR-1, après exposition à différents HAP. De nombreuses protéines présentaient des profils d'expression différents en présence de HAP, certaines d'entre elles présentant même des profils différents selon le HAP auquel les bactéries étaient exposées. Plusieurs de ces protéines dont l'expression était induite ont pu être identifiées par séquençage et directement reliées au métabolisme des HAP dont une catalase-péroxydase, une aldéhyde-déshydrogénase ainsi que la petite sous-unité (PAH-RHD) β (NidB). Singleton et al. (2009) ont également noté une forte induction au niveau transcriptionnel du gène *phnAcd*, codant la petite et la grande sous-unité d'une (PAH-RHD) d'*Acidovorax*, par le NAP et le PHE alors qu'aucune induction n'a pu être mesurée avec le PYR ou le FLA dans les mêmes conditions. De plus, il a été montré que la transcription des opérons *nah* chez *P. putida* G7 est régulée positivement par le régulateur *trans* NahR, dont l'expression est induite par le salicylate, produit final de la voie basse, formant ainsi une boucle d'auto-induction positive (Habe & Omori, 2003).

2.2. Dégradation par les champignons

2.2.1. Généralités

De très nombreuses souches de champignons, appartenant à tous les taxons, sont connues pour dégrader les HAP : Basidiomycètes, en particulier les champignons de la pourriture blanche (White Rot Basidiomycetes ou WRB) (Bogan et al., 1996; Eggen & Majcherczyk, 1998; Kotterman et al., 1998), Ascomycètes (Da Silva et al., 2004; Verdin et al., 2005; Federici et al., 2007), Deutéromycètes (Potin et al., 2004b; Saraswathy & Hallberg, 2005; Wu et al., 2009) et Zygomycètes (Salicis et al., 1999; Su et al., 2006). Quelques exemples d'études sur les champignons dégradant les HAP, concernant les espèces les plus étudiées ou présentant les résultats les plus originaux sont présentés dans le Tableau 2.

D'une manière générale, il est admis que les champignons dégradent les HAP par cométabolisme, c'est-à-dire que le HAP ne sert pas directement de substrat de croissance (Cerniglia, 1997; Peng et al., 2008). Les mécanismes de dégradation fongique des HAP les plus étudiés sont la détoxification par le cytochrome P450 (§ 2.2.2) et la sécrétion des enzymes extracellulaires impliquées dans la dégradation de la lignine (§ 2.2.3), bien qu'il existe d'autres mécanismes directs (sécrétion d'espèces réactives d'oxygène par exemple, § 2.2.4) ou indirects (effet myco(rhizo)sphère, § 3.3.3 et 4.2) (Fig. 8).

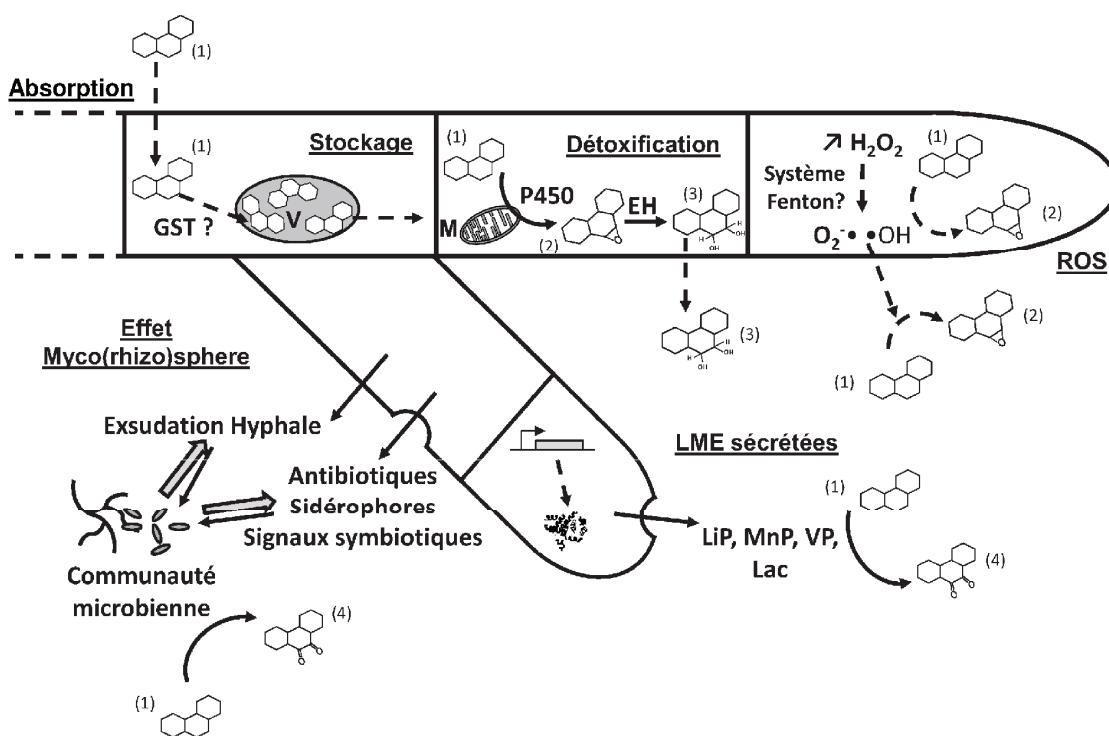


Figure 8. Synthèse des mécanismes moléculaires de la dégradation des HAP impliquant des champignons. (1) PHE, (2) phénanthrène-époxyde, (3) phénanthrène-diol, (4) phénanthrènequinone. EH : époxyde-hydrolase, GST : Gluthation-S-Transférase, Lac : laccase, LiP : lignine-péroxydase, LME : Lignin-modifying enzymes, M : mitochondrie, MnP : Manganèse-péroxydase, P450 : cytochrome P450 mono-oxygénases, ROS : espèces réactives d'oxygène, V : vésicules intracytoplasmiques, VP : versatile-péroxydase.

Classe	Genre espèce	HAP dégradés	Conditions	Métabolisme	Références
Zygomycètes	<i>Cunninghamella elegans</i>	AC, ANT, BaA BaP, BeP, CHR, NAP, FL, FLA, PHE, PYR	<i>in vitro</i>	P450	Cerniglia et al. (1997), Garon et al. (2000), Krivobok et al. (1998), Salicis et al., (1999)
Deutéromycètes (formes parfaites: Ascomycètes)	<i>Aspergillus</i> sp.	NAP, PHE, CHR, PYL	<i>in vitro</i> en conditions microaérobies	MnP	Silva et al. (2008)
	<i>Cyclothyrium</i> sp.	ANT, BaP, PHE, PYR	<i>in vitro</i>	P450	da Silva et al. (2003 et 2004)
	<i>Fusarium oxysporum</i>	ANT, BaP, PHE, PYR	<i>In vitro</i> et en sol, seul ou en coculture avec un consortium bactérien	n.d.	Jacques et al. (2008), Verdin et al. (2004)
	<i>Fusarium solani</i>	BaP	<i>in vitro</i>	ROS + UP	Veignie et al. (2003), Verdin et al. (2004), Verdin et al. (2006)
	<i>Penicillium frequentas</i>	PHE	sol stérile et non stérile, en présence de métaux lourds	n.d.	Amezcuca-Allieri et al. (2005)
Basidiomycètes	<i>Penicillium janthellinum</i>	BaA, BaP, CHR, DBA, PYR	<i>in vitro</i> et en sol, seul et en coculture avec un consortium bactérien	n.d.	Boonchan et al. (2000)
	<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	ANT, FLA, PYL, PHE, PYR	<i>in vitro</i> , sol non stérile	P450 (±LME)	Gramss et al. (1999a et b), Sack & Fritsche (1997), Sack et al. (1997)
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	ANT, BaA, BaP, BbF, BghiP, BkF, CHR, DBA, FL, FLA, IP, NAP, PHE, PYR	<i>in vitro</i> , sol stérile et non stérile	LME	Andersson et al. (2000), Bogan et al. (1996), Brodkorp & Legge (1992), Canet et al. (2001), D'annibale et al. (2005), Field et al. (1992), Garon et al. (2000), Krivobok et al. (1998), Mollea et al. (2005), Salicis et al. (1999), Tekere et al. (2005), Tucker et al. (1995)
	<i>Pleurotus ostreatus</i>	AC, BaA, BaP, BbF, BghiP, BkF, CHR, DBA, FL, FLA, IP, NAP, PYL, PYR	<i>in vitro</i> , sol stérile et non stérile, en présence de métaux lourds	LME	Andersson et al. (2000), Baldrian et al. (2000), Byss et al. (2008), Gramss et al. (1999b), In der Wiesche et al. (2002)
	<i>Trametes versicolor</i>	ANT, BaA, FL, PHE, PYR	<i>in vitro</i> , sol non stérile	LME	Field et al. (1992), Sack et al. (1997), Tekere et al. (2005)

Tableau 2. Exemples d'espèces de champignons dégradant les HAP dans différentes conditions expérimentales et voies métaboliques impliquées. *In vitro* : en cultures liquides, LME : Lignin Modifying Enzymes, P450 : cytochrome P450, n.d. : non déterminé, PYL : pérylène, ROS : espèces réactives d'oxygène, UP : absorption et formation de vésicules intracellulaires). Lorsque plusieurs références sont citées pour une espèce, ces références peuvent concerner différentes souches de la même espèce.

2.2.2. Cytochrome P450 mono-oxygénases

Lorsque des collections de souches fongiques sont testées pour leur potentiel de dégradation des HAP *in vitro*, les Zygomycètes, comme l'espèce modèle *Cunninghamella elegans*, présentent souvent les meilleurs résultats (Krivobok et al., 1998; Salicis et al., 1999; Garon et al., 2000). Ceci pourrait être dû à leur haut niveau d'activité du cytochrome P450, impliqué dans l'oxydation des acides gras et la biosynthèse des ergostérols, stérols majoritaires de cet ordre (Cerniglia, 1997).

Chez presque tous les organismes vivants, le système enzymatique du cytochrome P450, localisé dans les membranes internes des mitochondries et les microsomes chez les eucaryotes, est impliqué dans la détoxification des xénobiotiques (Smith & Rosazza, 1974; Kreuz et al., 1996). Les mono-oxygénases du cytochrome P450 sont capables de catalyser l'insertion d'un atome d'oxygène dans une grande variété de molécules, y compris des polluants organiques tels que les HAP et les polychlorobiphényles ou PCB (Cerniglia, 1997; Shimada, 2006; Peng et al., 2008). Cette oxydation conduit à la production de métabolites intermédiaires, les HAP époxydes, qui peuvent ensuite être métabolisés par une époxyde-hydrolase en HAP trans-dihydrodiols (Fig. 9).

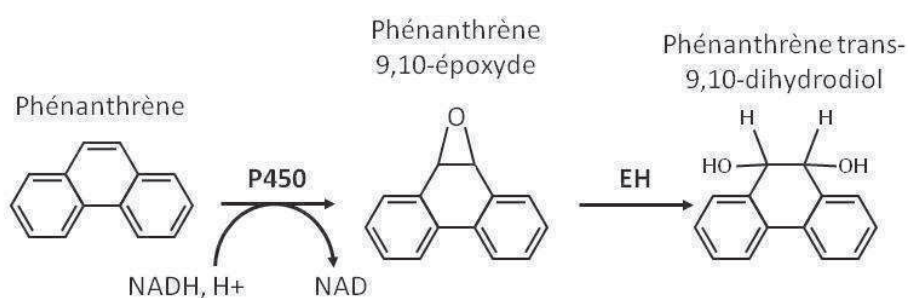


Figure 9. Activation des HAP par le cytochrome P450, exemple du PHE, d'après Peng et al (2008). P450 : mono-oxygénases du complexe enzymatique du cytochrome P450, EH : époxyde-hydrolase.

Bezalel et al. (1996), par exemple, ont mesuré une accumulation d'anthracène trans-1,2-dihydrodiol et de pyrène trans-4,5-dihydrodiol dans des cultures du Basidiomycète *Pleurotus ostreatus*, concomitante avec la disparition des composés parentaux, indiquant l'intervention du cytochrome P450 dans la dégradation observée.

L'immense diversité des isoformes des enzymes du cytochrome P450 a conduit à leur classification systématique en familles et sous-familles (Nelson et al., 1996). Le génome du Basidiomycète *Phanerochaete chrysosporium* contient plus de 150 gènes assemblés en 16 clusters impliqués dans la formation du cytochrome, dont la plupart ont encore des fonctions et régulations inconnues (Yadav et al., 2006). L'évolution des clusters de gènes du cytochrome P450 chez *P. chrysosporium* a conduit à

différents schémas de régulation : par exemple, les HAP peuvent induire d'un facteur 3 à 9 l'expression du cluster de gènes codant les mono-oxygénases pc-1/pc-2/pc-3, alors que le gène pc-7 ne répond pas à cette induction (Doddapaneni & Yadav, 2004; Yadav et al., 2006). De nombreux autres facteurs environnementaux, comme la teneur en azote, la source de carbone ou la présence de cofacteurs (le NADPH, par exemple) peuvent influencer l'expression et l'activité du cytochrome P450 (Masaphy et al., 1995; Yadav et al., 2006). Cette grande diversité de structures, de régulations et de fonctions illustre l'ampleur de l'adaptabilité des champignons face aux pressions de sélection imposées par l'introduction massive de différents polluants organiques et xénobiotiques dans l'environnement.

2.2.3. Lignin-Modifying Enzymes (LME)

Alors qu'un grand nombre de taxons fongiques sont connus pour leur capacité à dégrader la cellulose et l'hémicellulose (Baldrian & Valaskova, 2008), la biotransformation de la lignine est le fait exclusif des champignons saprotrophes Basidiomycètes de la pourriture blanche (White Rot Basidiomycètes, WRB). Cette activité de dégradation implique la sécrétion d'enzymes dites lignin-modifying enzymes ou LME, de type phénoloxydase, comme les versatile-péroxydases (VP), les lignine-péroxydases (LiP), les manganèse-péroxydases (MnP) ou les laccases (Leonowicz et al., 1999).

En raison de leur spécificité de substrat très faible – la diversité de structure des polymères de lignine étant très importante – les LME sont capables d'oxyder une large gamme de polluants organiques dont les structures polymériques sont proches de celle de la lignine, tels que les PCB et les HAP (Chroma et al., 2002; Novotny et al., 2004). Ainsi, Gramss et al. (1999a) ont observé une très forte corrélation ($r^2 \geq 0,85$) entre la production de LME par 58 souches fongiques et leur potentiel de dissipation de HAP. Ces résultats concernaient une large gamme de HAP, y compris de hauts poids moléculaires tels que le FLA, le PYR et le PYL. Par ailleurs, la transformation *in vitro* de différents HAP par des laccases et MnP fongiques purifiées a été montrée dans plusieurs expériences en conditions axéniques (Sack, 1997a; Rama et al., 1998; Gullotto et al., 2008; Hu et al., 2009).

Toutes les espèces de WRB n'expriment pas toutes les LME : *Pleurotus ostreatus*, par exemple, a un fort potentiel de production de laccases mais ne montre aucune activité LiP (Cerniglia, 1997; Lang, 1998; Téllez-Téllez et al., 2008). En revanche, la souche modèle *P. chrysosporium*, de loin la plus étudiée pour la production de LME et la dégradation de xénobiotiques (Bumpus et al., 1985; Mileski et al., 1988; Brodkorb & Legge, 1992; Tucker et al., 1995; Bogan et al., 1996; Canet et al., 2001; Tornberg et al., 2003; D'Annibale et al., 2005), exprime une large gamme d'isoenzymes des LiP et MnP, respectivement codées par au moins 10 et 3 gènes (Bogan et al., 1996; Martinez, 2002; Aro, 2005). Par ailleurs, de nombreux champignons ectomycorhiziens (EcM), n'appartenant donc pas à la famille des WRB, des genres *Russula* ou *Lactarius* par exemple, produisent des laccases et certaines études ont montré la présence de gènes codant des LiP et MnP chez les EcM (Gramss et al., 1999a; Burke & Cairney, 2002).

Puisqu'en théorie, toutes les LME peuvent dégrader fortuitement les HAP, les différences de profil d'expression des LME entre taxons peuvent en partie expliquer la variabilité de l'efficacité de la dégradation des HAP par ces taxons.

L'oxydation des HAP par les LME conduit à la formation des quinones correspondantes, anthraquinone à partir de l'anthracène, fluorenone à partir du fluorène, etc... (Fig. 10) (Cerniglia, 1997; Peng et al., 2008). Lorsqu'ils ne sont pas minéralisés par des réactions enzymatiques ultérieures, par la même souche fongique ou par un autre membre de la microflore (voir § 3.3.3), ces métabolites sont susceptibles de s'accumuler et sont donc considérés comme produits « dead-end » (Field et al., 1992; Bezalel et al., 1996; Hu et al., 2009).

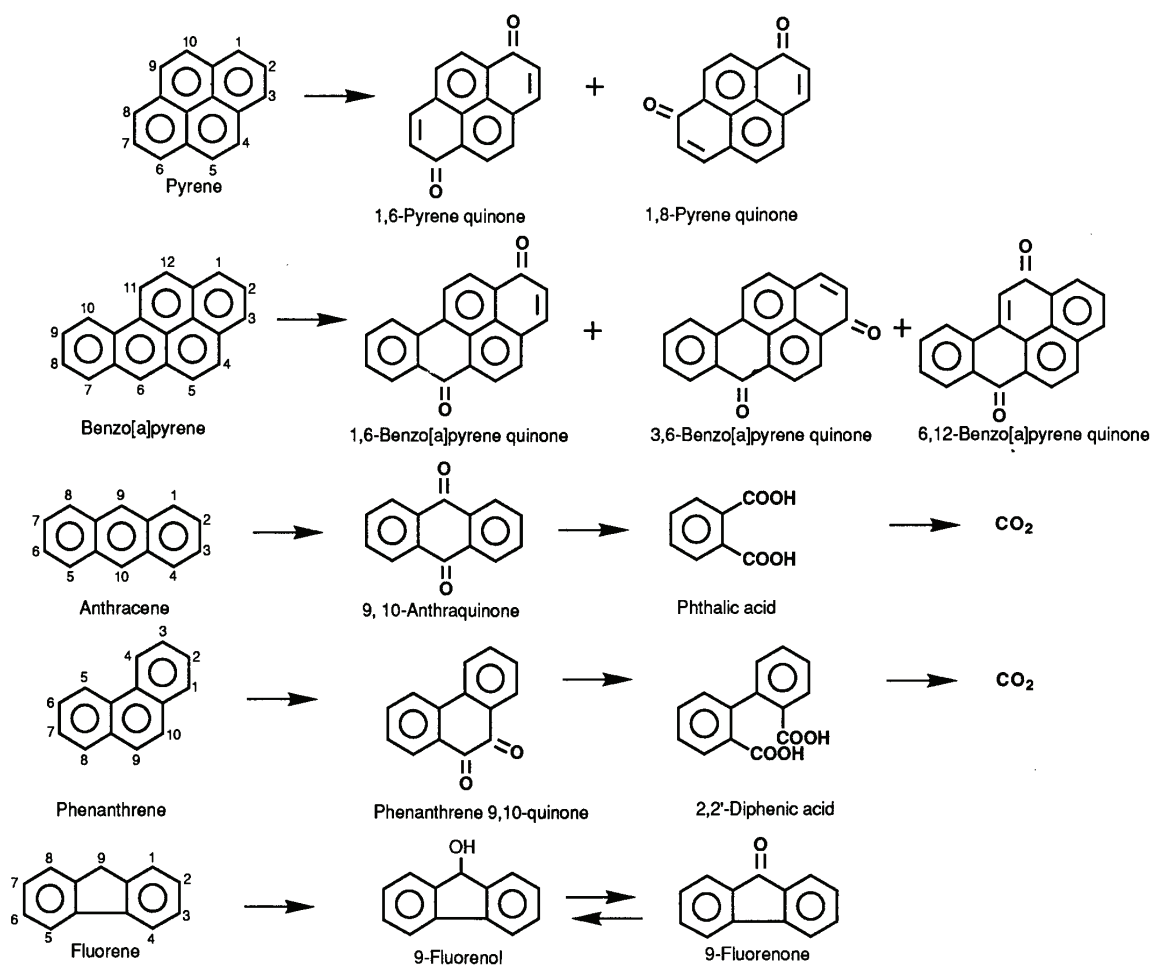


Figure 10. Oxydation des HAP par les lignin-modifying enzymes (LME) fongiques, d'après Cerniglia (1997).

Les facteurs influençant l'expression et l'activité des LME ont été très largement étudiés et comprennent : le pH, la température, les ressources nutritives (teneurs en carbone et azote), la présence de cofacteurs (Mn^{2+} pour les MnP par exemple), l'induction par des substrats ligno-cellulosiques, les conditions d'aérobiose, l'addition de surfactants ou encore la présence de pollution métallique (Kerem et al., 1992; Baldrian et al., 2000; Martinez, 2002; Baldrian, 2003; Novotny et al.,

2004; Hakala et al., 2006; Gullotto et al., 2008; Singh & Chen, 2008; Téllez-Téllez et al., 2008). Le système LME est régulé au niveau transcriptionnel et son induction est couramment admise comme une réponse au stress, généralement aux carences nutritives, azotées notamment (Aro, 2005).

2.2.4. Espèces réactives de l'oxygène

Récemment, une hypothèse novatrice a été proposée par Veignie et al. (2004) : les champignons pourraient oxyder fortuitement les HAP par l'intermédiaire d'espèces réactives d'oxygène (ROS) (Fig. 8). Afin de déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans la dégradation du benzo(a)pyrène par une souche de *Fusarium solani*, ces auteurs ont testé l'effet d'inhibiteurs du cytochrome P450 (acide salicylhydroxamique), des LME (piperonyl butoxyde) ou des deux systèmes (cyanure de potassium), ainsi que de l'hydroxytoluène butylé, composé capable de séquestrer les ROS. Seul le dernier composé a montré un effet inhibiteur sur la dégradation du BaP et les inhibiteurs des LME et du cytochrome P450 ont même conduit à une augmentation de la dégradation. Comme les LME et le cytochrome P450 utilisent l' H_2O_2 comme co-substrat, Veignie et al. (2004) ont émis l'hypothèse que l'accumulation d' H_2O_2 consécutive à leur inhibition a pu favoriser la formation de ROS, oxydant le BaP.

Il faut noter que l'intervention des ROS dans les premiers stades de l'oxydation de la lignine avait déjà été évoquée, les laccases et peroxydases présentant des tailles trop importantes pour pénétrer le très dense complexe lignino-cellulosique (Hammel et al., 2002). Ainsi, Jensen et al. (2001) ont montré que le champignon de la pourriture brune *Gloeophyllum trabeum* produisait et exportait de l' H_2O_2 et des ions Fe^{2+} , réactifs de la réaction de Fenton ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \bullet\text{OH}$) aboutissant à la formation de ROS.

L'absence totale de spécificité de cette voie de dégradation des HAP pourrait être d'un grand intérêt puisqu'elle pourrait être appliquée à une très large gamme de polluants organiques. De fait, l'oxydation chimique basée sur la réaction de Fenton est un procédé très utilisé pour la dépollution des nappes phréatiques et zones saturées des sols (Anglada et al., 2009; Umar et al., 2010). Bien que décrite également dans les sols en zone non saturée (Laurent et al., 2012) l'oxydation des polluants est limitée par la diffusion des ROS dans le sol, d'autant plus que toutes les particules telluriques, inorganiques comme organiques, sont également susceptibles d'être oxydées.

2.2.5. Adsorption, absorption et stockage

A ce jour, très peu de travaux ont porté sur les phénomènes de sorption des HAP par les champignons. Pourtant, il est généralement admis que les HAP, comme de nombreux autres polluants organiques (colorants industriels, pesticides organochlorés,...) ou métalliques, sont susceptibles d'être adsorbés sur les membranes et parois biologiques. Cette propriété est d'ailleurs utilisée dans les traitements de dépollution des eaux, sous le terme « biosorption », consistant à mettre en contact les eaux polluées et

une biomasse, végétale ou microbienne, vivante ou non (Aksu, 2005; Chojnacka, 2010). L'adsorption des HAP sur les parois cellulaires, phénomène très rapide (Binet et al., 2000), est d'autant plus importante que les HAP sont hydrophobes et dépend de la composition de la biomasse, augmentant avec les teneurs en carbone et en molécules aromatiques et aliphatiques et diminuant avec la teneur en polysaccharides (Chen et al., 2010; Chen et al., 2011). En conséquence, le taux d'adsorption des HAP est dépendant de l'espèce fongique, sans corrélation évidente avec le potentiel de dégradation (Salicis et al., 1999).

Par ailleurs, il a été montré que différents champignons, Ascomycètes, Basidiomycètes et Glomales, avaient la capacité d'internaliser les HAP et de les stocker sous la forme de vésicules autofluorescentes aux UV (Verdin et al., 2005; Verdin et al., 2006a; Wu et al., 2009) (Fig. 8). Néanmoins, les mécanismes moléculaires impliqués dans le passage des HAP à travers la paroi fongique et la formation des vésicules sont encore mal compris.

Thuillier et al. (2011) ont mis en évidence que, chez *Phanerochaete chrysosporium*, deux gènes codant pour des glutathion-S-transférases (GST) étaient surexprimés en présence de HAP, simultanément à la formation de vésicules autofluorescentes. Ces données sont en concordance avec de précédents résultats obtenus chez les animaux et l'homme (Pushparajah et al., 2008; Riaz et al., 2009). La glutathionylation des HAP réduit leur hydrophobicité, ce qui pourrait favoriser leur diffusion dans le cytoplasme, de nature aqueuse, vers les vésicules, de nature lipidique. Verdin et al. (2005) ont montré chez *Fusarium solani* que (1) ces vésicules pouvaient être colorées avec des marqueurs spécifiques des lipides et (2) leur formation ne dépendait ni du cytosquelette, ni de phénomènes d'endocytose. Les auteurs ont donc émis l'hypothèse que la diffusion des HAP vers le compartiment intracellulaire était un phénomène passif, dû à leur hydrophobicité. Dans une autre étude, les mêmes auteurs ont montré que la composition lipidique de *F. solani*, capable de dégrader le BaP, était modifiée par la présence du HAP (Verdin et al., 2006b). En effet, après six jours d'exposition au BaP, le ratio d'acides gras saturés et insaturés était affecté et la quantité de stérols totaux était significativement réduite. Ces modifications ont pu altérer la fluidité membranaire, favorisant l'internalisation du HAP. Les auteurs ont émis l'hypothèse que le cytochrome P450, monopolisé par la fonction enzymatique de détoxification du BaP, n'était plus disponible pour sa fonction première de biosynthèse des stérols. Cette hypothèse a été confortée par le fait que la composition lipidique d'une souche de *Fusarium oxysporum*, incapable de dégrader le BaP, n'était pas affectée par la présence du HAP.

Si le devenir des HAP internalisés reste aujourd'hui inconnu, il n'est évidemment pas exclu qu'ils soient ultérieurement transformés, voire dégradés : ceci pourrait être une stratégie de protection par confinement contre la cytotoxicité des HAP comme un moyen de stockage jusqu'au traitement enzymatique. Néanmoins, le stockage à long terme dans la biomasse fongique pourrait favoriser la bioaccumulation des HAP le long de la chaîne trophique.

3. Devenir des HAP dans les Sols

Le sol est un écosystème complexe et dynamique où une multitude d'interactions écologiques peuvent avoir lieu. Crawford et al. (2005) définissent la complexité de cet écosystème unique comme découlant des interactions dynamiques entre la composante physique et la composante biologique. La complexité physique du sol, et son hétérogénéité, contrôlent à grande échelle la dispersion des populations et à petite échelle la dispersion des individus. En retour, la complexité biologique crée des zones pauvres en nutriments et des « hot-spots » d'activité microbienne.

3.1. Processus abiotiques

3.1.1. Adsorption et séquestration par les particules de sol

La persistance des HAP dans les sols, dépendante de leur capacité à résister à la dégradation biotique et abiotique, est fortement influencée par leur piégeage sur et dans les particules de sol, plus ou moins forte selon la nature chimique et physique de ces particules (Figure 11). La fraction labile des HAP diminue alors avec le temps, phénomène connu sous le nom d'« aging » ou vieillissement d'une pollution, dû à leur sorption et à leur séquestration (Luthy et al., 1997).

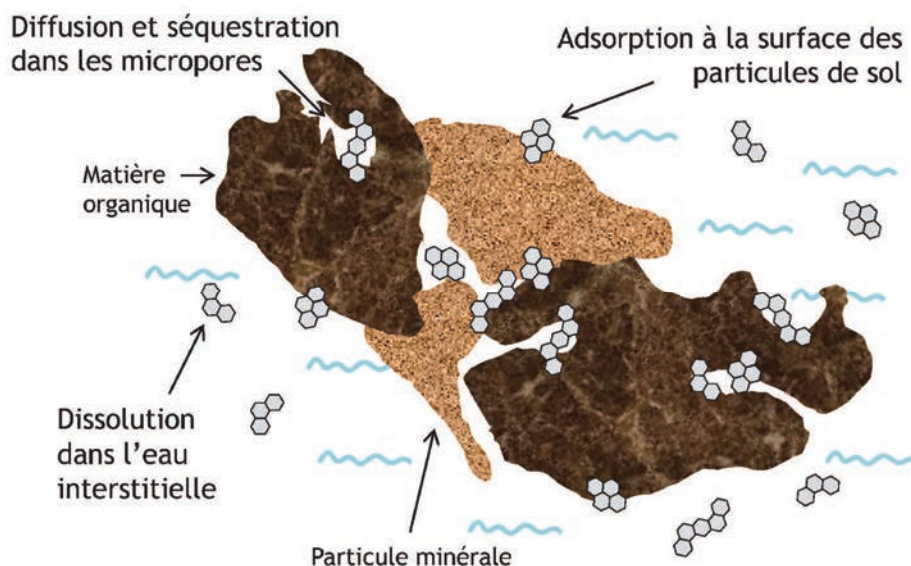


Figure 11. HAP dissous, adsorbés et séquestrés dans le sol.

Les molécules hydrophobes comme les HAP s'adsorbent sur la matière organique, ainsi la quantité de carbone organique d'un sol est typiquement utilisée pour évaluer sa capacité de sorption (US-EPA, 1993). Cependant, les caractéristiques physico-chimiques, et pas seulement la quantité, de la matière organique du sol (MOS) influencent l'adsorption des HAP. Les HAP peuvent être fortement adsorbés

aux fractions humiques et fulviques (Pan et al., 2006; Yang et al., 2010). Cependant, Pan et al. (2007) ont montré que la sorption du PHE sur des particules solides d'acides humiques était plus faible que sur des acides humiques dissous, malgré leur composition chimique strictement identique. La sorption des HAP sur les particules de « black carbon » (noir de carbone) ou sur le noir de fumée, matières organiques d'origine anthropogénique, est plus importante que sur la matière organique naturelle (Hong et al., 2003; Koelmans et al., 2006; Achten et al., 2011). Généralement, les HAP sont retrouvés dans les fractions les plus fines des sols, c'est-à-dire les fractions argileuses, présentant des surfaces spécifiques plus importantes mais également des teneurs en MOS plus élevées (Wilcke, 2000; Amellal et al., 2001a; Amellal et al., 2001b).

Par ailleurs, il a été suggéré que les HAP pouvaient être physiquement séquestrés dans les micropores créés par les particules organiques du sol, diminuant encore leur fraction labile (Amellal et al., 2001b; Bogan & Sullivan, 2003).

3.1.2. Lessivage

La sorption et la séquestration des HAP par les particules de sol, ainsi que leur solubilité très faible, les rendent très peu lessivables (Luthy et al., 1997; Wilcke, 2000). Les HAP peuvent en revanche migrer dans la phase aqueuse sous forme de colloïdes ou adsorbés sur des particules colloïdales de sol (Vaughan, 1983; Luthy et al., 1997). L'estimation des fractions lessivées de HAP est souvent difficile en raison des faibles concentrations dans les lixiviats, proches des limites de détection des méthodes actuelles.

Afin de déterminer la lessivabilité des HAP dans un sol anciennement contaminé, Enell et al. (2004) ont développé un dispositif constitué d'une colonne de sol à la sortie de laquelle une cartouche filtrante piégeait les HAP. Ces auteurs ont ainsi montré que seule une très petite part (0,3%) des HAP contenus dans ce sol (issu d'une friche d'ancienne usine à gaz et contenant environ 1500 mg des 16 HAP de l'US-EPA .kg⁻¹) avait pu être lessivée sur une période de plus de 2 mois, l'expérience étant pourtant réalisée en conditions saturées. Dans une autre expérience, les mêmes auteurs ont pu montrer que le lessivage des HAP était fonction de la température, diminuant près de 10 fois entre 23 et 7°C (Enell et al., 2005).

3.1.3. Dégradation abiotique

Dans les sols, les HAP sont susceptibles d'être dégradés ou transformés en conditions abiotiques, suivant différentes voies.

Un composé organique volatil (VOC) est défini comme « tout composé organique présentant une pression de vapeur de 0,01 kPa ou plus » (Directive 1999/13/CE). Les HAP de faible poids moléculaire, comme le NAP, sont donc considérés comme VOC (cf. Tableau 1, § 1.1.), signifiant qu'ils peuvent être volatilisés, donc dégazés vers l'atmosphère, depuis un sol. Il a été montré que la volatilisation des HAP

légers était très rapide (de l'ordre de quelques jours) après leur introduction dans un sol (Park et al., 1990). Cette volatilisation n'est pas uniquement fonction des propriétés du HAP, mais également des conditions atmosphériques (température, vitesse des vents, turbulences atmosphériques) et des conditions de saturation, les HAP dissous pouvant être volatilisés avec la vapeur d'eau (Wilcke, 2000; Cabrerizo et al., 2011). Bien sûr, ce phénomène ne concerne pas les HAP de haut poids moléculaire, trop peu volatils.

Les HAP peuvent également être photodégradés ou phototransformés (Tiller & Jones, 1997; Krauss & Wilcke, 2002). Ceci peut avoir lieu par photolyse (action directe, physique, des rayons UV), ou par photo-oxydation, l'irradiation UV catalysant la formation de ROS (par exemple l'oxygène singulet, $\bullet\text{O-O}\bullet$ à partir de O_2 ou le radical hydroxyle $\text{OH}\bullet$), possédant un fort pouvoir oxydant sur les HAP. Néanmoins, seule la couche superficielle des sols étant exposée à l'irradiation solaire, ces phénomènes ne représentent probablement qu'une part mineure de la disparition des HAP dans les sols pollués.

Enfin, l'oxydation chimique des HAP par l'oxygène atmosphérique peut avoir lieu spontanément dans les sols. Si cette possibilité est généralement admise comme une évidence dans la littérature, très peu d'études concernent cette oxydation spontanée (Biache et al., 2011). En revanche, davantage de travaux concernent la mise au point de procédés de remédiation par oxydation chimique induite (Anglada et al., 2009; Valderrama et al., 2009; Umar et al., 2010). Biache et al. (2011) ont montré que l'oxydation chimique spontanée des HAP légers dans un sol anciennement contaminé, beaucoup plus importante que celle des HAP de poids moléculaires élevés, pouvait atteindre 100% en 6 mois pour l'ACE avec une concentration initiale de 190 mg.kg^{-1} de sol. Néanmoins, la température d'incubation de 100°C utilisée dans ce travail, permettant d'ailleurs d'exclure toute dégradation biotique, agit comme un catalyseur sur les réactions d'oxydation : selon les auteurs, ces réactions s'étaleraient sur plusieurs dizaines d'années à température ambiante.

En définitive, il est généralement admis que l'ensemble de ces processus abiotiques ne représente qu'une faible part dans la dégradation des HAP dans les sols, la biodégradation des HAP par les microorganismes, présentée au paragraphe 3.3 étant considérée comme le phénomène majoritaire (Cerniglia, 1993; Juhasz & Naidu, 2000).

3.2. Effet des HAP sur les communautés microbiennes des sols

3.2.1. Méthodes d'étude de la diversité et de l'abondance des microorganismes dans les sols

De nombreuses méthodes de biologie moléculaire et biochimie permettent aujourd'hui l'observation des communautés microbiennes (Anderson & Cairney, 2004; Hirsch et al., 2010). En effet, selon la nature des milieux d'origine, la fraction cultivable des microorganismes serait comprise entre 0,001 et

15% et ces méthodes permettent donc de considérer la part non-cultivable des microorganismes. Notons toutefois que i) la mise en culture reste aujourd'hui le seul véritable moyen d'isoler des microorganismes et d'en étudier la biologie et ii) toutes les analyses du métagénome, métabolisme, acides gras, etc... découlent de l'identification préalable des taxons et activités grâce aux expérimentations *in vitro*.

Le dosage des acides gras phospholipidiques (PLFA ou « phospholipid fatty acids analysis ») permet d'évaluer la biomasse microbienne, mais également d'observer la structure de la communauté en utilisant des marqueurs lipidiques spécifiques de certains groupes taxonomiques (Andersson et al., 2000; Tornberg et al., 2003). Certains marqueurs, indicateurs de stress ou d'entrée des cellules en phase stationnaire, peuvent même renseigner sur l'état physiologique de la microflore (Stemmer et al., 2007; Williams & Rice, 2007).

La PCR en temps réel (ou PCR quantitative, qPCR), permettant de quantifier un gène cible, est de plus en plus utilisée pour quantifier la microflore totale (nombre de copies de gènes codant les ARN ribosomiques) mais également des gènes fonctionnels, comme les gènes codant pour les enzymes intervenant dans les voies de dégradation des HAP (Smith et al., 2006; Cébron et al., 2008; Smith & Osborn, 2009). La PCR en temps réel appliquée sur les ADNc synthétisés à partir des ARN extraits d'un sol permet d'explorer le niveau d'expression des gènes cibles. En parallèle, les méthodes d'empreintes moléculaires, comme par exemple la DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Vivas et al., 2008; Ros et al., 2010), la TTGE (Temporal Temperature Gradient Electrophoresis) (Corgié et al., 2006d; Cébron et al., 2009; 2011b) ou la tRFLP (terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) (Richardson et al., 2002; Macdonald et al., 2008) sont utilisées pour évaluer la diversité et obtenir une image globale de la structure des communautés microbiennes. Néanmoins, il est souvent admis que seuls les taxons les plus abondants sont considérés avec ces techniques, les espèces rares, réservoirs de diversité, étant ignorées (Bent & Forney, 2008; Elshahed et al., 2008). Ces analyses peuvent également être réalisées sur des ADNc afin d'observer la diversité des populations actives. Plus récemment, le pyroséquençage est apparu comme un outil intéressant, bien qu'encore très coûteux, pour explorer plus exhaustivement la diversité taxonomique et fonctionnelle des populations (Urich et al., 2008; Hollister et al., 2010). Les puces à ADN, pouvant analyser en une seule fois un très grand nombre de séquences cibles, sont également très performantes pour avoir une vision précise de la diversité taxonomique et fonctionnelle (Sanguin et al., 2006; Nemir et al., 2010). Bien qu'encore très peu appliquée à l'étude des sols, probablement en raison des difficultés d'extraction (voir paragraphe suivant), l'analyse du métabolisme permet une exploration de la diversité microbienne, tant taxonomique que fonctionnelle (Williams et al., 2010). L'utilisation de substrats marqués (Stable Isotope Probing), en combinaison avec la PLFA (Treonis et al., 2004), la PCR en temps réel (Lueders et al., 2004) ou la TTGE (Cébron et al., 2011b) par exemple, permet d'identifier les microorganismes impliqués dans un processus métabolique d'intérêt.

Toutes ces méthodes présentent des biais expérimentaux qui peuvent en limiter les interprétations et notamment la comparaison entre études. L'étape déterminante, et parfois limitante, reste l'extraction des molécules choisies comme indicateur (ADN, ARN, protéines, acides gras, ...), la qualité de l'extraction dépendant généralement de la nature du sol (quantité et qualité de la MOS, granulométrie, pH, niveau de pollution) (Zhou et al., 1996; Anderson & Cairney, 2004; Sagova-Mareckova et al., 2008; Papadopoulou et al., 2011). Les méthodes d'extraction doivent donc souvent être adaptées au sol étudié. Cébron et al. (2011a), par exemple, utilisent une résine échangeuse d'ion (Dowex) dans le protocole d'extraction d'ADN pour un sol anciennement contaminé aux HAP et ETM (Voir Chapitre II). En effet, les concentrations en soufre dans le sol étudié sont si importantes que l'ajout d'isopropanol entraîne la co-précipitation de cristaux de gypse (CaSO_4) et des acides nucléiques, qui s'y trouvent piégés. La résine préalablement chargée au lithium échange les ions Li^{2+} avec les ions Ca^{2+} , empêchant la formation de gypse. Par ailleurs, il a été montré que les indices de diversité calculés par des méthodes basées sur la PCR étaient corrélés ($r^2=0,88$ pour les bactéries et 0,72 pour les champignons) au ratio de pureté de l'ADN, c'est-à-dire le ratio des absorbances aux longueurs d'onde 260 et 280 nm, correspondant respectivement aux absorbances des acides nucléiques et des protéines (Thakuria et al., 2008). En effet, certains inhibiteurs des réactions enzymatiques ou chimiques peuvent être co-extraits avec les molécules d'intérêt et biaiser les réactions analytiques ultérieures. Ainsi, les acides humiques peuvent inhiber les réactions de PCR en séquestrant les ions Mg^{2+} cofacteurs des Taq-polymérases, inhibition qui peut être limitée par l'addition de PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) par exemple (Zhou et al., 1996; Zhang et al., 2009). Il convient donc d'être très attentif aux méthodes d'extraction et d'évaluation de l'abondance et de la diversité avant de comparer différentes études.

3.2.2. Communautés bactériennes dans les sols contaminés en HAP

De très nombreux travaux ont porté sur l'effet des HAP sur la microflore bactérienne des sols, dans une perspective d'étude de l'écotoxicité ou du potentiel de bioremédiation de ces polluants.

Les données concernant l'impact quantitatif des HAP sur les communautés bactériennes de sols montrent des effets variables en fonction du type de sol, de l'âge de la pollution, de la disponibilité des HAP ou encore de la technique utilisée. Cébron et al. (2008) ont montré qu'il n'y avait pas de corrélation significative entre le nombre de copies de gènes codant pour les ARNr 16S, indicateur de l'abondance bactérienne, dans différents sols et le niveau de contamination aux HAP de ces sols. Dans une autre expérience, les mêmes auteurs ont mesuré une abondance bactérienne légèrement plus faible (environ cinq fois) dans un sol anciennement contaminé aux HAP que dans le même sol traité par désorption thermique deux années après le traitement, alors que la concentration en HAP y était vingt fois inférieure (Cébron et al., 2009). Saul et al. (2005) ont également mis en évidence un nombre de bactéries totales (comptées directement au microscope après coloration au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) cinq fois inférieur dans un sol pollué aux HAP par rapport au sol témoin non pollué.

L'effet des HAP sur la microflore bactérienne des sols est aussi qualitatif (altération de la structure de la communauté). D'une manière générale, l'introduction dans un environnement d'un polluant organique est systématiquement suivie de l'apparition de communautés capables de résister à la toxicité de ce polluant, voire de le dégrader (Van der Meer et al., 1992; Ojo, 2007). Chez les bactéries, cette adaptation est particulièrement rapide, en raison de leur temps de génération très court et de leur grande plasticité génétique (taux de mutation élevés et transfert horizontal de gènes). De plus, quand un sol est pollué par des HAP, l'adaptation bactérienne est très rapide par rapport à d'autres polluants xénobiotiques comme les solvants chlorés, puisque les HAP sont des composés naturellement présents dans les sols (Wilcke, 2000). Cette adaptation a été mise en évidence par Johnsen & Karlson (2005) dans une étude évaluant le potentiel de minéralisation de PHE et de PYR marqués au ^{14}C par la microflore de 13 sols présentant différents niveaux de pollution aux HAP, de très faibles ($0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$) à élevés (400 mg.kg^{-1}). Les résultats montrent une forte corrélation négative ($r^2 > 0,96$) entre le temps nécessaire à la minéralisation de 10% du ^{14}C -PHE ou du ^{14}C -PYR et la teneur initiale en HAP totaux. Dans un sol n'ayant jamais été exposé aux HAP et artificiellement contaminé par du pétrole et du BaP, la totalité du BaP (67 mg.kg^{-1} de sol) a été biodégradé en cinq mois (Kanaly et al., 1997). Dans cette expérience, les auteurs ont observé une période de latence avant le début de la dégradation effective (moins de 50 jours), qui pourrait correspondre au temps nécessaire à l'adaptation de la microflore et à la sélection des populations dégradantes. La proportion de bactéries capables d'utiliser les HAP comme substrat de croissance dans des communautés issues de sol n'ayant jamais été pollués aux HAP augmente de manière très importante après exposition aux HAP (Chiapusio et al., 2007; Khan et al., 2009). Par ailleurs, il a été montré que le nombre de bactéries cultivables capables d'utiliser les HAP comme source de carbone, dans la communauté extraite d'un sol anciennement pollué aux HAP, pouvait augmenter de 2 à 3 ordres de grandeur après quelques semaines d'exposition aux HAP, suggérant que l'apport de HAP « frais », biodisponibles (§ 3.3.2), pouvait affecter la proportion de bactéries dégradantes (Corgié et al., 2006b). Saul et al. (2005) ont montré que, dans un sol pollué aux hydrocarbures, la proportion de bactéries cultivables capables d'utiliser le PHE comme source de carbone était supérieure de 4 ordres de grandeur à celle mesurée dans un sol voisin non contaminé. Cébron et al. (2008) ont observé une corrélation positive entre la quantité de gènes codant les (PAH-RHD) α (§ 2.1.2) des bactéries à Gram positif et négatif et le niveau de pollution aux HAP dans différents sols.

L'ensemble de la communauté bactérienne, et pas seulement la communauté dégradante, est affectée par la présence de HAP. Par exemple, Cébron et al. (2009) ont montré que les Protéobactéries, Actinobactéries et les *Chloroflexi* étaient fortement représentées dans la communauté d'un sol pollué aux HAP. Dans le même sol ayant subi un traitement de dépollution par désorption thermique, les Protéobactéries (α - et γ -) étaient dominantes. Néanmoins dans cette étude, les deux sols différaient par d'autres facteurs (ratios C/N notamment), ne permettant pas d'attribuer le changement de la structure de la communauté bactérienne uniquement aux HAP. Une forte proportion d'Actinobactéries

a également été observée dans un sol pollué au pétrole (Ros et al., 2010) et Vivas et al. (2008) ont également observé une corrélation positive entre le niveau de pollution aux HAP et ETM et l'abondance relative des Actinobactéries. Par ailleurs, Corgié et al. (2006b) ont montré que la structure de la communauté bactérienne était différente après 5 semaines d'exposition au PHE ou au DBA, indiquant un effet spécifique pour chaque HAP, en concordance avec d'autres résultats (Silva et al., 2010).

Vivas et al. (2008) ont étudié la diversité bactérienne dans différents sols multipollués aux HAP et ETM et montré que la richesse spécifique de ces sols était significativement inférieure à celle observée dans le sol témoin non pollué. Dans cette expérience, les indices de diversité de Simpson indiquaient une forte dominance par un petit nombre de taxons dans les sols pollués par rapport au sol témoin. Ces résultats sont en concordance avec les faibles diversités (richesse et indice de Shannon, sensible aux espèces rares) observées dans d'autres sols anciennement contaminés aux HAP (Andreoni et al., 2004; Federici et al., 2007; Silva et al., 2010). La diversité métabolique (gamme d'utilisation de substrats carbonés, Biolog®) peut également diminuer à la suite d'une pollution aux HAP (Lindstrom et al., 1999). Cette réduction de la diversité est probablement liée à l'intense pression de sélection exercée par les HAP, ne permettant qu'aux espèces les plus adaptées de survivre. Par ailleurs, l'existence de niches variées dans un écosystème est un facteur fondamental du maintien de la diversité, car elle permet à différentes populations de coexister sans être limitées par la compétition (Levine & HilleRisLambers, 2009). On peut donc émettre l'hypothèse que la présence de HAP dans les sols réduit la diversité des niches, par exemple en réduisant la diversité de la végétation, ressource trophique pour les microorganismes parasites, saprotrophes et symbiotes. S'il n'a jamais été montré que la diversité influençait directement le fonctionnement des écosystèmes, la stabilité fonctionnelle des sols, c'est-à-dire leurs capacités de résistance et de résilience des fonctions après une perturbation, en dépend (Griffiths et al., 2004).

3.2.3. Communautés fongiques dans les sols contaminés

Dans les sols, les champignons jouent un rôle complémentaire des bactéries dans les étapes clés des cycles biogéochimiques. Par ailleurs, ils possèdent une physiologie différente de celle des bactéries et les perturbations des communautés fongiques face à un stress sont donc différentes de celles subies par les bactéries. De nombreuses études montrent que les ratios champignons:bactéries, évalués par l'analyse des PLFA, des ergostérols ou par PCR en temps réel, varient selon les conditions environnementales (Strickland & Rousk, 2010). Ces ratios sont par exemple plus élevés dans les sols forestiers, où le rapport C:N est plus élevé, que dans les sols agricoles (Fierer et al., 2005; Lauber et al., 2008) ou dans les sols où l'humidité est maintenue par irrigation (Williams & Rice, 2007).

Pourtant, il existe très peu de données sur les communautés fongiques dans les sols pollués. Moins de 10% des publications scientifiques portant sur les communautés microbiennes dans les environnements

pollués aux HAP incluait les communautés fongiques (recherche sur la base de données Scopus, www.scopus.com, avec les mots clés « PAH » et « bacterial community » ou « fungal community » entre 1970 et 2010). De fait, l'application des méthodes de biologie moléculaire et de biochimie (§ 3.2.1) à l'étude des communautés fongiques est systématiquement retardée par rapport à celle des communautés bactériennes, les mycologues ayant tendance à utiliser préférentiellement des approches basées sur l'observation des cultivables (Anderson & Cairney, 2004). Néanmoins, les outils de biologie moléculaire sont de plus en plus appliqués à l'étude des communautés fongiques. Par exemple, Zhou (2011) a étudié l'abondance fongique dans un sol artificiellement pollué au PHE ou au PHE et DBA en présence de plantes par PCR en temps réel ciblant les gènes codant les ARNr 18S.

Comme pour les bactéries, l'exposition aux polluants organiques entraîne la sélection de populations fongiques capables de résister à la pollution, voire de la dégrader. Ainsi, Obire & Anyanwu (2009) ont observé l'augmentation du nombre de champignons cultivables capables d'utiliser le pétrole brut comme source de carbone en 18 semaines, dans un sol artificiellement pollué par du pétrole. Cette augmentation était d'autant plus marquée que la contamination était importante, passant d'un facteur 2,5 avec 0,5% de pétrole brut à un facteur 25 avec 3% de pétrole brut dans le sol. Ces auteurs ont pu identifier 14 genres différents parmi les souches dégradantes, appartenant toutes aux ordres Zygomycètes et Deutéromycètes (plusieurs de ces derniers correspondant à des formes imparfaites d'Ascomycètes). La diversité des souches dégradantes diminuait avec l'intensité de la pollution : seuls 7 genres (dont *Fusarium*, *Cladosporium*, *Mucor* et *Penicillium*) ont été retrouvés à partir du sol le plus contaminé (5% de pétrole brut). Ces résultats suggèrent que la pression de sélection appliquée par la pollution diminue la diversité fongique et tend à favoriser la dominance par les quelques espèces les mieux adaptées. De plus, le fait que des représentants des mêmes genres (*Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium*) aient été retrouvés dans des sédiments fortement contaminés aux HAP indique que ces taxons sont particulièrement résistants aux pollutions organiques (Salvo et al., 2005). Cette dominance par un faible nombre d'espèces dans les environnements pollués aux hydrocarbures a été confirmée par DGGE sur un sol artificiellement contaminé au pétrole et au DBT (dibenzothiophène) (Van Elsas et al., 2000). Dans cette étude, les auteurs ont observé, dès le 15^{ème} jour suivant la contamination, une très forte dominance des genres *Fusarium* et *Trichoderma*, présents par ailleurs dans le sol non pollué mais associés à de nombreuses espèces rares, c'est-à-dire présentant des abondances relatives faibles.

Davantage de travaux ont été consacrés à l'impact de la pollution métallique sur les communautés fongiques. Macdonald et al. (2008) ont évalué par tRFLP les changements de la structure des communautés de bactéries, champignons, archaea et Actinobactéries dans un sol 12 ans après l'application de boues d'épuration polluées au Zn et au Cu. Leurs résultats indiquent un changement plus important et plus durable de la structure des communautés fongiques que celui observé pour les communautés bactériennes, ce qui pourrait être dû au fait que les bactéries sont capables d'acquérir des gènes de résistance aux ETM par transfert horizontal ce qui leur conférerait une meilleure résistance et une meilleure résilience. A l'inverse, Gomes et al. (2010) ont montré que l'impact de boues

d'épuration polluées au Zn et au Cd sur les communautés fongiques d'un sol était moins important, à court (7 jours) et à moyen (6 mois) terme, que sur les communautés bactériennes.

L'évolution *in situ* et sur le long terme de l'abondance et de la diversité des populations fongiques dans les sols pollués aux HAP reste donc un sujet à explorer.

3.3. Biodégradation et dissipation des HAP dans les sols

Le terme « (bio)dégradation » est employé de manière quasi-systématique dans la littérature pour désigner la baisse des concentrations des composés HAP parentaux. Pourtant, en considérant (1) les mécanismes d'adsorption et absorption sur les particules de sol ou les organismes et (2) les voies microbiennes de métabolisation des HAP qui peuvent être incomplètes et aboutir à l'accumulation de métabolites « dead-end » (voir § 1.3.2 et 2), la disparition d'un HAP ne peut être confondue avec sa dégradation complète. En l'absence de dosage et d'identification des métabolites produits et/ou de mesure directe de la minéralisation des HAP (par marquage isotopique, par exemple), les termes de « biotransformation » ou de « dissipation » semblent plus appropriés.

Les facteurs influençant la dissipation des HAP dans les sols sont généralement étudiés au laboratoire à l'aide de microcosmes plus ou moins sophistiqués. Ceux-ci doivent répondre aux exigences de la question scientifique, satisfaire aux contraintes techniques (faisabilité de l'échantillonnage ou croissance microbienne par exemple) en reproduisant le plus fidèlement possible les conditions observées *in situ*, ce qui constitue le défi majeur de ce type d'expériences.

3.3.1. Effets des caractéristiques physico-chimiques du sol sur la biodégradation des HAP

3.3.1.1. Effets indirects via l'altération de la croissance, de l'activité globale ou de la structure des communautés microbiennes

De nombreux paramètres physico-chimiques sont susceptibles d'altérer la survie, la croissance et l'activité des microorganismes, donc indirectement la biodégradation des HAP. Parmi les facteurs les plus déterminants du développement microbien dans les sols, on retrouve : le pH (Lauber et al., 2008; Rousk et al., 2010), la disponibilité en eau, (Williams & Rice, 2007; Yergeau et al., 2007), les conditions nutritives (teneurs en N, P, notamment) (Haase et al., 2008; Zhou et al., 2009) et la quantité et la qualité de la MOS (Griffiths et al., 1998; Pennanen et al., 2004).

Durant plusieurs décennies, l'attention a été portée sur l'utilisation de champignons WRB pour la bioremédiation de sols contaminés aux polluants organiques. Or l'habitat naturel de ces champignons est le bois en décomposition, un milieu particulièrement riche en nutriments et très différent des

écosystèmes des sols pollués, souvent oligotrophes (Baldrian, 2008). Dans ce contexte, les expériences de bioremédiation de sols pollués aux HAP par des WRB impliquent très souvent l'addition d'un substrat ligno-cellulosique permettant la croissance de l'inoculum (Bogan et al., 1996; Eggen & Majcherczyk, 1998; Gramss et al., 1999b).

La biodégradation des HAP dans les sols peut être limitée par la teneur en eau (Zhou et al., 2009), un des facteurs déterminants de l'accessibilité du polluant aux microorganismes. Les sols contiennent de nombreuses micro-niches, indépendantes les unes des autres : la forme unicellulaire des bactéries leur interdit le passage d'une microniche à l'autre en l'absence de vecteur (eau, racine, mycélium,...) (de Boer et al., 2005). En revanche, la forme hyphale des champignons et des Actinobactéries leur permet d'étendre leur appareil végétatif de manière considérable (jusqu'à plusieurs mètres), ainsi que leur production d'exopolysaccharides, leur procurant en théorie une meilleure accessibilité au polluant.

Par ailleurs, la multipollution en HAP et ETM des sols de friches industrielles peut inhiber la biodégradation des HAP car les ETM affectent drastiquement la composition et l'activité des communautés microbiennes (Kandeler et al., 2000; Vivas et al., 2008; Khan et al., 2010; Marcial Gomes et al., 2010). Les ETM, essentiels (Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, Ni,...) comme non essentiels (Cr, Cd, Pb, Hg, Ag, As,...) sont en effet toxiques pour les cellules bactériennes et fongiques à des teneurs élevées (Silver, 1996; Baldrian, 2003) et seuls les microorganismes résistants peuvent survivre dans les sols contaminés. L'activité globale de la microflore est également affectée par la présence d'ETM : il a été montré que l'activité acide phosphatase, indicateur de l'activité globale, était d'autant plus faible que les concentrations en Cd et en Pb étaient élevées dans des microcosmes de sol (Khan et al., 2010). La Figure 12 illustre les différentes manières dont la concentration en ETM peut affecter la biodégradation des polluants organiques (Sandrin & Maier, 2003). La relation A, la plus fréquemment observée, correspond à une corrélation linéaire entre l'inhibition de la biodégradation et la concentration en métal. Dans des microcosmes de sol par exemple, Sockhn et al. (2001) ont observé une inhibition de la biodégradation du phénanthrène proportionnelle à la concentration de Cu et à la diminution consécutive de l'abondance microbienne. Les relations B et C ont été observées en utilisant des consortia et pourrait donc découler de la sélection de différentes populations bactériennes en fonction des concentrations.

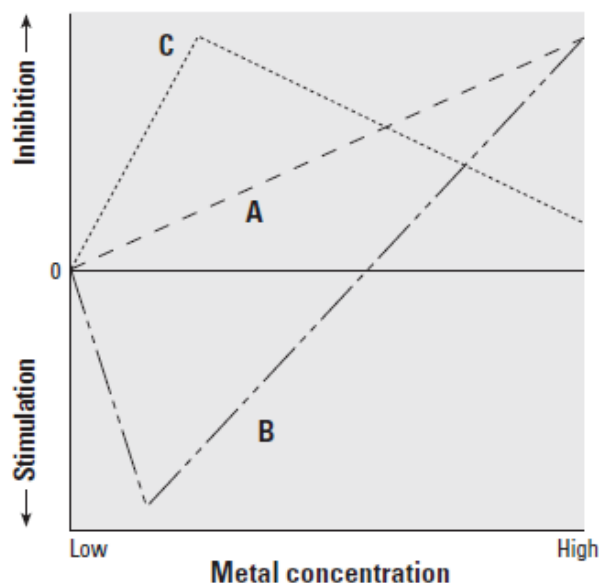


Figure 12. Effet des ETM sur la biodégradation des polluants organiques, selon Sandrin & Maier (2003). A : Relation linéaire. B : induction de la biodégradation par de faibles concentrations de métal, inhibition par des concentrations élevées, C : inhibition plus importante de la biodégradation avec de faibles concentrations en ETM.

3.3.1.2. Effets directs sur les potentiels de biodégradation des HAP

Les paramètres physico-chimiques du sol peuvent également affecter directement l'expression ou l'activité des enzymes impliquées dans la biodégradation des HAP.

Comme toutes les enzymes, les LME ont des pH optimaux d'activité : le pH du sol dans lequel elles sont sécrétées peut donc influencer leur potentiel de dégradation des HAP. Ainsi, Gramss et al. (1999a) ont mesuré une dégradation du PYR, par le WRB *Hypholoma fasciculare* 16 fois plus importante dans un sol acide que dans un sol à pH neutre, en concordance avec de nombreux travaux indiquant un pH optimum plutôt acide pour la production et l'activité des LME (Singh & Chen, 2008). D'autre part, il a été montré que l'internalisation du PHE par *Mycobacterium* était augmentée d'un facteur 12 entre les pH 7,5 et 6,5, suggérant des modifications de perméabilité membranaire aux HAP par le pH (Kim et al., 2005).

La présence de sources de carbone additionnelles dans un sol conditionne directement la biodégradation des HAP, en particulier par les champignons. Dans les processus de cométabolisme, la présence de substrats de croissance est indispensable à la biodégradation des HAP (Baldrian, 2008). Il a même été montré que l'expression des LME est induite directement par les substrats ligno-cellulosiques (Cerniglia, 1997; Martinez, 2002; Peng et al., 2008).

L'existence de micro-niches anaérobies dans les sols est un facteur influençant la biodégradation des HAP. Les voies enzymatiques et surtout les populations bactériennes impliquées sont différentes en aérobie et en anaérobiose (§ 2.1.1). Par ailleurs, il n'existe pas à notre connaissance de résultats indiquant la possibilité de biodégradation anaérobie des HAP par les champignons, bien que quelques études aient montré que celle-ci était possible en conditions micro-aérobies (Durrant, 1996; Silva et al., 2009a).

Les concentrations en ETM peuvent également influencer directement l'activité des enzymes métabolisant les HAP. De fortes concentrations en ETM dans le milieu extracellulaire peuvent inhiber de manière aspécifique l'activité des enzymes sécrétées en modifiant irréversiblement leur conformation par fixation sur les groupements thiol (Baldrian, 2003). Néanmoins, certains métaux sont essentiels à la fonction des enzymes de dégradation : les manganèse-péroxydases et les laccases utilisent respectivement les ions Mn^{2+} et Cu^{2+} comme cofacteurs (Baldrian, 2003; Singh & Chen, 2008). Par ailleurs, il a été montré que l'expression des gènes codant les laccases fongiques pouvait être induite au niveau transcriptionnel par le cuivre (Collins & Dobson, 1997). De la même manière, les (PAH-RHD) α bactériennes ont des activités dépendantes du fer, le domaine catabolique contenant un centre Rieske [2Fe-2S] ainsi qu'un motif de liaison au fer mononucléaire (Brezna et al., 2003; Peng et al., 2008).

3.3.2. Biodisponibilité des HAP

Depuis quelques années, il apparaît de plus en plus évident que la mesure de la teneur en HAP totaux dans les sols n'est pas le reflet de l'exposition réelle de la biosphère (Haritash & Kaushik, 2009; Pandey et al., 2009). La fraction biodisponible d'un polluant, organique ou métallique, est la part de ce polluant susceptible d'interagir avec les organismes vivants, donc la fraction susceptible d'être toxique et/ou biodégradée.

3.3.2.1. *Mesure de la part de HAP biodisponibles*

Différentes méthodes d'extraction exhaustives utilisent des solvants forts, comme l'acétonitrile ou le dichlorométhane (DCM), permettant de libérer les HAP fortement adsorbés sur les particules de sol, voire séquestrés (§ 3.1.1) (Macleod & Semple, 2000; Swindell & Reid, 2006). L'extraction ménagée permet d'évaluer la part biodisponible des HAP, sur la base du principe que l'accessibilité des polluants aux microorganismes est fonction du transfert de masse entre la phase solide et la phase aqueuse (Swindell & Reid, 2006). Ainsi, pour valider les protocoles d'extraction des HAP biodisponibles, la fraction extraite est souvent comparée au taux de biodégradation par des micro-organismes dégradants actifs. L'extraction au butanol, aux cyclodextrines (molécules organiques utilisées en solution aqueuse présentant une cavité hydrophobe intramoléculaire) ou à la résine Tenax[®] sont les

méthodes les plus utilisées pour évaluer la fraction biodisponible des HAP dans les sols (Cornelissen et al., 1997; Macleod & Semple, 2000; Bogan & Sullivan, 2003; Semple et al., 2006; Swindell & Reid, 2006).

Comme les HAP totaux, les HAP biodisponibles extraits peuvent être analysés par GC-MS (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) et HPLC (chromatographie liquide à haute performance) (Binet et al., 2001; Joner & Leyval, 2003; Biache et al., 2008). La distribution spatiale des HAP dans les sols est très hétérogène à l'échelle métrique, centimétrique et millimétrique en raison de l'hétérogénéité du sol (donc des paramètres physico-chimiques influençant le devenir des HAP, § 3.1) et de l'hétérogénéité spatiale du potentiel microbien de minéralisation des HAP (Bengtsson et al., 2010; Hybholt et al., 2011). Cette hétérogénéité aboutit très souvent à de grandes variabilités des teneurs en HAP dans les échantillons de sol, rendant difficile l'interprétation des résultats expérimentaux.

3.3.2.2. Biodisponibilité et biodégradation des HAP

Dans beaucoup d'études, les auteurs observent la biodégradation ou dissipation des HAP dans des sols artificiellement contaminés par des HAP (Gramss et al., 1999b; Joner & Leyval, 2001; Chiapusio et al., 2007). Ce type d'expérience permet de comparer des facteurs biologiques avant et après contamination ou de préciser les processus en comparant le sol contaminé avec un témoin non contaminé. Ces conditions expérimentales permettent également de contourner la limitation de la biodégradation des HAP par leur faible biodisponibilité dans des sols présentant une contamination ancienne (Amezcuza-Allieri et al., 2005). De fait, il a été montré que la fraction biodégradable et le taux de biodégradation des HAP étaient inversement proportionnels à l'ancienneté de la contamination (Hatzinger & Alexander, 1995; Macleod & Semple, 2000). Toutefois, certains travaux ont montré une dissipation des HAP dans des sols historiquement contaminés, par exemple en présence de plantes (Joner & Leyval, 2003). En revanche, des expériences de bioremédiation *in situ* des HAP dans les sols anciennement contaminés (plusieurs dizaines d'années) aboutissent fréquemment à des taux de dissipation très faibles, malgré l'adaptation de la microflore (Allard et al., 2000; Cébron et al., 2009; Achten et al., 2011).

Certains microorganismes sont connus pour produire des surfactants augmentant la solubilité, donc la biodisponibilité des HAP (Deziel et al., 1996; Johnsen et al., 2005; Peng et al., 2008). Ces surfactants peuvent être portés sur la surface membranaire comme les glycosphingolipides des bactéries des genres *Sphingobium* et *Sphingomonas* (Johnsen & Karlson, 2004). La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* est connue pour sa production de biosurfactants, les rhamnolipides, et de la protéine « bio-émulsifiante » PA (Holden et al., 2002). Par ailleurs, de nombreuses études expérimentales ont montré l'augmentation de la biodégradation dans les sols par l'addition de surfactants de synthèse, comme le

Tween 80, le Triton X-100 ou les cyclodextrines, ou naturels, comme les rhamnolipides (Garon et al., 2002; Wu et al., 2008; Rafin et al., 2009).

3.3.3. Interactions microbiennes et biodégradation des HAP

Tous les types d'interactions écologiques, délétères (parasitisme, prédation...) comme bénéfiques (symbiose, mutualisme), sont susceptibles d'avoir lieu entre les microorganismes (Whipps, 2001; de Boer et al., 2005; Tarkka et al., 2009). Plus généralement, la compétition inter-populations et intra-population, donc la compétitivité (« fitness ») des populations et individus, est le facteur déterminant de la structure de la communauté microbienne. Ainsi, la présence de microorganismes possédant un potentiel de biodégradation des HAP n'est pas garante de cette biodégradation si ces microorganismes ont une compétitivité faible ou réduite dans les conditions rencontrées. Par ailleurs les interactions entre microorganismes capables de dégrader les HAP, notamment entre bactéries et champignons, sont très peu étudiées. De nombreuses observations soutiennent pourtant l'hypothèse que les interactions microbiennes pourraient être un facteur déterminant de la dissipation des HAP dans les sols.

Les expériences visant à comprendre l'influence des paramètres physico-chimiques sur la biodégradation des HAP sont très souvent réalisées en inoculant dans un sol un (des) microorganisme(s) connu(s) pour dégrader les HAP *in vitro* (Boonchan et al., 2000; Byss et al., 2008; Anastasi et al., 2009). L'inoculation de différents champignons dégradants dans un sol anciennement contaminé au goudron de houille a abouti à l'inhibition de la biodégradation des HAP par la microflore indigène (Canet et al., 2001). Réciproquement, Andersson et al. (2000) ont montré que la croissance et la dégradation des HAP dans un sol non stérilisé inoculé avec *Pleurotus ostreatus* et *Phanerochaete chrysosporium* étaient inhibées par rapport à celles observées dans le même sol stérilisé avant l'inoculation, indiquant une interaction négative avec la microflore indigène. Dans le cas des plantes mycorhizées par un champignon mycorhizien à arbuscules, l'augmentation de la dissipation des HAP semble liée à une modification de la structure de la communauté bactérienne (Joner et al., 2001, Corgié et al., 2006).

Byss et al. (2008) ont montré une diminution significative de biomasse bactérienne dans un sol contaminé à la créosote suite à l'inoculation des WRB *Pleurotus ostreatus* et *Irpex lactus* dégradant les HAP *in vitro*. L'inoculation par *P. ostreatus* a abouti à une biodégradation significativement plus importante qu'avec la microflore indigène seule et ceci pourrait être lié aux modifications qualitatives subies par la microflore bactérienne (augmentation de la proportion des Actinobactéries). Sack et al. (1997b) ont même montré un effet synergique des activités de dégradation de PYR marqué au ¹⁴C par le champignon *Kuehneromyces mutabilis* et la microflore indigène dans un sol. Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'étape limitante de la biodégradation du PYR (l'oxydation initiale d'un cycle) était alors réalisée par le champignon, libérant des métabolites plus solubles susceptibles d'être utilisés comme source de carbone par la microflore indigène, en concordance avec d'autres résultats (Kotterman et al., 1998; Boonchan et al., 2000).

Sur la base de ce principe de coopération métabolique entre microorganismes, de nombreux travaux ont porté ces dernières années sur l'utilisation de consortia microbiens pour accélérer la biodégradation des HAP (Boonchan et al., 2000; Su et al., 2006; Vandermeer & Daugulis, 2007; Anastasi et al., 2009). Lors d'une expérience de bioaugmentation sur un sol pollué aux HAP par un consortium mixte bactérien et fongique, Jacques et al. (2008), ont observé une minéralisation de l'ANT par le consortium deux fois plus élevée que la somme des minéralisations par les partenaires séparés.

4. Dissipation des HAP dans la rhizosphère

4.1. La rhizosphère : définition et propriétés

Le terme rhizosphère, utilisé pour la première fois en 1904 par Lorentz Hiltner, désigne le compartiment de sol sous l'influence directe des racines et de leurs exsudats. En effet, la colonisation du sol par les racines fournit à la communauté microbienne des sources de carbone organique stimulant leur croissance autour des racines, effet connu sous le nom d'« effet rhizosphère » (Whipps, 2001). L'effet rhizosphère est donc quantitatif mais également qualitatif, sélectionnant certaines populations et en contre-sélectionnant d'autres (Marcial Gomes et al., 2003; Corgié et al., 2004; Phillips & Fahey, 2006; Sanguin et al., 2006).

L'effet rhizosphère est principalement lié à la libération d'exsudats racinaires. Ceux-ci sont constitués notamment d'acides organiques (lactate, acétate, oxalate, succinate, fumarate, malate, citrate, isocitrate et aconitate), acides aminés (sérine, alanine, glutamate,...) et de sucres (glucose, fructose, saccharose) (Marschner et al., 1997; Baudoin et al., 2003; Scheffknecht et al., 2006). Ces photosynthétats sont des sources de carbone facilement métabolisables par les populations fongiques et bactériennes. Des mélanges de polysaccharides (mucilage), de polypeptides et de protéines peuvent également être exsudés par les plantes (Walker et al., 2003). Les exsudats racinaires contiennent également des métabolites secondaires, par définition non-essentiels au métabolisme basal de la plante, tels que l'acide salicylique, les terpénoïdes, classe comprenant plus de 15 000 polymères différents de l'isoprène, et les composés phénoliques comme des phénylpropanoïdes, des flavonoïdes, des xanthonoïdes, des stilbénoloïdes et des coumarines (Fig. 13) (Singer et al., 2003). Leurs fonctions sont variables, de la signalisation pré-symbiotique à l'allélopathie, en passant par l'antibiose (Singer et al., 2003; Walker et al., 2003). Ces métabolites secondaires peuvent modifier la structure de la communauté microbienne en sélectionnant des populations capables de les métaboliser, d'y résister dans le cas des composés antibiotiques ou d'y répondre dans le cas des microorganismes symbiotiques (champignons mycorrhiziens et rhizobactéries).

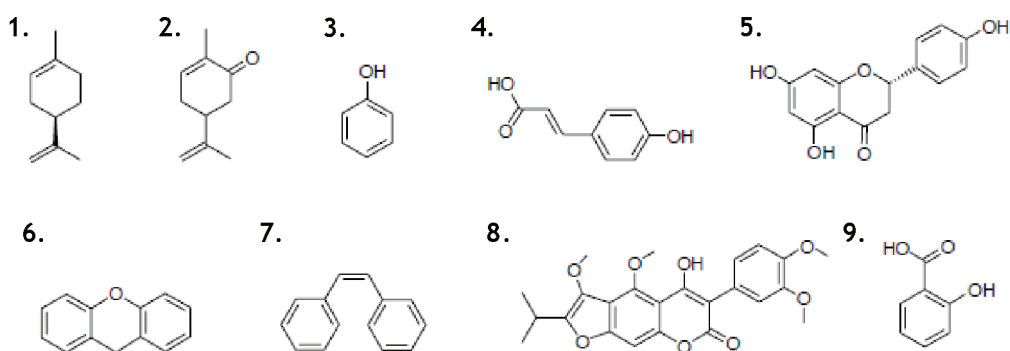


Figure 13. Quelques exemples de métabolites secondaires produits par les plantes. Terpénoïdes : 1 : Limonène, 2 : Carvone. Phénoliques : 3 : Phénol, 4 : Acide hydroxycinnamique (phénylpropanoïde), 5 : Naringinène (flavonoïde), 6 : Xanthone, 7 : Stilbène, 8 : dihydrochalcone (coumarine). 9 : Acide salicylique.

La composition des exsudats, donc l'effet rhizosphère, varie en fonction de l'âge de la plante, du stade physiologique dans lequel elle se trouve et de son espèce, voire même de son cultivar (Shaw et al., 2006; Broeckling et al., 2008; Curlevski et al., 2010). Par exemple, des modifications importantes de la structure de la communauté rhizosphérique de différents cultivars de maïs ont été mises en évidence lors du développement de la plante, de la germination à la sénescence, les communautés étant différentes entre elles et de celles du sol non rhizosphérique (« bulk soil ») (Marcial Gomes et al., 2003). La monoculture d'une plante favorise généralement la sélection de microorganismes pathogènes (Nicol et al., 2003; Manici & Caputo, 2009). Les caractéristiques physico-chimiques des sols, notamment leurs teneurs en nutriments minéraux jouent aussi un rôle dans l'amplitude de l'effet rhizosphère (Phillips & Fahey, 2007).

4.2. Devenir des HAP dans la rhizosphère

De nombreux travaux ont porté sur l'effet des plantes sur la dissipation des HAP dans la rhizosphère. Comme le montrent les paragraphes suivants, les résultats obtenus sont très variables, pouvant aller d'une absence d'effet de la présence de plantes, jusqu'à une augmentation très significative de la dissipation des HAP. Ces résultats, qui peuvent paraître contradictoires, soulignent en réalité la complexité des processus rhizosphériques, liés au type de HAP, à leur disponibilité, au type de sol, à la plante, etc...

Peu d'études ont pu montrer une implication directe des végétaux dans la dégradation des HAP (Gianfreda & Rao, 2004). Les HAP peuvent être internalisés dans les plantes depuis les sols *via* le système racinaire mais la translocation des HAP vers les parties aériennes est très faible en raison de leur hydrophobicité et varie selon les espèces (Binet et al., 2000; Fismes et al., 2002; Gao & Zhu, 2004). Ainsi, la phytovolatilisation (relargage vers l'atmosphère via les stomates, § 5) et l'accumulation dans les

tissus végétaux sont réduites. Gramss et al. (1999c) ont observé la production de peroxydases et laccases par la luzerne, la moutarde et le cresson, en particulier dans les plants sénescents. Chroma et al. (2002) ont montré la dégradation d'ACE par des cultures stériles de plantes *in vitro*, concomitante à la production de peroxydases, mais les conditions expérimentales très artificielles de cette étude ne permettent pas d'extrapoler les résultats au milieu tellurique. D'une manière générale, il est aujourd'hui admis que la rhizodégradation des HAP résulte plutôt de l'activité métabolique des microorganismes rhizosphériques (Haritash & Kaushik, 2009).

L'effet des plantes sur la biodégradation des HAP semble également varier selon l'espèce. Liste & Alexander (2000) ont mesuré la biodégradation du PYR dans la rhizosphère de neuf plantes de diverses espèces et montré que toutes avaient un effet positif sur la biodégradation par rapport au sol non rhizosphérique, en particulier le colza, l'avoine et le poivre. Dans un sol anciennement contaminé aux HAP, des effets très différents en fonction des plantes, mais également du HAP, ont été observés (Liste & Prutz, 2006). La moutarde, par exemple, a augmenté significativement la dégradation des HAP légers (NAP, PHE et ANT, notamment) comme lourds (DBA, BghiP). Le cresson en revanche a ralenti cette dégradation et a même contribué à l'augmentation des fractions extractibles des HAP de poids moléculaires élevés, ce qui pourrait être lié à la production de surfactants augmentant leur solubilité. Les plantes herbacées, en particulier le ray-grass anglais (*Lolium perenne*), ont été beaucoup étudiées en raison de leur caractère vivace et de leur production abondante de racines (Binet et al., 2001; Joner & Leyval, 2001; Kirk et al., 2005; Rezek et al., 2008). Beaucoup de travaux étudiant le devenir des HAP dans la rhizosphère ont utilisé les légumineuses, notamment la luzerne (*Medicago sativa*) et le trèfle (différentes espèces de *Trifolium*), généralement tolérantes à de fortes concentrations de HAP et avantagées dans les milieux oligotrophes par leurs symbioses mycorhiziennes et fixatrices d'azote (Muratova et al., 2003; Chiapusio et al., 2007; Cébron et al., 2009; Zhou et al., 2009).

Certains métabolites secondaires exsudés par les plantes, les composés phénoliques notamment, ont des structures analogues aux HAP : la xanthone et le stilbène sont par exemple des analogues structuraux du PHE (Fig. 13). Le salicylate est connu pour induire l'expression de gènes codant pour la dégradation de HAP (§ 2.1.2.2) (Singer et al., 2003). Ainsi les exsudats racinaires pourraient favoriser le développement de bactéries dégradant les HAP, comme Louvel et al. (2011) l'ont montré dans des expériences en microcosmes simplifiés. Par ailleurs, les plantes pourraient favoriser la biodégradation des HAP en produisant des surfactants, comme les saponines augmentant leur biodisponibilité (Zhou et al., 2011). Cébron et al. (2011b) ont étudié l'effet d'exsudats racinaires sur les communautés bactériennes actives et sur la dégradation de PHE marqué au ^{13}C dans un sol anciennement contaminé aux HAP. Ces auteurs ont montré que la diversité des bactéries ayant utilisé le ^{13}C -PHE était différente avec et sans exsudats. Lorsque le PHE fraîchement ajouté était la seule source de carbone, les bactéries majoritairement impliquées dans sa dégradation appartenaient aux genres *Pseudoxanthomonas* et *Microbacterium*, alors que les genres *Pseudomonas* et *Arthrobacter* étaient favorisés en présence d'exsudats racinaires. Cependant, l'apport par les exsudats racinaires de sources de carbone simples,

substrats de croissance préférentiels pour les bactéries, peut aussi conduire à un ralentissement de la dissipation des HAP, parfois temporaire, en présence de plantes (Corgié et al., 2004 ; 2006a, Cébron et al., 2011b ; Louvel et al., 2011).

Joner et al. (2004) ont montré un effet positif, très significatif, de la présence de luzerne sur la biodégradation des HAP à 3, 4 et 5 cycles dans un sol anciennement contaminé non fertilisé. Chiapuso et al. (2007) ont montré un effet positif de l'ajout de plantes (trèfle rouge ou ray-grass) sur la dissipation du PHE en 30 jours dans deux sols artificiellement contaminés, alors que dans les mêmes conditions aucun effet n'a été observé sur un troisième sol. Zhou et al. (2010) n'ont observé aucun effet significatif de la présence de luzerne sur la biodégradation de PHE et DBA dans un sol artificiellement pollué, malgré une proportion significativement supérieure des gènes codant les (PAH-RHD) α des bactéries à Gram positif dans le sol planté. A l'aide de dispositifs de culture à compartiments visant à évaluer la biodégradation des HAP en fonction de la distance (0-3 mm, 3-6 mm, 6-9 mm) à la racine, Corgié et al. (2004 ; 2006a; 2006c; 2006d) ont mis en évidence un gradient rhizosphérique de la biodégradation du PHE parallèle à un gradient de densité des bactéries dégradant les HAP. De fait, les communautés totales et actives étaient différentes entre elles et en fonction de la distance à la racine (Corgié et al., 2006c). Si le nombre de copies de gènes codant les (PAH-RHD) α était effectivement plus élevé à proximité des racines, leur expression n'était pas significativement différente. Néanmoins, la mesure a été effectuée après cinq semaines, alors que le phénanthrène était déjà dégradé à 90% (Corgié et al., 2006e).

Les conditions nutritives (teneur en eau, en phosphore) sont aussi susceptibles d'influencer la dissipation des HAP dans la rhizosphère, par leur effet sur la croissance des plantes et les microorganismes associés (Zhou et al., 2009).

Les bactéries endophytes, commensales ou symbiotiques, pourraient également avoir un rôle dans la dégradation des HAP, soit directement, soit indirectement en servant de réservoir de plasmides portant des gènes de dégradation pour la communauté microbienne rhizosphérique (Phillips et al., 2008).

La mycorhization peut également influencer l'orientation et l'amplitude de l'effet rhizosphère sur la dégradation des HAP, en augmentant la production de biomasse végétale et/ou en modifiant la composition des exsudats racinaires et la structure des communautés bactériennes, bien qu'ici encore des résultats variables aient été observés (Binet et al., 2000; Joner & Leyval, 2001; Corgié et al., 2006e; Verdin et al., 2006a; Mathur et al., 2007; Zhou et al., 2009). En revanche, il n'existe pas, à notre connaissance, de données concernant l'impact des interactions entre bactéries et champignons non-mycorhiziens sur la dissipation des HAP dans la rhizosphère.

5. Les techniques biologiques de remédiation des sols contaminés par les HAP

Les techniques de bioremédiation des sols pollués sont basées sur l'application des potentiels métaboliques à l'atténuation de la toxicité des polluants via la biotransformation, la minéralisation ou l'immobilisation de ces polluants (Pandey et al., 2009). Elles présentent toutes l'avantage de maintenir les propriétés physico-chimiques, voire biologiques, du sol et sont relativement peu coûteuses (Leyval, 2005). Parmi ces techniques, la biostimulation, la bioaugmentation et la phytoremédiation sont applicables dans le cas d'une pollution par les HAP.

La biostimulation est un principe de bioremédiation consistant à stimuler l'activité microbienne globale, et donc l'atténuation naturelle par la microflore dégradante, en modifiant les conditions physico-chimiques du milieu, *in situ* ou *ex situ* après excavation des terres (Leyval, 2005; Scullion, 2006; Pandey et al., 2009). Concernant la dépollution des HAP, cette stimulation peut impliquer l'amendement des sols par des nutriments minéraux et/ou organiques, des surfactants (§ 3.3.2.2) ou encore l'aération du sol (bioventing) stimulant les activités métaboliques aérobies (Joner & Leyval, 2001; Atagana, 2004; Mohan et al., 2006; Ros et al., 2010). Le landfarming, par exemple, consiste à étaler le sol contaminé sur une faible épaisseur (10-15 cm), favorisant ainsi les activités microbiennes aérobies, avec des amendements de N, P et K (Atagana, 2003). Le traitement par biopile, ou biotertre, est un autre exemple de procédé de bioremédiation de sols pollués aux HAP basé sur le principe de la biostimulation. Le sol contaminé est placé en tas sur une surface étanche, empêchant la contamination du sol sous-jacent, et recouvert d'une membrane imperméable au gaz, limitant l'émission de VOC. La biopile est équipée de systèmes d'irrigation et d'aération en re-circulation (ré-injection des eaux et de l'air après filtration). De plus, le sol est amendé en nutriments minéraux et/ou organiques. Sur un sol issu d'une friche industrielle multicontaminé aux HAP et ETM, ce traitement a permis de baisser la concentration totale en HAP de plus de 3 000 mg.kg⁻¹ à 480 mg.kg⁻¹ (Norini, 2007). Toutefois, les teneurs en ETM étaient supérieures après traitement, en raison probablement de l'augmentation de leur extractabilité due aux activités microbiennes.

La bioaugmentation implique l'inoculation de souches dégradantes dans le milieu contaminé (Vogel, 1996; Scullion, 2006; Pandey et al., 2009). Comme la biostimulation, avec laquelle elle est d'ailleurs souvent combinée, elle peut avoir lieu *ex situ* après excavation des terres ou *in situ*. De nombreuses expériences en laboratoire visent à comprendre les mécanismes déterminant l'efficacité de la bioaugmentation (Juhász et al., 2000; Garon et al., 2004; Johnsen et al., 2007). Le facteur limitant reste la plupart du temps la survie et la croissance de l'inoculum dans le sol, en lien avec sa compétitivité face à la microflore indigène, même lorsque les souches dégradantes ont été isolées du sol contaminé lui-même (voir § 3.3.3) (van Veen et al., 1997; Blumenroth & Wagner-Döbler, 1998).

La phytoremédiation est définie comme l'usage de plantes pour extraire, séquestrer ou dégrader un polluant, organique ou métallique et comprend la phytoextraction, la phytovolatilisation, la phytoaccumulation, la phytostabilisation et la rhizodégradation (Fig. 14) (Abhilash et al., 2009). Comme souligné précédemment (§ 4.2), les phénomènes de volatilisation et de transfert aux plantes des HAP sont très limités et la phytoremédiation des HAP impliquerait principalement la rhizodégradation, c'est-à-dire la dissipation des HAP par les microorganismes rhizosphériques.

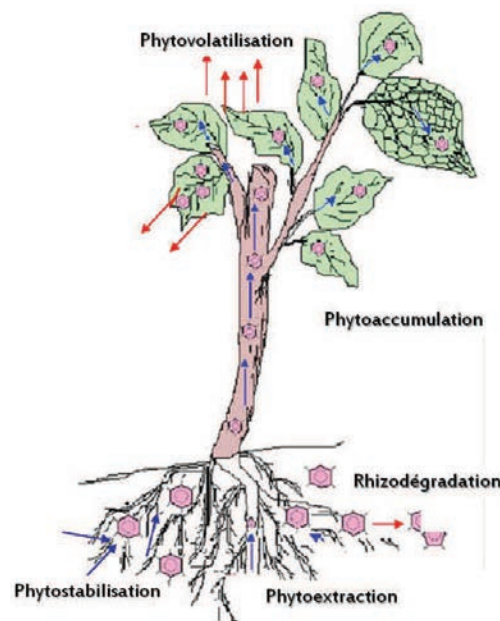


Figure 14. Les différents mécanismes impliqués dans la phytoremédiation des polluants, d'après Abhilash et al. (2009).

Le traitement des pollutions organiques par les techniques de bioremédiation est relativement long par rapport aux techniques non biologiques, comme l'incinération ou la désorption thermique, et s'applique plutôt à des contaminations de surface et de faible importance (Leyval, 2005). Néanmoins, en France en 2008, 1 276 700 tonnes de sol pollué ont été soumises à un traitement de dépollution par des techniques biologiques, principalement par bioventing ou biotertre, soit 39% des sols traités cette même année (hors pollutions aux pesticides et pyrotechniques)(www.ademe.fr). La phytoremédiation des HAP, en revanche, est aujourd'hui encore au stade expérimental. En effet, il apparaît clairement que les interactions entre les différents acteurs écologiques des sols pollués (le sol lui-même, les HAP, les microorganismes et les plantes) régissent la biodégradation et la dissipation des HAP dans les sols et doivent être mieux comprises pour améliorer l'efficacité des procédés de bioremédiation (Pandey et al., 2009).

6. Objectifs de la thèse

Les objectifs de ce travail de thèse étaient de préciser la dynamique des HAP dans la rhizosphère sous l'effet des microorganismes et de leurs interactions, en considérant les bactéries mais également les champignons, ces derniers ayant fait l'objet de beaucoup moins d'études. Pour cela, ce travail s'est articulé autour d'études à la fois *in situ* et *in vitro*.

Dans une première partie, considérant l'absence de données bibliographiques sur ce sujet, la structure et la diversité des communautés fongiques ont été étudiées *in situ*, dans un sol de friche industrielle présentant une forte contamination en HAP, et son évolution au cours du temps (Chapitre III-1, Thion et al., soumis).

Dans une perspective de meilleure compréhension de l'influence des interactions écologiques sur la dissipation des HAP par les microorganismes, l'objectif de la deuxième partie de ce travail était d'étudier les interactions de souches microbiennes capables de dissiper les HAP, dans différents dispositifs expérimentaux, des plus simples aux plus complexes. Des souches fongiques et bactériennes ont donc été isolées à partir du sol de friche industrielle étudié précédemment. Après identification de ces souches, leur résistance aux HAP et leur potentiel de dissipation de 3 HAP de poids moléculaires différents ont été testés *in vitro* (Chapitre III-2). Un champignon et une bactérie ont été choisis comme modèle car présentant les potentiels de dissipation *in vitro* les plus importants. Dans la troisième partie, les potentiels de dissipation des HAP du champignon et de la bactérie modèles, lorsqu'ils étaient inoculés seuls ou en coculture, ont été étudiés *in vitro* en milieu liquide (Chapitre III-3, Thion et al., sous presse). Enfin, dans les deux dernières parties, l'influence d'une plante sur les deux microorganismes modèles, leur potentiel de dissipation des HAP et leurs interactions a été étudiée dans des microcosmes stériles de sable (Chapitre III-4), puis dans des microcosmes de sol non stérile (Chapitre III-5).

Chapitre II :

MATERIELS

ET

METHODES

La section ci-dessous présente les matériels et les méthodes utilisés dans ce travail. Les plans expérimentaux détaillés sont présentés en introduction de chaque partie du Chapitre III.

1. Matériels

1.1. Sols et sable

Plusieurs types de sols ont été utilisés dans ce travail. Un sol industriel présentant une multicontamination aux HAP et ETM, et le même sol après un traitement de remédiation (désorption thermique), ont été prélevés *in situ* sur un dispositif expérimental de longue durée. Pour les expériences en microcosmes au laboratoire, un sol agricole non contaminé, mélangé à du sable et artificiellement pollué aux HAP a été utilisé.

1.1.1. Sol de friche industrielle (NM) et sol thermo-désorbé (TD)

1.1.1.1. *Origine et caractéristiques physico-chimiques*

Le sol de friche industrielle (sol NM), pollué aux HAP et ETM, provient de la friche de l'ancienne cokerie-acierie de Neuves-Maisons (Meurthe-et-Moselle, France). Le sol TD est le même sol, qui a été soumis à un traitement par désorption thermique (Entreprise Deep Green, Bruxelles, Belgique). Ce procédé de dépollution consiste à amener le sol à une température comprise entre 400 et 600°C, entraînant la volatilisation des polluants organiques comme les HAP. Les gaz contenant ces polluants sont récupérés et les polluants sont éliminés par combustion. Le sol a ensuite été refroidi avec de l'eau de rivière (Moselle). En septembre 2005, un dispositif de parcelles expérimentales de longue durée a été mis en place avec ces deux types de terre (§ 1.1.1.2). Les paramètres physico-chimiques et les teneurs en HAP et ETM des terres des parcelles TD et NM, au moment de leur mise en place et après 5 années, sont présentés dans le Tableau 3 (les données présentées sont les moyennes des valeurs mesurées dans les parcelles lysimétriques, § 1.1.1.2.1).

Les sols TD et NM se distinguent par : le ratio C:N (au moins deux fois plus élevé pour le sol TD, essentiellement dû à une diminution de la teneur en azote), le pH (légèrement plus basique pour le sol TD) et les teneurs en calcium, magnésium et fer (plus basses pour le sol TD). Les concentrations en HAP du sol TD sont très inférieures à celles du sol NM. En revanche, à l'exception du mercure, les teneurs en ETM sont sensiblement identiques d'un sol à l'autre.

Sol	Sol de Neuves Maisons (NM)		Sol thermo-désorbé (TD)	
Date	sept-05	mai-10	sept-05	mai-10
Granulométrie (g.kg ⁻¹) *				
Argile (< 2 µm)	123 ± 22	132 ± 9	104 ± 5	99 ± 2
Limons fins (2-20 µm)	147 ± 28	138 ± 13	97 ± 10	102 ± 3
Limons grossiers (20-50 µm)	75 ± 13	123 ± 7	97 ± 4	97 ± 6
Sables fins (50-200 µm)	83 ± 15	122 ± 13	141 ± 8	167 ± 13
Sables grossiers (>200 µm)	572 ± 62	485 ± 21	560 ± 13	535 ± 18
Paramètres agronomiques				
Azote Total (g.kg ⁻¹)	2,7 ± 0,1	2,7 ± 0,3	0,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1
Ratio C:N	23,0 ± 1,3	25,4 ± 2,1	62,0 ± 1,4	52,3 ± 1,4*
Carbone organique (g.kg ⁻¹)	62,0 ± 3,6	67,9 ± 5,3	58,4 ± 8,3	64,1 ± 4,7
Matière organique (g.kg ⁻¹)	107,2 ± 6,3	117,4 ± 9,1	101,0 ± 1,6	110,5 ± 8,2
pH	7,0 ± 0,2	7,5 ± 0,1	8,0 ± 0,1	7,8 ± 0,1
CaCO ₃ total (g.kg ⁻¹)	19,2 ± 3,2	15,2 ± 3,4	49,2 ± 3,8	47,7 ± 6,2
P ₂ O ₅ (g.kg ⁻¹)	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,08 ± 0,01
Soufre (S) *	nd	49425 ± 6702	nd	28975 ± 6089
Éléments échangeables à l'acétate d'ammonium (g.kg ⁻¹)				
Calcium (Ca)	41,7 ± 3,4	41,4 ± 3,1	27,1 ± 1,1	25,1 ± 1,2
Magnésium (Mg)	1,01 ± 0,08	0,12 ± 0,02*	0,24 ± 0,01	0,06 ± 0,01*
Potassium (K)	0,42 ± 0,05	0,39 ± 0,17	0,46 ± 0,01	0,30 ± 0,01*
Métaux extractibles à l'EDTA (mg.kg ⁻¹)				
Cuivre (Cu)	10,3 ± 0,9	14,4 ± 1,1	11,6 ± 0,6	15,2 ± 5,8
Fer (Fe)	79,4 ± 3,3	95,2 ± 5,8	25,3 ± 0,8	29,2 ± 2,0
Manganèse (Mn)	352 ± 76	87,4 ± 8,5*	394 ± 23	72,0 ± 3,3*
Zinc (Zn)	249 ± 13	187,1 ± 17,1*	248 ± 8	203,7 ± 6,5*
Métaux totaux (mg.kg ⁻¹)				
Bore (B)	8,4 ± 0,7	3,6 ± 0,4*	3,1 ± 0,1	1,8 ± 0,1*
Cadmium (Cd)	2,7 ± 0,1	2,8 ± 0,3	2,1 ± 0,1	2,4 ± 0,1
Chrome (Cr)	599 ± 64	1077 ± 151*	593,7 ± 23,1	576 ± 87
Cobalt (Co)	25,1 ± 1,2	26,7 ± 1,1	27,2 ± 0,2	30,0 ± 1,6
Cuivre (Cu)	130,8 ± 8,2	136,2 ± 7,2	109,2 ± 1,7	120,2 ± 5,9
Mercure (Hg) *	5,3 ± 4,4	6,0 ± 1,1	1,5 ± 0,2	2,11 ± 0,4
Molybdène (Mo)	11,2 ± 0,5	11,0 ± 0,8	11,8 ± 0,3	11,8 ± 0,4
Nickel (Ni)	97,3 ± 4,1	101,6 ± 5,8	102,2 ± 2,1	111,0 ± 5,6
Plomb (Pb)	481,9 ± 57,6	596,6 ± 127,7	672,7 ± 23,0	811,8 ± 38,7
Thallium (Tl)	0,63 ± 0,04	0,76 ± 0,03	0,78 ± 0,03	0,81 ± 0,01
Zinc (Zn)	2085 ± 229	2279 ± 182	2745 ± 26	2915 ± 97
HAP (mg.kg ⁻¹)				
Naphthalène	48,7 ± 23,6	23,0 ± 3,8*	2,9 ± 0,5	0,8 ± 0,5*
Acenaphthylène	54,3 ± 5,9	18,3 ± 2,0*	2,9 ± 0,5	0,3 ± 0,1*
Acénaphthène	61,0 ± 11,0	33,8 ± 8,5*	0,8 ± 0,1	0,5 ± 0,1*
Fluorène	52,6 ± 10,9	32,6 ± 9,2	2,6 ± 0,1	0,5 ± 0,2*
Phénanthrène	152,9 ± 25,8	119,5 ± 23,7	9,3 ± 0,3	4,3 ± 0,8*
Anthracène	150,7 ± 29,3	80,9 ± 5,4*	6,4 ± 0,2	1,2 ± 0,2*
Fluoranthène	273,9 ± 37,6	201,0 ± 25,9	15,7 ± 0,4	6,1 ± 1,0*
Pyrène	200,1 ± 28,7	150,5 ± 20,9	10,7 ± 0,4	4,0 ± 0,6*
Benzo[a]anthracène	149,1 ± 20,3	104,9 ± 13,4	8,2 ± 0,3	2,7 ± 0,4*
Chysène	117,9 ± 16,2	83,9 ± 9,6	5,4 ± 0,5	2,6 ± 0,4*
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	133,5 ± 15,5	136,5 ± 15,0	10,7 ± 0,4	3,8 ± 0,3*
Benzo[b]fluoranthène	185,8 ± 21,8	65,9 ± 15,3*	9,1 ± 0,5	1,7 ± 0,1*
Benzo[k]fluoranthène	69,6 ± 13,4	91,5 ± 9,8	3,7 ± 0,8	1,7 ± 0,2*
Benzo[a]pyrène	158,0 ± 20,4	78,5 ± 7,6*	8,2 ± 0,5	1,5 ± 0,2*
Dibenzo[a,h]anthracène	26,6 ± 3,0	20,2 ± 2,7	4,9 ± 0,1	0,5 ± 0,0*
Benzo[g,h,i]perylène	89,6 ± 10,2	65,4 ± 6,7	4,9 ± 0,2	1,4 ± 0,1*
16 HAP US-EPA	1924 ± 258	1205 ± 295*	106 ± 4	34 ± 4,4*

Tableau 3. Caractéristiques physico-chimiques du sol de Neuves-Maisons non traité (NM) et traité par désorption thermique (TD). Nd : non disponible. En gras : paramètres variant significativement entre les deux sols. * : données de Mai 2009 (données de Mai 2010 non disponibles). * : paramètres montrant une variation significative entre 2005 et 2010.

Au cours des 5 années d'expérience, les teneurs globales de l'ensemble des HAP ont diminué significativement dans les deux sols. Cette diminution concerne tous les HAP dans le sol TD mais seulement certains HAP dans le sol NM (Tableau 3). On note également une diminution des concentrations en magnésium, potassium, manganèse, zinc et bore dans les deux sols ainsi qu'une légère baisse du ratio C:N dans le sol TD.

1.1.1.2. Dispositif expérimental in situ

1.1.1.2.1. Parcelles lysimétriques

Dans le cadre du GISFI et d'un projet de recherche financé par les programmes EC2CO et ANR-CES (MULTIPOLSITE), le dispositif expérimental, décrit par Ouvrard et al. (2011), a été mis en place en Septembre 2005 sur une friche industrielle à Homécourt (Meurthe-et-Moselle). Vingt-quatre cuves en acier (parcelles lysimétriques) équipées d'un système de récupération des eaux de lessivage, mesurant chacune 2 x 3 x 0,4 m (largeur x longueur x profondeur), ont été implantées : 20 d'entre elles ont été remplies avec le sol NM et 4 avec le sol TD, les deux sols ayant préalablement été tamisés à 40 mm. Parmi les différents traitements de ce dispositif, qui ont été distribués aléatoirement sur ces parcelles lysimétriques, ceux qui ont été suivis dans ce travail sont (Fig. 15) :

- NM-BS : sol NM, élimination de toute végétation à la main (terre nue) ;
- NM-SV : sol NM, laissé libre à la colonisation par les espèces végétales endémiques (végétation spontanée) ;
- NM-MSm : sol NM, planté avec de la luzerne et inoculé avec les champignons mycorhiziens *Glomus mosseae* et *Glomus intraradices* ;
- TD-MSm : sol TD, planté avec de la luzerne et inoculé avec les champignons mycorhiziens *Glomus mosseae* et *Glomus intraradices*.

1.1.1.2.2. Echantillonnage et paramètres testés

Depuis 2006, l'échantillonnage de sol a été réalisé deux fois par an, au printemps (courant Mai) et à l'automne (courant Septembre). A chaque temps de prélèvement, sur chaque parcelle, un échantillon moyen (2 kg environ), constitué du mélange de 6 prélèvements de terre à la tarière sur 30 cm de profondeur, a été tamisé à 5 mm et des sous-échantillons de 30 g environ ont été stockés à -20°C pour les analyses de biologie moléculaire.

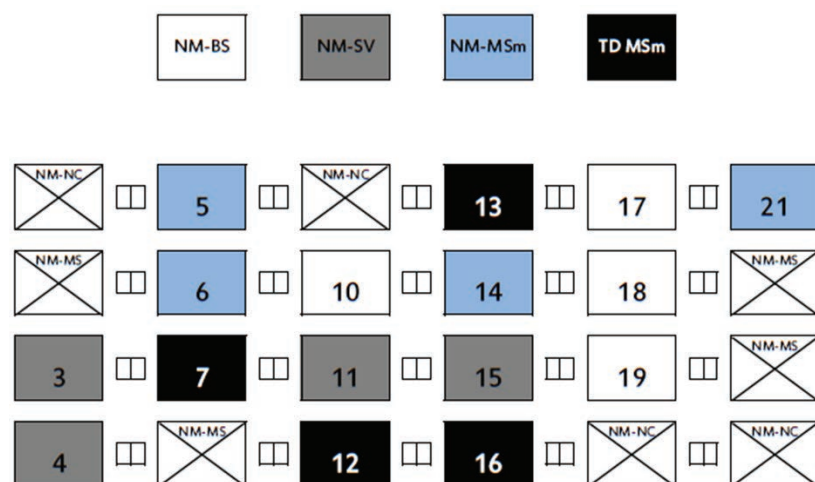


Figure 15. Distribution des traitements sur les parcelles lysimétriques du dispositif expérimental *in situ*. NM : terre de Neuves-Maisons, TD : terre thermo-désorbée, BS : terre nue, SV : végétation spontanée, MSm : luzerne mycorhisée. Les parcelles marquées d'une croix (NM-NC : terre NM + *Nocardia caerulea* et NM-MS : terre NM + luzerne non inoculée par *Glomus*) n'ont pas été prises en compte dans ce travail.

1.1.2. Sol agricole (La Bouzule)

1.1.2.1. Origine et caractéristiques physico-chimiques

Granulométrie (g.kg ⁻¹)	
Argile (< 2 µm)	328
Limons fins (2-20 µm)	327
Limons grossiers (20-50 µm)	190
Sables fins (50-200 µm)	45
Sables grossiers (>200 µm)	110
Paramètres agronomiques	
Azote Total (g.kg ⁻¹)	1,5
Ratio C:N	10,1
Carbone organique (g.kg ⁻¹)	15,6
Matière organique (g.kg ⁻¹)	26,9
pH	6,4
P ₂ O ₅ (g.kg ⁻¹)	0,112
CEC (cmol ⁺ .kg ⁻¹)	15,6
Pollutions	
16 HAP US-EPA (g.kg ⁻¹)	2,2

Tableau 4. Caractéristiques physico-chimiques du sol de La Bouzule. Les paramètres ont été mesurés après broyage et tamisage. CEC : capacité d'échange cationique.

Le sol agricole utilisé dans ce travail provient de la ferme expérimentale de l'École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (INPL, Nancy) située à La Bouzule (Meurthe-et-Moselle). Ce sol, limono-argileux, utilisé antérieurement dans de nombreux travaux (Binet et al., 2000; Martin-Laurent et al., 2003; Novak et al., 2003; Chiapusio et al., 2007; Cébron et al., 2008; Zhou et al., 2009), présente de très faibles teneurs en HAP (Tableau 4).

1.1.2.2. Préparation du sol pour les microcosmes en pots

Un échantillon de terre prélevé sur le site de La Bouzule a été séché (3 jours à l'étuve à 25°C, avec aération), broyé mécaniquement (broyeurs à mâchoires et à cylindres), tamisé à 2 mm et quarté à la station STEVAL (LEM, Vandoeuvre-les-Nancy). Le sol quarté a ensuite été pasteurisé 1 heure à 90°C. Par ailleurs, du sable d'aquarium ($\varnothing < 2\text{mm}$) a été lavé à l'eau distillée, séché et pasteurisé de la même manière. Sol et sable pasteurisés ont alors été mélangés en un seul lot, avec un ratio de masses de 70:30 (sol:sable), afin de garantir l'homogénéité entre les microcosmes. Le sol de La Bouzule étant très riche en particules fines argileuses, la dilution dans le sable a augmenté la granulométrie, permettant une meilleure croissance racinaire, un meilleur drainage et une meilleure aération du compartiment tellurique. La capacité de rétention en eau du mélange sol-sable était de 26 ml pour 100 g.

Une partie (10%) du mélange sol/sable a été répartie dans des cristallisoirs sous hotte chimique et contaminé par une solution de PHE (Fluka™, >97% de pureté), PYR (SIGMA-ALDRICH®, >99% de pureté) et DBA (Acros Organics, >99% de pureté) dans du chloroforme (1320 ml de solution par kg de sol), pour obtenir des concentrations théoriques finales respectives de 5000, 5000 et 500 mg.kg^{-1} de mélange sol-sable. Après évaporation complète du chloroforme (3 jours sous la hotte avec mélange régulier à la spatule pour éviter la formation d'une croûte superficielle de HAP), les cristallisoirs de mélange sol-sable contaminé ont été réunis et homogénéisés. Dans des sacs plastiques, des lots de 50 g de ce sol pollué ont été dilués dans 450 g du mélange sol-sable non pollué, pour obtenir des concentrations théoriques respectives dans les microcosmes de 500, 500 et 50 mg.kg^{-1} de PHE, PYR et DBA. Finalement ces lots ont été placés à 4°C à l'obscurité, pendant 15 jours (phase de vieillissement ou « aging »). Lors de la mise en place de l'expérience, les mélanges sol-sable pollués ont été placés dans les pots directement avec les sacs en plastique, facilitant ainsi le montage et le démontage de l'expérience (Chapitre III-4).

1.1.3. Mélange de sables pour les microcosmes stériles

Un mélange de sable d'aquarium ($\varnothing < 2\text{mm}$, SDS France) et de sable de Fontainebleau ($0,06 < \varnothing < 0,35$ mm, Carlo Erba Reagents), avec un ratio de masses 80:20, a été réparti en lots de 350 g dans des flacons en verre. Les flacons ont ensuite été stérilisés à l'autoclave (30 minutes à 110°C) 3 fois avec 24 heures d'intervalle, afin d'empêcher la germination éventuelle de spores de champignons. Sous hotte microbiologique et chimique, une solution de PHE, PYR et DBA dissous dans du chloroforme (1l de solution par kg de mélange de sable) a été ajoutée dans chaque flacon, pour obtenir des teneurs théoriques en HAP, de respectivement 500, 500 et 50 mg.kg^{-1} dans le sable. Le sable a été laissé sous hotte pendant 48 heures jusqu'à complète évaporation du solvant. Lors de la mise en place de l'expérience, les mélanges de sable pollué ont été directement versés dans les dispositifs sous hotte microbiologique (Chapitre III-3).

1.2. Microorganismes et conditions de cultures

1.2.1. Microorganismes

L'ensemble des souches microbiennes utilisées dans ce travail a été isolé à partir des parcelles NM-MSm (sol NM planté avec de la luzerne inoculée avec des champignons mycorhiziens) (voir § 1.1.1.2) en Novembre 2008. La démarche d'isolement et la description des souches sont présentées dans le Chapitre III-1. La démarche d'identification à partir de critères moléculaires est présentée au § 2.1.2.4. Les souches fongiques ont été conservées à 4°C sur boîtes de milieu ME gélosé (§ 1.2.2), et repiquées tous les 2 mois environ sur des boîtes fraîches (§ 1.2.3.1 pour le repiquage). Les souches bactériennes ont été conservées dans du glycérol à 30% à -80°C.

1.2.2. Milieux et conduite des cultures de microorganismes

Les compositions données ci-dessous concernent les milieux liquides. Tous les milieux ont été préparés avec de l'eau distillée et stérilisés à l'autoclave pendant 30 minutes à 110°C. Si nécessaire, les milieux ont été gélosés avec 15 g.l⁻¹ d'agar (Fluka®). Toutes les cultures liquides ont été réalisées à l'obscurité sous agitation orbitale (210 rpm pour les cultures de bactéries et 150 rpm pour les cultures de champignons et les cocultures mixtes). Lorsque cela est précisé dans les plans expérimentaux, de la streptomycine (SIGMA® ; 1/1000^{ème} v/v d'une solution mère à 100 mg.ml⁻¹ dans de l'eau ultrapure) ou de la cycloheximide (Carl ROTH® ; pureté >96% ; 1/1000^{ème} v/v d'une solution mère à 75 mg.ml⁻¹ dans l'acétone) ont été ajoutées.

• Milieu Malt-Extract (ME)

Le milieu Malt-Extract, utilisé pour la culture des champignons en milieu riche (Chapitre III-2), était composé de 20 g.l⁻¹ d'extrait de malt (Fluka®), 20 g.l⁻¹ de D-glucose (Sigma-Aldrich®) et 1 g.l⁻¹ de peptone (hydrolysate enzymatique de caséine, Mast) (Van Elsas et al., 2000).

• Milieu Luria-Bertoni (LB)

Le milieu LB (Sigma-Aldrich®), utilisé pour la culture des bactéries en milieu riche (Chapitre III-2) contenant 10 g.l⁻¹ de tryptone, 5 g.l⁻¹ d'extrait de levure et 10 g.l⁻¹ de NaCl, a été préparé suivant les instructions du fournisseur (20 g de poudre commerciale .L⁻¹).

• Milieu Büshnell-Haas (BH)

Le milieu minimum BH, utilisé pour l'isolement des souches bactériennes (Chapitre III-2), contenait en g.L⁻¹ : MgSO₄ 0,2, CaCl₂ 0,02, KH₂PO₄ 1, K₂HPO₄ 1, KNO₃ 1, FeCl₃ 0,05.

• Basal Salt Medium (BSM)

Le milieu BSM, utilisé pour la culture des champignons en milieu minimum (Chapitre III-2 et III-3), était composé de milieu BH (voir § ci-dessus) supplémenté avec une solution d'oligo-éléments pour des concentrations finales de (mg.l^{-1}) : acide nitrilo-acétique 15, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1, ZnSO_4 1, CuSO_4 0,1, H_3BO_3 0,1, Na_2MoO_4 0,1, $\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,1 selon Saraswathy *et al.* (2005). Si nécessaire, le pH a été tamponné à 6.8 avant l'autoclavage avec 5mM de K_2HPO_4 et 5mM de KH_2PO_4 . Dans certains cas une solution stock de glucose (200 g.l^{-1}) filtrée à $0,22 \mu\text{m}$ a été ajoutée, pour une concentration finale de 20 g.l^{-1} de glucose.

• Ajout des HAP dans les milieux de culture liquides

Le PHE, le PYR et le DBA (10, 10 et 1 mg respectivement pour 20 ml de milieu liquide), dissous dans 10 ml de chloroforme, ont été placés dans des fioles Erlenmeyer stériles sous hotte microbiologique et chimique. Les milieux de culture ont été ajoutés après totale évaporation du chloroforme pour obtenir des concentrations respectives finales de 500, 500 et 50 mg.l^{-1} .

1.2.3. Préparation des inocula microbiens

1.2.3.1. *Champignons filamenteux*

Pour les champignons filamenteux, une pièce de gélose (5 mm Ø) colonisée par du mycélium non sénescant (partie périphérique des colonies fongiques) a été repiquée sur boîte de ME gélosé et incubée pendant 7 à 10 jours à l'obscurité à 24°C . De l'eau distillée stérile (15 ml par boîte) a ensuite été ajoutée sur le mycélium pour récolter les spores. La concentration cellulaire des suspensions de spores a été évaluée par comptage au microscope à la cellule de Thoma. Les dilutions nécessaires dans une solution de NaCl à 0,85% ont été effectuées pour une inoculation théorique de 10^4 spores par ml de milieu de culture liquide (Chapitre III-2 et III-3) ou par g de sol ou de mélange sol-sable (Chapitre III-4 et III-5). Les suspensions ont été conservées à 4°C et utilisées dans les 24 heures suivant leur préparation.

1.2.3.2. *Bactéries*

Des précultures ont été réalisées dans 5 ml de LB liquide à partir du stock glycérolé à -80°C . Après 24 heures, des stries d'isolement sur boîtes de LB ont été réalisées à partir de ces cultures. Après 2 à 4 jours de croissance à 24°C , une colonie isolée a été remise en culture dans 5 ou 10 ml de milieu, selon la quantité d'inoculum désirée. Après 24 à 72 heures selon les souches bactériennes, les cultures ont été centrifugées pendant 10 minutes à 4700 rpm et les culots rincés trois fois avec une solution saline de NaCl 0,85%. Après suspension dans la même solution saline, la $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ a été déterminée et ajustée si nécessaire, pour une inoculation théorique des cultures liquides à une $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ de 0,02 (Chapitre III-2 et

III-3). Pour l'inoculation d'*A. oxydans* Pyr2MsHM11 dans les microcosmes (Chapitre III-4 et III-5), le rapport $DO_{600\text{ nm}}/\text{concentration cellulaire}$ a été déterminé (0,4 unité $DO_{600\text{ nm}}$ correspondant à 10^9 cellules. ml^{-1}) et la concentration de la suspension bactérienne ajustée pour une inoculation théorique à 10^7 cellules par g de mélange sol-sable ou de sable. Les suspensions de bactéries ont été conservées à 4°C et utilisées dans les 48 heures suivant leur préparation.

1.2.3.3. Levure

La levure *Cryptococcus* sp. ME4 a été placée en culture liquide dans 5 ml de milieu ME à partir d'une colonie isolée sur boîte de milieu ME gélosé. Après 3 jours à 24°C, les cultures ont été centrifugées 10 minutes à 4700 rpm et les culots suspendus dans une solution de NaCl 0,85% (§ 1.2.3.2). La concentration cellulaire a été estimée en microscopie à la cellule de Thoma et ajustée pour inoculer les cultures liquides à 10^4 cellules. ml^{-1} (Chapitre III-2).

1.2.3.4. Microflore du sol agricole (La Bouzule)

Le sol de La Bouzule non pasteurisé (150 g), a été placé dans une solution de NaCl 0,85% (25 ml pour 15 g de sol) avec des billes de verre (3 mm Ø) dans des tubes de 50 ml. Les tubes ont été soumis à une agitation rotative (60 rpm) pendant 2 heures. Après sédimentation des particules de sol (10 minutes environ), les surnageants des 10 tubes ont été récupérés et mélangés pour garantir l'homogénéité de l'inoculum. Cette suspension de sol a été filtrée à l'aide de toiles à bluter, successivement à 20 µm puis à 10 µm de diamètre. La densité cellulaire de l'inoculum filtré a été évaluée à la cellule de Thoma et ajustée pour une inoculation théorique de 10^6 cellules par g de sol (Chapitre III-5).

1.3. Plante et conditions de culture

La plante modèle utilisée dans ce travail est la luzerne, *Medicago sativa*, var. Europe. En effet, plusieurs études mentionnent les effets de la luzerne sur la dissipation des HAP et/ou les communautés microbiennes de sols pollués aux HAP, dans des expériences en microcosmes, y compris à relativement court terme (Criquet et al., 2000; Muratova et al., 2003; Liu et al., 2004; Kirk et al., 2005; Fan et al., 2008; Zhou et al., 2009). De plus, les microorganismes modèles (§ 1.2.1) qui font l'objet de ce travail ont été isolés à partir de sol planté avec de la luzerne et leur innocuité sur la croissance de la luzerne a été vérifiée (Chapitre III-2 et III-4). Les luzernes ont été cultivées en conditions contrôlées : air ambiant à 80% d'humidité, 22/18°C jour/nuit avec un éclairage artificiel à 250 µmol photons. s^{-1} .

1.3.1. Plantules stériles pour les dispositifs de culture stérile

1.3.1.1. Stérilisation des graines

La mise au point du protocole de stérilisation des graines est détaillée dans le Chapitre III-4. Les graines de luzerne ont été placées dans une boule à thé (préalablement stérilisée par autoclavage) et soumises à des bains successifs sous agitation par un barreau magnétique (Fig. 16.A) : 10 minutes dans l'eau de javel diluée à 7% de chlore actif, 10 minutes dans l'eau oxygénée à 7,5% puis 10 minutes dans une solution d'antibiotique (streptomycine à 2%, Sigma®) et d'antifongique (chloramine T à 2%, Sigma®) additionnée de Tween 80 à 1% (Merck). Entre chacun de ces bains, les graines ont été rincées pendant 30 secondes dans l'eau distillée stérile. A la fin du protocole de stérilisation les graines ont été laissées pendant 3 à 5 heures dans de l'eau distillée stérile.

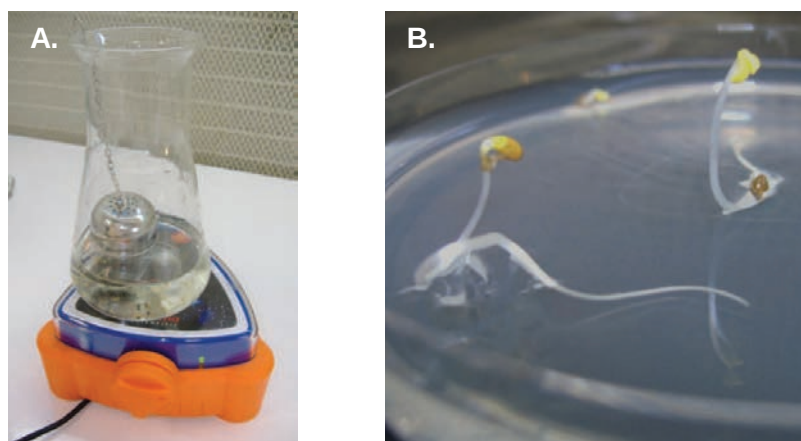


Figure 16. Stérilisation (A) et germination (B) des graines de luzerne pour les dispositifs de culture stérile.

1.3.1.2. Germination et transplantation

La mise au point de ce protocole de germination des graines est détaillée au Chapitre III-4. Les graines stérilisées ont été placées à germer dans de la gélose molle (5 g.l^{-1} d'agar) de LB liquide dilué 5 fois (4 g de poudre LB par litre) à raison de 5 graines par boîte de Pétri de 8 cm de diamètre, à l'aide d'une pince souple stérilisée à la flamme. Après 6 jours de germination à l'obscurité à 24°C , les boîtes présentant des contaminations microbiennes (moins de 15% des boîtes) ont été écartées et les plantules stériles des boîtes non contaminées (Fig. 16.B) récupérées à la pince pour être transplantées dans les dispositifs de culture stérile (Chapitre III-4).

1.3.2. Graines pour les microcosmes avec du sol

Les graines de luzerne utilisées pour les microcosmes dans le mélange sol-sable (Chapitre III-5) ont été laissées à gonfler 3 à 5 heures dans l'eau distillée avant d'être transplantées à la pince dans les pots, à 0,5 cm de la surface. L'eau de rinçage des graines a été répartie dans les pots non plantés (5 ml par pot).

1.3.3. Conditions de culture de la luzerne

1.3.3.1. Dispositifs de culture stérile

La solution nutritive décrite par Criquet *et al.* (2000) a été utilisée pour l'arrosage des dispositifs de culture stérile (Chapitre III-4). La composition des solutions stock est donnée dans le Tableau 5. Pour un volume final de 5 l de solution, 4995 ml de la solution stock, 1, 5 ml de la solution stock 2 et 10 µl de la solution stock 3 ont été mélangés et la solution finale a été autoclavée 2 fois 30 minutes à 110°C à 24 heures d'intervalle. Jusqu'à utilisation, la solution a été stockée à 4°C et à l'obscurité. L'arrosage a été effectué quotidiennement les 2 premières semaines, puis tous les 2 à 3 jours, en ramenant les dispositifs à la masse correspondant à une humidité de 70% de la capacité de rétention en eau (100% de la capacité en eau correspondant à 16 ml d'eau pour 100 g de sable).

Elément	C _{stock} (mM)	C _{finale} (mM)
Solution d'éléments majeurs (Solution stock 1)		
Ca(NO ₃) ₂	1	1
NH ₄ NO ₃	1	1
K ₂ SO ₄	1	1
MgSO ₄	0,8	0,8
Na ₂ HPO ₄	0,1	0,1
Fe(III) Na-EDTA	0,025	0,025
Solution de métaux (Solution stock 2)		
H ₃ BO ₃	25	25.10 ⁻³
MnSO ₄	5	5.10 ⁻³
ZnSO ₄	2	2.10 ⁻³
CuSO ₄	0,5	0,5.10 ⁻³
Na ₂ MoO ₄	0,1	0,1.10 ⁻³
Solution de Cobalt (Solution stock 3)		
CoCl ₂	20	4.10 ⁻⁶

Tableau 5. Composition de la solution nutritive pour arrosage de la luzerne selon Criquet *et al.* (2000). C_{stock} : concentration dans la solution stock, C_{finale} : concentration dans la solution finale.

1.3.3.2. Microcosmes avec du sol

Les luzernes ont été arrosées avec la solution nutritive de Hewitt modifiée telle que décrite par Redon *et al.* (2009), avec des teneurs en phosphore réduites à 0,1 mM au lieu de 0,4 mM (solution « Low Phosphorus Hewitt » de Zhou *et al.* (2009)). La composition des solutions stocks pour la préparation de cette solution est donnée dans le Tableau 6 : 25 ml des solutions stocks 1 à 4, 5 ml de la solution stock 5 et 80 mg de Fe-EDTA ont été ajoutés à la quantité suffisante d'eau distillée pour 10 l de solution. Après autoclavage (30 minutes à 110°C), la solution a été conservée à 4°C et à l'obscurité. L'arrosage a été

effectué quotidiennement jusqu'à l'apparition des premières feuilles, puis tous les 2 à 3 jours, en ramenant les microcosmes à la masse correspondant à une humidité de 80% de la capacité de rétention en eau soit un volume initial de 104 ml pour les 500 mg de mélange sol-sable (Chapitre III-5).

Elément	C _{stock} (g.l-1)	C _{finale} (mg.l-1)
Solution Stock 1		
NH ₄ NO ₃	32	80
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	94,5	240
Solution Stock 2		
Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	7,12	20
Solution Stock 3		
K ₂ SO ₄	70	180
Solution Stock 4		
MgSO ₄ .7H ₂ O	74	190
Solution Stock 5		
H ₃ BO ₃	0,27	0,67
MnSO ₄ .H ₂ O	0,27	0,67
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,03	0,07
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,13	0,32
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,01	0,02
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02	0,05
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,02	0,05

Tableau 6. Composition de la solution nutritive de Hewitt modifiée pour l'arrosage de la luzerne selon Zhou et al. (2009). C_{stock} : concentration dans la solution stock, C_{finale} : concentration dans la solution finale.

2. Méthodes d'analyses

2.1. Suivi des paramètres biologiques

2.1.1. UFC microbiennes

L'abondance des microorganismes cultivables a été évaluée par comptage des unités formant des colonies (UFC). Pour le comptage des UFC dans les microcosmes, des suspensions ont été réalisées en plaçant 10 g de sable ou de sol à agiter pendant 2 heures dans 25 ml de solution de NaCl 0,85% (agitation rotative, 60 rpm). Des dilutions en cascade de 10 en 10 dans la solution de NaCl 0,85% ont été réalisées à partir de ces suspensions de sol ou directement à partir des cultures liquides. Ces dilutions ont été étalées sur boîtes de milieu ME gélosé additionné de streptomycine₁₀₀ ou de LB additionné de cycloheximide₇₅ pour le comptage des UFC fongiques et bactériennes respectivement après une incubation de 4 à 8 jours à 24°C à l'obscurité.

2.1.2. Biologie moléculaire

2.1.2.1. Extractions d'ADN

- Extraction d'ADN génomique à partir de souches microbiennes

L'ADN génomique des souches fongiques a été extrait grâce au kit d'extraction DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) à partir du culot de 10 ml de cultures en milieu ME liquide récupéré après centrifugation (10 minutes, 4700 rpm). L'ADN génomique des cultures et cocultures de *F. solani* et *A. oxydans* des tests de sorption des HAP (Chapitre III-2) a été extrait avec la même méthode à partir de 5 mg de biomasse récupérée par centrifugation (15 minutes, 4700 rpm) et lyophilisée. L'ADN génomique des souches bactériennes a été extrait grâce au FastDNA® Spin Kit (MP Biomedicals) à partir du culot de 5 ml de cultures en milieu LB liquide tel que décrit ci-dessus.

- Extraction d'ADN à partir du sol de friche industrielle (Neuves-Maisons) et du sable

Les acides nucléiques ont été extraits à partir de 0,5 g de sol ou de sable pour chaque échantillon, selon le protocole décrit dans Cébron et al. (2008), légèrement modifié pour le sol de friche industrielle. Cette méthode a été spécifiquement développée au laboratoire pour le sol de Neuves-Maisons. Elle comprend une lyse chimique (800 µl de tampon d'extraction composé de Tris-base pH8 100 mM, EDTA 100 mM, NaCl 100 mM, PVPP 1% et SDS 2% additionné de 40 µl de CTAB 6%/CaCl₂ 5mM par échantillon) combinée à une lyse mécanique (bead-beating : 1 minute de broyage au broyeur horizontal Retsch® avec des billes de verre), une purification au phénol:chloroforme:iso-amylalcool (25:24:1), un lavage au chloroforme:isoamylalcool (24:1) et la précipitation des acides nucléiques à l'isopropanol. Lors de l'étape de purification, une résine chélatante (40 µl de résine Chelex, Sigma) a été ajoutée pour limiter la concentration résiduelle en ETM dans les extraits d'ADN, facteur influençant notamment l'efficacité des PCR. De plus, lors de l'étape de lavage au chloroforme:isoamylalcool, 200 mg de résine échangeuse d'ions (Dowex®, Sigma) ont été ajoutés. La résine a préalablement été chargée en Li²⁺ par passage de 100 ml d'une solution de LiCl à 1 M pour 10 g de résine, dans un col de cygne. Cette étape, en séquestrant les ions Ca²⁺, a évité la co-précipitation de gypse (CaSO₄) avec les acides nucléiques lors de l'ajout d'isopropanol, due à la concentration très élevée en SO₄²⁻ dans le sol de Neuves-Maisons (cf. concentration en soufre, Tableau 3).

- Extraction d'ADN à partir du sol agricole (La Bouzule)

L'extraction d'ADN du sol de La Bouzule a été réalisée à partir de 0,5 g de sol grâce au FastDNA® Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) selon la méthode décrite par le fournisseur, avec un volume final d'élution de 100 µl.

2.1.2.2. *Dosage et conservation des ADN*

L'efficacité des extractions d'ADN génomique a été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose DNA Grade 1% (Euromedex) dans du tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 1X (Euromedex). Après coloration du gel dans un bain de bromure d'éthidium, l'ADN a été visualisé sous UV au transilluminateur GelDoc (BioRad). La quantité d'ADN et les ratios de pureté (Abs_{260nm}/Abs_{280nm}) dans les extraits finaux d'ADN ont été mesurés au spectrophotomètre UV-1800® (Shimadzu) à l'aide d'un module (TrayCell Hellma®) adapté au dosage de petits volumes (3 µl). Pour garantir l'efficacité des PCR, les échantillons ont été dilués 10 fois, pour une concentration finale comprise en 1 et 10 ng.µl⁻¹, dans de l'eau ultrapure filtrée à 0,22 µm. Les extraits d'ADN ont été conservés à -20°C.

2.1.2.3. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*

Les PCR ont été réalisées dans un thermocycleur iCycler (BioRad). Les mélanges réactionnels étaient composés de 1,25 U de Taq Polymerase recombinant (Invitrogen), tampon PCR 1X (Invitrogen) additionné de 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de chaque amorce (Eurofins-MWG Biotech), 200 µM de chaque dNTP et 1 µl d'extrait d'ADN dilué comme décrit au § 2.1.2.2 (5 µl pour la PCR-TTGE sur les ARNr 18S). Lorsque les échantillons d'ADN provenaient de sol, 0,5 µl de sérum-albumine bovine (Sigma-Aldrich) à 3% et 0,2 µl de diméthyl-sulfoxyde (VWR) ont été ajoutés. Le volume réactionnel final a été ajusté à 50 µl avec de l'eau ultrapure filtrée à 0,22 µm et autoclavée.

Le cycle d'amplification suivant a été utilisé : 5 minutes de dénaturation à 95°C suivies de 30 à 45 cycles de 30 secondes de dénaturation à 95°C, 45 secondes d'hybridation et d'une élongation à 72°C (temps d'élongation déterminé sur la base de 30 secondes pour 500 pb), puis 10 minutes d'élongation terminale à 72°C. Les conditions particulières à chaque PCR (couples d'amorces, températures d'hybridation, temps d'élongation,...) sont précisées dans le Tableau 7. Les Figures 17 et 18 montrent les sites d'hybridation des amorces ciblant les gènes codant les ARN ribosomiques 16S, 18S et 28S et les internal transcribed spacer (ITS) fongiques. L'efficacité et la spécificité des PCR ont été vérifiées par migration électrophorétique des produits d'amplification en gel d'agarose comme décrit au § 1.2.1.4. Les produits issus de la PCR destinés au séquençage ont été purifiés grâce au kit High Pure PCR Product Purification (ROCHE).

Cible	Amorces	Séquences 5'→3'	TH (°C)	C	TF (pb)	Réf
Identification de souches						
ADNr 16S	27F 1492R	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG TACGGYTACCTTGTTACGACTT	56	30	1465	Lane et al., 1991
ITSI	ITS1F ITS2	CTTGGTCATTAGAGGAAGTAA GCTGCGTTCTTCATCGATGC	50	35	± 280	Anderson & Cairney, 2004
ADNr 28S	NL-1 NL-4	GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG GGTCCGTGTTTCAAGACGG	52	35	605	Kurtzman & Robnett, 1998
PCR en temps réel et TTGE						
ITS Fusarium	ITS-Fu-F ITS-Fu-R	CAACTCCCAAACCCCTGTGA GCGACGATTACCAGTAACGA	54	40	420-430	Abd Elsalam et al., 2003
ADNr 18S	Fung5F FF390R ± queue GC	GGAACCCAGGACTTTTAC GAGGTCTCGTTCGTATCG <i>CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCC</i> <i>CGCCGCCCCCGCCC</i>	50	35	550	Lueders et al., 2004
ADNr 16S	968F ± queue GC 1401R	GAACGCGAAGAACCTTAC <i>CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCC</i> <i>CGCCGCCCCCGCCC</i> CGGTGTGTACAAGACCC	56 <i>TD*</i>	35	430	Felske et al. 1998
ADNr 16S Actino	F243 R513 ± queue GC	GGATGAGCCCGCGGCCTA CGGCCGCGGCTGCTGGCACGTA <i>CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGG</i> <i>GGCGGGGGCACGGGGGG</i>	63 <i>56</i>	40	270	Heuer et al., 1997
PAH-RHD _α GP	PAH-RHD _α GP1 F PAH-RHD _α GP1 R	CGGCGCCGACAAVTTYGTNGG GGGGAACACGGTGCCRTGDATRAA	54	45	290	Cébron et al. 2008
Séquençage des inserts pour gammes standards de PCR en temps réel						
Plasmide pCR2.1	M13F M13R	TGTAAACGACGGCCAGT AGGAAACAGCTATGACCAT	55	30	Δ	-

Tableau 7. Amorces, températures d'hybridation (TH), nombres de cycles (C) et taille attendue des fragments (TF) des différentes PCR. Les données en italique concernent les PCR destinées à la TTGE. ADNr 28S, 18S et 16S : gène codant les ARN ribosomiques 28S, 18S et 16S, Actino : Actinobactéries, PAH-RHD_α GP : gènes codant les HAP dioxygénases des bactéries Gram+. *: PCR Touch-Down pour la TTGE (§ 2.1.2.6), Δ : variable selon la taille de l'insert (§ 2.1.2.5.2). Les queues GC ont été positionnées aux extrémités 5' des amorces.



Figure 17. Sites d'hybridation des amorces ciblant les gènes codant les ARN ribosomiques 16S des bactéries. Univ : amorces universelles, Actino : amorces ciblant les Actinobactéries.

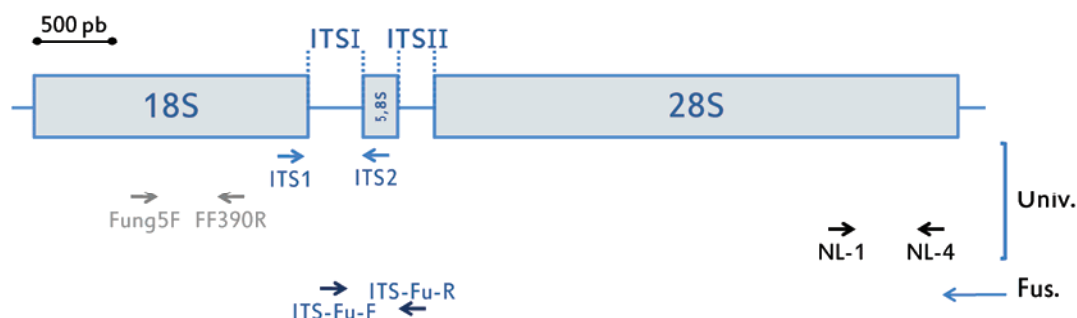


Figure 18. Sites d'hybridation des amorces ciblant l'opéron ribosomique des champignons. Univ : amorces universelles, Fus : amorces ciblant les *Fusarium*.

2.1.2.4. Identification de souches microbiennes

Pour identifier les souches de champignons filamenteux, de levure et de bactéries isolées à partir du sol de Neuves-Maisons, des fragments des ITS I, ADNr 28S et ADNr 16S, ont respectivement été amplifiés par PCR et séquencés (Tableau 7, Fig. 16 et 17). Pour les souches fongiques, 1 µl d'ADN génomique a été ajouté au milieu réactionnel. Pour les souches bactériennes, les PCR ont été réalisées directement sur des colonies obtenues par stries d'épuisement sur des boîtes de milieu LB. Les produits des PCR purifiés ont été séquencés (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne) et les séquences obtenues ont été comparées à la base de données GenBank grâce à l'application BlastN (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ces informations ont été complétées pour certaines souches (Chapitre III-2) par les résultats de l'identification sur critères morphologiques (études des caractères phénotypiques micro- et macroscopiques) effectuée par l'Equipe Taxonomie et Biologie des Microchampignons de l'Unité Scientifique 0602 du Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris).

2.1.2.5. PCR en temps réel

2.1.2.5.1. Mélange réactionnel et conditions de PCR

Le mélange réactionnel utilisé pour les expériences de PCR en temps réel était le suivant : 10 µl de Mix iQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad), 0,8 µl de chaque amorce à 10 mM (Tableau 7), 0,4 µl de sérum-albumine bovine (Sigma-Aldrich) à 3%, 0,2 µl de diméthyl-sulfoxyde (VWR), 0,08 µl de protéine gp32 du bactériophage T4 (QBiogene) et 1 µl d'ADN pour un volume réactionnel final de 20 µl ajusté à l'eau ultrapure filtrée à 0,22 µm. Les PCR en temps réel de ce travail ont été réalisées dans un thermocycleur iCycler iQ™ (Bio-Rad) associé au logiciel de traitement de signal iCycler optical system (version 2.3, Bio-Rad), à l'exception des PCR effectuées sur les ADN extraits des microcosmes avec du sol (thermocycleur CFX96™, Bio-Rad et logiciel associé CFX Manager). Les programmes utilisés pour la PCR en temps réel sont décrits au § 2.1.2.3 et dans le Tableau 7. Afin d'éviter la détection de fluorescence due à des

amplifications aspécifiques ou la formation de dimères d'amorces, 5 secondes de dénaturation à 82°C ont été appliquées à la fin de chaque cycle avant la mesure de la fluorescence.

2.1.2.5.2. Mise au point des PCR en temps réel spécifiques des Actinobactéries et des *Fusarium*

• Validation des couples d'amorces

Pour amplifier spécifiquement les ADNr 16S des Actinobactéries et la région ITS des champignons du genre *Fusarium*, les couples d'amorce F243 / R513 et ITS-Fu-F / ITS-Fu-R, respectivement développés par Heuer *et al.* (1997) et Abd-Elsalam *et al.* (2003), ont été utilisés (Tableau 7, Fig. 16 et 17). Ces couples d'amorces ont été dessinés par ces auteurs pour étudier la diversité des Actinobactéries par TGGE et DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) et pour l'identification des champignons du genre *Fusarium* mais, à notre connaissance, n'avaient jamais été utilisées pour la PCR en temps réel. La spécificité du couple d'amorces F243/R513 a été vérifiée par PCR sur les ADN génomiques de 15 souches bactériennes de divers taxons, Actinobactéries et non Actinobactéries (Tableau 8). La spécificité du couple d'amorces ITS-Fu-F / ITS-Fu-R a été vérifiée par PCR sur les ADN génomiques de 17 souches fongiques de divers taxons, *Fusarium* et non *Fusarium* (Tableau 9).

Souche	Classification	Genre espèce	Provenance /Référence
Pyr2MsHM11	Actinobactérie	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Chapitre III-1
Pyr2MsHM4	Actinobactérie	<i>Microbacterium oxydans</i>	Chapitre III-1
6PY1	Actinobactérie	<i>Mycobacterium</i> sp.	Krivobok et al. (2003)
ATCC 33464	Actinobactérie	<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	CRBIP (Tsukamura et al., 1983)
BIE-20	Actinobactérie	<i>Rhodococcus opacus</i>	Blumenroth & Wagner-Döbler (1998)
P6	Actinobactérie	<i>Rhodococcus globerulus</i>	Asturias et al. (1994)
DSM402	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i>	DSMZ (Spizizen, 1958)
Phe2MsHM10	α-Protéobactérie	<i>Sphingomonas</i> sp.	Chapitre III-1
U2	β-Protéobactérie	<i>Ralstonia</i> sp.	CRBIP (Fuenmayor et al., 1998)
DSM10684	β-Protéobactérie	<i>Burkholderia phenazinium</i>	DSMZ (Viallard et al., 1998)
JW3434	γ-Protéobactérie	<i>Escherichia coli</i>	Baba et al. (2006)
Flua2MsHM11	γ-Protéobactérie	<i>Pseudomonas</i> sp.	Chapitre III-1
LP6a	γ-Protéobactérie	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CRBIP (Foght & Westlake, 1996)
G7	γ-Protéobactérie	<i>Pseudomonas putida</i>	CRBIP (Eaton & Chapman, 1992)
F1	γ-Protéobactérie	<i>Pseudomonas putida</i>	CRBIP (Gibson et al., 1968)

Tableau 8. Nom et taxonomie des souches bactériennes dont les ADN génomiques ont été utilisés pour tester la spécificité du couple d'amorces F243/R513. CRBIP : Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur, DSMZ : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen.

Souche	Division, Ordre	Genre espèce	Provenance
ME8, MM9	Ascomycète, Hypocréales	<i>Fusarium oxysporum</i>	Chapitre III-1
MM1	Ascomycète, Hypocréales	<i>Fusarium solani</i>	Chapitre III-1
TV01	Ascomycète, Hypocréales	<i>Trichoderma viride</i>	ADN génomiques fournis par M. Bué, UMR 1136 INRA- UHP, Champenoux
M51	Ascomycète, Pezizales	<i>Peziza succosa</i>	
iam	Ascomycète, Pezizales	<i>Tuber melanosporum</i>	
BL77	Ascomycète, Xylariales	<i>Xylaria longipes</i>	
S238n	Basidiomycète, Agaricales	<i>Laccaria bicolor</i>	
M5	Basidiomycète, Amanitales	<i>Amanita rubescens</i>	
PEP	Basidiomycète, Bolétales	<i>Paxillus involutus</i>	
M153	Basidiomycète, Bolétales	<i>Xerocomus pruinatus</i>	
RP78	Basidiomycète, Polyporales	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	
BL58	Basidiomycète, Polyporales	<i>Piptoporus betulinus</i>	
CV863A/2	Basidiomycète, Polyporales	<i>Trametes versicolor</i>	
CHA	Basidiomycète, Téléphorales	<i>Thelephora terrestris</i>	

Tableau 9. Nom et taxonomie des souches fongiques dont les ADN génomiques ont été utilisés pour tester la spécificité du couple d'amorces ITS-Fu-F/ITS-Fu-R.

• Clonage des fragments de PCR

Les produits d'amplification de l'ADNr 16S d'*A. oxydans* et de la région ITS de *F. oxysporum* ont été purifiés grâce au kit GENECLEAN® Turbo (MP Biomedicals). Les fragments obtenus par PCR purifiés ont été clonés dans le plasmide vecteur pCR®2.1 grâce au TA Cloning® Kit (Invitrogen) et les produits de ligation ont été utilisés pour transformer des cellules d'*E. coli* compétentes OneShot®Top10 (Invitrogen), suivant les instructions du fournisseur. Les cellules transformées ont été étalées sur boîtes de LB additionné d'agar, d'ampicilline 50 mg.l⁻¹ et de 40 µl par boîte d'une solution de substrat X-Gal (Fermentas) à 40 mg.ml⁻¹ dans du N-M-diméthyl-formamide (Sigma). Le plasmide pCR®2.1 porte le gène *bla*, codant la résistance à l'ampicilline et le système de complémentation *lacZ*, où se trouve le site d'insertion. Les clones formant des colonies blanches ont donc été considérés comme possédant le vecteur pCR®2.1 portant les inserts 16S *Arthrobacter* ou ITS *Fusarium*. Des PCR ont été réalisées sur ces colonies, avec le couple d'amorce M13F/M13R, s'hybridant de part et d'autre du site d'insertion du plasmide. Les produits de ces amplifications ont été séquencés (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne) afin de confirmer la présence des inserts. Pour chaque séquence cible, un clone possédant le vecteur et l'insert a été sélectionné et conservé à - 80°C dans du glycérol (30%).

• Préparation des gammes standards

Les vecteurs pCR®2.1 portant les inserts ont été extraits grâce au NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel) suivant les instructions du fournisseur. Les plasmides ont ensuite été linéarisés par digestion par l'endonucléase BglII (Fermentas), possédant un seul site de restriction dans pCR®2.1 et aucun dans les inserts. Les restrictions ont été effectuées dans des volumes finaux de 20 µl ajustés à l'eau ultrapure filtrée à 0,22 µm, avec 2 µl de la préparation plasmidique, 2 µl de tampon 10x (Fermentas Orange), 0,5

μl de BglII ($10 \text{ unités} \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Après vérification de la restriction par visualisation sur gel d'agarose, la quantité d'ADN plasmidique a été dosée en spectrophotométrie (voir § 2.1.2.2). Les nombres de copies de plasmides (et donc des séquences cibles) ont été calculés en considérant la taille de l'insert (270 et 560 pb, respectivement pour l'ADNr 16S des Actinobactéries et l'ITS de *Fusarium*) et du vecteur (3930 pb), en admettant un poids moléculaire de 660 Daltons pour une paire de bases, selon la formule :

$$\text{Masse du plasmide (g)} = (\text{nombre de pb} \times 660) / 6,0221415 \cdot 10^{23}$$

Une solution stock de chaque plasmide, contenant 10^9 copies de la séquence cible par μl a été préparée et stockée à -20°C . Les gammes standards pour la PCR en temps réel, de 10^8 à 10^2 copies $\cdot \mu\text{l}^{-1}$, ont été préparées par dilution en cascade de la solution stock.

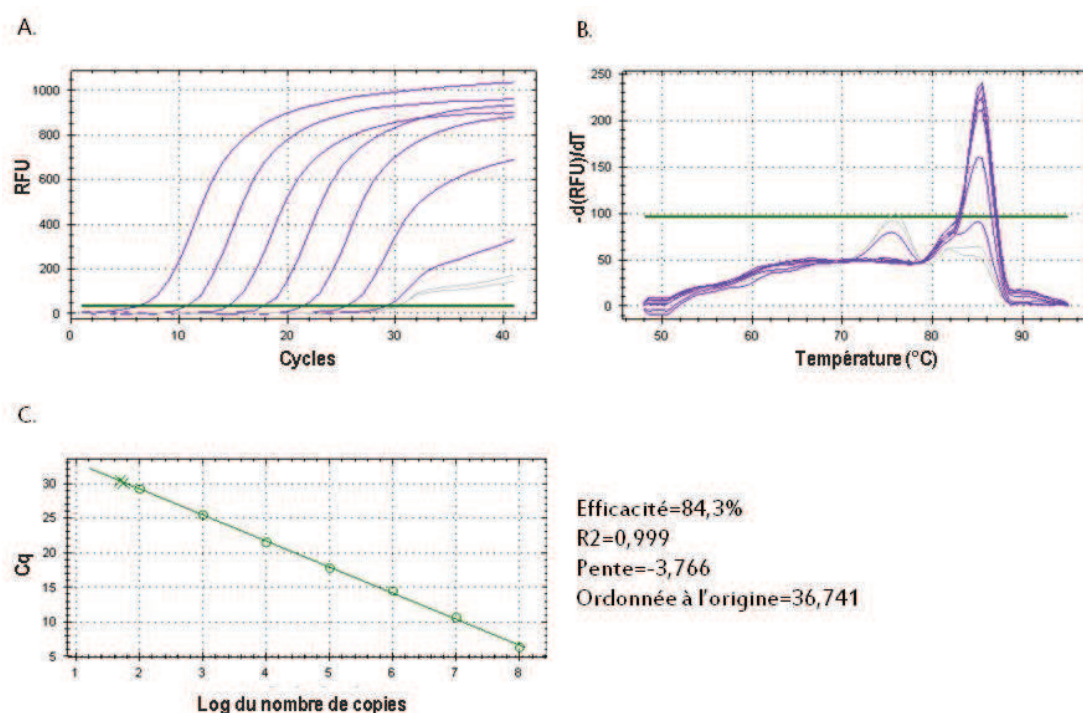


Figure 19. Courbes d'amplification (A), de fusion (melting curve) (B) et courbe standard (C) des PCR en temps réel ciblant les ITS des *Fusarium*. Les courbes violettes correspondent à la gamme standard, les courbes grises aux témoins négatifs.

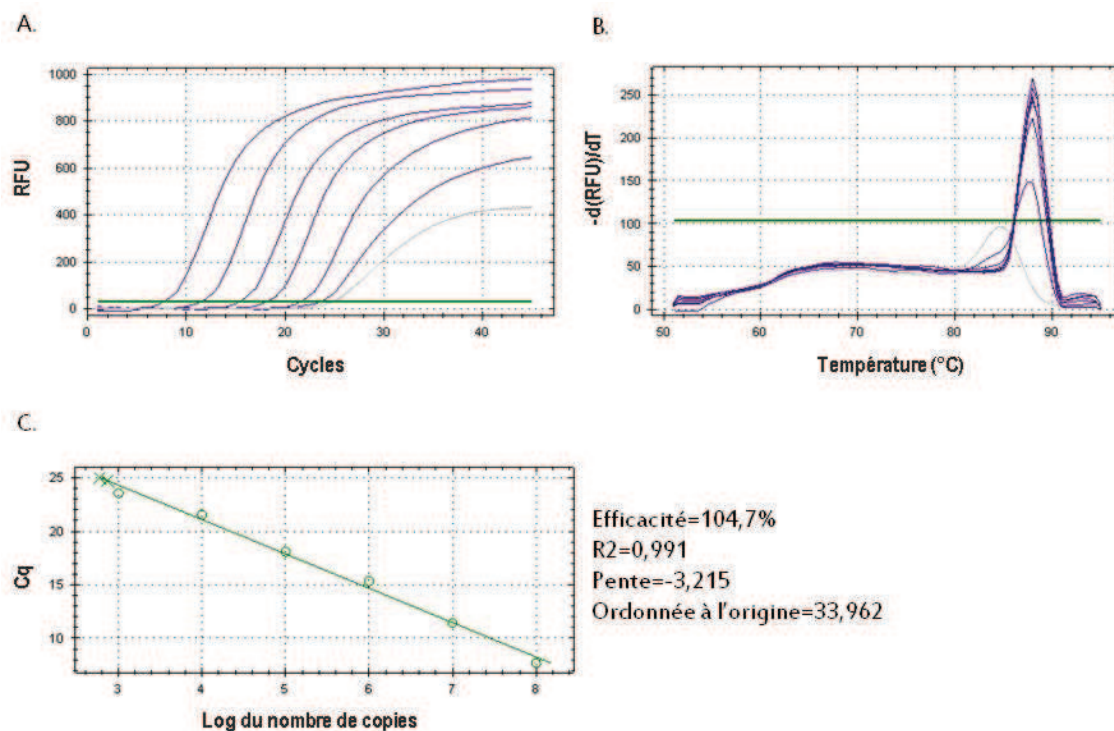


Figure 20. Courbes d'amplification (A), de fusion (melting curve) (B) et courbe standard (C) des PCR en temps réel ciblant les ARNr 16S des Actinobactéries. Les courbes violettes correspondent à la gamme standard, les courbes grises aux témoins négatifs.

• Validation des gammes standards

Lors des tests initiaux des gammes standards, les niveaux des lignes de seuil de détection ont été ajustés manuellement, afin de les placer dans la phase exponentielle d'émission de la fluorescence. Les runs ont été pris en compte dès lors que les coefficients de corrélation entre le cycle seuil (Cq, cycle auquel la courbe de fluorescence croise la ligne de seuil de détection) et le nombre de copies de la séquence cible des échantillons de la gamme standard étaient supérieurs à 0,99 et que l'efficacité de la PCR calculée par l'appareil était supérieure à 80% (Fig. 19 et 20). La pureté des produits de PCR a été vérifiée par analyse de la Melting Curve (courbe des températures de dénaturation), considérant un produit de PCR comme pur lorsqu'un seul pic était détecté et par électrophorèse sur gel d'agarose. Pour chaque run, les échantillons présentant un Cq supérieur ou égal au Cq des témoins négatifs, ont été considérés comme négatifs (nombre de copies en dessous du seuil de détection).

2.1.2.6. PCR-TTGE

• Conditions de PCR

Les conditions de PCR pour les amplifications des fragments destinés à la TTGE sont présentées dans le Tableau 7. Pour la PCR sur le gène codant les ARNr 16S, un programme "touch-down" a été utilisé,

constitué de 19 cycles avec une température d'hybridation diminuant de 63°C à 54°C (-1°C tous les 2 cycles) puis 15 cycles avec une température d'hybridation de 54°C (Cébron et al., 2009).

• Préparation et conditions de migration des gels de TTGE

Pour les ADNr 16S, totaux, la composition des gels décrite par Cébron et al. (2009) a été utilisée : 6% m/v d'acrylamide/bisacrylamide (Sigma®), 7 M d'urée (Euromedex), 2% v/v de glycérol dans du tampon TAE à 1,25X (1X correspond à 40 mM de tris-acétate, 20 mM d'acide acétique et 1 mM d'EDTA, à pH 8,3). La composition des gels a été légèrement modifiée pour la migration des ADNr 18S des champignons (5,5 M d'urée) et des ADNr 16S des Actinobactéries (8M). Après filtration, les gels polymérisent grâce à l'ajout de 300 µl persulfate d'ammonium à 10% m/v (Euromedex) et 30 µl de N,N,N',N'-tétraméthyl-éthylène-diamine (TEMED, Euromedex) pour un gel de 30 ml. Les électrophorèses ont été effectuées dans un appareil DCode system (BioRad) à migration verticale, suivant les gradients de température, les temps de migration et les voltages présentés dans le Tableau 10.

Fragment PCR	ΔT (°C)	$\Delta T/\text{heure}$ (°C)	Temps de migration (h)	Tension (V)
16S totaux	57 à 67	2	5	130
16S Actino	61 à 65	0,8	5	130
18S totaux	51,5 à 60,5	1,5	6	145

Tableau 10. Conditions de migration des gels de TTGE.

Après la migration, les acides nucléiques ont été marqués par incubation des gels de TTGE dans un bain de SYBR® Gold (1/10 000 final, Molecular Probes®) et les images prises au transilluminateur (Geldoc) ont été analysées avec le logiciel QuantityOne 4.01 (BioRad). Le niveau du bruit du fond a été ajusté pour chaque piste avant détection automatique des bandes. La correspondance des bandes entre les pistes d'un même gel a été déterminée manuellement, sur la base des séquences obtenues comme décrit dans le paragraphe suivant. La correspondance des bandes entre différents gels a été établie en faisant migrer de manière systématique le même échantillon sur les gels à comparer. Les proportions relatives de la fluorescence des bandes calculées par QuantityOne ont été utilisées pour construire des matrices pour le traitement statistique ultérieur (§ 2.3).

Les bandes majoritaires et/ou les plus discriminantes ont été découpées au scalpel et placées dans 35 µl de tampon DES (MP biomedical) à 4°C pendant 24 heures pour permettre la dissolution de l'ADN. Cet ADN (5 µl) a été amplifié par PCR avec les amorces correspondantes et portant les queues GC et les produits d'amplification soumis à une nouvelle TTGE afin de s'assurer de la pureté des bandes. Sur ces deuxièmes gels de TTGE, les bandes ont été découpées comme décrit précédemment et l'ADN dissous

(5 µl) a été amplifié par PCR à l'aide des amorces sans les queues GC. Les produits d'amplification ont été purifiés grâce au kit High Pure PCR Product Purification (ROCHE) et séquencés (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne) et les séquences comparées aux bases de données pour l'identification taxonomique (§ 2.1.2.4).

2.1.3. Microscopie

Toutes les observations microscopiques ont été réalisées avec un microscope à épifluorescence (Nikon Eclipse E600) équipé d'un ensemble de filtres standard à fluorescence (FITC, excitation : 495-565 nm et émission : 515-555 nm, G2A, excitation : 510-560 nm et émission: >590 nm, DAPI excitation : 340-380 nm et émission: 435-485 nm) et les photographies prises avec un appareil Nikon D70. Les différentes colorations ont été effectuées sur des prélèvements différents pour éviter les interférences entre colorants. Les observations réalisées sur le sable (Chapitre III-4) ont été effectuées sur quelques grains prélevés à la spatule, montés directement entre lame et lamelle dans le colorant.

Les vésicules intracellulaires autofluorescentes aux UV de *F. solani* MM1 ont été visualisées avec le filtre DAPI. L'absence d'interférence entre l'autofluorescence des HAP et celle des colorants a été vérifiée.

La viabilité d'*A. oxydans* Pyr2MsHM11 a été estimée par coloration des cultures au LIVE/DEAD® BacLight (Molecular Probes), suivant les instructions du fournisseur, sur des gouttes de cultures liquides prélevées à la pipette pasteur montées directement entre lame et lamelle dans le colorant.

La viabilité de *F. solani* MM1 a été estimée par coloration au FUN®1 cell stain (Molecular Probes®) (Chapitre III-3 et III-4). La coloration FUN®1 a été utilisée dans de nombreux travaux pour tester la viabilité de levures ou de spores de champignons filamenteux (Brul et al., 1997; Marr et al., 2001; Pina-Vaz et al., 2001; Balajee & Marr, 2002), mais son application aux hyphes des champignons filamenteux reste encore très réduite (Hua et al., 2011) et une mise au point a été nécessaire pour le présent travail. Des expériences préliminaires ont été réalisées pour déterminer la concentration de colorant et la taille des fragments de mycélium garantissant la réduction d'une éventuelle hétérogénéité de la coloration due à une mauvaise diffusion à travers les pelotes mycéliennes. Les résultats ont montré que les meilleures observations étaient réalisées en utilisant 25 µl de colorant FUN®1 à 50 µM sur des fragments de mycélium de 0,5 mm de diamètre prélevés avec la pointe d'un cône. Pour visualiser les structures cylindriques intra-vacuolaires (Cylindrical IntraVacuolar Structures ou CIVS) caractéristiques de la viabilité (Millard et al., 1997), montrées dans la Figure 21, les images prises lors de la visualisation au microscope avec les filtres FITC et G2A ont été fusionnées (Logiciel Image J). Ce test de viabilité présente les avantages d'être relativement bon marché et rapide et de pouvoir être utilisé même en cas de sporulation limitée.

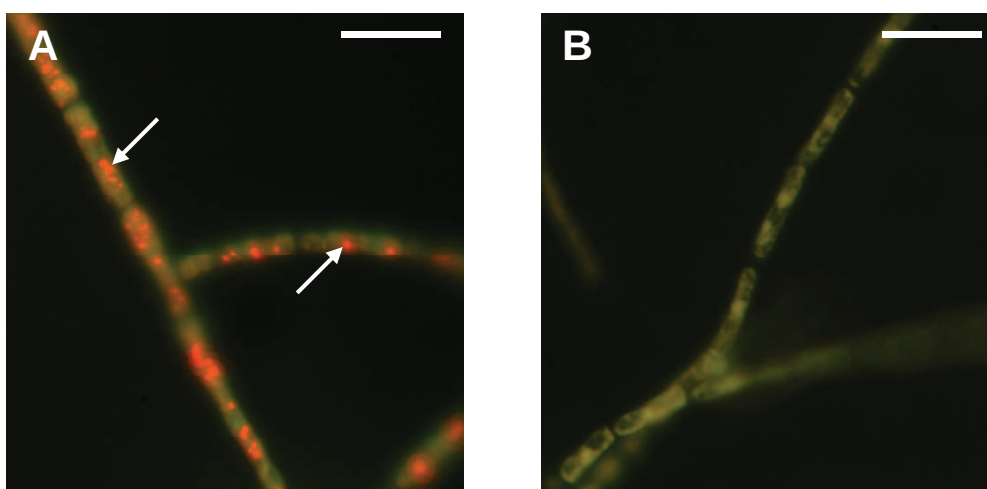


Figure 21. Coloration de mycélium de *Fusarium solani* MM1 au FUN@1. A. Mycélium métaboliquement actif, présentant des Cylindrical Intravacuolar Structures (CIVS) indiquées par les flèches, B. Mycélium « tué » par autoclavage (30 minutes à 110°C). Ces images résultent de la superposition des images des canaux vert et rouge, prises respectivement avec les filtres à fluorescence FITC et G2A.

2.1.4. Estimation des biomasses végétales

Après les cultures, les parties aériennes et racinaires des luzernes ont été prélevées séparément. Les fragments de racines ont été soigneusement lavés pour éliminer les particules de sol adhérentes. Après 2 jours de séchage à l'étuve (70°C), les parties aériennes et racinaires ont été pesées séparément.

2.2. Suivi des paramètres physico-chimiques

2.2.1. Mesure de la concentration en glucose dans les cultures liquides

La concentration en glucose (Chapitre III-3) a été estimée par un test colorimétrique (Glucose GOD-PAP®, BioLabo) suivant les instructions du fournisseur. Brièvement, ce test applique la méthode de Trinder (1969) : le glucose est oxydé par la glucose-oxydase (GOD) en acide gluconique, qui réagit en présence de peroxydase avec le chloro-4-phénol et le 4-amino-antipyrine (PAP) pour former une quinonéimine rouge. La quantité de cette quinonéimine, évaluée par mesure de l'absorbance à 505 nm au spectrophotomètre (Xenius XML, SAFAS) est directement proportionnelle à la quantité de glucose. Le pourcentage de glucose résiduel dans les milieux de culture a été calculé en prenant les valeurs des témoins abiotiques comme valeur équivalente à 100%.

2.2.2. Extractions et analyses des HAP

2.2.2.1. Extractions à partir de cultures liquides

Les extractions des HAP à partir de cultures liquides (Chapitre III-2 et III-3) ont été réalisées à froid sur la totalité des cultures dans des ampoules à décanter de 500 ml, par 3 passages successifs de 1 volume de DCM pour 1 volume de culture.

2.2.2.2. Extractions à partir de matrices solides

Les extractions de HAP à partir de matrices solides (biomasse microbienne lyophilisée, sable et sol, Chapitre III-3 à III-5), ont été réalisées au DCM par Accelerated Solvent Extraction (ASE®350, Dionex) suivant les programmes présentés dans le Tableau 11. De la poudre de diatomée (1 à 2 g, Sigma-Aldrich) a été ajoutée à la biomasse microbienne afin d'en augmenter le volume et d'optimiser l'extraction.

Matrice	Masse (mg)	Nombre de cycles	T (°C)	Durée des cycles (min)
Biomasse microbienne lyophilisée	5	2	130	5
Sable	3000	1	130	5
Mélange sol/sable	1000	2	130	5

Tableau 11. Programmes ASE utilisés pour l'extraction de HAP à partir de matrices solides.

2.2.2.3. Analyses des HAP extraits

Le DCM des extraits de HAP (40 ml environ par extrait) a été totalement évaporé au concentrateur SpeedVac (Thermo Scientific RC1010) et les échantillons ont été dissous dans l'acétonitrile (20 ml), solvant adéquat pour les dosages par HPLC. Afin d'éliminer d'éventuelles particules résiduelles, les extraits ont été filtrés à 0,2 µm avec des filtres en Teflon (UPTIDISC™, Interchim).

L'analyse des HAP dans les extraits a été effectuée par HPLC (High-Pressure Liquid Chromatography) avec un appareil Dionex UltiMate 3000 System à 30°C. La colonne de séparation (Supelco Ascendis® Express C18) mesurait 100 mm de long, avait un diamètre intérieur de 4,6 mm et une granulométrie de 2,6 µm. Le volume injecté était de 10 µl. La phase mobile était constituée d'acétonitrile à 100% avec un débit de 1,6 ml.min⁻¹. Un détecteur à photodiode a été utilisé, pour des détections à 254 nm pour le PHE et le PYR et 297 nm pour le DBA. La concentration résiduelle en HAP et la dissipation ont été

calculées en prenant les témoins abiotiques (cultures liquides) ou non inoculés (microcosmes) comme valeurs correspondant à 100%, mesurées pour chaque temps dans les expériences de cinétique.

2.3. Analyses Statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel XLStat 2008 (Addinsoft) avec $\alpha < 0,05$. Pour la comparaison entre 2 modalités, le test t de Student a été utilisé. Pour la comparaison entre plusieurs modalités d'un facteur ou plusieurs facteurs, des analyses de la variance (ANOVA), suivies de tests de comparaisons multiples de Newman-Keuls si des différences significatives étaient montrées, ont été appliquées. Pour l'analyse de l'évolution de l'abondance et des indices de diversité des champignons dans les parcelles lysimétriques (Chapitre III-5) ainsi que dans les cinétiques de dissipation des HAP par *F. solani* et *A. oxydans* (Chapitre III-2), le temps a été considéré comme facteur indépendant. Les tests utilisés sont mentionnés dans les plans expérimentaux au début de chaque section du Chapitre III. Pour analyser la diversité et l'abondance des champignons sur les parcelles lysimétriques (Chapitre III-5) ainsi que les différents groupes taxonomiques des microcosmes de sol (Chapitre III-4), des analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées selon la méthode de Pearson à partir des tableaux observations/variables.

Chapitre III :

RESULTATS

Chapitre III, 1^{ère} partie :

Dynamique des communautés
fongiques dans un sol multipollué aux
HAP et ETM : effet des plantes et
d'un traitement de dépollution par
désorption thermique

Résumé

Dans ce chapitre, les communautés fongiques ont été étudiées à long terme et *in situ* dans le sol issu de la friche industrielle de l'ancienne cokerie-acierie de Neuves-Maisons (NM), multipollué aux HAP et aux ETM, ainsi que dans le même sol ayant subi un traitement de remédiation par désorption thermique (TD). Trois traitements avec quatre répétitions ont été appliqués sur le sol NM, dans un dispositif de parcelles lysimétriques: le sol nu (NM-BS), le sol colonisé par la végétation spontanée (NM-SV) et le sol planté avec de la luzerne (*Medicago sativa*) et inoculé avec les champignons mycorhiziens *Glomus mosseae* et *G. intraradices* (NM-Msm). De plus, quatre parcelles lysimétriques contenant le sol TD ont été installées avec ce dernier traitement (TD-Msm). Des prélèvements deux fois par an (au printemps et à l'automne) pendant cinq ans, ont permis d'explorer l'abondance et la structure des communautés fongiques par PCR en temps réel et PCR-TTGE. La diversité a été mesurée par l'indice de diversité de Shannon et les ribotypes majoritaires ont été séquencés. Les analyses statistiques ont été effectuées en comparant d'une part les trois traitements du sol NM, pour évaluer l'effet des plantes, et d'autre part les traitements NM-Msm et TD-Msm, pour évaluer l'effet du traitement par désorption thermique. L'abondance des champignons a augmenté au cours du temps dans l'ensemble des parcelles. De plus, cette abondance était plus importante dans les parcelles plantées par rapport aux parcelles non plantées et dans le sol TD par rapport au sol NM. Par ailleurs, seuls deux ribotypes ont été détectés sur les profils de TTGE au début de l'expérience. Durant les deux premières années, où les profils de TTGE étaient hétérogènes entre les réplicats d'un même traitement, l'indice de diversité de Shannon H' a fortement augmenté, grâce à l'émergence de plus de 30 nouveaux ribotypes. Cependant, l'indice H' a diminué à partir de la troisième année, au profit d'un petit nombre de ribotypes dominants capables de se maintenir à long terme, appartenant majoritairement aux Ascomycètes, notamment *Geomyces* sp., *Phoma exigua* et *Penicillium purpurogenum*. Le sol portant des plantes de différentes espèces (NM-SV) présentait une diversité fongique plus importante que le sol planté avec la luzerne seule et le sol non planté. En revanche, l'indice H' et la structure globale de la communauté fongique n'y était pas différente de celle du sol NM, bien que certains ribotypes, comme le Basidiomycète *Clitopilus prunulus*, y aient été favorisés. L'ensemble des résultats indique que, même dans un sol très pollué, la couverture végétale était le principal facteur déterminant la structure des communautés fongiques et que l'effet du traitement de remédiation par désorption thermique, modifiant pourtant de manière importante les caractéristiques physico-chimiques du sol, n'était que secondaire. L'effet positif des plantes, en particulier des assemblages multi-spécifiques, sur l'abondance et la diversité fongiques pourrait représenter un avantage non négligeable dans les processus d'atténuation naturelle, reposant sur la biomasse et l'activité microbiennes.

Long term *in situ* dynamic of fungal communities in a heavy metal and PAH polluted soil with various plants and impact of thermal desorption treatment

Submitted to FEMS Microbiology Ecology in January 2012

Abstract

Fungal communities from a polycyclic aromatic hydrocarbon and heavy metal polluted soil (NM) were studied within a long-term *in situ* lysimetric plots experiment of natural attenuation assisted by plants. Three treatments were monitored: bare soil (NM-BS), soil planted with alfalfa (NM-Msm), and soil colonized by spontaneous vegetation (NM-VS). Four plots containing the same soil after thermal desorption treatment (TD) were planted with alfalfa (TD-Msm). Twice a year for five years, fungal abundance and community structure were evaluated by real-time PCR and temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) targeting 18S rDNA. The fungal abundance increased with time and it was higher in planted than in bare NM polluted soil and in TD treated than in NM polluted soil. The Shannon diversity index (H') increased during the first two years, with the emergence of more than 30 ribotypes, but it decreased after three years because of the selection of few competitive species, mostly Ascomycetes. H' was higher under complex plant assemblage (NM-SV) than in NM-BS plots but did not differ between NM and TD soils, both planted with alfalfa. These results indicated that even in a highly polluted soil, the plant cover was the main driver of the fungal community structure.

Introduction

Due to anthropogenic activities, particularly the intensive industrialization, large areas have been exposed worldwide to organic and metallic pollutants over the two last centuries. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), persistent organic compounds resulting from incomplete combustion of fossil organic matter, are common contaminants of industrial (metallurgy, petrochemical and coke industries) and coal mining wastelands (Wilcke, 2000). In these wasteland soils, PAHs are very often associated with heavy metal (HM) pollution, including Cu, Zn, Pb, As or Ni (Sandrin & Maier, 2003; Amezcua-Allieri et al., 2005; Vivas et al., 2008) and can lead to high toxicity and ecotoxicity (Joner et al., 2004; Eom et al., 2007).

Such as bacteria, fungi play an essential role in the ecosystem functioning, particularly in carbon and nitrogen cycles (Wainwright, 1992). They are also involved in PAH biodegradation, which is the main process of PAH removal from polluted soils (Cerniglia, 1997; Peng et al., 2008). Besides, fungal physiological traits are different from bacterial ones and it has been shown that the response to environmental conditions (e.g. vegetal cover, pH, C:N ratio or water content variations) could be different, or even opposite, between the two kingdoms (Williams & Rice, 2007; Houlden et al., 2008; Lauber et al., 2008; Rousk et al., 2010). However, whereas bacterial diversity in polluted areas has been extensively studied (Chiapusio et al., 2007; Vivas et al., 2008; Cébron et al., 2009), very scarce studies focused on fungal communities in these ecosystems. Indeed, some authors studied the diversity of cultivable fungi in PAH polluted harbor sediments (Salvo et al., 2005) or in soil artificially contaminated with crude oil (Obire & Anyanwu, 2009). Van Elsas et al. (2000) focused on the fungal diversity in a soil artificially polluted with crude oil and dibenzothiophene (DBT). However, studies almost exclusively concerned fungal communities in HM polluted environments (Macdonald et al., 2008; Marcial Gomes et al., 2010). But, to our knowledge, no study focused on the global diversity of the fungal community in PAH polluted soils of industrial wastelands.

Among PAH remediation treatments of soils, biological ones are of great interest because they are economically and environmentally friendly (Pandey et al., 2009). Natural attenuation process consists in monitoring the pollutant removal in soils under natural conditions, i.e. microbial PAH biodegradation. Natural attenuation can be assisted by the use of plants to increase the biodegradation rates. Indeed, plants, through the rhizosphere effect, are known to influence microbial biomass and activity in the vicinity of roots (Hiltner, 1904). For fungi as well as for bacteria, this effect can be quantitative and/or qualitative, leading to changes in community structure and diversity (Marcial Gomes et al., 2003; Broeckling et al., 2008; Curlevski et al., 2010). But very little is known about the rhizosphere effect on fungal communities in polluted environments.

The remediation treatment of PAH polluted soils by biological processes is not always feasible, often due to too high concentrations of pollutants or to bioavailability issues. Alternatively, physico-chemical treatments can be applied, among which thermal desorption (TD) consists in heating the soil at 500°C

to eliminate organic pollutants (Biache et al., 2008). If this treatment is very efficient for PAH removal, it does not reduce the HM contamination, and soil characteristics are drastically affected (e.g. soil structure, organic matter or nutrients (Biache et al., 2008). The impact of such remediation treatment on soil microbial diversity and functions and whether they can be restored with time is poorly known. Cébron et al. (2009) have studied bacterial communities in a soil from an industrial wasteland with and without treatment by thermal desorption and found that bacterial community structure and diversity evolved differently during time. Even if complex microbial communities recolonize the TD treated soil, it was shown that microbial enzymatic activities remained really low even four years after the TD treatment (Cébron et al., 2011a).

In this study we investigated fungal community (density, structure and diversity) in a highly PAH and HM polluted soil and the same soil after TD treatment, both soils being monitored within a long-term *in situ* experiment of natural attenuation assisted by plants (Ouvrard et al., 2011). We aimed at i) follow the dynamic of fungal community structure and diversity in these soils during five years of monitoring, ii) characterize the dominant fungal species and iii) assess the impact of plant cover and TD treatment on fungal community.

Materials & Methods

1. Experimental device, sampling, soils and vegetation

In situ experimental device and sampling

The experimental device, settled at the site of an industrial wasteland (Homécourt, Meurthe-et-Moselle, France) within the facilities supported by the GISFI (www.gisfi.fr), was previously described by Cébron et al. (2009; 2011a) and Ouvrard et al. (2011). Briefly, steel tanks (3 x 2 x 0.4 m, length x width x height) equipped with water collection systems were filled with HM and PAH polluted soil, NM soil, coming from a former coking plant site (Neuves-Maisons, Meurthe-et-Moselle, France). At the set up of the experiment (T0, September 2005), three treatments with four replicates were applied on NM soil: NM-BS, bare soil where vegetation was prevented by hand, NM-SV, soil with spontaneous colonisation by endemic plant species and NM-Msm, where alfalfa (*Medicago sativa* var. Europe) was sown (40 g seeds plot⁻¹) and arbuscular mycorrhizal (AM) fungi (*Glomus mosseae* and *G. intraradices*) were inoculated. Four additional plots, TD-Msm, were filled with TD soil, which is NM soil treated by thermal desorption six months before T0, sown with alfalfa and inoculated with AM fungi as described above. Each autumn, alfalfa shoot biomass was harvested for analyses thus few plant litter could accumulate on NM-Msm and TD-Msm plots. At T0, T3 (May 2007), T5 (May 2008), T6 (September 2008), T7 (May 2009), T8 (September 2009), T9 (May 2010), T10 (September 2010), six subsamples per plot were collected with a hand auger and mixed to make a composite sample per plot which was sieved at 5 mm. Part of these soil samples were dried for soil characteristic analyses and aliquots were stored at -20°C until DNA extraction.

Sampling date	NM soil		TD soil	
	T0	T9	T0	T9
Agronomical parameters				
N _{tot} (g.kg ⁻¹)	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.3	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.1
C:N	23.0 ± 1.3	25.4 ± 2.1	62.0 ± 1.4	52.3 ± 1.4
TOC (g.kg ⁻¹)	62.0 ± 3.6	67.9 ± 5.3	58.4 ± 8.3	64.1 ± 4.7
pH	7.0 ± 0.2	7.5 ± 0.1	8.0 ± 0.1	7.8 ± 0.1
S (g.kg ⁻¹)	nd	49425 ± 6702	nd	28975 ± 6089
Ca (g.kg ⁻¹)	41.7 ± 3.4	41.4 ± 3.1	27.1 ± 1.1	25.1 ± 1.2
Mg (g.kg ⁻¹)	1.01 ± 0.08	0.12 ± 0.02	0.24 ± 0.01	0.06 ± 0.01
Heavy metals (mg.kg⁻¹)				
Cadmium (Cd)	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.3	2.1 ± 0.1	2.4 ± 0.1
Chromium (Cr)	599 ± 64	1077 ± 151	593.7 ± 23.1	576 ± 87
Copper (Cu)	130.8 ± 8.2	136.2 ± 7.2	109.2 ± 1.7	120.2 ± 5.9
Molybdene (Mo)	11.2 ± 0.5	11.0 ± 0.8	11.8 ± 0.3	11.8 ± 0.4
Nickel (Ni)	97.3 ± 4.1	101.6 ± 5.8	102.2 ± 2.1	111.0 ± 5.6
Lead (Pb)	481.9 ± 57.6	596.6 ± 127.7	672.7 ± 23.0	811.8 ± 38.7
Zinc (Zn)	2085 ± 229	2279 ± 182	2745 ± 26	2915 ± 97
PAH (mg.kg-1)				
Naphthalène	48.7 ± 23.6	23.0 ± 3.8	2.9 ± 0.5	0.8 ± 0.5
Acenaphtylène	54.3 ± 5.9	18.3 ± 2.0	2.9 ± 0.5	0.3 ± 0.1
Acénaphène	61.0 ± 11.0	33.8 ± 8.5	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Fluorène	52.6 ± 10.9	32.6 ± 9.2	2.6 ± 0.1	0.5 ± 0.2
Phénanthrène	152.9 ± 25.8	119.5 ± 23.7	9.3 ± 0.3	4.3 ± 0.8
Anthracène	150.7 ± 29.3	80.9 ± 5.4	6.4 ± 0.2	1.2 ± 0.2
Fluoranthène	273.9 ± 37.6	201.0 ± 25.9	15.7 ± 0.4	6.1 ± 1.0
Pyrène	200.1 ± 28.7	150.5 ± 20.9	10.7 ± 0.4	4.0 ± 0.6
Benzo[a]anthracène	149.1 ± 20.3	104.9 ± 13.4	8.2 ± 0.3	2.7 ± 0.4
Chysène	117.9 ± 16.2	83.9 ± 9.6	5.4 ± 0.5	2.6 ± 0.4
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	133.5 ± 15.5	136.5 ± 15.0	10.7 ± 0.4	3.8 ± 0.3
Benzo[b]fluoranthène	185.8 ± 21.8	65.9 ± 15.3	9.1 ± 0.5	1.7 ± 0.1
Benzo[k]fluoranthène	69.6 ± 13.4	91.5 ± 9.8	3.7 ± 0.8	1.7 ± 0.2
Benzo[a]pyrène	158.0 ± 20.4	78.5 ± 7.6	8.2 ± 0.5	1.5 ± 0.2
Dibenzo[a,h]anthracèn	26.6 ± 3.0	20.2 ± 2.7	4.9 ± 0.1	0.5 ± 0.0
Benzo[g,h,i]perylène	89.6 ± 10.2	65.4 ± 6.7	4.9 ± 0.2	1.4 ± 0.1
Σ 16 PAH US-EPA	1924 ± 258	1205 ± 295	106 ± 4	34 ± 4.4

Table 12. Characteristics of NM and TD soils at T0 and T9.

Soil characteristics and plant parameters

Soil characteristics, as previously described in Cébron et al. (2009; 2011a) and Ouvrard et al. (2011), are shown in Table 12 for T0 and T9 sampling dates. The PAH concentration was much lower after TD treatment, but HM contents were still very high. Alfalfa shoot biomass (around 1 700 g dry weight plot⁻¹) was identical during the first two years (2006-2007) of the experiment while it was significantly higher in TD-Msm than in NM-Msm plots during the last three years (2008-2010) with 2 000 and 400 g dry weight plot⁻¹ at T10 for TD-Msm and NM-Msm, respectively (Ouvrard et al., 2011). Moreover, mycorrhizal colonization rate, as determined according to Trouvelot's method (1986), was found to be higher in TD-Msm than in NM-Msm plots (90% and 20% as a mean for 2009-2010 period, respectively). In NM-SV plots, plant diversity increased the first two years with gradual colonization of the NM soil (Dazy et al., 2008) and then plant communities exhibited a loss of species richness and diversity, explained by the establishment of highly competitive invasive plants: the goldenrod (*Solidago canadensis*) and the cinquefoil (*Potentilla reptans*) (Ouvrard et al., 2011).

2. DNA extraction

DNA was extracted from 0.5 g of soil using a bead beating based method as previously described (Cébron et al., 2011b) and eluted in 50 µL final volume. To prevent the coprecipitation of DNA and CaSO₄ during the isopropanol precipitation step, due to the high concentration of SO₄ in both soils (49 and 29 g kg⁻¹ for NM and TD soil, respectively), 200 mg of Dowex resin (Sigma-Aldrich) charged with a 5 M LiCl solution were added before this step, to exchange Li²⁺ and Ca²⁺ ions. DNA concentrations and A₂₆₀/A₂₈₀ purity ratio in final extracts were measured with a spectrophotometer (UV1800, Shimadzu) equipped with a module (Tray Cell, Hellma) adapted to small volumes (3 µL). The extracts were diluted in filtered (0.22 µm) ultrapure water to reach 1 to 10 ng DNA µL⁻¹ final concentrations. DNA extraction reproducibility was checked by comparison of fungal density and community fingerprints obtained from four independent extractions from the same soil sample. The quantification of 18S rRNA gene copy number by real-time PCR in these four technical replicates led to a very low standard deviation of 2.1%. Moreover, TTGE performed with PCR products from the four replicate extractions separately and each combination of pooled extractions (two, three and four extraction products were mixed) showed identical profiles.

3. Fungal abundance by real-time PCR

The number of 18S rRNA gene copies was used as an indicator of fungal abundance. The real-time PCR quantification of 18S rRNA gene was performed on 1 µL of ten-time diluted DNA extracts, using the universal primers Fung5F (5'-GGGAACCAGGACTTTTAC-3') and FF390R (5'-GAGGTCTCGTTCGTTATCG-3') previously used by Lueders et al. (2004), yielding 550 pb amplicons. Real-time qPCR detection chemistry using SybrGreen (iQ SyberGreen Supermix, Bio-Rad) and temperature profiles were as previously described (Cébron et al., 2009; Cébron et al., 2011a) with

modification, i.e. annealing temperature of 50°C (Thion et al., 2012). To prepare the 18S rRNA gene standard, a purified Fung5F-FF390R PCR fragment (QIAquick PCR purification kit, QIAGEN) from *Russula* sp. was cloned into the pCR2.1 vector using the TOPO TA cloning method (Invitrogen). Plasmid was purified (QIAprep Spin Miniprep kit, QIAGEN) and linearized using the restriction enzyme BglII (Euromedex). The plasmid concentration was quantified by spectrophotometry as described above. The copy number of standard plasmids was calculated according to the plasmid (3957 bp) plus insert (550 pb) lengths and assuming a molecular mass of 660 Da for a base pair. A standard DNA stock solution of 10^9 copies of plasmid μL^{-1} and a standard 10-fold dilution series were prepared. Quantification in each sample was performed in triplicate with three independent real-time PCR runs using an iCycler iQ apparatus (Bio-Rad) associated with iCycler optical system interface software (version 2.3, Bio-Rad) for data collection and melting curve analysis. The detection limit of the method was $5 \cdot 10^1$ gene copies μL DNA extract⁻¹, corresponding to about 10^4 gene copies g soil⁻¹.

4. Fungal diversity by PCR-TTGE

Fungal diversity and community structure were evaluated by thermal temporal gradient gel electrophoresis (PCR-TTGE) on 18S rRNA genes. PCR amplification was performed using the primers Fung5F/FF390R described above, with a GC clamp (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCC-3') added on the reverse primer. PCR were performed in 50 μL final volume with 1X PCR Buffer (Invitrogen), 1.25 U of Taq Polymerase recombinant (Invitrogen), 1.5 mM MgCl_2 , 200 μM of each primer (Eurofins-MWG Biotech), 200 μM of each dNTP and 1 μL of DNA extract. The PCR temperature profile comprised a 7 min initial denaturation step at 94°C, followed by 40 cycles, at 94°C for 30 s, 50°C for 45 s and 72°C for 40 s, and finally ended at 72°C for 10 min. PCR efficiency and specificity were assessed by agarose (1%) gel electrophoresis. To set optimal conditions for TTGE, melting temperatures of selected Fung5F-FF390R sequences (*Fusarium merismoides* [AF141950], *Sordariomyces* sp. [AF292054], *Aspergillus nidulans* [U77377], *Talaromyces flavus* [M83262], *Phaeotrichum benjamin* [AY016348], *Saccharomyces cerevisiae* [Z75578], *Cortinarius iodes* [AF026633], *Glomus mosseae* [U96139]) were predicted using MacMelt™ software. The temporal gradient and the concentration of urea in TTGE gel were experimentally adjusted to optimize the electrophoretic separation of ribotypes. The TTGE gels were composed of 6% w/v acrylamide/bisacrylamide (Sigma®), 5.5 M urea (Euromedex), 2% v/v glycerol and 1.25X TAE (50 mM tris-acetate, 25 mM acetic acid et 1.25 mM EDTA, pH 8.3) in 30 ml final volume. The migration was performed in TAE 1.25X at 145 V with an increase of the temperature of 1.5°C h^{-1} from 51.5 to 60.5 °C. Finally, TTGE gel staining using SybrGold were the same as described previously (Cébron et al., 2009; Cébron et al., 2011a). TTGE gel images were analysed using Quantity One 4.0.1 Software (BioRad) for detection of bands and calculation of their relative abundance. To allow comparison between different gels, some samples were run in every gels. Band correspondence between gels was further checked by comparing the sequences of excised bands (described below). A matrix of ribotype relative abundances

in samples was then generated. The diversity of fungal communities was expressed as Shannon diversity index (H'):

$$H' = - \sum_i p_i \ln p_i$$

where p_i is the relative abundance of the ribotype i (Hill et al., 2003).

5. Phylogenetic analysis

On every TTGE gel, the discriminating bands, i.e. the most intense and/or the bands which presented different patterns between profiles, were excised and dissolved overnight in 35 μ l of Tris HCl buffer (10 mM, pH 8.0) at 4°C. They were then amplified with Fung5F/FF390R-GC and run again in TTGE gels to ensure that a single ribotype was obtained. Individual bands on the second gels were excised and amplified using primers without GC clamp and PCR products were purified with High Pure PCR product purification Kit (Roche Applied Science). Purified amplicons were sequenced (Eurofins MWG Biotech, Germany) and sequences were compared to GenBank database using blastn program. The sequences of ribotypes and references were aligned using Clustalw tool in BioEdit then we used the tools DNA-DIST, NEIGHBOR, SEQBOOT and CONSENSE of PHYLIP 3.65 Software for the construction of the phylogenetic tree. The sequences of ribotypes 1 to 16 were deposited on GenBank under the accession numbers JQ423134 to JQ423149.

6. Statistical analysis

All statistical analyses were performed using XL-Stat 2008 Software (Addinsoft) with $\alpha \leq 0.05$ considering the results from the four replicate plots. Two-way analyses of variance (ANOVA), followed by multiple comparison tests of Newman-Keuls, were used to evaluate the effects of the time, the treatment and their interaction on the dependant factors, i.e. fungal abundance, fungal diversity and relative abundance of ribotypes. All ANOVAs were distinctly performed for NM soil (treatments NM-BS, NM-SV and NM-MSm), to assess the effect of plant cover, and for NM-MSm and TD-MSm, to assess the effect of thermal desorption treatment. Principal component analyses (PCA) were performed using the matrix of ribotype relative abundances, independently for each sampling date, considering all treatments together.

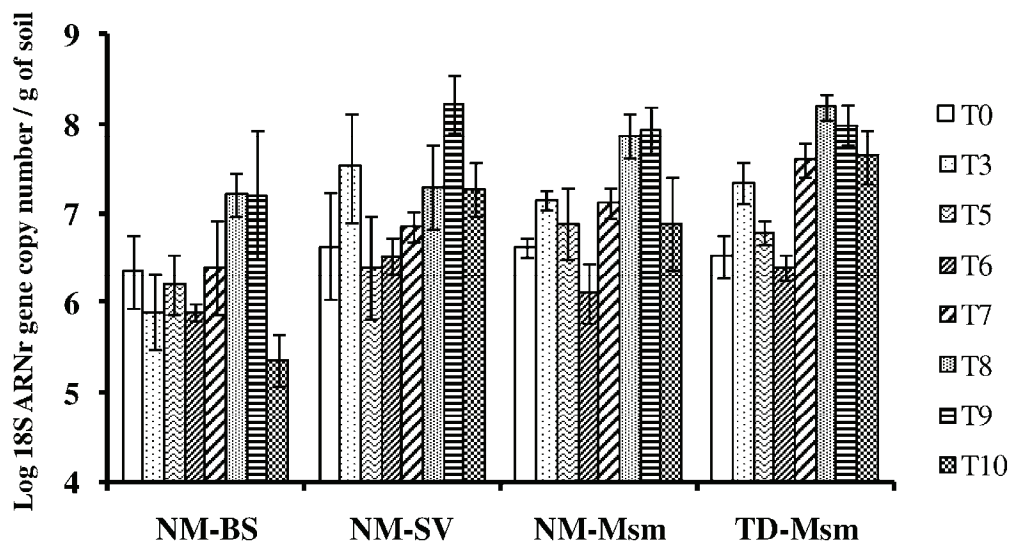
Results

1. Dynamic of fungal abundance

Fungal abundance was estimated using real-time PCR quantification of 18S rRNA genes in the four studied treatments and during time (Figure 22). Fungal abundance was not statistically different between the two soils (NM-MSm and TD-MSm plots) at the very beginning of the experiment (T0).

Furthermore, at T0 the three treatments NM-BS, NM-VS and NM-Msm were similar because no vegetation yet

colonized the plots, then T0 data were excluded from statistical analysis. Significant effects of treatments and sampling dates (time) were observed for the NM soil. Fungal abundance in vegetated plots (1.16×10^7 and 1.22×10^7 18S rRNA gene copy number g soil⁻¹ in average from T3 to T10 for NM-MSm and NM-SV, respectively) was significantly higher ($p < 0.001$) than in bare soil plots (2.04×10^6 18S rRNA gene copy number g soil⁻¹ in average from T3 to T10). Moreover, fungal abundance tended to be lower in September than in May in NM soil ($p = 0.051$), but the overall effect of time is unpredictable (e.g. $T_6 < T_5 = T_{10} < T_0 < T_7 = T_3 < T_8 = T_9$, Figure 22) probably because of the influence of the climate. The significant effect of the interaction between time and treatment ($p = 0.001$, not shown) indicated that the variations of fungal abundance with time were more significant in SV plots. Fungal abundance in TD-MSm plots (2.00×10^7 18S rRNA gene copy number g soil⁻¹ in average from T3 to T10) was significantly higher than in NM-MSm ones ($p = 0.011$). In both soils, fungal abundance significantly increased during the first 4 years of the experiment and then started to decline at T10 ($p < 0.0001$). No significant effect of the interaction between time and soil type could be observed.



Effect of treatment	p-value	NM-BS	NM-SV	NM-MSm	TD-MSm
NM vs TD	0.011			B	A
BS vs SV vs MSm	<0.0001	b	a	a	

Effect of time	p-value	T3	T5	T6	T7	T8	T9	T10
NM vs TD	<0.0001	BC	C	D	B	A	A	CD
BS vs SV vs MSm	<0.0001	b	bc	c	b	a	a	bc

Figure 22. Fungal 18S rRNA gene copy number determined by real-time PCR for the four treatments from Sept. 2005 (T0) to Sept. 2010 (T10). NM (polluted soil), TD (thermal-desorption treated soil), BS (bare soil), SV (spontaneous vegetation), Msm (planted with *Medicago sativa* and inoculated with mycorrhizal fungi). Mean values $\pm$ SD ($n=4$). The table below shows the results of 2-way (treatment and time) ANOVAs, different letters indicating significant differences ($p < 0.05$).

2. Fungal community structure

Fungal community structure was studied using TTGE fingerprinting method (Figure 23). All sampling dates and treatments taken together, 45 ribotypes could be distinguished. The TTGE gel pictures and the corresponding PCAs are shown for the sampling times T5 and T6, when the number of bands was the highest and for T8, when the structure of the community had stabilized (Figure 23). The datas for other sampling dates are available in Supplemental Data.

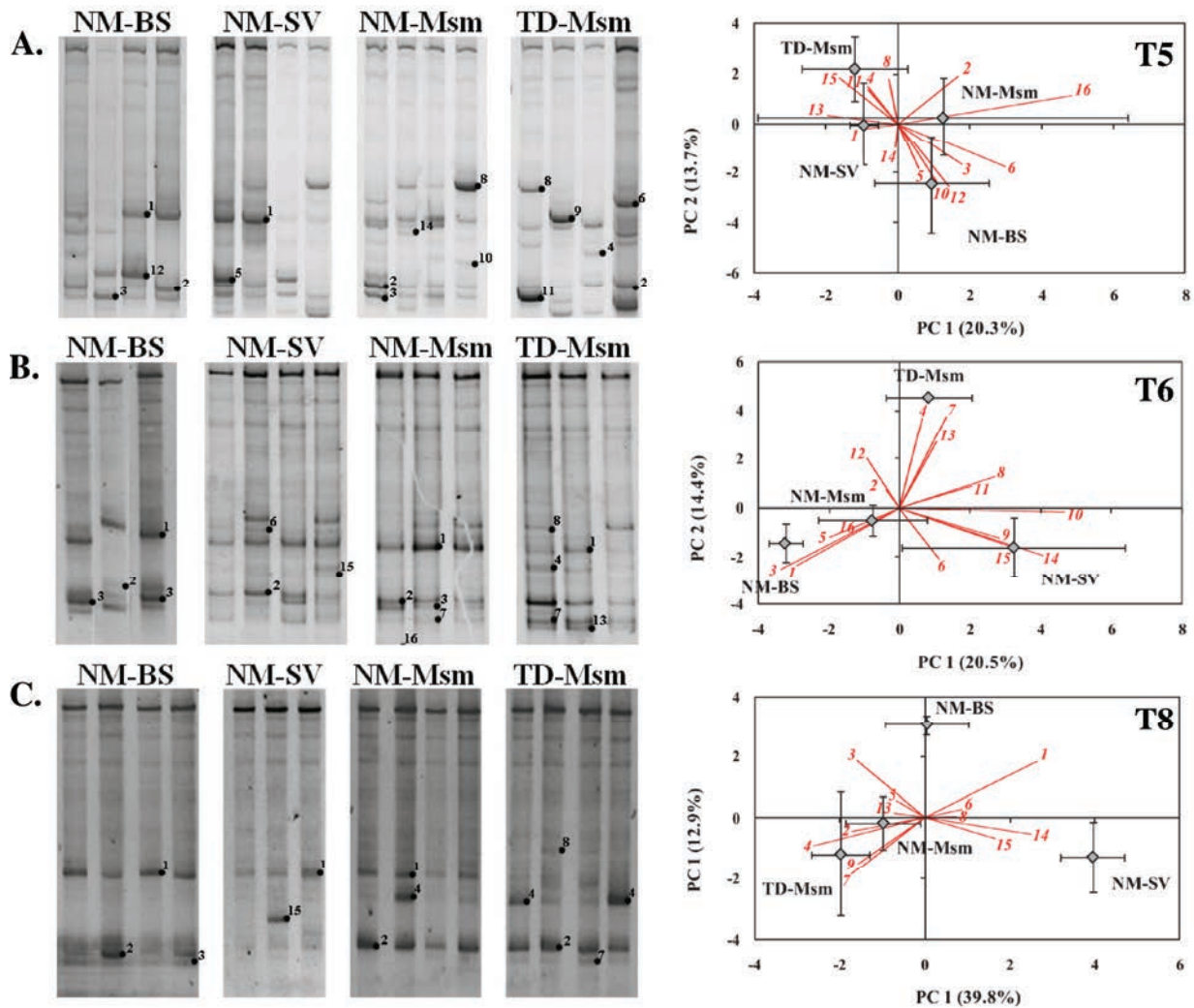
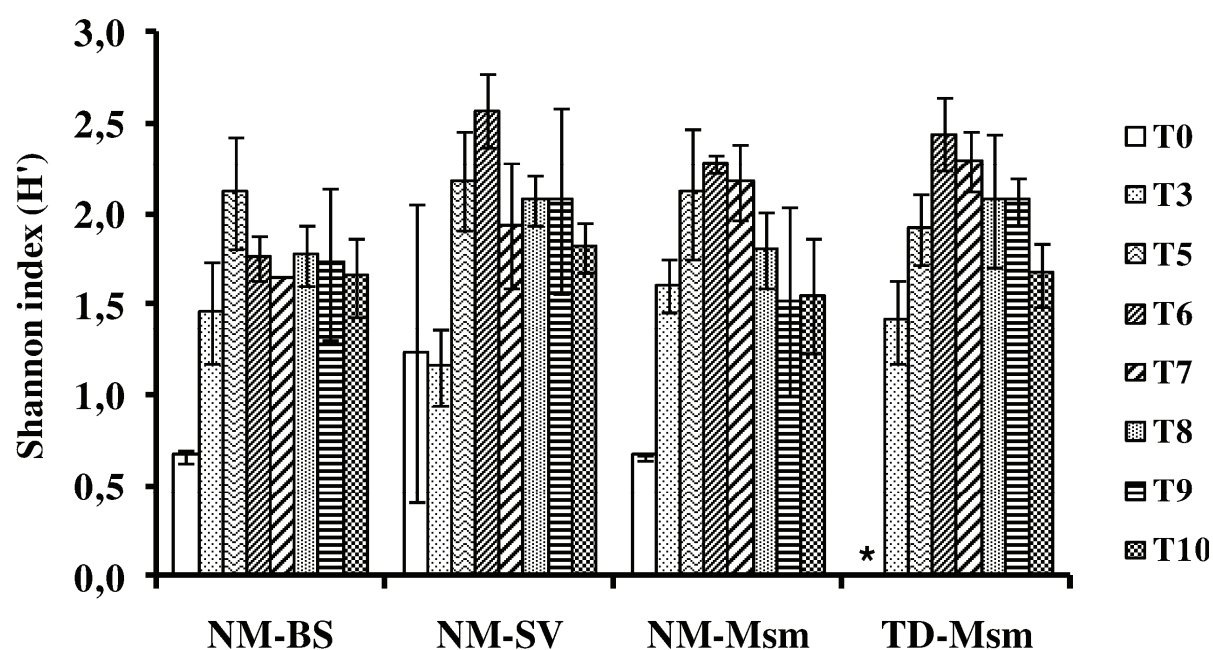


Figure 23. Structure of the fungal community for the four treatments. Left: TTGE gels of 18S rRNA fragments of replicate plots for the four treatments at T5, T6 and T8. Dominant bands marked with filled circles were excised for sequencing (the numbers indicate the ribotype). Right: principal components analyses (PCA) of relative abundance of the ribotypes, based on Pearson correlation matrix for the three corresponding sampling dates. For one replicate of NM-BS at T6 and NM-SV at T8, no exploitable TTGE profiles could be obtained because PCR products were too weak.

At T0 no TTGE profile could be obtained for TD-Msm where a too low quantity of PCR products was generated with GC-clamp primers. For all the treatments on the NM soil, TTGE profiles were similar and dominated by only two distinct ribotypes at T0 (Figure 26, supplemental data). The number of ribotypes increased at T3 (one year and a half after T0) with an average of 7.7 ribotypes plot⁻¹ (all NM and TD treatments taken together; Figure 26, supplemental data). At this date, profiles were similar between the three treatments (BS, SV, Msm) of the NM soil, but TD-Msm profiles were different from NM-Msm ones. At T5 and T6, diversity increased and many new ribotypes were observed, with different patterns between the two sampling dates. At T5, the four replicate plots of each treatment showed very heterogeneous profiles (Figure 23.A). Indeed, PCA illustrated the absence of discrimination between treatments due to this heterogeneity between replicates. On the contrary, at T6, the profiles of treatment replicates tended to homogenize (Figure 23.B), leading to the discrimination of treatments on PCA. Bare soil (NM-BS) was separated from planted ones (NM-SV and NM-Msm) on the 1st axis, explaining 20% of the variation, and TD and NM soils were clearly separated on the 2nd axis, explaining 14% of the variation. At T8 (Figure 23.C), the structure of the community seemed to stabilize, with strong dominance of few ribotypes. On PCA, the 1st axis explained 39% of the variation and discriminated the type of vegetation with NM-Msm being closer to TD-Msm than to NM-SV and the 2nd axis (12% variation) discriminated the bare soil plots (NM-BS) from the plots with vegetation (NM-SV, NM-Msm and TD-Msm). Moreover, this discrimination between bare soil plots and planted ones, and more particularly of NM-BS from NM-SV, on PCAs was observed from T6 to T10 (Figure 26, supplemental data).

From TTGE profiles Shannon diversity indexes (H') were calculated for each plot of each treatment at every sampling date based on the matrix of ribotype relative abundances (Figure 24). A significant increase ($p < 0.0001$) of the Shannon diversity index was observed during the first 3 years, reaching at T6: 1.75, 2.57, 2.27 and 2.43, for NM-BS, NM-SV, NM-Msm and TD-Msm, respectively. This was followed by a decline during the last two years, the Shannon diversity index reaching 1.67 in average at T10 (no significant difference between treatment at this time), which was equivalent to T3 values. On NM soil, the Shannon diversity index was significantly higher in the plots with spontaneous vegetation compared to bare soil plots ($p = 0.036$). On the contrary, Shannon diversity index were not significantly different between plots planted with alfalfa (NM-Msm) and bare soil plots (NM-BS). The analysis of the effect of interaction between time and treatment ($p = 0.017$) revealed that there was no significant temporal variation of Shannon index in bare soil.



Effect of treatment	p-value	NM-BS	NM-SV	NM-MSm	TD-MSm
NM vs TD	0.099				A
BS vs SV vs MSm	<0.0001	b	a	ab	

Effect of time	p-value	T3	T5	T6	T7	T8	T9	T10
NM vs TD	<0.0001	C	A	A	AB	AB	B	B
BS vs SV vs MSm	<0.0001	e	bc	a	ab	ab	b	b

Figure 24. Shannon diversity indexes (H') estimated from TTGE profiles in the four treatments from sept. 2005 (T0) to Sept. 2010 (T10). NM (polluted soil), TD (thermal-desorption treated soil), BS (bare soil), SV (spontaneous vegetation), Msm (planted with *Medicago sativa* and inoculated with mycorrhizal fungi). *: not determined. Mean values $\pm$ SD ($n=4$). The table below shows the results of 2-way (treatment and time) ANOVAs, different letters indicating significant differences. ($p<0.05$). T0 data were not included in statistical analysis, since at this time NM plots were all identical and no TTGE profile could be obtained for TD soil.

3. Identification of dominant fungal ribotypes

Dominant fungal strains were identified by sequencing of TTGE bands (Table 13). Sequences were used to construct a phylogenetic tree (Figure 25). In NM and TD soils, the most dominant ribotypes belonged to the Ascomycota, and more particularly the Pezizomycotina. For instance, *Geomyces* sp. (ribotype 1) and *Penicillium purpurogenum* (ribotype 3) were dominant at T0, before the detection of other ribotypes, such as *Phoma* sp. (ribotype 2) or *Meliniomyces variabilis* (ribotype 6) at T3, at the expense of *Penicillium purpurogenum* sp.. Only three ribotypes could be identified as Basidiomycota, among which *Clitopilus prunulus* (ribotype 4) was the dominant. Moreover, no Zygomycota could be identified.

The relative abundance of each identified ribotype was found to vary with time, plant cover and soil type (Figure 23). For instance, *Phoma* sp. (ribotype 2) was more and more represented throughout the

first four years of the experiment and then significantly declined in both soils ($p = 0.001$). *Cyphellophora laciniata* (ribotype 9) was much more represented at T5 than at other sampling dates ($p \leq 0.006$). The effect of vegetation was also significant for several ribotypes. The dominant fungus, *Geomyces* sp. (ribotype 1), was more abundant in NM-BS plots than in NM-MSm ($p = 0.008$) and NM-SV ($p = 0.058$) ones. Some ribotypes tended to be more represented in NM-SV plots than in NM-MSm ones, such as *Phoma* sp. (ribotype 2, $p = 0.061$), *Penicillium purpurogenum* (ribotype 3, $p = 0.058$), *Cyathus striatus* (ribotype 15, $p = 0.044$) or *Fusarium solani* (ribotype 13, $p = 0.021$). Contrastingly, some ribotypes were equally abundant in bare and planted soils, such as *Thelebolus stercoreus* (ribotype 10) or *Neurospora crassa* (ribotype 11). In addition, some ribotypes were favoured in TD soil compared with NM soil, such as *Clitopilus prunulus* (ribotype 4, $p = 0.008$), *Fusarium solani* (ribotype 13, $p = 0.001$) or *Chaetomium elatum* (ribotype 8, $p = 0.065$), whereas some others were more represented in NM soil, such as *Geomyces* sp. (ribotype 1, $p < 0.0001$) or *Meliniomyces variabilis* (ribotype 6, $p = 0.004$). On the contrary, the relative abundance of some ribotypes, such as *Phoma* sp. (ribotype 2) and *Penicillium purpurogenum* (ribotype 3), was not affected by the soil type.

Rib.*	% §	Nearest sequence (Accession number)	Phylum, subphylum, class
1	100	<i>Geomyces</i> sp. (GQ214385)	Ascomycota, Pezizomycotina, Leotiomycete
2	98	<i>Phoma exigua</i> (AB454232)	Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycete
3	99	<i>Penicillium purpurogenum</i> (GQ903331)	Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycete
4	98	<i>Clitopilus prunulus</i> (AY771607)	Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycete
5	98	<i>Aspergillus versicolor</i> (GU227343)	Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycete
6	99	<i>Meliniomyces variabilis</i> (GU206875)	Ascomycota, Pezizomycotina, Leotiomycete
7	99	<i>Fusarium oxysporum</i> (FN666092)	Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycete
8	99	<i>Chaetomium elatum</i> (FN666095)	Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycete
9	98	<i>Cyphellophora laciniata</i> (FJ358307)	Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycete
10	97	<i>Thelebolus stercoreus</i> (AY942194)	Ascomycota, Pezizomycotina, Leotiomycete
11	98	<i>Neurospora crassa</i> (FJ610444)	Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycete
12	99	<i>Collybia tuberosa</i> (NG_013178)	Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycete
13	99	<i>Fusarium solani</i> (EF397944)	Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycete
14	100	<i>Cladosporium</i> sp. (GU322367)	Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycete
15	99	<i>Cyathus striatus</i> (AF026617)	Basidiomycota, Agaricomycotina, Agaricomycete
16	99	<i>Kionochaeta</i> sp. (AB521047)	Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycete

Table 13. Phylogeny of dominant and/or discriminant ribotypes, based on comparison of sequences with GenBank database (BLASTn).

* Ribotype number, as shown in Figure 3, corresponding to the order of frequency (all treatments and sampling dates taken together). § % of identity.

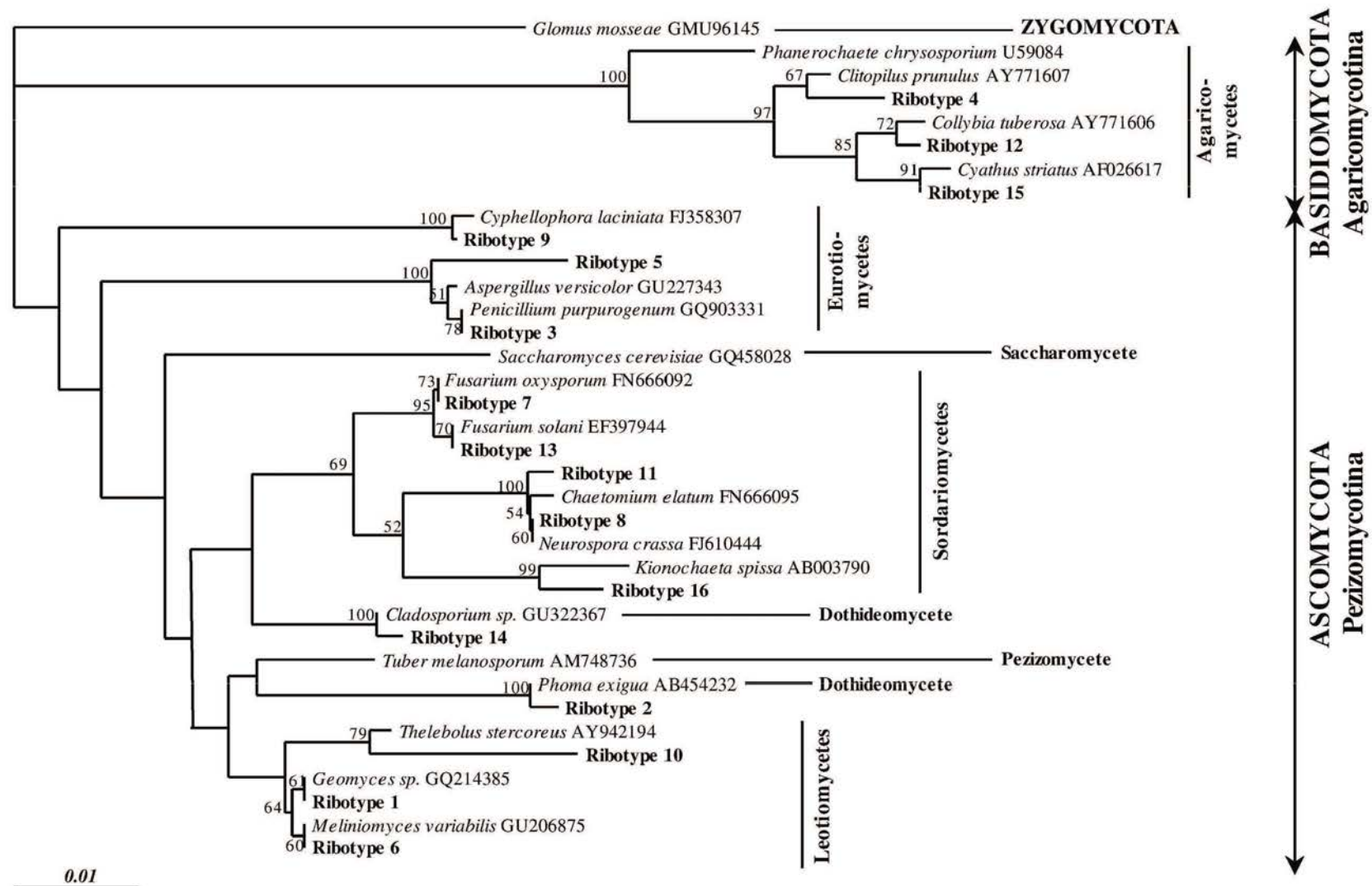


Figure 25. Phylogenetic Neighbor-Joining tree showing sequences of ribotypes and the reference sequences with their accession numbers in GenBank. *Glomus mosseae* GMU96145 (Zygomycete) was chosen as outgroup. Bootstrap values greater than 50% are shown (numbers beside each branch junction). They derived from 100 replicates using neighbor-joining method with Phylip 3.65 Software.

Discussion

Fungal communities in the multicontaminated soil under the influence of plant cover

Our results indicated that the vegetation strongly influenced the fungal communities in the highly polluted NM soil. Firstly, fungal abundance, as determined by real-time PCR targeting fungal 18S rRNA genes, was significantly higher (about 4-times from T3 to T10) in planted than in bare soil, which is an illustration of the quantitative rhizosphere effect. A higher number of bacteria in planted NM soil was also reported by collaborators using culture dependent quantification (Ouvrard et al., 2011) but not using bacterial 16S rRNA gene quantification (Cébron et al., 2009). In concordance with our results, Hannula et al. (2010) showed that the fungal biomass, evaluated by total ergosterol measurement, was higher in potato rhizosphere than in bulk soil. On the contrary, Chen et al. (2008) did not observe any difference in fungal biomass, estimated by phospholipid fatty acid analysis (PLFA), between soil planted with different legumes and grasses and unplanted soil. Fungi are heterotrophic organisms depending on exogenous carbon for their growth, thus plants can provide simple carbon substrates through litter deposition and exudation of primary and secondary metabolites (Butler et al., 2003; Walker et al., 2003). Secondly, the vegetation significantly affected fungal community structure, which was shown by TTGE profile analyses. From T6 to T10, PCAs discriminated bare and planted soil, which is an illustration of qualitative rhizosphere effect as previously observed for fungi and/or bacteria (Marcial Gomes et al., 2003; Phillips et al., 2006; Chen et al., 2008). *Geomyces* sp. was found to be the very dominant species in all NM treatments, and more particularly in bare soil, where its relative abundance was higher than in planted soil. Fungi of this genus were commonly found in forest and agricultural soils (De Bellis et al., 2007; Baldrian et al., 2011). Besides, it was previously detected in extreme environments, notably Arctic and Antarctic polar areas (Kirtsideli, 2007; Tosi et al., 2010) and a heavy metal polluted forest soil (Nordgren et al., 1985). In addition, it was shown that *Geomyces* sp. have the ability to use a large range of carbon substrates, such as wood, fur or paper (Arenz et al., 2006) and *Geomyces pannorum* was found to be able to degrade polyvinylchloride (PVC) and polyurethane (PU) (Barratt et al., 2003; Cosgrove et al., 2007). All these data suggest a great adaptability of the genus *Geomyces* to environmental stresses. Moreover, PCA discrimination of fungal communities was more obvious between NM-SV and NM-BS plots, indicating that a diversified vegetation have a stronger impact on fungal community structure than a monoculture of alfalfa. This was confirmed by a higher Shannon diversity index in NM-SV plots than NM-BS ones. Indeed, several identified ribotypes taking part to this higher diversity, *Phoma* sp., *Penicillium purpurogenum*, *Cyathus striatus* and *Fusarium solani*, were more represented in spontaneously vegetated soil than in soil planted with alfalfa. Members of the *Phoma* genus are plant-associated fungi, most often not phytopathogenic (Hamayun et al., 2009; Trillas & Segarra, 2009), which were interestingly often detected in soils contaminated with organic and/or metallic pollutants (Naranjo Briceño et al., 2007; Dirginciute-Volodkiene & Peciulyte, 2011). *P. purpurogenum* was also found in various rhizospheres (Pratt & Tewolde, 2009; Scervino et al., 2011)

but, unlike many other members of the *Penicillium* genus (Saraswathy & Hallberg, 2005; Naranjo Briceño et al., 2007), it was to our knowledge never detected in highly polluted soils. This is also the first time that the brown-rot Basidiomycete *C. striatus*, previously studied for its ligninolytic activity and antibiotic production (Halsall, 1993; Gehrig et al., 1998), was found in a polluted soil. *F. solani* is a common inhabitant of legume rhizosphere, where it can live as a saprotroph or a phytopathogen (Salzer et al., 2000; Manici & Caputo, 2010). In addition, *F. solani* has often been isolated from PAH and/or HM contaminated areas (Verdin et al., 2004; Hong et al., 2010) and some strains have been studied for their potential in PAH removal (Rafin et al., 2006; Thion et al., 2012). As previously reported by other authors in crop rotation systems, mixed cultures and forest ecosystems (Chen et al., 2008; Curlevski et al., 2010; Manici & Caputo, 2010), we showed that the fungal diversity was lower in soil under monoculture than in soil where vegetal inputs were more diverse. More diverse plant community could increase the range of carbon sources for heterotrophic fungi, thus the fungal diversity, since it is known that the existence of different niches is a key factor for diversity (Levine & HilleRisLambers, 2009). Cébron et al. (2009) monitored the bacterial diversity in the same experimental device during the first two years and also found that the structure of the bacterial community of NM-SV plots was more divergent from NM-BS than NM-MSm one. It is surprising that no Zygomycete could be identified, even in vegetated plots where plants were colonized by mycorrhizal fungi. This could be explained by the fact that we did not identify all TTGE bands, especially the rarest ones, and that specific primers should rather be used to study AM fungi (Sonjak et al., 2009).

Influence of the thermal desorption treatment

Our results highlighted differences in fungal abundance and diversity between NM and TD soils. Fungal abundance, i.e. 18S rRNA gene copy number g soil⁻¹, was 1.7-fold higher in TD soil than in NM soil from T3 to T10. The thermal desorption treatment drastically depleted PAH concentration in this wasteland soil but also modified the physicochemical characteristics, e.g. porosity, N content and thus C:N ratio, Ca, Mg and S content (Table 1, Ouvrard et al., 2011), and did not affect HM concentrations which remained very high. Consequently, the difference of fungal abundance cannot only be attributed to the PAH removal. The alfalfa biomass was significantly higher in TD-MSm plots than in NM-MSm ones, which could have increased the input of available carbon substrate in the rhizosphere, promoting fungal growth. On the other hand, PCA analyses, with the exception of T3 and T6, did not discriminate TD-MSm and NM-MSm plots, suggesting that the fungal community structure was driven firstly by the vegetal cover and not by the soil characteristics in the present experiment. It is interesting to note that the bacterial community strongly differed between TD and NM soils for the first two years of the experiment, despite an equivalent alfalfa biomass (Cébron et al., 2009). Nevertheless, the relative abundance of some fungal ribotypes was affected by the soil type. The Agaricomycete *Clitopilus prunulus* was favored in TD soil, where it was very often among the three dominant ribotypes. This saprophytic fungus, previously detected in forest soil (Edwards et al., 2008), has been studied for its ability to produce the pleurotomutilin, an antibiotic used in veterinary medicine (Hartley et al., 2009).

To our knowledge, this fungus has not yet been reported in a polluted environment. At first sight, this is in contradiction with Lauber et al. (2008) who found that the relative abundance of Agaricomycetes was negatively correlated with C:N ratio. However, the organic matter in TD soil is more condensed than in NM soil (Biache et al., 2008) which decreases its lability and bioavailability and increases its recalcitrance to biodegradation, in concordance with the lower respiration rate and enzymatic activities (e.g. arylamidase, lipase or phosphatase) reported for the same soil (Cébron et al., 2011a). Biodegradable carbon sources in this soil could thus mainly come from the plants. As a matter of fact, only three ribotypes could be related to Basidiomycetes in both NM and TD soil, to the benefit of Ascomycetes. In the few previous studies concerning fungi in polluted environments Ascomycetes such as *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* and *Trichoderma* were also dominant ribotypes (Van Elsas et al., 2000; Salvo et al., 2005; Obire & Anyanwu, 2009). Such results suggest that Basidiomycetes have a lower competitiveness than Ascomycetes in polluted environments. The relative abundance of the imperfect fungi *Fusarium solani* and *Chaetomium elatum*, were also higher in TD compared to NM soil. *C. elatum*, a cellulolytic brown-rot fungus previously found in association with tree roots (Violi et al., 2007), was apparently never detected in polluted soils. On the contrary, *Geomyces* sp. was significantly favored in NM soil, upholding its higher competitiveness in this extremely contaminated soil relatively to other taxa.

Long-term dynamic of the fungal community structure

This study allowed the monitoring over 5 years the structure of the fungal community in a polluted soil and the re-colonization of a TD treated soil. The Shannon diversity index evolved more significantly with time that the number of ribotypes, suggesting that the differences in fungal diversity concerned the distribution of the fungal ribotypes more than the richness. At the beginning of the experiment (T0), only two fungal taxa were detected, corresponding to the “geometric” distribution, typical of disturbed communities, as described by Zak et al. (1992), i.e. a very small number of dominant species (two ribotypes here) and very few and very rare species. The “disturbance” mentioned here is not the high level of pollution of the soil, because indigenous fungi were theoretically already adapted to this pollution (Van der Meer et al., 1992), but rather the treatments (excavation, sieving, seeding,...) applied to the soil before and at the set-up of the experiment. The population density at this time was relatively low, which is known to favor the development of fast-growing r-strategists (Andrews, 1992) who colonized the soil from T0 to T6. Concerning fungi, r- and K- strategies mostly refer to fast or slow growth, less or more resource allocation to self-maintenance and short or long living, respectively (Andrews, 1992). Considering the extreme plasticity of fungal phenotypes and growth forms, the same individual or population could easily switch between r and K strategies, adapting its life cycle to environmental conditions (Andrews, 1992). The fungal species which emerged during this colonization phase were probably i) indigenous fungi previously present but very rare then not detectable with the TTGE technique and/or ii) exogenous fungi freshly introduced from surrounding area dispersed by air, water, or fauna (Malloch & Blackwell, 1992). At T6, the fungal community displayed a large number of

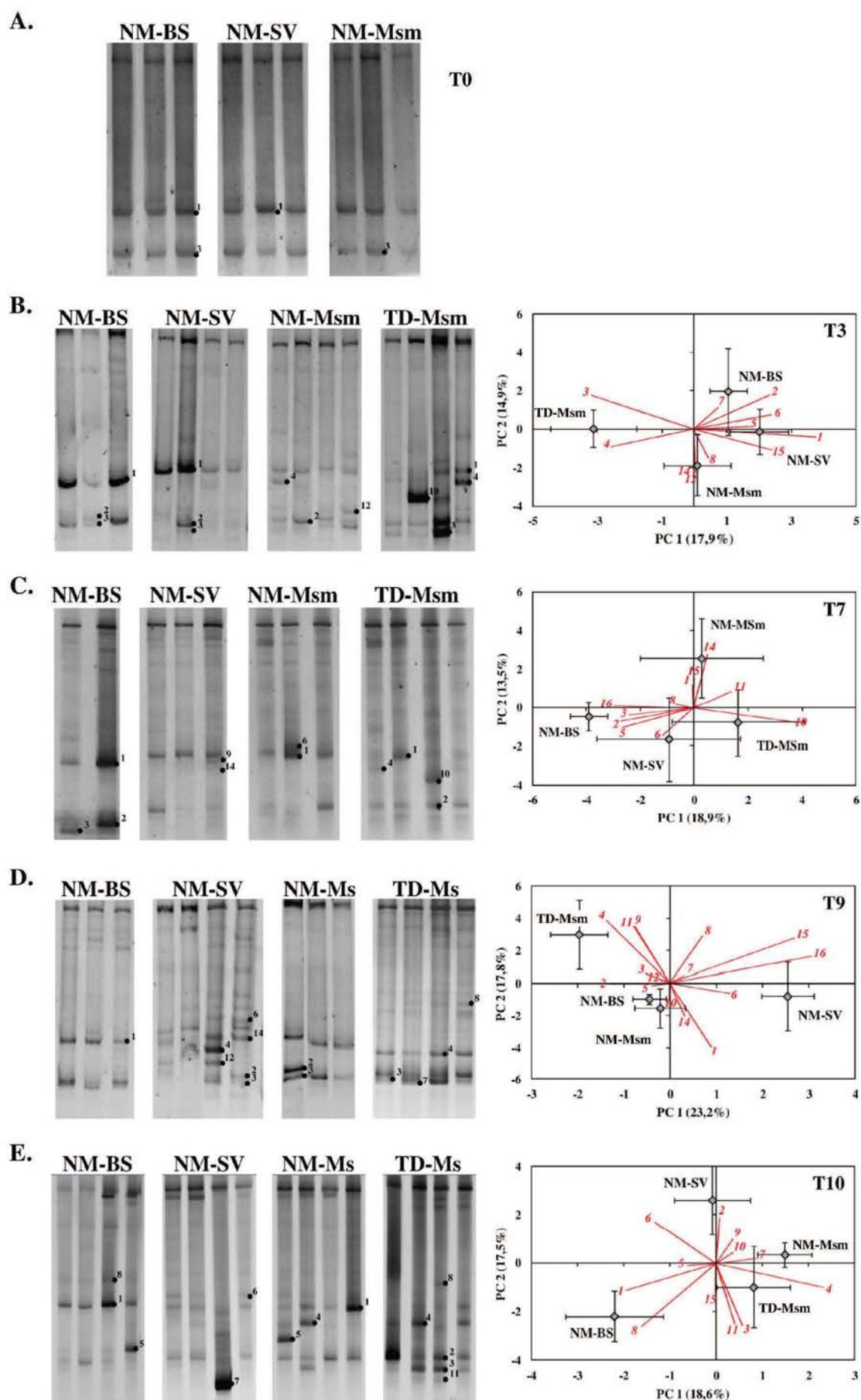
species with relatively homogenous relative abundances, corresponding to a “lognormal” distribution (Zak, 1992). Then, the density of population increased, probably leading to limiting nutrient conditions, thus increasing competition in a stabilized environment, known to favor K-strategists (Andrews, 1992). From T6 to T10, these K-strategists could have been selected, the selection being mostly driven by the status of the vegetal cover (no vegetation, a single plant species or a diverse vegetal community) representing the carbon source and, to a lower extent by the soil characteristics. At T10, the communities seemed to have stabilized, displaying the intermediate “log-series” distribution, with a small number of dominant species and a relatively large number of rarer species (Zak, 1992). This kind of species distribution was previously observed in bacterial and fungal communities of polluted areas (Van Elsas et al., 2000; Andreoni et al., 2004; Vivas et al., 2008).

Conclusion

In conclusion, even in this highly contaminated environment, the vegetal cover seemed to be the main driver of fungal community structure. The positive effect of plants, especially in multi-species assemblage, on fungal abundance and diversity could represent a significant advantage in natural attenuation processes, which rely on microbial biomass and activities. The remediation treatment by thermal desorption did not prevent fungi to re-colonize the soil and could even favor the establishment of a more diverse community. Nevertheless, high levels of organic and metallic pollution allowed to only a small number of competitive species, mostly Ascomycetes, to be maintained on the long-term.

Supplemental data

Figure 26. Structure of the fungal community for the four treatments. Left: TTGE gels of 18S rRNA fragments of replicate plots for the four treatments at T0, T3, T7, T9 and T10. Dominant bands marked with filled circles were excised for sequencing (the numbers indicate the ribotype). Right: principal components analyses (PCA) of relative abundances of the ribotypes, based on Pearson correlation matrix. For several replicates, no exploitable TTGE profiles could be obtained because PCR products were too weak.



Chapitre III, 2ème partie :

Isolement de souches microbiennes à partir d'un sol multi-pollué (HAP et ETM) et test *in vitro* de leur potentiel de dissipation des HAP

Résumé

Dans la perspective d'étudier au laboratoire l'effet des interactions biologiques sur le devenir des HAP dans les sols, cette partie de la thèse visait à isoler des souches bactériennes et fongiques à partir du sol de friche industrielle multi-pollué étudié dans le Chapitre III-1. Des enrichissements ont été réalisés à partir de ce sol pollué, en milieu liquide minimum ou riche contenant 3 HAP de différents poids moléculaires (PHE, PYR et DBA, respectivement à 500, 500 et 50 mg.L⁻¹). Des étalements sur milieu gélosé ont abouti à l'isolement de 22 souches de champignons. Les critères moléculaires (séquence de l'ITS1) et morphologiques ont permis d'identifier 21 Deutéromycètes dont les formes parfaites sont des Ascomycètes, parmi lesquels vingt souches appartiennent au genre *Fusarium* (majoritairement aux espèces *F. oxysporum* et *F. solani*) et une souche à l'espèce *Cladosporium herbarum*, ainsi qu'une souche de levure Basidiomycète du genre *Cryptococcus*. Tous ces genres et espèces sont connus dans la littérature pour tolérer de fortes concentrations en HAP et ETM, voire même pour dissiper les HAP. Les potentiels de dissipation du PHE, du PYR et du DBA de quatre représentants parmi ces souches (*F. solani* MM1, *F. oxysporum* MM9, *Cladosporium herbarum* ME14 et *Cryptococcus* sp. ME4) ont ensuite été testés en cultures liquides, en présence ou non d'une source de carbone additionnelle (glucose). Les deux souches du genre *Fusarium* ont été les seules à dissiper significativement les HAP en 14 jours en présence de glucose, *F. solani* présentant les taux de dissipation les plus importants. Les mêmes tests ont été réalisés sur quatre souches de bactéries isolées précédemment au LIMOS à partir du même sol (*Arthrobacter oxydans* Pyr2MsHM11, *Microbacterium oxydans* Pyr2MsHM4, *Pseudomonas* sp. Flua2MsHM11 et *Sphingomonas* sp. Phe2MsHM10). Seule *A. oxydans* a montré un potentiel de dissipation des HAP, utilisant le PHE comme source de carbone en absence de glucose. Sur la base de ces résultats, le champignon *F. solani* MM1 et la bactérie *A. oxydans* Pyr2MsHM11 ont été sélectionnés pour des expériences ultérieures de dissipation des HAP en microcosmes.

Introduction

Les outils de biologie moléculaire ont permis d'étudier la diversité de la microflore bactérienne (Cébron et al., 2009) et fongique (Chapitre III-1) dans le sol de friche industrielle de Neuves-Maisons, multi-pollué aux HAP et ETM. De manière complémentaire, l'utilisation de souches modèles, isolées et cultivées au laboratoire paraît essentielle pour étudier les potentiels de biodégradation de microorganismes indigènes et les interactions écologiques entre les microorganismes, les HAP, le sol et les plantes ainsi que leur influence sur le devenir des HAP dans les sols. L'objectif de cette expérience était donc d'isoler des souches microbiennes à partir du sol de Neuves-Maisons et de tester leur potentiel de dissipation des HAP afin de désigner une souche fongique et une souche bactérienne comme modèles d'étude. Les matériels et méthodes cités dans les paragraphes suivants sont détaillés dans le Chapitre II de ce travail.

Matériels & Méthodes

1. Isolement des souches fongiques

La démarche d'isolement des souches fongiques est présentée dans la Figure 27. Trois prélèvements de sol rhizosphérique (A, B et C) éloignés d'environ 50 cm les uns des autres ont été effectués dans une parcelle de sol NM-MSm du dispositif expérimental du GISFI (voir Chapitre III-1) en Octobre 2008. Pour chaque prélèvement, 10 g de sol et 10 g de billes de verre stériles ont été placés dans 20 ml de NaCl 0,85%. Après 2 heures d'agitation (agitation rotative à 99 rpm), 5 ml de chaque suspension de sol ont été ajoutés à 45 ml de milieu minimum BSM (cultures nommées MM) ainsi qu'à 45 ml de milieu riche ME (cultures nommées ME), tous deux supplémentés en PHE, PYR et DBA comme décrit au Chapitre II § 1.2.2 (Fig. 27, T0).

Après 7 jours pour les cultures MM et 48 heures pour les cultures ME (Fig. 27, T1), 5 ml des cultures d'enrichissement ont été prélevés et placés dans 45 ml des mêmes milieux frais supplémentés en HAP (cultures nommées MM' et ME') et 100 µl des dilutions 10^{-5} , 10^{-4} et 10^{-3} ont été étalées sur boîtes de ME gélosé additionné de streptomycine (MEA). Après 7 jours pour les cultures MM' et 48 heures pour les cultures ME' (Fig. 27, T2), 100 µl des dilutions 10^{-5} , 10^{-4} et 10^{-3} ont été étalés comme décrit ci-dessus. Les colonies obtenues présentant des aspects morphologiques différents ont été striées sur de nouvelles boîtes de ME gélosé jusqu'à obtention de souches pures et identifiées sur critères morphologiques (observations macro- et microscopiques, Muséum National d'Histoire Naturelle) et moléculaires (amplification et séquençage de l'ITS) (Chapitre II § 2.1.2.4). Quatre des souches fongiques isolées ont été sélectionnées pour les tests de dissipation *in vitro* des HAP.

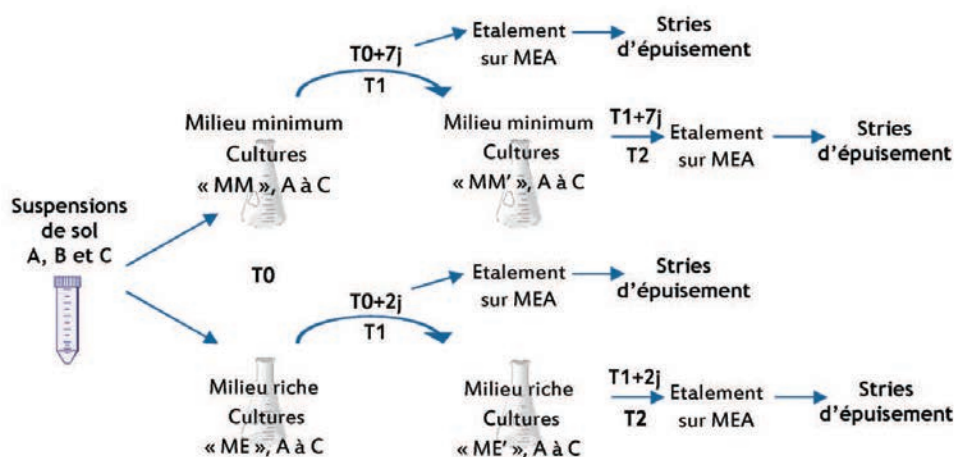


Figure 27. Démarche d'isolement des souches fongiques à partir du sol de Neuves-Maisons. MM et MM' : cultures en milieu minimum BSM ; ME et ME' : cultures en milieu riche ME.

2. Isolement des souches bactériennes

Les souches bactériennes ont été isolées et sélectionnées précédemment par A. Cébron au LIMOS. Brièvement, des suspensions de sol d'une parcelle lysimétrique NM-MSm ont été placées à agiter en présence de bille de verre et de NaCl à 0,85% (comme décrit ci-dessus). Des milieux minimum BH (Chapitre II § 1.2.2) supplémenté en PHE, en PYR ou en FLA et contenant des ETM (Cd, Pb, Zn) ont été inoculés avec la suspension de sol. Ces cultures d'enrichissement ont ensuite été diluées et étalées sur boîtes de milieu LB gélosé. Pour chaque HAP, une trentaine de colonies a été striée sur milieu LB gélosé (Chapitre II § 1.2.2) jusqu'à l'obtention de souches pures. Toutes ces souches ont ensuite été étalées sur boîtes de milieu minimum BH recouvertes d'une fine croûte de PHE, PYR ou FLA comme seule source de carbone. Les souches ayant formé des colonies et entourées d'un halo de dégradation (Fig. 29) sont considérées comme capables de croissance sur HAP comme seule source de carbone. De plus, la présence du gène codant pour la (PAH-RHD) α a été testée par PCR.

3. Dissipation des HAP par les souches isolées

Les tests de dissipation *in vitro* des HAP ont été réalisés en culture liquide pendant 14 jours, en milieu minimum BSM (20 ml) contenant du PHE, du PYR et du DBA à respectivement 500, 500 et 50 mg.l⁻¹. Ces trois HAP ont été choisis comme représentatifs des HAP à 3, 4 et 5 cycles aromatiques, respectivement. La même expérience a été réalisée avec et sans glucose comme source de carbone additionnelle (20 g.l⁻¹, voir Chapitre II § 1.2.2). Toutes les cultures, ainsi que les témoins abiotiques incubés dans les mêmes conditions, ont été réalisées en triplicats. Les inocula ont été préparés pour obtenir des DO_{600nm} de 0,02 dans les cultures bactériennes et des concentrations de 10⁴ propagules par ml de culture fongiques (Chapitre II § 1.2.3). La croissance des microorganismes après 14 jours a été exprimée en biomasse sèche pour les champignons et en nombre de cellules, comptées à la cellule de Thoma, pour les bactéries. Afin de considérer la part de dégradation abiotique, les pourcentages de dissipation des

HAP ont été calculés en prenant comme valeurs de référence celles des témoins abiotiques correspondants après 14 jours. Des tests *t* de Student pour deux échantillons ont été appliqués pour comparer les croissances microbiennes avec et sans glucose ainsi que les concentrations en PHE, PYR et DBA entre les cultures et les témoins abiotiques correspondants.

Résultats

1. Isolement de souches fongiques

Vingt-deux souches de champignons listées dans le Tableau 14, dont 21 Deutéromycètes et un Basidiomycète, ont pu être isolées à partir des suspensions de sol. Les noms des souches font référence aux cultures d'enrichissement dont elles proviennent. Il a été possible de répartir les isolats en cinq groupes selon les résultats de l'identification basée sur des critères moléculaires, au sein desquels l'identité des séquences des ITS1 était supérieure à 99%. Certains isolats présentant des séquences d'ITS1 à 100% identiques formaient des colonies de couleurs et de morphologie différentes malgré les conditions de cultures strictement identiques (Fig. 28) et ont donc été considérés comme des souches différentes.

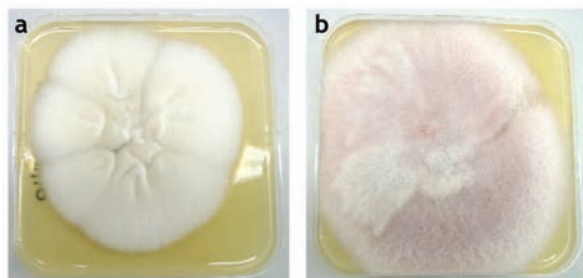


Figure 28. Photographies de colonies sur boîtes de milieu ME gélosé des souches ME2 (a) et MM7 (b), appartenant au groupe 2 (*F. oxysporum*) et présentant 100% d'homologie de séquence des ITS1.

Le séquençage de la région hypervariable ITS1 n'a pas toujours permis de discriminer les espèces : il n'a en effet pas été possible de déterminer par ce moyen les espèces des groupes 1, 4 et 5. L'identification sur critères morphologiques, micro- et macroscopiques (Chapitre II, § 2.1.2.4), a confirmé l'appartenance des souches MM'9 et ME9 aux espèces *Fusarium oxysporum* et *Fusarium solani* respectivement. De plus, MM1 a été identifié sur ces critères comme appartenant à l'espèce *F. solani* et ME'14 comme appartenant à l'espèce *Cladosporium herbarum*.

La grande majorité (90%) des isolats obtenus appartenaient au genre *Fusarium*. Cette dominance était d'autant plus marquée qu'elle semble indépendante du prélèvement et de la culture d'origine. Ainsi,

des isolats de *F. solani* ont été isolés à partir de cultures en milieu minimum inoculé avec le prélèvement A (MM1 par exemple) comme dans des cultures en milieu riche inoculé avec le prélèvement C (ME5 par exemple).

Groupe	Souche(s)	Genre et espèce de référence (N° d'accession)	% d'identité	Identification sur critères morphologiques
1	MM1, MM2, MM3, ME5	<i>Fusarium</i> sp. (FJ487925.1)	98	MM1: <i>Fusarium solani</i>
2	MM4, MM5, MM6, MM7, MM8, MM'9, ME2, ME6, ME7, ME8, ME10, ME11, ME12, ME13	<i>Fusarium oxysporum</i> (EU839402.1)	99	MM'9: <i>Fusarium oxysporum</i>
3	ME3, ME9	<i>Fusarium solani</i> (AM412635.1)	99,5	ME9: <i>Fusarium solani</i>
4	ME4	<i>Cryptococcus</i> sp. (AY749434.1)	96	–
5	ME'14	<i>Cladosporium</i> sp. (FJ176478.1)	99,5	<i>Cladosporium herbarum</i>

Tableau 14. Identification des 22 souches fongiques isolées à partir du sol de Neuves-Maisons.

2. Isolement de souches bactériennes

Quatre des souches bactériennes formant des halos de dégradation du PHE et possédant un gène codant pour une (PAH-RHD) α , les Actinobactéries *Arthrobacter oxydans* Pyr2MsHM11 et *Microbacterium oxydans* Pyr2MsHM4 et les Protéobactéries *Pseudomonas* sp. Flua2MsHM11 et *Sphingomonas* sp. Phe2MsHM10, ont été identifiées et sélectionnées pour les tests de dissipation *in vitro* des HAP. Les noms de ces souches sont fonction du HAP qui était présent dans les cultures d'enrichissement lors de leur isolement.

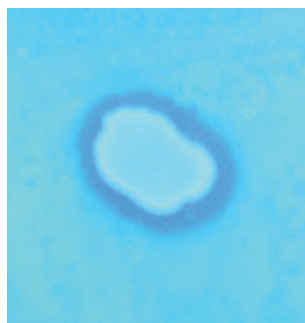


Figure 29. Halo de dégradation des HAP autour d'une colonie bactérienne sur milieu gélosé. La photographie a été prise sous rayonnement UV. Photographie mise à disposition par A. Cébron.

3. Dissipation du PHE, du PYR et du DBA par les souches isolées

Une souche fongique a été choisie au hasard pour chaque espèce identifiée, soit *F. solani* MM1, *F. oxysporum* ME9, *Cladosporium herbarum* ME14 et *Cryptococcus* sp. ME4, pour les tests de dissipation des HAP. Alors que toutes les souches testées présentaient une bonne croissance en présence de glucose, leurs biomasses sèches étaient quasiment nulles après 14 jours de culture en absence de glucose (Fig. 30.A).

La variabilité des concentrations finales en HAP dans les témoins abiotiques, de l'ordre de 10 à 20% des valeurs absolues, explique que les pourcentages de HAP extraits des cultures soient parfois supérieurs à 100 dans les cultures (Fig. 31). Néanmoins, les concentrations extraites des cultures n'étaient jamais significativement supérieures à celle des témoins abiotiques avec $\alpha < 0,05$.

Les deux souches appartenant au genre *Fusarium* ont significativement dissipé les HAP en présence de glucose (Fig. 31.A). *F. oxysporum* ME9 a dissipé respectivement 10 et 18% du PHE et du DBA, soit 0,69 et 0,24 mg en 14 jours par culture ou 5,8 et 2,0 μg de PHE et DBA par mg de biomasse sèche. *F. solani* MM1 a dissipé 21% du PHE et du PYR, soit 1,03 et 0,34 mg en 14 jours par culture ou 12,0 et 12,3 μg de PHE et de PYR par mg de biomasse sèche. Par ailleurs, la concentration en DBA dans les cultures de *F. solani* MM1 avait tendance à être plus faible de 17% par rapport aux témoins abiotiques correspondants ($p = 0.108$). Aucune dissipation significative de HAP n'a pu être observée dans les cultures de *C. herbarum* ME14 et *Cryptococcus* sp. ME4.

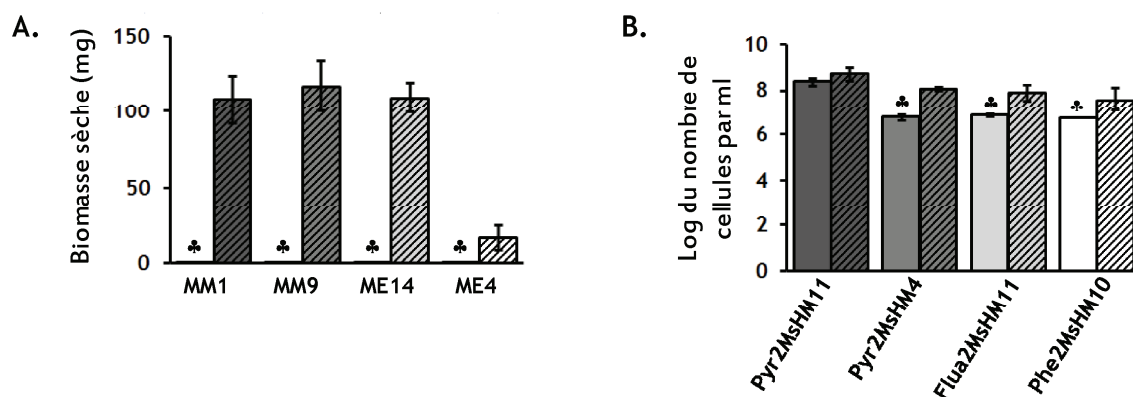


Figure 30. Croissance des souches microbiennes après 14 jours de culture en présence de HAP, sans (barres pleines) et avec (barres hachurées) glucose. A : Biomasse sèche totale par culture de 20 ml pour *F. solani* MM1, *F. oxysporum* MM9, *C. herbarum* ME14 et *Cryptococcus* sp. ME4. B : Nombre de cellules bactériennes par ml de *A. oxydans* Pyr2MsHM11, *M. oxydans* Pyr2MsHM4, *Pseudomonas* sp. Flua2MsHM11 et *Sphingomonas* sp. Phe2MsHM10. ♣ : indique une croissance significativement différente en absence et en présence de glucose (Tests t de Student, $\alpha < 0,05$).

Après 14 jours, les concentrations cellulaires dans les cultures bactériennes de *M. oxydans* Pyr2MsHM4, *Pseudomonas* sp. Flua2MsHM11 et *Sphingomonas* sp. Phe2MsHM10 étaient significativement inférieures en absence de glucose (Fig 30.B). En revanche, la croissance de *A. oxydans* Pyr2MsHM11 était identique avec et sans glucose. De fait, seule *A. oxydans* Pyr2MsHM11 a été capable de dissiper significativement le PHE, réduisant sa concentration extractible de 66% soit 5,12 mg de PHE par culture (Fig. 31.B). Cependant aucune dissipation significative du PYR ou du DBA n'a été observée, pour aucune des quatre souches bactériennes, avec et sans glucose ajouté.

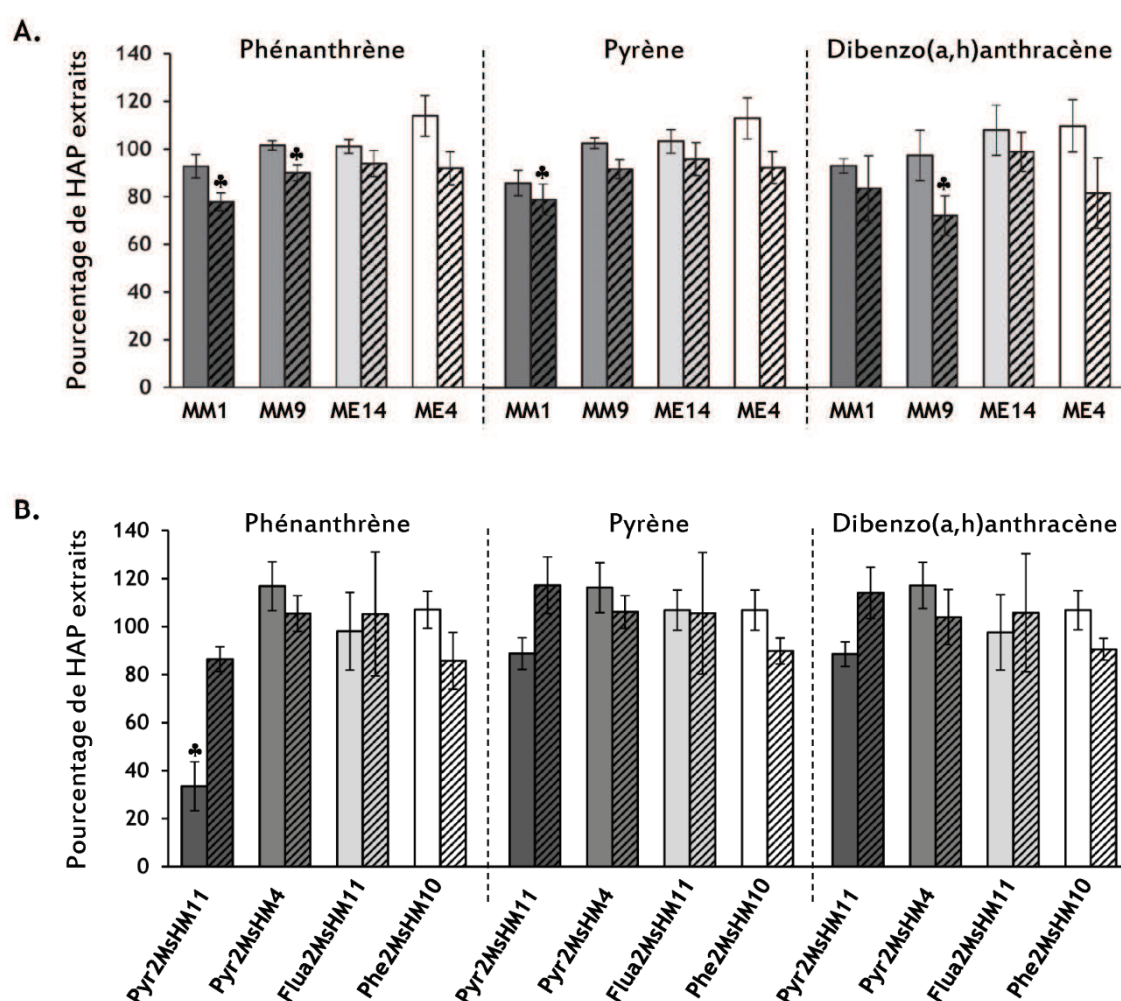


Figure 31. Pourcentage de PHE, PYR et DBA extraits des cultures microbiennes après 14 jours sans (barres pleines) et avec (barres hachurées) glucose. A : Cultures de *F. solani* MM1, *F. oxysporum* MM9, *C. herbarum* ME14 et *Cryptococcus* sp. ME4. B : Cultures de *A. oxydans* Pyr2MsHM11, *M. oxydans* Pyr2MsHM4, *Pseudomonas* sp. Flua2MsHM11 et *Sphingomonas* sp. Phe2MsHM10. Les valeurs de référence (100%) sont celles des témoins abiotiques correspondants. * : indique une différences significative avec les témoins abiotiques correspondants (Tests t de Student, $\alpha < 0,05$).

Discussion

Diversité des champignons cultivables dans le sol de Neuves-Maisons

La quasi-totalité des souches de champignons isolées au cours de ce travail à partir du sol de Neuves-Maisons sont des Deutéromycètes dont les formes parfaites appartiennent à la classe des Ascomycètes, à l'exception d'une levure appartenant à la classe des Basidiomycètes. Bien qu'ils soient ubiquistes, très communs dans les sols et souvent cultivables (Richardson, 2009), aucun champignon appartenant à la classe des Zygomycètes n'a pu être isolé à partir du sol de Neuves-Maisons dans les présentes conditions expérimentales. Ces résultats sont en concordance avec les données de diversité fongique obtenues par TTGE et confirment l'hypothèse selon laquelle les Ascomycètes, en particulier les Pezizomycètes, seraient favorisés dans ce sol multicontaminé (voir Chapitre III-1).

Le genre majoritaire *Fusarium*, dont les formes parfaites appartiennent aux genres Ascomycètes *Nectria* et *Gibberella*, est un champignon ubiquiste des environnements telluriques, en particulier rhizosphériques, pouvant présenter un mode de vie saprophyte ou phytopathogène (Errakhi et al., 2009; Kaur et al., 2010). La présence des espèces *F. solani* et *F. oxysporum* parmi les taxons majoritaires dans le sol de Neuves-Maisons a déjà été révélée par TTGE (voir Chapitre III-1). Le sol d'origine des souches est planté avec de la luzerne (*M. sativa*), un des hôtes naturels des *Fusarium* et aucune rotation de culture n'a été effectuée durant les 3 années ayant précédé les prélèvements, ce qui a probablement favorisé la dominance par *F. oxysporum* et *F. solani* (Raynal, 1989). De plus, de nombreux travaux ont antérieurement montré une abondance relative élevée des espèces appartenant au genre *Fusarium* dans divers sols et sédiments pollués aux HAP (Potin et al., 2004a; Jacques et al., 2008; Mohsenzadeh et al., 2010) et/ou aux ETM (Massaccesi et al., 2002; Zafar et al., 2007). Ces résultats suggèrent une bonne tolérance du genre *Fusarium* aux polluants organiques et métalliques. Les Deutéromycètes du genre *Cladosporium* sont des moisissures ubiquistes, saprophytes et oligotrophes, très fréquemment retrouvées dans les sols, y compris ceux présentant de fortes concentrations en polluants organiques et métalliques (Massaccesi et al., 2002; Potin et al., 2004b; Salvo et al., 2005; Naranjo Briceño et al., 2007). De même, la levure Basidiomycète *Cryptococcus* a déjà été rencontrée dans les environnements telluriques, comme dans les eaux et sédiments, y compris pollués aux HAP (MacGillivray & Shiaris, 1993; Crestani et al., 2009).

Potentiel de dissipation des HAP des souches isolées

L'introduction dans un environnement d'un polluant organique est toujours suivie à relativement court terme de l'émergence de populations microbiennes capables de métaboliser – parfois fortuitement – ce composé (Ojo, 2007). La bioaugmentation de sols pollués aux HAP par des souches fongiques s'est souvent avérée peu efficace jusqu'à aujourd'hui, malgré des résultats antérieurs de biodégradation *in vitro* encourageants (Tucker et al., 1995; Andersson et al., 2000). En effet, lors de l'introduction d'une

souche microbienne dans un sol, les conditions physico-chimiques (notamment les concentrations en nutriments, le pH ou la disponibilité en eau) ainsi que la présence de la microflore autochtone, adaptée donc plus compétitive, rendent difficile la croissance, voire la survie des inocula (Vogel, 1996; van Veen et al., 1997; Baldrian, 2008). A l'opposé, la ré-introduction d'inocula microbiens isolés depuis un sol pollué dans leur biotope d'origine, auquel ils sont adaptés, s'avère beaucoup plus efficace en terme de dissipation des HAP (Potin et al., 2004a; Johnsen & Karlson, 2005; Rafin et al., 2009). Pour répondre aux objectifs de la thèse, il était donc essentiel d'isoler des souches microbiennes adaptées d'une part au milieu tellurique et d'autre part à la pollution aux HAP.

De nombreuses souches de bactéries de taxonomies très diverses, sont connues pour leur capacité à dissiper les HAP, la plupart du temps de poids moléculaires peu élevés tels que le NAP ou le PHE (Seo et al., 2006; Kallimanis et al., 2007; Kim et al., 2008). En parallèle, de nombreuses souches de champignons dissipant les HAP, y compris de poids moléculaires élevés comme le DBA ou le BAP ont été isolées (Bogan et al., 1996; Salicis et al., 1999; Da Silva et al., 2004; Potin et al., 2004b). Très souvent, les bactéries dégradantes sont capables de pousser sur un ou des HAP comme seule source de carbone alors qu'il est généralement admis que les champignons dissipent les HAP par cométabolisme, le HAP ne servant pas directement de substrat de croissance (Peng et al., 2008). Il a donc été choisi de tester la dissipation d'un mélange de trois HAP de poids moléculaires différents (de 3 à 5 cycles aromatiques), avec ou sans source de carbone additionnelle, afin de permettre l'expression des différents potentiels métaboliques. Par ailleurs, les concentrations en HAP utilisées dans cette étude (1050 mg.l^{-1} au total) étaient relativement élevées au regard des divers travaux de la littérature dans lesquels les teneurs en HAP en cultures liquides sont très variables, de 10 à 500 mg.l^{-1} (Verdin et al., 2004; Silva et al., 2009a; Wu et al., 2009). Ce choix était délibéré, considérant que le sol d'origine des souches isolées présente une teneur très importante en HAP de poids moléculaires variés (environ 1900 mg.kg^{-1} , voir Chapitre II § 1.1.1.1). Par ailleurs, l'exposition effective aux HAP était limitée dans les cultures par la très faible solubilité du PHE, du PYR et du DBA en milieu aqueux (respectivement 1,1, 0,13 et $0,0006 \text{ mg.l}^{-1}$) et donc bien inférieure aux concentrations théoriques.

Il a été possible d'isoler des souches fongiques depuis les cultures d'enrichissement en milieu minimum ne contenant théoriquement pas d'autres sources de carbone que les HAP (souches MM et MM'). Différentes hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Tout d'abord, ces souches auraient utilisé les HAP comme substrat de croissance. Par ailleurs, ces champignons auraient pu utiliser comme source de carbone les métabolites produits lors de la dégradation des HAP par d'autres microorganismes de la culture, fongiques ou bactériens. Enfin, les champignons, appartenant tous à des genres et espèces saprophytes, se seraient développés en dégradant la biomasse des microorganismes moins compétitifs. Les résultats de tests de dissipation réalisés ici ont permis d'exclure la première hypothèse, au moins pour les 4 souches testées qui ont toutes été incapables de croissance sur HAP comme seule source de carbone.

Espèce	Nom / Origine de la souche	Dissipation des HAP	Références
<i>Fusarium</i> sp.	F5 / Friche industrielle	30% des HAP de 5 et 6 cycles ($Ci=438 \text{ mg.kg}^{-1}$), en bioaugmentation dans le sol d'origine, en 30 jours	Potin et al. (2004)
<i>F. oxysporum</i>	n.c.	23% du pyrène ($Ci=500 \text{ mg.L}^{-1}$) en milieu liquide en conditions microaérobies, en 30 jours	Silva et al. (2009)
<i>F. solani</i>	F33 / Compost artificiellement pollué au fuel	55% du benzo(a)pyrène ($Ci=100 \text{ mg.L}^{-1}$) en milieu liquide, en 30 jours	Verdin et al. (2004)
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	Cla / Friche industrielle	28% des HAP de 5 et 6 cycles ($Ci=369 \text{ mg.kg}^{-1}$), en bioaugmentation dans le sol d'origine, en 30 jours	Potin et al. (2004)
<i>Cryptococcus albidus</i>	n.c. / Sol	93% du fluoranthène ($Ci=10 \text{ mg.kg}^{-1}$) en milieu liquide en 2 jours	Salicis et al. (1999)

Tableau 15. Exemples de résultats de la littérature montrant un potentiel de dissipation des HAP par des souches fongiques taxonomiquement proches des souches isolées dans ce travail. n.c.: non connu, Ci: concentration initiale.

De nombreux travaux font état de dissipation des hydrocarbures par des souches du genre *Cladosporium* (Tableau xx) (Chaîneau et al., 1999; Salvo et al., 2005; Naranjo Briceño et al., 2007). En revanche, seuls quelques études mentionnent la dissipation des HAP par *Cryptococcus*, mais de manière générale la bioremédiation des HAP par les levures est très peu étudiée (Tableau xx) (MacGillivray & Shiaris, 1993; Salicis et al., 1999). En concordance avec nos résultats, plusieurs souches de *Fusarium* ont déjà été étudiées pour leur potentiel de dissipation des HAP *in vitro* et dans les sols (Tableau xx) (Chaîneau et al., 1999; Potin et al., 2004a; Verdin et al., 2005; Chulalaksananukul et al., 2006; Jacques et al., 2008; Silva et al., 2009a). Les champignons de ce genre n'étant pas connus pour sécréter des LME, les voies métaboliques impliquées dans la dégradation seraient plutôt la détoxification par le cytochrome P450 et/ou la production de ROS (Veignie et al., 2004; Chulalaksananukul et al., 2006). Par ailleurs, il a été montré que *F. solani* pouvait accumuler les HAP dans des vésicules intracellulaires de nature lipidique (Verdin et al., 2005). Les méthodes utilisées dans cette expérience ne permettent pas de déterminer les voies métaboliques impliquées dans la dissipation observée, ni de déterminer si les HAP ont été effectivement dégradés, c'est-à-dire minéralisés, biotransformés en métabolites intermédiaires ou accumulés dans les cellules fongiques.

Afin de comparer les présents résultats avec des données de la littérature, la dissipation des HAP en quantité absolue (masse) a été rapportée à la quantité de biomasse, lorsque les données nécessaires au calcul étaient fournies par les auteurs. Saraswathy & Hallberg (2005) par exemple, ont mesuré une dissipation d'environ 3 µg de pyrène par mg de biomasse de *Penicillium ochrochloron* en 28 jours. Une souche de *F. solani* a été capable de dissiper environ 20 µg d'ANT et de BAP (séparément) par mg de

biomasse en 30 jours (Verdin, 2005). Les mêmes auteurs ont observé la dissipation de 42 µg de BAP par mg de biomasse de *Trichoderma viride* en 30 jours. La dissipation mesurée pour *F. solani* MM1, soit 12,4 µg de PHE et 12 µg de PYR par mg de biomasse en 14 jours, apparaît donc relativement importante par rapport à *F. oxysporum* MM9 (5,8 et 2,0 µg de PHE et PYR respectivement par mg de biomasse) et dans les mêmes ordres de grandeur que les travaux cités ci-dessus. Néanmoins, Chulalaksanakul et al. (2006) rapportent le résultat exceptionnel de 400 µg de BAP dissipés par mg de biomasse de *Fusarium* sp.

Parmi les souches bactériennes, seule *A. oxydans* Pyr2MsHM11 a été capable de dissipation significative et uniquement du PHE. Pourtant, toutes les souches bactériennes ont été capables de croissance sur HAP comme seule source de carbone, bien que significativement moins importante d'environ un ordre de grandeur pour les souches non dégradantes. Ces résultats sont surprenants considérant les données de la littérature. De nombreuses souches du genre *Pseudomonas*, appartenant aux espèces *P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. saccharophila* ou encore *P. fluorescens*, le plus souvent isolées à partir de sols pollués aux HAP, ont été capables de dégrader *in vitro* différents HAP, y compris de poids moléculaires élevés comme le BaP (Aitken et al., 1998; Romero et al., 1998; Demir et al., 2000; Haritash & Kaushik, 2009). De même, les bactéries du genre *Sphingomonas* sont connues pour leurs capacités à dégrader une large gamme de polluants organiques, dont les HAP (Ye et al., 1996; Habe & Otori, 2003; Begonja Kolar et al., 2007; Vandermeer & Daugulis, 2007). Néanmoins, bien que les Actinobactéries soient souvent retrouvées parmi les espèces efficaces en terme de dégradation des polluants organiques récalcitrants (Krivobok et al., 2003; Ros et al., 2010; Kallimanis et al., 2011), aucune étude à notre connaissance ne fait mention de la dégradation des HAP par une souche de *A. oxydans*. Cette espèce bactérienne a en revanche été retrouvée dans divers environnements pollués à l'uranium ou aux ETM (Merroun et al., 2006; Aksornchu et al., 2008).

Toutes les souches bactériennes utilisées dans ce travail ont été isolées à partir de cultures d'enrichissement où les HAP constituaient la seule source de carbone. De plus, des halos de dégradation du PHE sur milieu gélosé ont été observés pour ces quatre souches lors des tests préliminaires (Fig. 29). Enfin, des expériences de PCR avaient indiqué la présence de gènes codants les (PAH-RHD) α chez chacune des souches (données non présentées). La masse moyenne d'une cellule bactérienne est de $7 \cdot 10^{-10}$ mg (Zourob et al., 2008), est constituée à 80% d'eau et 50% de la masse sèche est constituée de carbone (Gerardi, 2006). On peut donc calculer que la masse de carbone cellulaire appartenant aux bactéries dans une culture de la présente expérience est de l'ordre de 14 à 140 µg pour une densité cellulaire de l'ordre de 10^7 à 10^8 cellules.ml⁻¹. Or les quantités initiales théoriques de PHE, PYR et DBA dans les cultures sont respectivement de 10, 10 et 1 mg, soit environ 9,5, 9,5 et 0,95 mg de carbone. La grande variabilité des quantités de HAP extraites entre les différents triplicatas du même traitement, y compris abiotique, pourrait donc avoir masqué une éventuelle dégradation, même si celle-ci était suffisante pour supporter la croissance bactérienne. Par ailleurs, il est possible que ces souches soient capables de croissance sur agar, de croissance autotrophe, utilisant

le CO₂ atmosphérique, ou encore oligotrophe, en utilisant les traces de carbone organique présentes dans le milieu gélosé.

La souche *A. oxydans* Pyr2MsHM11 a dissipé de manière très significative une quantité importante de PHE (5,1 mg en 14 jours environ) en absence de glucose. Le genre *Arthrobacter* est très souvent retrouvé parmi les dominants dans les sols pollués aux hydrocarbures (Chaîneau et al., 1999; Johnsen et al., 2007; Ros et al., 2010), notamment dans le sol de Neuves-Maisons, comme l'a montré l'étude de la diversité des bactéries totales par TTGE (Cébron et al., 2009) et cultivables (P. Bauda et P. Poupin, résultats non publiés). De nombreux travaux de la littérature ont fait état de la dégradation de HAP ou d'autres polluants organiques récalcitrants par des souches d'*Arthrobacter* (Chaîneau et al., 1999; Seo et al., 2006; Kallimanis et al., 2007; Zhang et al., 2011). *Arthrobacter* sp. FB24, isolée à partir d'un sol multipollué aux ETM et hydrocarbures aromatiques et principalement étudiée pour sa résistance à de très fortes concentrations en Cr, est capable de dégrader le benzène, le toluène et le xylène (Nakatsu et al., 2005; Jerke et al., 2008). La souche *A. phenanthrenivorans* Sphe3, dont le génome vient très récemment d'être entièrement séquencé (Kallimanis et al., 2011), a été isolée à partir d'un sol pollué à la créosote et s'est avérée capable de dégrader 3,5 mg de PHE en 4 jours en milieu liquide (Kallimanis et al., 2007). De manière très intéressante, l'internalisation du PHE par Sphe3 impliquait à la fois une altération de la fluidité membranaire due à une modification de la composition lipidique membranaire et un système de transport actif, inductible par le PHE et inhibé en présence de glucose (Kallimanis et al., 2007). Un mécanisme similaire de répression catabolique pourrait expliquer que les HAP n'aient pas été dégradés dans les cultures d'*A. oxydans* Pyr2MsHM11 en présence de glucose, la bactérie utilisant alors préférentiellement celui-ci, plus facilement dégradable. Néanmoins, il a été montré grâce à l'utilisation de PHE marqué au ¹³C (SIP) que la croissance de bactéries du genre *Arthrobacter* pouvait être favorisée en présence d'exsudats racinaires facilement dégradables sans pour autant empêcher leur activité de dégradation du PHE (Cébron et al., 2011b). De plus, cette souche ayant été isolée à partir d'une culture d'enrichissement avec PYR comme seule source de carbone, une dégradation significative du PYR était attendue dans la présente expérience. Ici encore, une compétition entre substrats a pu avoir lieu, la bactérie dégradant préférentiellement le HAP le plus léger.

Conclusion

Il a été possible d'isoler 22 souches de champignons à partir du sol de Neuves-Maisons, d'une diversité taxonomique peu importante mais concordant avec les résultats obtenus en biologie moléculaire (Chapitre III-1), confirmant une forte dominance des Ascomycètes dans ce sol pollué. Par ailleurs, les travaux préalablement réalisés au laboratoire ont permis d'isoler à partir du même sol une centaine de souches bactériennes capables de pousser sur milieu gélosé avec des HAP comme seule source de carbone. Les tests de dissipation du mélange de PHE, PYR et DBA en cultures liquides ont montré que le

champignon *Fusarium solani* MM1 et la bactérie *Arthrobacter oxydans* Pyr2MsHM11 présentaient les meilleurs potentiels parmi les souches isolées. De manière contrastée, le champignon a dissipé les trois HAP lorsque du glucose était ajouté pour supporter sa croissance alors que la bactérie a utilisé le PHE comme source de carbone uniquement en absence de glucose. Ces deux souches ont été choisies comme modèles d'étude pour la suite du présent travail (Chapitres III-3 à III-5).

Chapitre III-3 :

Biotransformation et sorption des
HAP par *Fusarium solani* et
Arthrobacter oxydans en culture
axénique et en coculture mixte

Résumé

Le champignon *Fusarium solani* MM1 et la bactérie *Arthrobacter oxydans* Pyr2MsHM11, isolés à partir du sol de Neuves-Maisons étudié dans le Chapitre III-1, ont été sélectionnés parmi différentes souches pour leur potentiel de dissipation des HAP *in vitro* (Chapitre III-2). L'objectif de ce chapitre était d'évaluer l'effet des interactions entre ces deux souches modèles sur leurs potentiels de dissipation des HAP en culture liquide. Pour ceci, les souches ont été inoculées conjointement ou séparément dans du milieu minimum liquide contenant du glucose et respectivement 500, 500 et 50 mg.L⁻¹ de PHE, PYR et DBA. Par ailleurs, les parts de l'adsorption, de l'absorption et de la biotransformation dans la dissipation observée ont été évaluées en réalisant séparément des extractions et dosages des HAP dans la biomasse microbienne et dans le milieu de culture. En culture pure, *F. solani* a dissipé en 28 jours environ 30% de chacun des 3 HAP lorsque du glucose était ajouté comme source de carbone. Alors que l'adsorption sur la biomasse du champignon était négligeable, l'absorption à l'intérieur de cette biomasse représentait un tiers de la dissipation observée. Les HAP absorbés par le champignon représentaient jusqu'à 3% de la biomasse fongique et ont pu être observés au microscope sous la forme de vésicules intracellulaires autofluorescentes aux UV. A l'opposé, *A. oxydans*, capable de croissance sur HAP comme seule source de carbone, a biotransformé 55% du PHE en 28 jours sans affecter les concentrations en PYR et DBA, mais ce potentiel était inhibé par la présence de glucose comme source de carbone additionnelle. Placés en coculture, des interactions antagonistes entre les deux souches ont systématiquement inhibé la croissance (évaluée par PCR en temps réel) et/ou la viabilité (estimée par observation microscopique après coloration Live/Dead) de l'une et/ou de l'autre. Ces interactions négatives, plus probablement de type indirect comme la compétition pour les sources de carbone et la modification du pH, ont fortement affecté la dissipation des HAP dans ces cocultures. Ces résultats soulignent l'importance de l'impact des interactions microbiennes sur les processus de bioremédiation, étudiées dans les chapitres suivants dans des conditions moins artificielles, impliquant à la fois (i) des milieux solides, où les HAP sont moins accessibles et les contacts entre microorganismes moins directs, (ii) des sources de carbone plus diversifiées comme les exsudats racinaires et (iii) un réseau d'interactions microbiennes plus complexes avec une microflore indigène.

PAH biotransformation and sorption by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed cocultures

International Biodeterioration and Biodegradation

2012, 68(1): 28-35

Abstract

The polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation potential of *Fusarium solani* MM1 and *Arthrobacter oxydans* MsHM11, isolated from a PAH-polluted soil, was investigated in liquid cultures containing 500, 500, and 50 mg l⁻¹ of phenanthrene (PHE), pyrene (PYR), and dibenz(a,h)anthracene (DBA), respectively. The contributions of adsorption, absorption and biotransformation were evaluated separately by extracting and analysing PAHs from the biomass and from the culture medium. In the pure culture, *F. solani* dissipated approximately 30% of each tested PAH in 28 days when glucose was supplied as the carbon source. PAH adsorption on *F. solani* hyphae was negligible, whereas absorption was found to account for one-third of the dissipation. Absorbed PAHs, reaching 3% of the fungal dry biomass, could be visualised in autofluorescent intracellular vesicles. In contrast, *A. oxydans* grew on PAHs as sole carbon source and led to 55% dissipation of PHE in 28 days without any significant absorption. This dissipation potential was inhibited by the presence of glucose, and the PYR and DBA contents were never dissipated in the bacterial pure culture. In the mixed co-culture, the PAH dissipation rates were lower, showing that antagonistic interactions, such as pH changes or competition for carbon source, indirectly inhibited both microbial potentials.

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are recalcitrant organic pollutants resulting from the incomplete combustion of organic carbon-based material associated with a wide range of human activities. Their persistence in environments and their toxicity increase with their hydrophobicity and molecular weight (MW) (Cerniglia, 1992). Among the different techniques of PAH remediation in soils, bioremediation (i.e., biodegradation by microorganisms) is of great interest because of its lower environmental and economic cost (Vogel, 1996; Mohan et al., 2006).

A wide range of bacteria is known to grow on PAHs as the sole carbon source, and their molecular degradation mechanisms are increasingly better understood (Kim et al., 2007; Peng et al., 2008). However, bacterial degradation mostly affects low-molecular weight (MW) PAHs, i.e., those up to four rings (e.g., Kang et al., 2003; Kallimanis et al., 2007; Kim et al., 2007). Fungi, however, have been shown to remove higher MW PAHs, i.e., up to 7 rings (e.g., Gramss et al., 1999; Juhasz and Naidu, 2000; Silva et al., 2009a) via co-metabolism pathways. To date, there is no absolute evidence of the existence of fungi able to use PAHs as a growth substrate (Cerniglia, 1997; Peng et al., 2008). It has also been shown that some fungi take up and store PAHs in lipid vesicles, although the extent of absorption and the mechanisms by which PAHs cross the cell wall are still unknown (Verdin et al., 2005; Wu et al., 2009).

During recent decades, great attention has been paid to ligninolytic fungi as potential PAH degraders through the secretion of non-specific lignin-modifying enzymes that can oxidise a wide variety of aromatic pollutants (Rabinovich et al., 2004). Still, these wood-inhabiting fungi are, by definition, not properly adapted to soil habitats. Ecological constraints, such as microbial competition, physical and chemical properties, and nutritional stress, strongly alter their survival and growth in soils (Baldrian, 2008). Therefore, an increasing number of studies has focussed on the bioremediation potential of pre-adapted fungi isolated from polluted soil (Verdin et al., 2004; Saraswathy and Hallberg, 2005; Atagana et al., 2006). Indeed, it has been shown that pollutant exposition tends to select resistant, if not degrading, microorganisms. All types of ecological interactions, from symbiosis to predation, can occur between bacteria and fungi (De Boer et al., 2005; Tarkka et al., 2009), and their effects on survival, growth, and metabolic activities, such as PAH dissipation, are quite variable. It has been suggested that fungi and bacteria could be metabolically complementary in regard to PAH degradation: fungi could transform PAHs into less insoluble intermediates, which could be further mineralised by bacteria (Brodkorb and Legge, 1992; Kotterman et al., 1998). Boonchan et al. (2000) showed a noteworthy synergistic effect on high-MW PAH degradation when the fungus *Penicillium janthinellum* and the bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* were grown together, both in liquid media and in PAH-polluted soil. However, *Pleurotus ostreatus* has been shown to inhibit 14C-pyrene mineralisation by indigenous microflora when inoculated in non-sterile soil, probably due to antagonistic interactions (In Der Wiesche et al., 2003).

The purpose of this work was to investigate the potential of two microbial strains isolated from an aged PAH-polluted soil – the fungus *Fusarium solani* MM1 and the actinobacterium *Arthrobacter oxydans* MsHM11 – to remove three PAHs with different MWs: phenanthrene (PHE; 3 rings), pyrene (PYR; 4 rings) and dibenz(a,h)anthracene (DBA; 5 rings) in axenic cultures or mixed co-cultures. Furthermore, we aimed to quantify the respective parts of sorption and biotransformation in the observed PAH dissipation.

Materials & Methods

1. Isolation, conservation and inoculation of microbial strains

Both microbial strains were isolated from a previously described aged PAH-contaminated soil from a former coking site (Biache et al., 2008; Cébron et al., 2009). The soil was sampled in October 2008, and the total concentration of the 16 priority PAHs from the Environmental Protection Agency was approximately 1,800 mg kg⁻¹ soil dw. Briefly, soil was sampled from planted plots (*Medicago sativa* var. Europe) and suspended in NaCl 8.5%. The suspension aliquots were incubated in the liquid basal salt medium (BSM) described below supplemented with PAHs without any additional carbon source. The cultures were spread and subcultured on agar plates (15 g l⁻¹ agar) with the same nutrient medium as above until pure strains were obtained. The strains were identified by partial sequencing followed by comparison with GenBank Database (Blastn) of ITS and 16S rRNA gene for fungi and bacteria, respectively. MM1, which ITS showed 97% sequence identity among 224 pb with a strain of *F. solani*, accession number AM412623, was chosen among 24 isolated fungal strains, of which the *Fusarium* genus was strongly dominant. MsHM11, which 16S rRNA gene showed 100% identity among 1028 pb with a strain of *A. oxydans*, accession number AY785732, was chosen among more than a hundred isolated bacterial strains because of its ability to grow on PAHs as sole carbon source and because of the presence of a PAH-ring hydroxylating dioxygenase gene (Cébron et al., 2008). Both sequences were deposited in the GenBank database under the accession numbers JF345080 and JF345081 for *F. solani* MM1 ITS1 and the *A. oxydans* MsHM11 16S rRNA gene. After two weeks of growth at 24°C, *F. solani* MM1 was conserved on malt extract agar (MEA) plates (malt extract 20 g l⁻¹, glucose 20 g l⁻¹, peptone 1 g l⁻¹, agar 15 g l⁻¹) at 4°C and subcultured on fresh PAH-free plates every two months. *F. solani* MM1 was reactivated for inoculation on fresh MEA plates at 24°C for 7 to 10 days, and spores were collected from the plates with 15 ml sterile distilled water. The spore concentration was estimated using a Thoma hemocytometer, and the suspension was used as inoculum at a final concentration of 10⁴ spores ml⁻¹ culture. *A. oxydans* MsHM11 was precultured in Luria-Bertoni liquid broth (AthenaES™) for 3 days at 24°C under orbital shaking. The precultures were then centrifuged (4,700 rpm, 10 min), washed three times with NaCl 8.5‰ and used as inoculum to a final DO₆₀₀ of 0.02 (corresponding to 10⁷ cells ml⁻¹).

2. Culture conditions with PAHs

Liquid culture experiments were conducted in 150 mL Erlenmeyer flasks containing 20 mL of BSM medium, i.e., a Buschnell-Haas (BH) mineral medium composed of (g l^{-1} in distilled water) MgSO_4 0.2, CaCl_2 0.02, KH_2PO_4 1, K_2HPO_4 1, KNO_3 1 and FeCl_3 0.05, supplemented with a trace element solution, leading to final concentrations (mg l^{-1}) as follows: nitriloacetic acid 15, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1, ZnSO_4 1, CuSO_4 0.1, H_3BO_3 0.1, Na_2MoO_4 0.1 and $\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1, according to Saraswathy and Hallberg (2005). When required, a filter-sterilised ($0.22 \mu\text{m}$) glucose solution was added (20 g l^{-1} final concentration) and/or the culture medium was buffered at pH 6.8 with 5 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$.

The required amounts of PHE (Fluka™, >97% purity), PYR (SIGMA-ALDRICH®, >99% purity) and DBA (Acros Organics, >99%), i.e., 10 mg, 10 mg and 1 mg, respectively, were dissolved in 9 mL chloroform and added to each Erlenmeyer flask. The autoclaved BSM (20 mL) was added after total chloroform evaporation under a fume hood, leading to theoretical initial concentrations of 500, 500 and 50 mg l^{-1} of PHE, PYR and DBA, respectively. The flasks were then inoculated with *F. solani*, *A. oxydans* or both, and they were incubated at 24°C in the dark with orbital shaking (150 rpm) (Thermo Fisher Scientific). After the scheduled incubation times (see sections 2.3. and 2.4.), glucose concentrations, pH and bacterial colony forming units (CFUs) were assessed and the flasks were stored at -80°C until the PAHs were extracted. In all experiments, the abiotic controls were conducted in the same conditions as the inoculated treatments and each condition was conducted in triplicate.

3. PAH dissipation experiments

A PAH dissipation experiment with *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 was performed for 14 days. The two strains were cultured separately in BSM supplemented with PAHs as described in section 2.2 with and without glucose as an additional carbon source. Then, a PAH dissipation kinetics experiment was performed, with glucose-supplemented BSM and four different conditions: the abiotic control, the *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 axenic cultures and the mixed coculture. Triplicates of each treatment were harvested and analysed after 0, 7, 14, 21 and 28 days. The same experiment was conducted in a buffered (pH 6.8) BSM medium.

The PAHs were successively extracted from the total cultures (i.e., liquid medium and biomass) three times with dichloromethane (DCM) (vol:vol) in separating funnels. We assumed that the PAHs that were absorbed or strongly adsorbed to the biomass were not extracted by this protocol. We thus used the term “dissipated”, which included biotransformation, absorption and strong sorption, to characterise the difference between the extractable PAH concentrations in these extracts and the corresponding controls.

4. Estimation of sorption and biotransformation

We investigated the contribution of the sorption and of the effective biotransformation to the observed PAH dissipation when the fungal strain was present in the cultures. Twenty-eight-day cultures were conducted with four treatments: abiotic control, *F. solani* MM1 in pure culture, *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 in mixed cocultures unbuffered or buffered to pH6.8.

The PAHs were successively extracted from the culture medium and biomass and separately analysed. After total culture extraction in the separating funnels as described in section 2.3, the biomass was collected by centrifugation from the aqueous phase and freeze-dried. Lyophilised pellets were then crushed in liquid nitrogen, mixed with diatomaceous earth (1:2, w:w) and extracted with DCM using Accelerated Solvent Extraction (ASE[®]350, Dionex) with 2 cycles of 5 minutes each at 130°C. Biotransformed PAHs were estimated by calculating the difference between PAH dissipation and the PAH recovered from the biomass (absorbed and adsorbed PAHs).

To assess PAH adsorption on the fungal mycelium, *F. solani* MM1 was grown for 28 days in PAH-free BSM supplemented with glucose. Fungal biomass was killed by autoclaving (110°C, 30 min), and it was then incubated for 2 h in PAH-containing BSM, thus allowing the adsorption mechanism (Binet et al., 2000). Fungal biomass was collected by centrifugation, and the PAHs were extracted as described above.

5. PAH analysis

The DCM extracts were evaporated in a speedvac concentrator (Thermo Scientific RC1010), and the dried samples were dissolved in acetonitrile and filtered through Teflon filters (45 µm). High-pressure liquid chromatography (HPLC) analysis was performed with a Dionex UltiMate 3000 System at 30°C. The separation column (Supelco Ascendis[®] Express C18) was 100 mm long and had a 4.6-mm inside diameter and a 2.6-µm granulometry. The injected volume was 10 µl. The mobile phase was 100% acetonitrile with a 1.6 ml min⁻¹ flow rate. A photodiode-array detector was used for detection at 254 nm for PHE and PYR and 297 nm for DBA. The PAH recovery and dissipation in the inoculated cultures were calculated using the mean of quantities recovered in the corresponding abiotic treatment (control) as a 100% value calculated for each sampling time for the kinetics experiment to focus on biotic dissipation. In all abiotic treatments, the dissipation of any of the three PAHs was not significant (p<0.05).

6. pH and glucose measurements

The pH was evaluated using indicator strips (Special indicator, Merck). The glucose concentration was measured using colorimetric method Glucose GOD-PAP (BioLabo), as recommended by the manufacturer, with the absorbance reading at 505 nm (Xenius XML, SAFAS). The percentage of glucose recovery was estimated using the mean of glucose quantities recovered from corresponding abiotic treatment as a 100% value.

7. Microbial growth

Microbial biomass was collected by centrifugation of the aqueous phase after DCM extraction and weighed after complete drying. Otherwise, the number of bacterial colony forming units (CFUs) was determined on Luria-Bertoni agar plates supplemented with 75 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ cycloheximide (Carl Roth®, 96% purity) to inhibit fungal growth.

8. Real-Time PCR assays

To evaluate the bacteria/fungi ratio after 28 days of coculture in sorption assays, the 18S and 16S rRNA gene copy numbers per mg dry biomass were quantified by real-time PCR with the previously described primer pairs Fung5f-FF390r (Lueders et al., 2004) and 968F-1401R (Felske et al., 1998), respectively. DNA was extracted from 5 mg of lyophilised biomass using the QIAGEN® DNeasy Plant Mini Kit and quantified by spectrometry at 260 nm (Shimadzu UV 1800, with Hellma® Traycell). Real-time qPCR detection chemistry and temperature profiles were as previously described (Cébron et al., 2008) with slight modification for 18S rDNA quantification, i.e., annealing temperature of 50°C, according to the Lueders et al. (2004) method. To prepare the 18S rDNA qPCR standards, a purified Fung5f-FF390r PCR fragment (QIAquick PCR purification kit, QIAGEN) from *Russula* sp. was cloned into the pCR2.1 vector using the TOPO TA cloning method (Invitrogen). Plasmid was purified (QIAprep Spin Miniprep kit, Qiagen) and linearised using the restriction enzyme BglIII (Euromedex) to prevent an erroneous calibration curve due to coiled DNA (Suzuki et al., 2000). The plasmid concentration was quantified by spectrometry as described above. The copy number of standard plasmids was calculated according to the plasmid (3957 bp) plus insert (550 pb) lengths and assuming a molecular mass of 660 Da for a base pair. A standard DNA stock solution of 10^9 copies of plasmid μl^{-1} and a standard 10-fold dilution series were prepared. Quantification of each target gene in each sample replicate was performed in triplicate with three independent real-time PCR runs using an iCycler iQ apparatus (Bio-Rad) associated with iCycler optical system interface software (version 2.3, Bio-Rad) for data collection and melting curve analysis.

9. Microscopic observations

All observations were performed with an epifluorescent microscope (Nikon Eclipse E600).

To estimate *A. oxydans* MsHM11 viability after 28 days of culture in sorption assays, the culture samples were stained with LIVE/DEAD® *Bad*light (Molecular Probes®) according to manufacturer instructions. *F. solani* MM1 viability was assessed using 25 μl of 50 μM FUN®1 cell stain (Molecular Probes®) on 0.5 mm mycelium pieces. The observations were performed with FITC (excitation: 565-495, emission: 515-555 nm) and G2A (excitation: 510-560, emission: >590 nm) standard filter sets, and pictures were taken with a Nikon D70 camera. For FUN®1 visualisation, the red and green channels were merged with Image J Software, and hyphae showing Cylindrical IntraVacuolar Structures (CIVS; Millard et al., 1997) were

assumed to be metabolically active. UV fluorescent vesicles were observed without any previous staining in bright light and with a DAPI standard filter (excitation: 340-380 nm, emission: 435-485 nm).

10. Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using XLstat 2008 (Addinsoft) with $\alpha=0.05$. Student *t* tests (inoculated culture *vs.* abiotic treatment) were applied for the initial dissipation assays. In the kinetics experiment, a two-way analysis of variance (ANOVA) was performed with time (considering that the cultures were sacrificed at each sampling time) and biotic treatments as independent factors. In the sorption assays, one-way ANOVA was used to separately compare PAH absorption, biotransformation and recovery in the culture medium between inoculated treatments, whereas the PAH dissipation per unit biomass was analysed using two-way ANOVA with treatment and PAH as independent factors. All ANOVAs showing significant differences were followed by Newman-Keuls multiple comparison tests.

Results

1. PAH dissipation in pure cultures with or without glucose

The 14-day incubation of *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 in PAH-containing BSM with or without glucose highlighted two contrasted patterns of PAH dissipation (Table 16). The percentages of recovery were calculated considering the mean values measured in abiotic control as references. Some values in table 1 were slightly higher than 100% which can be explain by the variability between replicates in these controls. *F. solani* MM1 could not grow with the PAHs as a unique growth substrate, and thus, no dissipation could be observed in these conditions. However, when glucose was added, *F. solani* significantly dissipated 22% and 21% – i.e., 1.3 ± 0.3 mg each – of the added PHE and PYR, respectively. No significant dissipation of DBA was observed, which could be due to DBA having lower water solubility than PHE and PYR (i.e., 2 400- and 270-fold, respectively). In contrast, *A. oxydans* was found to deplete 66% of PHE – i.e., 5.1 ± 0.8 mg – when the PAHs were provided as the sole carbon source ($p<0.01$) but glucose addition in large excess inhibited this ability. Furthermore, the bacteria did never significantly remove PYR or DBA, even when no glucose was added. However, glucose addition was required in the coculture experiments with *F. solani*. We hypothesised that when the glucose would be totally consumed in the cocultures, *A. oxydans* would start to degrade phenanthrene.

2. PAH dissipation kinetics in buffered and unbuffered medium

The PAH dissipation kinetics experiment was conducted in unbuffered and buffered BSM containing PHE, PYR and DBA (500, 500 and 50 mg.l⁻¹, respectively) inoculated with *F. solani* MM1, *A. oxydans* MsHM11 or both microbes in coculture. In the pure culture with unbuffered medium, the *F. solani* biomass reached a plateau from the seventh day concomitantly with the total disappearance of glucose

(Fig. 32.A). The pH remained statistically constant (6.8) throughout the experiment. A significant depletion of the three PAHs was measured from the 7th day ($p \leq 0.03$) and tended to increase with time, reaching 5.42 ± 0.15 mg of total PAHs dissipated after 28 days of culture, corresponding to 27%, 26% and 24% dissipation for PHE, PYR and DBA, respectively. The three PAHs followed the same kinetics pattern throughout the incubation.

In the pure culture of *A. oxydans*, the number of CFUs increased during the first 7 days of the experiment but quickly dropped from the 14th day of the culture (Fig. 32.B). This was probably due to the drastic acidification to pH ~ 5 , consequence of the bacterial growth. Approximately 11% of the PHE, i.e., 0.91 ± 0.34 mg, was significantly ($p \leq 0.03$) dissipated after 7 and 14 days, but no dissipation was noted after 21 and 28 days. No significant PYR or DBA dissipation could be measured at any sampling time.

Microbial strain	Phenanthrene		Pyrene		Dibenz(a,h)anthracene	
	BSM	BSM + glucose	BSM	BSM + glucose	BSM	BSM + glucose
<i>F. solani</i>						
MM1	92.8 $\pm$ 4.9	77.9 $\pm$ 3.7 *	85.8 $\pm$ 5.3	78.9 $\pm$ 6.5 *	93.0 $\pm$ 3.0	83.5 $\pm$ 13.7
<i>A. oxydans</i>						
MsHM11	33.5 $\pm$ 10.2 *	86.5 $\pm$ 5.2	88.8 $\pm$ 6.6	117.3 $\pm$ 11.8	88.6 $\pm$ 5.1	114.1 $\pm$ 10.7

Table 16. Percentage of residual PAHs after 14 days of axenic culture of *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 in liquid basal salt medium (BSM) compared to abiotic treatment, with or without glucose. *: Significant difference between biotic and corresponding abiotic treatments with $p < 0.01$ according to Student t tests.

No synergistic or even additive effect could be observed in the fungal-bacterial cocultures with unbuffered medium. The microbial growth was slower than in the *F. solani* pure cultures, and the biomass continued to increase until the 28th day ($p \leq 0.04$; Fig. 32.C), which was correlated with a delay in glucose consumption that was complete after 14 days. The bacterial viability were highly affected: no bacterial CFU could be counted from the 7th day (data not shown) when the pH had dropped to 4. Probably bacteria grew during the first few days, acidified the medium and the low pH then affected their viability on agar plate. The microbial growth is thus expressed in Figure 32.C in dry biomass. No significant dissipation of any of the three PAHs could be measured at any sampling time.

To avoid a negative interaction due to pH decrease, *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 were cultivated in BSM buffered to pH 6.8. When cultivated alone, *F. solani* quickly reached a two-fold higher biomass than in unbuffered condition (Fig. 32.D). Then the biomass drastically declined and changes in cell morphology were observed (thinner fungal filaments). *A. oxydans* completely lost its viability from the 7th day probably due to the high cell density. The PAH dissipation in the buffered pure cultures was nearly identical to what was observed in the unbuffered cultures, but a different pattern was observed in the cocultures. Indeed, the three PAHs were linearly depleted with time ($r^2 =$

0.95, 0.95 and 0.88 for PHE, PYR and DBA, respectively) throughout the experiment in the buffered coculture, leading to a final dissipation of 23%, 17% and 17%, respectively ($p < 0.01$, Fig. 32.F). The biomass was not significantly different from the *F. solani* pure culture, and *A. oxydans* was no more cultivable after 7 days (data not shown). This buffered coculture was thus dominated by fungal biomass (confirmed visually).

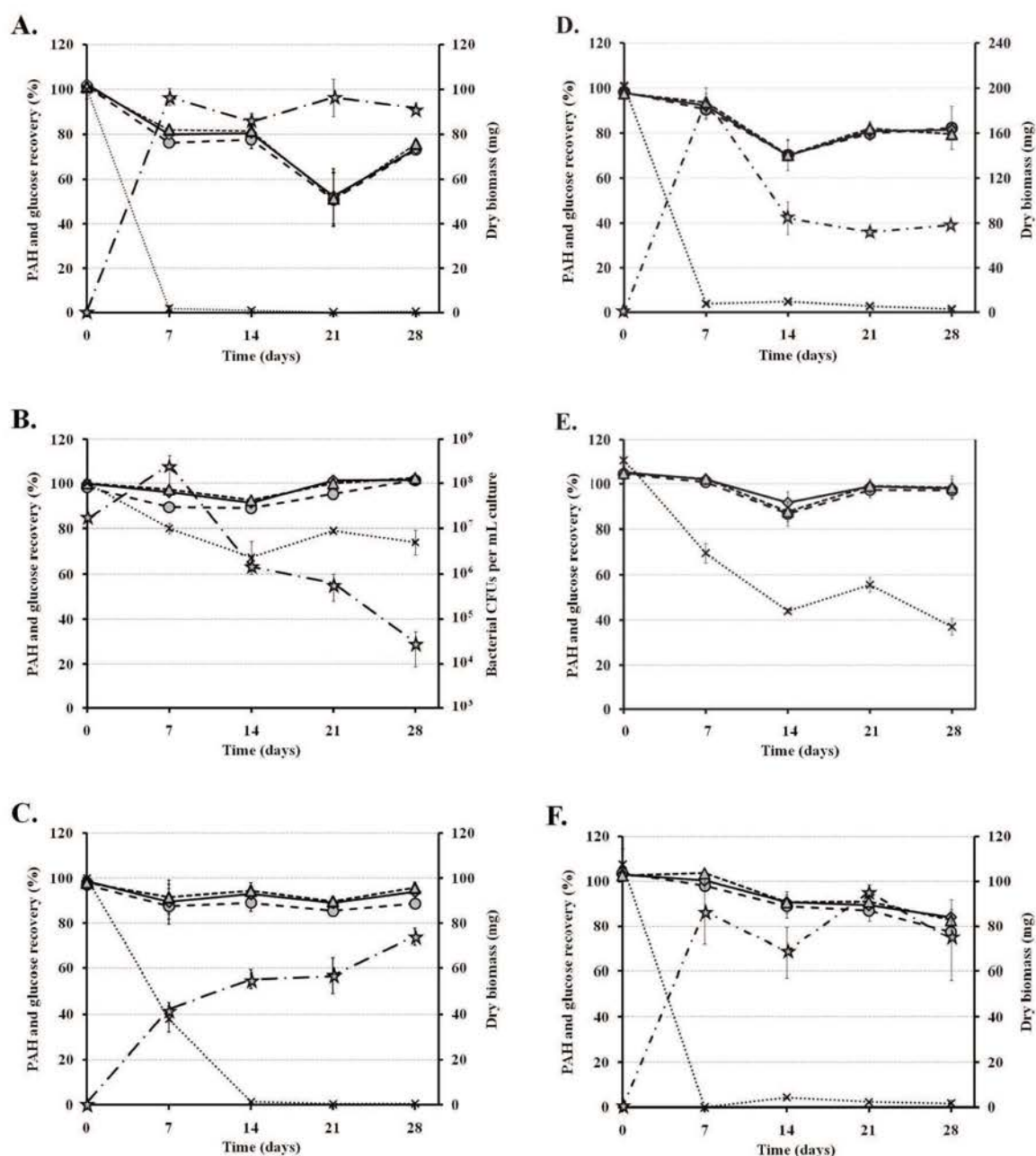


Figure 32. Percentage of PHE (circles), PYR (rhombuses), DBA (triangles) and glucose (crosses) recovery and microbial growth (stars) in pure cultures of *F. solani* (A: unbuffered and D: buffered), *A. oxydans* (B: unbuffered and E: buffered) and fungal-bacterial cocultures (C: unbuffered and F: buffered). 100% PAH and glucose recovery are the means of extracted PAHs or glucose in abiotic treatments. Means $\pm$ SE, n=3.

The dissipation efficiency was significantly higher with the fungus alone than in the coculture for the 3 PAH compounds, and the PHE and PYR dissipation was significantly higher in the buffered cocultures than the *Arthrobacter* pure cultures ($p < 0.05$).

3. PAH adsorption, absorption and biotransformation in *F. solani* pure cultures and cocultures with *A. oxydans*

In the fungal cultures of the kinetics experiment, the PAH dissipation seemed to continue even after the biomass had stopped increasing. Moreover, the dissipation followed the same patterns, whatever the PAH molecular weight, indicating no selectivity for molecule type. We thus hypothesised that part of the observed depletion could be due to a passive mechanism, such as PAH sorption on (adsorption) or in (absorption) fungal cells. The PAHs recovered from the *F. solani* killed biomass were less than 0.2% of the total PAHs, i.e., less than $0.9 \mu\text{g PAHs mg}^{-1}$. Thus, the adsorption contribution to the dissipation was considered negligible. The absorption was then estimated in the 28-day PAH-containing cultures of *F. solani* MM1 and the cocultures with *A. oxydans* in the unbuffered or buffered (pH 6.8) medium (Fig. 33). The PAHs were separately analysed from the liquid medium and the microbial biomass.

Treatment	Extraction yield (ng DNA mg^{-1} biomass)	18S copy number ng^{-1} DNA	16S copy number ng^{-1} DNA	Ratio 16S/18S
<i>F. solani</i>	$4.2 \times 10^2 \pm 1.6 \times 10^2$ ^a	$8.6 \times 10^3 \pm 5.2 \times 10^3$ ^a	—	—
<i>F. solani</i> + <i>A. oxydans</i> , non buffered	$2.8 \times 10^2 \pm 1.0 \times 10^2$ ^a	$1.9 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^4$ ^a	$7.3 \times 10^2 \pm 3.3 \times 10^2$ ^a	$4.9 \times 10^{-2} \pm 2.2 \times 10^{-2}$ ^a
<i>F. solani</i> + <i>A. oxydans</i> , buffered	$1.1 \times 10^3 \pm 2.0 \times 10^2$ ^b	$1.7 \times 10^2 \pm 1.1 \times 10^2$ ^b	$1.6 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^5$ ^b	$1.9 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^4$ ^b

Table 17. DNA extraction yields and 18S and 16S rRNA gene copy number, determined by real-time PCR, in 28 days-old *F. solani* axenic cultures and co-cultures with *A. oxydans*. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments.

The respective contributions of *F. solani* and *A. oxydans* to the biomass were quantified using real time PCR targeting the rRNA genes (Table 17). The DNA extraction yields (i.e., quantity of extracted DNA per mg dry biomass) were significantly lower in the unbuffered than buffered cocultures. The fungal 18S rRNA gene copy number per ng DNA was 100-fold lower in the buffered than unbuffered cocultures ($p < 0.05$). However, the bacterial 16S rRNA gene copy number per ng DNA was approximately 2000-fold higher in the buffered than unbuffered co-cultures ($p \leq 0.01$). Consequently, the 16S/18S copy number ratios were completely inverted in these two treatments because it was approximately 4.10^5 -fold higher in the buffered co-cultures ($p < 0.04$). This result suggests a great dominance of *A. oxydans* in the buffered cocultures and of *F. solani* in the unbuffered cultures in this 28-day incubation experiment. Indeed, the visual aspect of the buffered cocultures in this experiment (highly turbid liquid and yellow-

coloured medium with numerous 5-mm mycelial pellets) was totally different from that observed in the unbuffered cocultures and in the *F. solani* pure culture (with one large ~3 cm diameter mycelial pellet in a clear red aqueous medium).

The microscopic observations, notably using viability staining, were conducted to assess morphologic and physiological changes. In the unbuffered cocultures dominated by *F. solani* and in the pure fungal cultures, a microscopic observation of the bright field showed highly branched mycelium with relatively wide hyphae (5-10 μm in diameter) supporting chlamydospores containing refringent intracellular vesicles (Fig. 33.a). After Fun[®]1 staining, cylindrical intra-vacuolar structures could be observed in the hyphae and chlamydospores after 28 days, suggesting *F. solani* viability (Fig. 33.c), which was consistent with the *F. solani* growth on agar plates. In the buffered cocultures dominated by *A. oxydans*, the *F. solani* aspect was different: the hyphae were reduced to thin filaments (1-3 μm in diameter), supporting a greater number of chlamydospores, and only these spores were stained with FUN[®]1 (Figs. 33.d and f). Conversely, the *A. oxydans* viability, assessed by LIVE/DEAD[®] Badlight staining, was lower in the unbuffered cocultures dominated by the fungus, than the buffered cocultures dominated by the bacterium (data not shown).

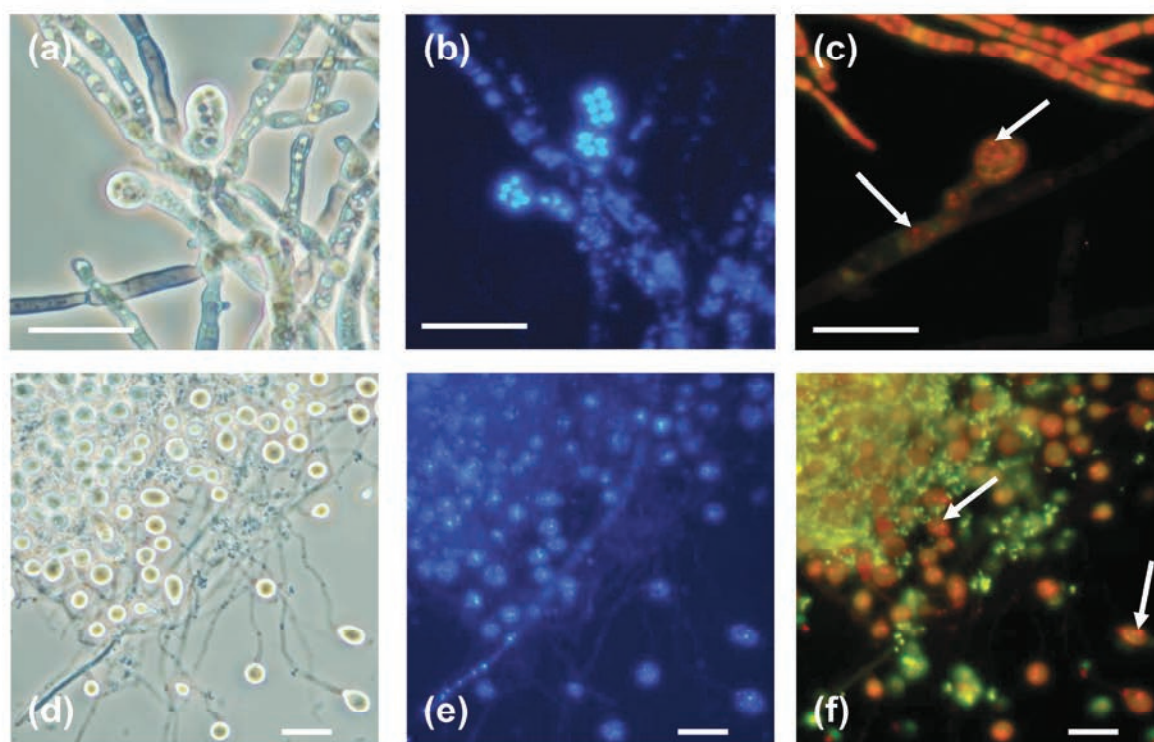


Figure 33. Epifluorescence micrographs of *F. solani* in pure culture (A, B, C) or in coculture with *A. oxydans* (D, E, F) after 28 days with PAHs. Bar = 20 μm . The culture conditions are detailed in the Materials and Methods section. (A, D) bright field; (B, E) same field, autofluorescence using DAPI standard filter. Arrows indicate the UV fluorescent vesicles in the chlamydospores and hyphae never observed without PAHs; (C, F) Fungal Live/Dead staining using FUN[®]1 cell stain. The present picture results from the merging of red and green channels using G-2A and FITC standard filters, respectively. Arrows indicate red fluorescent cylindrical structures showing fungal viability.

The absorbed PAHs were found to be a highly significant part of the PAH dissipation in *F. solani* pure cultures and unbuffered cocultures dominated by the fungus. In both cases, one-third of the dissipated PAHs was recovered from the biomass, reaching 2.01 ± 0.32 mg of the absorbed PAHs in the pure culture, i.e., 30 µg per mg biomass (Fig. 34). The refringent vesicles in the chlamydo-spores, and some smaller ones located in hyphae, showed a high autofluorescence when observed with the DAPI standard filter (Fig. 33.b). Such vesicles were never observed in the mycelium from the PAH-free cultures (data not shown), suggesting that the fluorescence was due to PAHs (UV autofluorescent). In contrast, the absorption part was negligible in the PHE dissipation observed in the buffered co-cultures dominated by *A. oxydans*, which is in concordance with the microscopic observations showing less refringent vesicles and a weaker UV autofluorescence (Fig. 33.e).

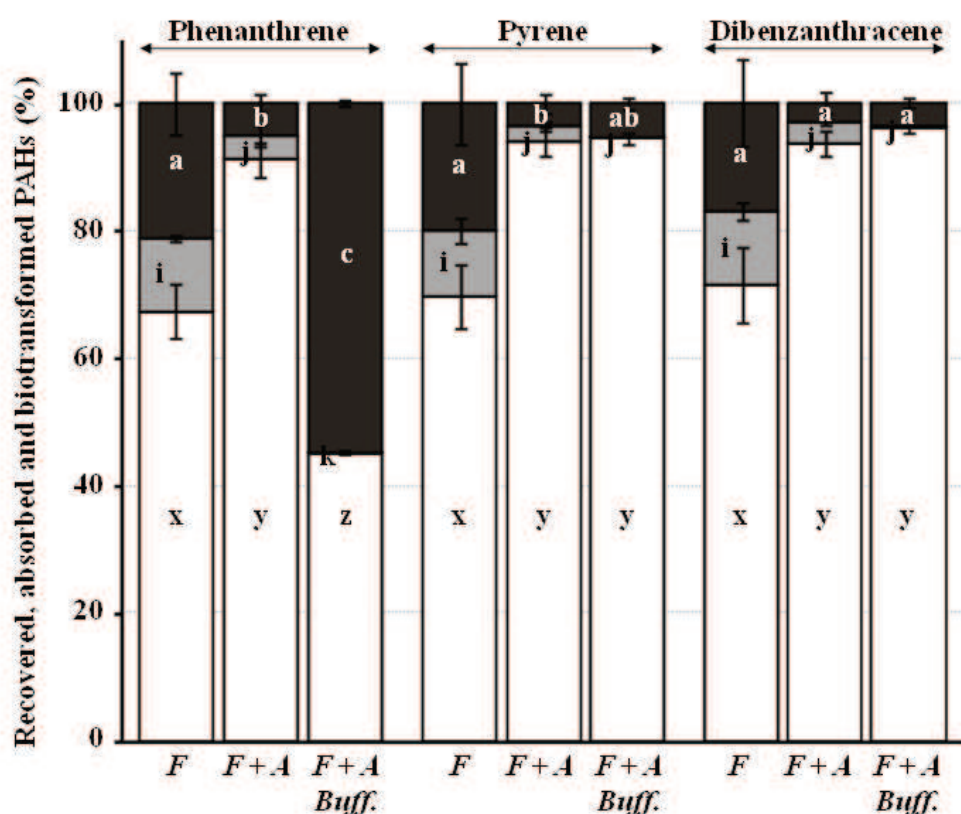


Figure 34. Distribution between biotransformed (black areas), absorbed (grey areas) and residual (white areas) PAHs in 28-day-old pure cultures of *Fusarium solani* (F) or cocultures of *F. solani* and *Arthrobacter oxydans* unbuffered (F + A) or buffered to pH 6.8 (F + A Buff.). Absolute values corresponding to 100% are means of the total extracted PAHs in the abiotic treatment. Means $\pm$ SE, n=3. Different letters indicate a significant difference ($p \leq 0.05$) of biotransformed (a, b, c), absorbed (i, j, k) or residual (x, y, z) PAHs between treatments. Statistical analyses were performed independently for each PAH.

In the *F. solani* pure cultures, the PHE, PYR and DBA dissipation was 33%, 30% and 29%, respectively, i.e., 5.88 ± 1.50 mg total PAHs (Fig. 34). These percentages did not significantly differ from the kinetics experiment, revealing a good reproducibility. The calculated biotransformed PAH quantities were 1.91 ± 0.75 mg, 1.78 ± 0.92 mg and 0.19 ± 0.13 mg for PHE, PYR and DBA, respectively. As in the kinetics

experiment, in the unbuffered co-cultures, the PAH dissipation was very weak for the 3 PAHs, with only PHE being significantly dissipated (i.e., 9% corresponding to 0.79 ± 0.43 mg; $p = 0.018$; Fig. 2). Even though *F. solani* dominated and did not show any growth delay compared to the pure cultures (Table 17), other factors partly inhibited its remediation potential. In the buffered co-cultures, dominated by *Arthrobacter*, a high PHE dissipation ($p < 0.001$) was observed, reaching 55% (i.e., 4.94 ± 0.06 mg) after 28 days of culture (Fig. 34), which could be exclusively imputed to biotransformation. No significant dissipation was observed in this treatment for PYR or DBA, which is in accordance with the dominance by *A. oxydans*.

Discussion

The initial PAH concentrations in these experiments were deliberately very high compared with other studies because the soil from which both strains were isolated presented a 16-PAH concentration of approximately $1,800 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Biache et al., 2008). The effective exposition in the liquid cultures was even lower because of the very low PAH solubility in the aqueous medium. Furthermore, *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 did not show any growth delay when cultured with these PAH concentrations compared with the PAH-free cultures (data not shown).

The two microbial strains exhibited different PAH dissipation potential. *F. solani* could deplete the three PAHs, whatever their molecular weight, provided that an additional carbon source was added. Other *Fusarium* strains isolated from the polluted soils were successfully tested for their PAH bioremediation ability in various conditions, such as liquid cultures (Veignie et al., 2004; Silva et al., 2009a), inoculation within a complex consortium in soil microcosms (Jacques et al., 2008) or even in association with plants (Mohsenzadeh et al., 2010). The PAH dissipation potential of *F. solani* MM1 seemed to include the uptake and storage of PAHs in intracellular vesicles. Such vesicles have been found in other fungal strains when incubated with PAHs (Verdin et al., 2005; Wu et al., 2009). Verdin *et al.* (2005) showed that these vesicles could be stained with lipid-specific dyes and that their formation did not depend on the cytoskeleton. They hypothesised that the PAH uptake involves passive diffusion through the lipidic membrane (Verdin et al., 2005). The fluorescence of the vesicles was very intense (Fig. 2), and we could relate the presence of the PAH-containing vesicles to the large amounts of absorbed PAHs, representing 3% of the total fungal biomass. The fate of internalised PAHs is still unknown: this could be a strategy of protection against PAH cytotoxicity through pollutant containment or transitory storage until oxidation by enzymatic systems of detoxification. A significant part of the PAHs, i.e., $\sim 60 \text{ } \mu\text{g}$ per mg biomass, was *de facto* biotransformed by *F. solani* MM1 because it could neither be recovered from the culture medium nor from the biomass. This value is rather high compared with other values calculated from the published data: $\sim 3 \text{ } \mu\text{g}$ PYR mg^{-1} for *Penicillium ochrochloron* at 28 days (Saraswathy & Hallberg, 2005); $\sim 19 \text{ } \mu\text{g}$ anthracene, PYR or DBA (separately)

mg⁻¹ for *F. solani* at 30 days (Verdin et al., 2004; Verdin et al., 2005); and ~41 µg DBA mg⁻¹ for *Trichoderma viride* at 30 days (Verdin et al., 2004).

By contrast, *A. oxydans* MsHM11 could use the three-ring PAH phenanthrene as a growth substrate, biotransforming 73.1 ± 16.1 µg PHE mg⁻¹ biomass, and this potential was inhibited by the presence of glucose. The medium acidification was certainly due to bacterial growth and not to PAH dissipation metabolism since it occurred even when PHE dissipation was low. Members of the genus *Arthrobacter* have been isolated from different PAH-polluted soils and were shown to efficiently remove low molecular weight PAHs, such as PHE, and some organic xenobiotics, such as carbazole (Seo et al., 2006; Johnsen et al., 2007; Kallimanis et al., 2007). Also, among the PAH-degrading bacteria isolated from the Neuves-Maisons wasteland soil, strains belonging to the genus *Arthrobacter* were frequent (Poupin P. and Bauda P., personal communication). Moreover, we previously showed, by using real-time PCR detection of the PAH-dioxygenase gene, that PAH degraders belonging to Gram-positive Actinobacteria were favoured compared with Gram-negative Proteobacteria in this soil (Cébron *et al.*, 2009). Growth substrate competition took place in our experiment: *A. oxydans* preferentially used easily degradable glucose at the expense of PAH dissipation and PHE when glucose was not available. Kallimanis et al. (2007) also showed that PHE uptake by *Arthrobacter* sp. Sphe3, mediated by an inducible active transport mechanism, was inhibited in the presence of glucose. However, *Arthrobacter* sp. was favoured in the presence of an easily degradable carbon source (i.e., ray-grass root exudates) and was still active in phenanthrene degradation, as shown by a DNA-stable isotope probing experiment (Cébron *et al.*, 2011).

Previous studies have shown a synergistic effect of the co-inoculation of fungi and bacteria on PAH depletion from artificial media and soils. For instance, Boonchan et al. (2000) showed a noteworthy synergistic effect on different PAH dissipation (benzo(a)pyrene and DBA in particular) when the fungus *P. janthinellum* and the bacteria *S. maltophilia* were grown together in liquid media and in PAH-polluted soil. Jacques et al. (2008) also observed that the co-inoculation of *Fusarium oxysporum* and a bacterial consortium composed of 5 PAH-degrading bacterial strains strongly increased anthracene dissipation in soil compared with separate inoculations. The coculture of the two microbial strains did not improve PAH depletion in our work. The results show that some negative interactions inhibited both partners' remediation potentials. In the cocultures of the kinetics (Fig. 32) and 28-day incubation (Fig. 34) experiments, although the bacterial and fungal inocula were prepared using the same procedure, the results differed in terms of bacterial and fungal dominance. The coculture led to the loss of cultivability and/or viability of *A. oxydans* in the cocultures dominated by the fungus and to the extensive formation of chlamydospores by *F. solani* in the cocultures dominated by the bacteria. The production of these thick-walled conservation spores was shown to be induced by stresses such as carbon starvation, pH variations or bacterial colonisation (Jansons & Nickerson, 1970; El-Ani, 1988). In our experiments, the competition for the carbon source and the pH decrease (i.e., indirect antagonism)

were also implicated. Indeed, when grown on the same MEA plates, no inhibition of growth was observed for either the fungus or the bacterium even when colonies were overlapping, suggesting no direct antagonism (e.g., antibiotic production) between the two model strains (data not shown).

Conclusion

The two isolated strains were shown to efficiently dissipate PAHs. To our knowledge, this is the first time that PAH absorption in fungal biomass has been accurately measured, and these results highlight that a significant part of fungal PAH dissipation could be due to accumulation in intracellular vesicles. However, the PHE dissipation by *A. oxydans* was only due to biotransformation. Our results show that *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 are potential candidates for bioremediation. Although a significant portion of the PAHs were absorbed in the fungal biomass, an *in vitro* PAH-efficient biotransformation occurred. The mixed cocultures showed that indirect antagonism, such as competition for carbon source or pH modifications, could impede PAH dissipation.

Chapitre III-4 :

Etude de la dissipation des HAP en
microcosmes stériles de luzerne
(*Medicago sativa*), inoculée par
Fusarium solani et/ou *Arthrobacter*
oxydans

Résumé

L'objectif de cette expérience était de tester l'effet des interactions entre les deux souches modèles *F. solani* MM1 et *A. oxydans* Pyr2MsHM11 (voir Chapitre III-2 et III-3), sur leurs potentiels de dissipation des HAP, dans un milieu solide et en présence d'une plante modèle, la luzerne. Pour limiter l'influence de facteurs additionnels (interactions avec d'autres microorganismes et disponibilité des HAP), un dispositif de culture stérile de luzerne dans du sable a été développé. Des tests préliminaires ont permis de vérifier l'absence de pathogénicité des deux souches microbiennes sur la luzerne et la tolérance de la luzerne au PHE, PYR et au DBA dans du sable. La mise au point du protocole de stérilisation des graines de luzerne et la conception des dispositifs ont permis de maintenir la stérilité de 78% des microcosmes après 21 jours. Une expérience de dissipation du PHE, du PYR et du DBA (à des concentrations respectives de 200, 200 et 20 mg.kg⁻¹) par les deux souches modèles en présence de plantes a été réalisée dans ces dispositifs de culture stérile. Les dispositifs ont été non inoculés, inoculés avec *A. oxydans*, *F. solani* ou co-inoculés avec les deux souches. La quantification par PCR en temps réel des gènes codant pour les ARNr 16S et 18S a montré une croissance significative des deux microorganismes dans les dispositifs en 21 jours. Contrairement à ce qui a été observé dans le Chapitre III-3, aucune interaction négative n'a été observée entre les deux microorganismes et un nombre supérieur d'UFC d'*A. oxydans* a même été observé en présence de *F. solani*. Après 21 jours, environ 35% du PHE ont été dissipés en moyenne dans les dispositifs, qu'ils aient été inoculés ou non, mais cette diminution par rapport à la teneur initiale n'était significative que dans les dispositifs co-inoculés avec *A. oxydans* et *F. solani*. Toutefois, les concentrations en PYR et DBA n'ont pas été affectées après 21 jours. Enfin, de légères modifications devront être apportées au dispositif pour améliorer les conditions de croissance des plantes en présence de HAP.

Introduction

Le champignon *F. solani* MM1 et la bactérie *A. oxydans* Pyr2MsHM11, isolés à partir d'un sol pollué aux HAP et ETM planté, ont montré de bons potentiels de dissipation des HAP *in vitro* dans les expériences précédentes (Chapitre III-2 et III-3). Néanmoins, ces expériences étaient réalisées dans des conditions très artificielles (cultures liquides riches en nutriments minéraux) et en absence de plantes. L'objectif de la présente expérience était donc de tester l'effet des interactions entre les deux souches modèles sur leurs potentiels de dissipation des HAP, en complexifiant le système par l'inoculation en milieu solide et sous l'influence d'une plante.

Dans un premier temps, l'innocuité des microorganismes modèles sur la croissance de la luzerne a dû être vérifiée. En effet, la luzerne est un hôte naturel des champignons du genre *Fusarium* qui, selon les souches, peuvent être saprophytes comme phytopathogènes (Salzer et al., 2000; Manici & Caputo, 2009). D'autre part, les caractéristiques physico-chimiques d'un sol sont susceptibles d'influencer fortement la dissipation des HAP, en modifiant notamment leur biodisponibilité (Macleod & Semple, 2000; Semple et al., 2006). Ainsi, une partie des HAP additionnés dans un sol est très rapidement adsorbée et séquestrée, réduisant leur biodégradabilité (Cébron et al. 2011b). Le sable est en revanche relativement neutre vis-à-vis des HAP, les processus d'adsorption et de séquestration des polluants concernant plutôt la fraction organique des sols (Amellal et al., 2001a). Il a été montré que dans du sable, les HAP sont totalement biodisponibles, puisque 100% du PHE ajouté à du sable a pu être biodégradé lors d'une expérience en microcosmes (Louvel et al. 2011). Pour répondre aux objectifs de cette expérience, il était essentiel de limiter l'influence de la biodisponibilité : il a donc été choisi d'utiliser du sable comme support de croissance pour la plante et les microorganismes. Par ailleurs, de nombreux travaux ont montré l'effet négatif des HAP sur la survie et la croissance des plantes (Tukaj & Aksmann, 2007; Debiane et al., 2008). La capacité de la luzerne à pousser dans du sable pollué aux HAP a donc dû être vérifiée. Enfin, pour limiter les interactions microbiennes à *F. solani* et *A. oxydans*, la plante et les souches microbiennes d'intérêt ont été cultivées en conditions stériles. Pour ceci, un protocole de stérilisation et de germination des graines de luzerne permettant l'obtention de plantules stériles et viables ainsi qu'un dispositif de culture stérile ont été mis au point. Les matériels et méthodes cités dans les paragraphes suivants sont détaillés dans le Chapitre II de ce travail.

Matériels & Méthodes

1. Tests d'innocuité des microorganismes et de toxicité des HAP sur la croissance de la luzerne

Des plantules de luzerne, provenant de graines mises à germer dans de la vermiculite, ont été transplantées dans des gobelets en plastique (5 plantules/gobelet) remplis d'un mélange de sable d'aquarium et de sable de Fontainebleau (80/20, m/m). La nutrition minérale, notamment en azote et

phosphore, a été apportée par une solution nutritive mise au point par Criquet et al. (2000) décrite dans le Chapitre II § 1.3.3.1. Les traitements appliqués étaient les suivants : témoin non pollué et non inoculé (T), inoculation avec *F. solani* (F) ou avec *A. oxydans* (A) et contamination avec des concentrations respectives de 500, 500 et 50 mg.kg⁻¹ de PHE, PYR et DBA (HAP). Chaque traitement a été réalisé en triplicats. Ces cultures ont été placées pendant 28 jours en chambre de culture en conditions contrôlées (Chapite II § 1.3) et arrosées tous les 2 à 3 jours en ajustant à la pesée la quantité de solution nutritive pour maintenir le sable à 70% de sa capacité de rétention en eau. Après 28 jours, les biomasses racinaires et aériennes ont été récoltées, séchées et pesées et comparées statistiquement par ANOVA à 1 facteur. La croissance des microorganismes a été évaluée par comptage des UFC fongiques sur boîtes de milieu ME gélosé additionné de streptomycine (traitements T et F) et des UFC bactériennes sur boîtes de milieu LB gélosé additionné de cycloheximide (traitements T et A) (Voir Chapitre II § 2.1.1). Les nombres d'UFC par g de sable ont été comparés entre les traitements inoculés et les témoins par test *t* de Student pour deux échantillons.

2. Stérilisation des graines de luzerne

Différents protocoles de stérilisation des graines ont été testés, basés sur les travaux de M.P. Norini (2007) et les communications personnelles de T. Béguiristain, comprenant différentes combinaisons de bains de streptomycine à 2%, de chloramine T à 2%, d'hypochlorite de calcium (Ca(ClO)₂) à 2 ou 20%, d'eau de javel à 7% de chlore actif, d'éthanol à 50% et d'eau oxygénée à 10%. Les bains d'antibiotiques ont été additionnés de Tween 80 à 1%. L'efficacité de la stérilisation a été évaluée en déposant les graines dans des boîtes de Pétri contenant du milieu LB gélosé mou (5 g.L⁻¹ d'agar), incubées pendant 7 jours à 24°C. Le taux de germination des graines après stérilisation a également été mesuré à l'obscurité pendant 4 jours à 24°C dans du coton hydrophile imbibé d'eau distillée et sur des boîtes de Pétri contenant différentes concentrations de milieu LB (1X, 0,5X, 0,2X et 0,1X, c'est-à-dire 20 g, 10 g, 4 g ou 2 g de poudre commerciale LB par litre) gélosé mou afin de déterminer une concentration idéale pour une bonne germination des graines et l'observation d'éventuelles contaminations. D'autres boîtes des mêmes milieux ont été laissées ouvertes pendant 1h en dehors de la hotte microbiologique et placées à incuber dans les mêmes conditions pour tester la capacité de ces milieux à supporter la croissance microbienne.

3. Mise au point et présentation du dispositif de culture stérile

Le dispositif de culture stérile, présenté dans la Figure 35, était constitué d'une base en PVC contenant le sable pollué, surmonté d'une colonne en verre transparent fermée par un bouchon en coton cardé. Une pipette en verre traverse le bouchon et est plantée directement dans le sable. A l'extrémité de la pipette se trouvant en dehors du dispositif, une tubulure est raccordée à un filtre à 0,22 µm au travers duquel la solution nutritive est dispensée. Tous les éléments du dispositif ont été stérilisés avant la mise en route des expériences. Les socles en PVC ont été placés pendant 48 heures dans un bain de biocide (2 tablettes de désinfection CT1 ELGA pour 5 l d'eau) et d'eau de javel (7% de chlore actif). Les parties

hautes des dispositifs (la colonne fermée en bas par un papier sulfurisé, le bouchon, la pipette et la tubulure fermée avec un clamp) ont été stérilisées assemblées par trois autoclavages à 24 heures d'intervalle. Le sable a été stérilisé et contaminé avec un mélange de PHE, PYR et DBA comme décrit dans le Chapitre II § 1.1.3. Suite à des essais préliminaires avec différentes concentrations de HAP (Fig. 37), les concentrations en PHE, PYR et DBA pour l'expérience de dissipation des HAP par les souches modèles ont été fixées respectivement à 200, 200 et 20 mg.kg⁻¹ de sable. L'assemblage des dispositifs a été entièrement réalisé sous hotte microbiologique. Un flacon de sable contaminé a été versé directement dans chaque socle en PVC. Le volume de solution nutritive stérile suffisant pour amener le sable à une humidité correspondant à 70% de sa capacité de rétention en eau, à laquelle était ajouté l'inoculum fongique (10⁴ spores .g⁻¹ de sable) et/ou bactérien (10⁷ cellules .g⁻¹ de sable) préparés comme décrit dans le Chapitre II § 1.2.3, a ensuite été versé sur le sable. Trois jours avant le début des expériences, les boîtes de Pétri contenant les graines germées ont été placées à la lumière jusqu'à la formation des cotylédons. Les plantules stériles ainsi obtenues ont été transplantées dans les colonnes, à l'aide d'une pince souple en métal préalablement flambée. La partie haute des dispositifs a alors été ajoutée et les filtres fixés à l'extrémité des tubulures. Les dispositifs placés en chambre de culture et arrosés comme décrit dans le Chapitre II § 1.3.3.1.

4. Etude de la dissipation des HAP dans les dispositifs de culture stérile plantés et inoculés avec *F. solani* et/ou *A. oxydans*

Après la mise au point des conditions expérimentales, notamment de la concentration en HAP et des conditions d'aération du dispositif, l'expérience de dissipation des HAP par *F. solani* et/ou *A. oxydans* dans les dispositifs de culture stérile plantés avec de la luzerne a été réalisée. Quatre traitements ont été appliqués avec neuf répétitions pour les dispositifs non inoculés (NI) et cinq répétitions pour les dispositifs inoculés avec *F. solani* (F), *A. oxydans* (A) ou les deux (A+F). Huit plantules ont été transplantées dans chaque dispositif avant l'installation en chambre de culture. Après 21 jours, les dispositifs ont été démontés et les mesures suivantes ont été effectuées : extraction à l'ASE puis dosage à l'HPLC des HAP dans le sable (Chapitre II § 2.2.2), biomasse végétale, nombre d'UFC fongiques et bactériennes, nombre de copies des gènes codant pour les ARNr 18S fongiques et 16S bactériens déterminé par PCR en temps réel (Chapitre II § 2.1.2.5). De plus, la viabilité et l'état physiologique de *F. solani* dans le sable éloigné ou adhérent aux racines ont été évalués par observations microscopiques et colorations Live/Dead au FUN®1 (Chapitre II § 2.1.3). La stérilité des dispositifs NI a été vérifiée par des étalements de sable sur boîtes de milieu gélosé riche (LB + cycloheximide ou ME + Streptomycine) placées à incuber à 24°C et 28°C pendant 7 jours. Les données ont fait l'objet d'analyses statistiques par ANOVA à 1 facteur suivies de tests de comparaison multiples de Newman-Keuls.

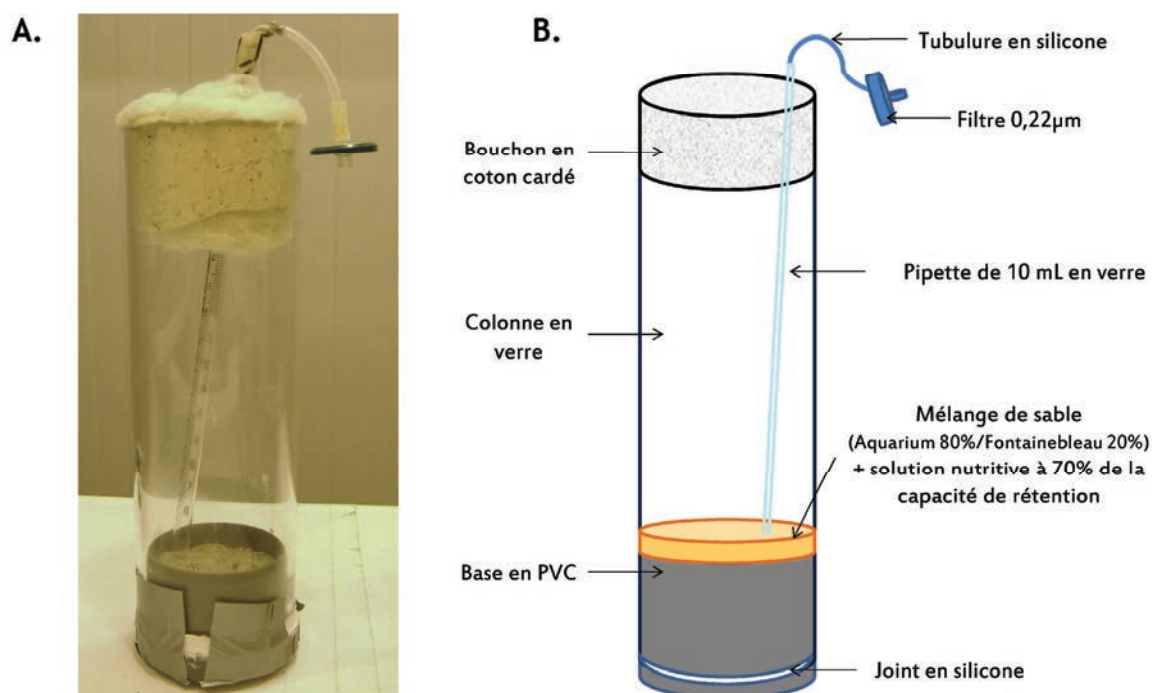


Figure 35. Photographie (A) et schéma (B) du dispositif expérimental de culture stérile de plantes après mise au point.

Résultats

1. Tests préliminaires

Stérilisation et germination des graines

Le Tableau 18 présente les résultats des tests de stérilisation des graines. Le protocole F présentait les meilleurs taux de germination sur du coton hydrophile et une très bonne efficacité de stérilisation. Ce protocole, comprenant 10 minutes de bain dans l'eau de javel à 7% de chlore actif puis 10 minutes de bain de streptomycine à 2% et de chloramine T à 2% additionnées de Tween 80 à 1%, avec 30 s dans l'eau distillée stérile après chaque bain, a donc été retenu pour la stérilisation des graines pour toute la suite de ce travail. Il a été constaté lors de ces tests que les taux de germination sur boîte de milieu LB étaient très inférieurs aux taux obtenus sur coton hydrophile, aussi différentes concentrations de milieu LB ont été testées pour la germination. Les taux de germination des graines stérilisées déposées dans les boîtes de milieu LB 1X, LB 0,5X, LB 0,2X et LB 0,1X étaient respectivement de 4%, 37%, 75% et 70%. Des tapis bactériens ont été observés dans les boîtes laissées à l'air libre contenant toutes les concentrations de LB excepté le LB 0,1X, où seules quelques colonies ont été observées. Le milieu

gélifié mou LB dilué 5 fois (0,2X) a donc été retenu comme milieu de germination des graines pour toute la suite de ce travail.

Traitement		Germ. sur coton	Germ. sur LB dilué 5 fois	% Stérilité
T	Témoin (aucun traitement)	♣♣♣♣	♣♣♣	0
A	1. ChIT 2% 2. Sm 2% + Tween 80 1%	♣♣♣♣	♣♣	50
B	1. H ₂ O ₂ 10% 2. Sm 2% + ChIT 2% + Tween 80 1%	♣♣♣♣	♣♣	78
C	1. Ethanol 50% 2. Ca(ClO) ₂ 20%	♣♣♣♣	nd	82
D	H ₂ O ₂ 10%	♣♣♣	nd	92
E	1. Ethanol 50% 2. Ca(ClO) ₂ 20% 3. ChIT 2% 4. Sm 2% + Tween 80 1%	♣♣	nd	97
F	1. Javel 7% 2. Sm 2% + ChIT 2% + Tween 80 1%	♣♣♣♣	♣♣♣	98

Tableau 18. Résultats des tests de stérilisation des graines de luzerne. Germ. : Taux de germination (♣♣♣♣ : 100%, ♣♣♣ : 50 à 80%, ♣♣ : moins de 50% de graines germées), % Stérilité : pourcentage de graines stériles après 7 jours sur boîtes de milieu LB 0,2X gélifié mou. ChIT : chloramine T, Sm : streptomycine.

Effet des HAP, de *F. solani* et d'*A. oxydans* sur la croissance de la luzerne

La Figure 36 présente les résultats des tests de tolérance de la luzerne aux HAP d'une part et aux souches modèles *F. solani* et *A. oxydans* d'autre part. Les biomasses ont été exprimées par plante vivante car 63% des plantules sont mortes avant la formation des premières feuilles, indépendamment du traitement. Aucune différence significative n'a été observée entre les biomasses par plante des quatre traitements, suggérant que les HAP ne sont pas toxiques pour la luzerne dans ces conditions et que ni *F. solani* ni *A. oxydans* n'inhibe la croissance de la luzerne.

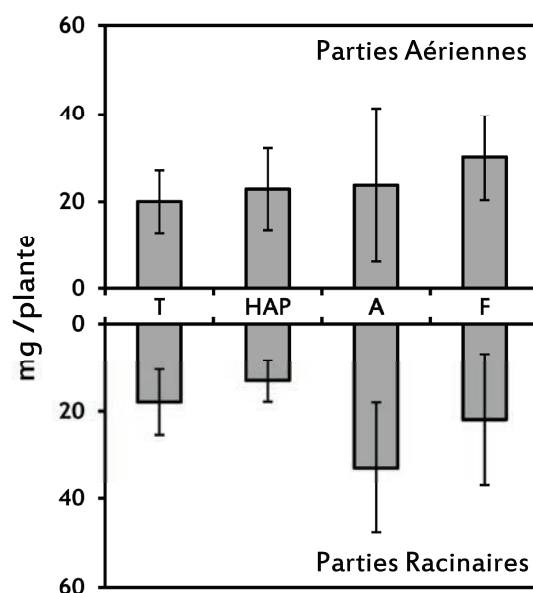


Figure 36. Biomasses aériennes et racinaires de luzerne après 28 jours de cultures en conditions non stériles. Les cultures ont été réalisées dans du sable non pollué non inoculé (T), pollué au PHE, PYR et DBA avec des concentrations respectives de 500, 500 et 50 mg.kg⁻¹ de sable (HAP), inoculé avec *A. oxydans* Pyr2MsHM11 (A) ou *F. solani* MM1 (F). Les moyennes et écarts-types sont présentés.

Comme présenté dans le Tableau 19, le nombre d'UFC fongiques dans les pots inoculés avec *F. solani* ($p = 0,018$) et bactériens dans les pots inoculés avec *A. oxydans* ($p = 0,050$) étaient supérieurs après 28 jours à ceux mesurés dans les pots non inoculés, indiquant que les deux microorganismes ont été capables de croissance dans ces conditions.

UFC	Témoin	Inoculé
Fongiques	$9,5.10^2 \pm 1,4.10^3$	$1,1.10^4 \pm 4,3.10^3$ ♣
Bactériennes	$2,1.10^4 \pm 1,4.10^4$	$7,4.10^5 \pm 4,5.10^5$

Tableau 19. Nombre d'UFC fongiques et bactériennes par g de sable dans les pots non inoculés et inoculés respectivement par *F. solani* MM1 et *A. oxydans* Pyr2MsHM11 et plantés avec de la luzerne. ♣ : indique une différence significative avec le témoin non inoculé avec $p < 0,05$.

Une première expérience, réalisée avec des concentrations respectives en PHE, PYR et DBA de 500, 500 et 50 mg.kg⁻¹ de sable et en utilisant du chloroforme comme solvant pour la pollution du sable, a été arrêtée après une quinzaine de jours car toutes les plantules étaient mortes avant même d'avoir formé des feuilles (données non présentées). Bien que le bouchon soit en coton cardé pour permettre les flux gazeux, un important dépôt de buée se formait rapidement (après quelques heures) à l'intérieur de la

colonne de verre et l'air à l'intérieur des colonnes semblait rapidement saturé en HAP (forte odeur d'hydrocarbures).

Une deuxième expérience de culture de luzerne (cinq plantules par dispositif) dans les dispositifs a donc été réalisée, sans inoculer les microorganismes, avec différents taux de polluants. Le sable a été pollué avec des solutions de HAP dans de l'hexane, pour des concentrations en PHE, PYR et DBA de 500, 500 et 50 ou 200, 200 et 20 ou 100, 100 et 10 mg.kg^{-1} de sable. Deux dispositifs ont été montés par niveau de pollution. Deux dispositifs ont été réalisés dans du sable ayant préalablement reçu le même volume d'hexane sans HAP et laissé à évaporer dans les mêmes conditions, afin de distinguer l'effet des HAP d'un éventuel effet de l'hexane seul. De plus, les dispositifs ont également été ouverts sous hotte microbiologique tous les 5 jours, pour permettre le renouvellement de l'air et éliminer la buée sur les parois en verre. Lors de cette expérience, la mortalité des plantules était encore plus élevée (77%). Cette mortalité, équivalente dans tous les traitements, affectait les plantules avant la formation des premières feuilles (stade des dicotylédons). En exprimant la biomasse par plante vivante après 28 jours, on observe que la biomasse aérienne de la luzerne a été réduite par la présence de PHE, PYR et DBA, quelles que soient leurs concentrations, alors que la biomasse racinaire ne semblait pas affectée jusqu'à 200, 200 et 20 mg de PHE, PYR et DBA .kg^{-1} de sable (Fig. 37), c'est pourquoi cette dernière gamme de concentrations a finalement été choisie.

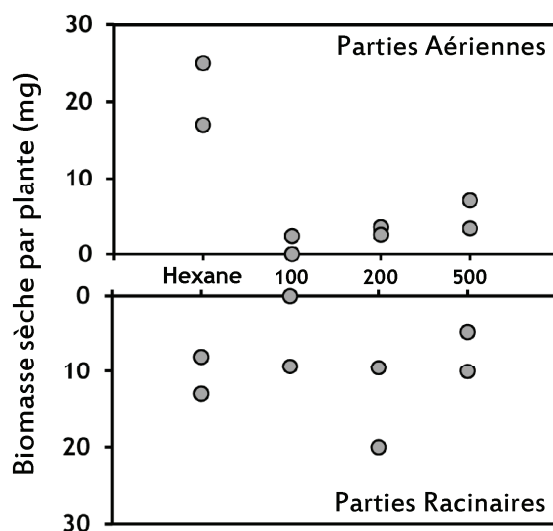


Figure 37. Biomasses aériennes et racinaire de luzerne après 28 jours de culture dans les dispositifs stériles. Les cultures ont été réalisées dans du sable non pollué (Hexane) ou pollué au PHE, PYR et DBA à hauteur de 100, 100 et 10 mg.kg^{-1} (100) ou 200, 200 et 20 mg.kg^{-1} (200) ou 500, 500 et 50 mg.kg^{-1} (500) de sable. Les valeurs présentées sont celles des deux réplicats par condition.

2. Dissipation des HAP par les souches microbiennes en présence de luzerne dans les microcosmes stériles

Survie et croissance de la luzerne dans les dispositifs

Initialement prévue sur 28 jours, l'expérience de dissipation des HAP dans les microcosmes stériles a été arrêtée après 21 jours en raison d'une mortalité atteignant 93% des plantes. Ici aussi, cette mortalité concernait des plantules au stade des dicotylédons. Les plantes ayant développé les premières feuilles ont survécu jusqu'à la fin de l'expérience mais présentaient des biomasses faibles, d'en moyenne 35 mg de matière sèche par plante, sans différence significative entre les traitements (Fig. 38).



Figure 38. Photographie de plantes de luzerne après 21 jours dans un dispositif de culture stérile. Initialement, huit plantules ont été repiquées dans chaque dispositif. Les plantules mortes sont visibles à la surface du sable.

Survie et croissance des microorganismes dans les dispositifs

Seuls 2 dispositifs NI sur 9 ont été contaminés, 7 dispositifs sont donc restés stériles pendant les 21 jours de l'expérience. Les données correspondant à ces 2 dispositifs ont été écartées de l'analyse. Sur la base de ce résultat, il a été admis que le nombre d'UFC fongiques et bactériennes ainsi que le nombre de copies de gènes codant pour les ARNr 18S et 16S (Fig. 39) correspondaient à ceux des inocula de *F. solani* et *A. oxydans*.

Pour *F. solani*, le nombre d'UFC au temps initial (J0) était plus faible que l'inoculation initiale théorique. Les deux méthodes d'évaluation de la croissance bactérienne (comptage des UFC et PCR en temps réel ciblant les gènes codant pour les ARNr) ont donné des résultats très similaires. En revanche, pour le champignon *F. solani*, le nombre de copies du gène codant l'ARNr 18S fongique était supérieur de 3 à 4 ordres de grandeur au nombre d'UFC, à J0 comme après 21 jours. Alors que pour les deux souches, les nombres d'UFC n'étaient pas statistiquement différents au début et à la fin de l'expérience, les nombres de copies de gènes codant les ARNr 18S et 16S ont augmenté significativement en 21 jours ($p < 0,001$). Par ailleurs, l'abondance bactérienne mesurée par PCR en temps réel tendait à être plus importante

dans les dispositifs co-inoculés par rapport aux dispositifs inoculés avec *A. oxydans* seul ($p = 0,052$). Les observations microscopiques de *F. solani* ont montré des morphologies différentes selon la distance à la racine (Fig.40). Dans le sable éloigné des racines, le champignon se trouvait sous la forme de macrospores fusariformes, comprenant de une à quatre cellules par spore, métaboliquement viables (Fig. xxA et 40.B). Par opposition, dans le sable proche des racines, *F. solani* se trouvait très majoritairement sous forme d'hyphes viables, à la surface des racines (Fig. xxC) mais également à l'intérieur de certaines racines (Fig. 40.D). Par ailleurs, il a été possible d'observer des vésicules autofluorescentes aux UV dans des chlamydospores portées par des hyphes de *F. solani* (Fig. 40.E et F).

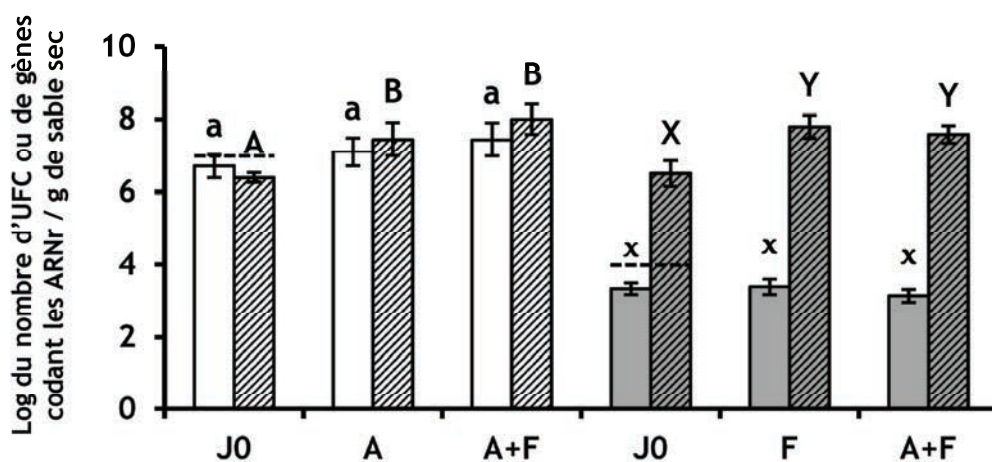


Figure 39. Log du nombre d'UFC (barres pleines) et de copies de gènes codant les ARNr 16S et 18S (barres hachurées) bactériens (blanc) et fongiques (gris) par g de sable dans les dispositifs au temps initial (J0) et après 21 jours dans les dispositifs inoculés *A. oxydans* (A), *F. solani* (F), ou les deux microorganismes (A+F). Les lignes pointillées indiquent les niveaux théoriques d'inoculation. Les moyennes et écarts types sont présentés ($n=3$ pour J0, $n=5$ pour les autres). Des lettres différentes indiquent une différence significative entre les nombres d'UFC bactériennes ou fongiques (minuscules) ou de gènes codant les ARNr 16S ou 18S (majuscules).

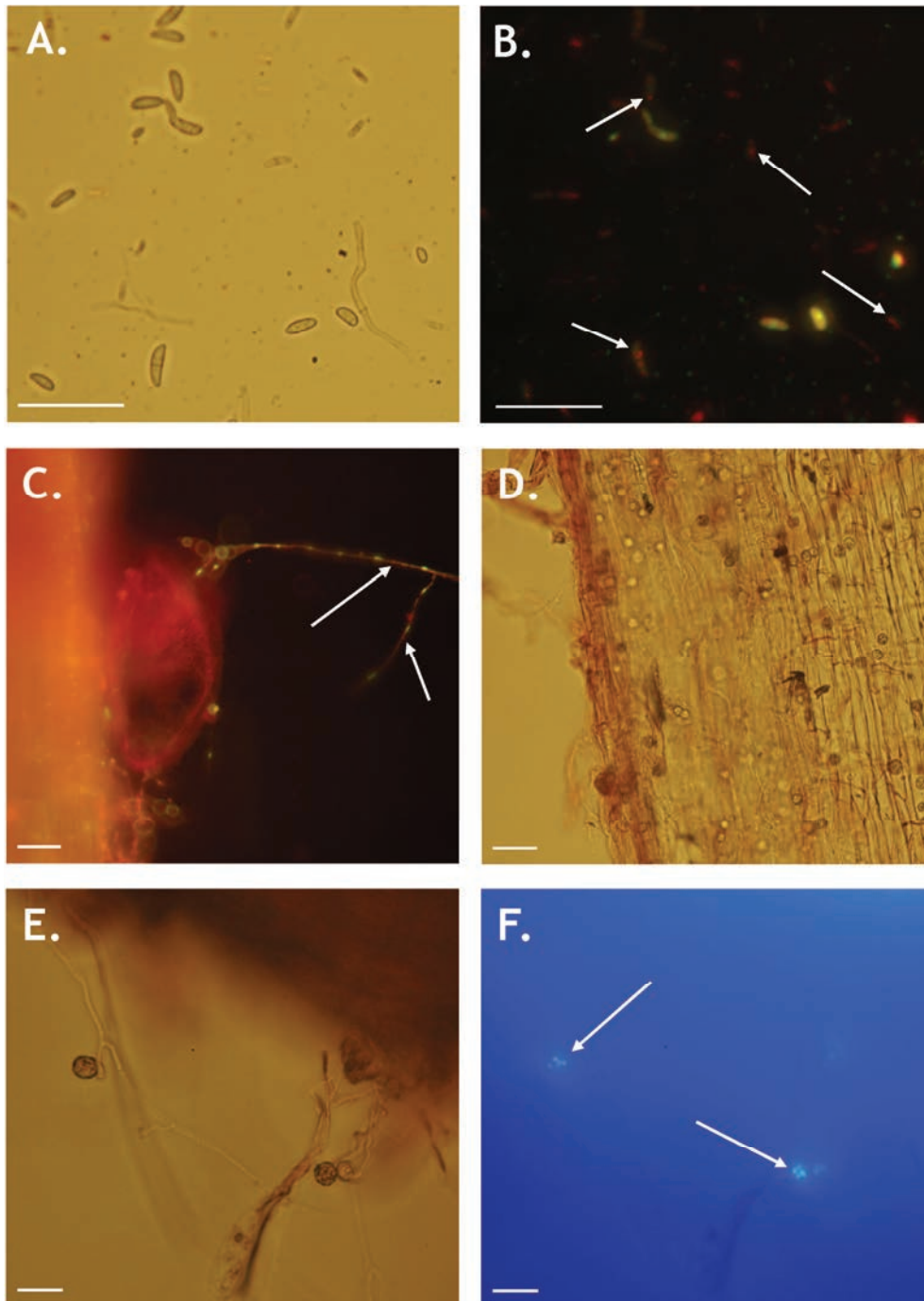


Figure 40. Observations microscopiques de *F. solani* après 21 jours de culture dans les dispositifs stériles. Microscopie optique à épifluorescence après coloration Live/Dead au FUN®1. A : *F. solani* dans le sable éloigné des racines de luzerne, lumière directe, B : Même champ, avec superposition des images des canaux vert et rouge, prises respectivement avec les filtres à fluorescence FITC et G2A, C. *F. solani* à proximité d'une racine de luzerne, même traitement d'image que B, D : Racine de luzerne entièrement colonisée par *F. solani*, lumière directe. E : *F. solani* à proximité d'une racine de luzerne, lumière directe, F : Même champ avec filtre à fluorescence DAPI. Les flèches blanches indiquent les CIVS caractéristiques de la viabilité (B et C) fongique les vésicules autofluorescentes aux UV dans les chlamydospores (F). Les barres blanches correspondent à 20 µm.

Teneurs en HAP après 21 jours

La Figure 41 présente les résultats des dosages des HAP à l'HPLC après extraction à l'ASE. Les concentrations initiales mesurées en PHE, PYR et DBA étaient inférieures aux concentrations initiales théoriques, en particulier pour le PYR et le DBA (respectivement 126 ± 18 et 14 ± 2 mg.kg⁻¹ de sable au lieu de 200 et 20 mg.kg⁻¹). Après 21 jours, la teneur en PHE a eu tendance à diminuer dans tous les dispositifs, inoculés comme non inoculés, sans différence significative entre les traitements. Cependant, la seule diminution par rapport aux teneurs initiales qui soit statistiquement significative a été observée dans les dispositifs inoculés par *F. solani* et *A. oxydans* (A+F). Le PHE, le plus léger des trois HAP, a subi une baisse significativement plus importante (-35%) que le PYR (-15%) et le DBA (-19%), aucune diminution significative n'ayant été observée pour ces deux HAP.

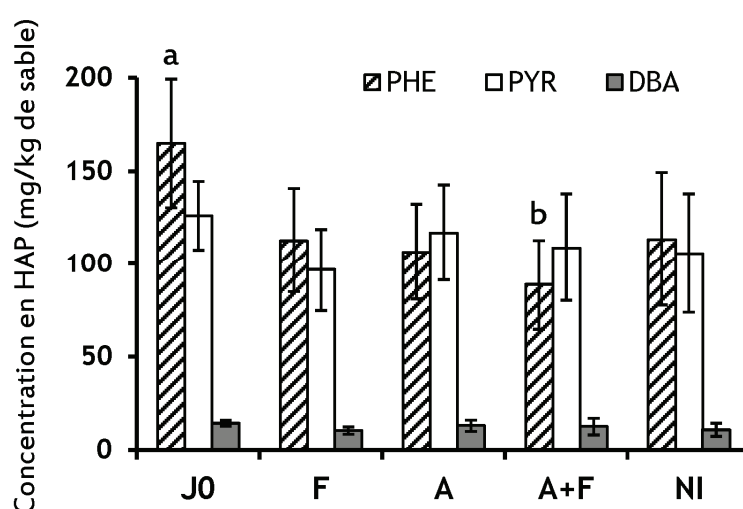


Figure 41. Teneurs en PHE, PYR et DBA dans le sable des dispositifs de culture stériles plantés avec la luzerne au début de l'expérience (J0) et après 21 jours dans les dispositifs inoculés avec *F. solani* (F), *A. oxydans* (A), les deux microorganismes (A+F) ou non inoculés (NI). Les teneurs initiales théoriques étaient de 200, 200 et 20 mg.kg⁻¹. Des lettres différentes indiquent une différence significative ($\alpha < 0,05$).

Discussion

L'effet de la rhizosphère sur la dissipation des HAP est très complexe car il dépend de différents processus, dont la stimulation des activités microbiennes totales (Hiltner, 1904), l'augmentation de la biodisponibilité des HAP via l'exsudation de biosurfactants (Zhou W et al., 2011) et la modification de la proportion des bactéries dégradant les HAP (Corgié et al., 2006d; Cébron et al., 2011b). Les microorganismes modèles *F. solani* et *A. oxydans* utilisés dans ce travail, isolés à partir de sol planté avec de la luzerne, appartiennent à des taxons communément retrouvés dans des sols rhizosphériques (O'Donnell, 2000; Wakelin et al., 2008; Banerjee et al., 2011; Sorkhoh et al., 2011). Dans ce contexte,

les objectifs de cette expérience étaient 1) d'évaluer le potentiel de dissipation des HAP de *F. solani* MM1 et *A. oxydans* Pyr2MsHM11 sous l'influence d'une plante (luzerne) et 2) d'observer l'effet de l'interaction entre les deux souches microbiennes sur leur croissance et leur potentiel de dissipation des HAP en conditions rhizosphériques. Pour répondre à ces objectifs en limitant l'influence de facteurs additionnels (interactions microbiennes avec d'autres microorganismes et interactions avec les particules et la matière organique d'un sol), un dispositif de culture stérile de luzerne, dans du sable, a été mis au point après de nombreuses expériences préliminaires.

De nombreux dispositifs de culture axénique de plantes, plus ou moins complexes, ont précédemment été développés (Fig. 42). Les systèmes les plus artificiels impliquent la croissance des plantes dans des milieux artificiels gélosés ou liquide (Fig. 42.A). Ce type de dispositif a par exemple été utilisé pour l'étude de l'expression des gènes de défense de la pomme de terre contre un champignon pathogène (Gallou et al., 2009) ou encore du transfert du césium vers la luzerne par ses racines mycorhizées (De Boulois et al., 2006). La culture en hydroponie (Fig. 42.B) est fréquemment utilisée pour récolter les exsudats racinaires et en étudier la composition (Groleau-Renaud et al., 1998; Louvel et al., 2011). Ce type de dispositif ne pouvait satisfaire aux objectifs de la présente expérience, étant trop éloigné des conditions rhizosphériques que nous souhaitons approcher. Leyval (1981) a mis au point un dispositif de culture axénique du maïs sur du sable, dont la stérilité (de 50 à 87% après 8 semaines) était favorisée par une couche de sable hydrofugé (Fig. 42.C). L'utilisation de sable hydrofugé n'était cependant pas adaptée à notre expérience, le traitement d'hydrofugation du sable le rendant alors susceptible d'adsorber fortement les HAP. Les premiers tests effectués lors de ce travail ont permis de mettre au point un protocole de préparation des graines stériles de luzerne relativement peu contraignant, favorable à la germination et très efficace en termes de stérilité. Ce protocole, ainsi que la conception, la désinfection et l'assemblage méthodiques des différents éléments des dispositifs, ont abouti au maintien de la stérilité de près de 80% des dispositifs non inoculés. En absence de HAP, la biomasse des plantes après 28 jours était équivalente dans les dispositifs de culture stérile et dans les cultures non stériles dans le même mélange de sable (respectivement 31 et 34,5 mg de matière sèche totale par plante, Fig. 37 et 36). En revanche, la mortalité des plantes était plus importante dans les dispositifs de culture stérile (77% contre 63% en conditions non stériles). La phase critique de développement de la plante a été le passage du stade des dicotylédons à la formation des premières feuilles, puisque seules les plantes ayant réussi cette transition ont survécu. Lorsque les HAP ont été ajoutés dans ces dispositifs, même à de faibles concentrations (100, 100 et 10 mg de PHE, PYR et DBA par kg de sable), la mortalité des plantes a drastiquement augmenté (jusqu'à 93%), alors même que l'ajout de HAP à des concentrations cinq fois plus élevées en conditions non stériles n'affectait ni la biomasse ni la survie des plantes. Ceci pourrait être dû à une combinaison des facteurs suivants : i) une fragilisation des plantules liée à la méthode de stérilisation ou de germination, ii) l'importante humidité de l'atmosphère dans les dispositifs, iii) à la présence de HAP dans l'atmosphère malgré son renouvellement, iv) à la teneur en HAP dans le sable ou v) au sable lui-même, moins propice qu'un sol à la culture de la luzerne. Les HAP

volatilisés sont en effet susceptibles d'être adsorbés et internalisés via les parties aériennes des plantes, altérant leur survie et leur croissance (Oguntimehin et al., 2008). Henry et al. (2006) ont mis au point un dispositif de culture axénique disposant d'un système de ventilation et placé sous hotte à flux laminaire (Fig. 42.D). L'utilisation d'un dispositif de ce type, adapté à l'étude des HAP pourrait être envisagée pour s'affranchir des problèmes de saturation de l'atmosphère en HAP et en eau. Un poste de sécurité microbiologique, garantissant à la fois la stérilité de l'enceinte et la filtration des gaz toxiques, devrait alors être utilisé. Par ailleurs, ces auteurs ont également utilisé un gradient vertical de granulométrie du sable (les particules les plus grosses en bas) dans le compartiment comprenant les parties racinaires, garantissant une répartition idéale de l'humidité pour une croissance et une survie optimale des plantes (plus de 70 jours). Ce type de gradient n'est pas envisageable pour une étude de la biodégradation des HAP puisque non compatible avec une répartition homogène des polluants.

Dans les dispositifs de culture stérile, une éventuelle pathogénicité des microorganismes inoculés est à écarter puisque la mortalité et la biomasse végétales ne diffèrent pas entre les traitements (A, F, A+F et NI). Ces résultats sont en concordance avec les tests d'innocuité, qui n'ont montré aucune inhibition de croissance de la luzerne par *F. solani* et *A. oxydans*. Il n'existe pas, à notre connaissance, de souches phytopathogènes d'*Arthrobacter oxydans*. En revanche, les légumineuses, telles que le pois, le haricot ou la luzerne sont des cibles préférentielles de la pathogénicité des *Fusarium solani* (Salzer et al., 2000; Infantino et al., 2006; Naseri & Marefat, 2011). L'espèce *Fusarium solani* est aujourd'hui considérée comme un vaste ensemble, appelé *Fusarium solani* species complex (FSSC) constitué d'au moins 45 sous-espèces. L'appellation de ces sous-espèces est basée sur leur hôte végétal naturel : par exemple *F. solani* f. sp. *pisi* est un pathogène du pois et *F. solani* f. sp. *piperis* un pathogène du poivrier (O'Donnell, 2000). Si le FSSC est principalement étudié dans le cadre de la lutte contre les fusarioses végétales responsables de fortes pertes économiques (Salzer et al., 2000; Infantino et al., 2006; Naseri & Marefat, 2011), de nombreuses souches de *F. solani* non pathogènes ont été isolées et sont même étudiées comme agent de biocontrôle contre des souches phytopathogènes de *Fusarium* (Trillas & Segarra, 2009; Rep & Kistler, 2010; Patil et al., 2011).

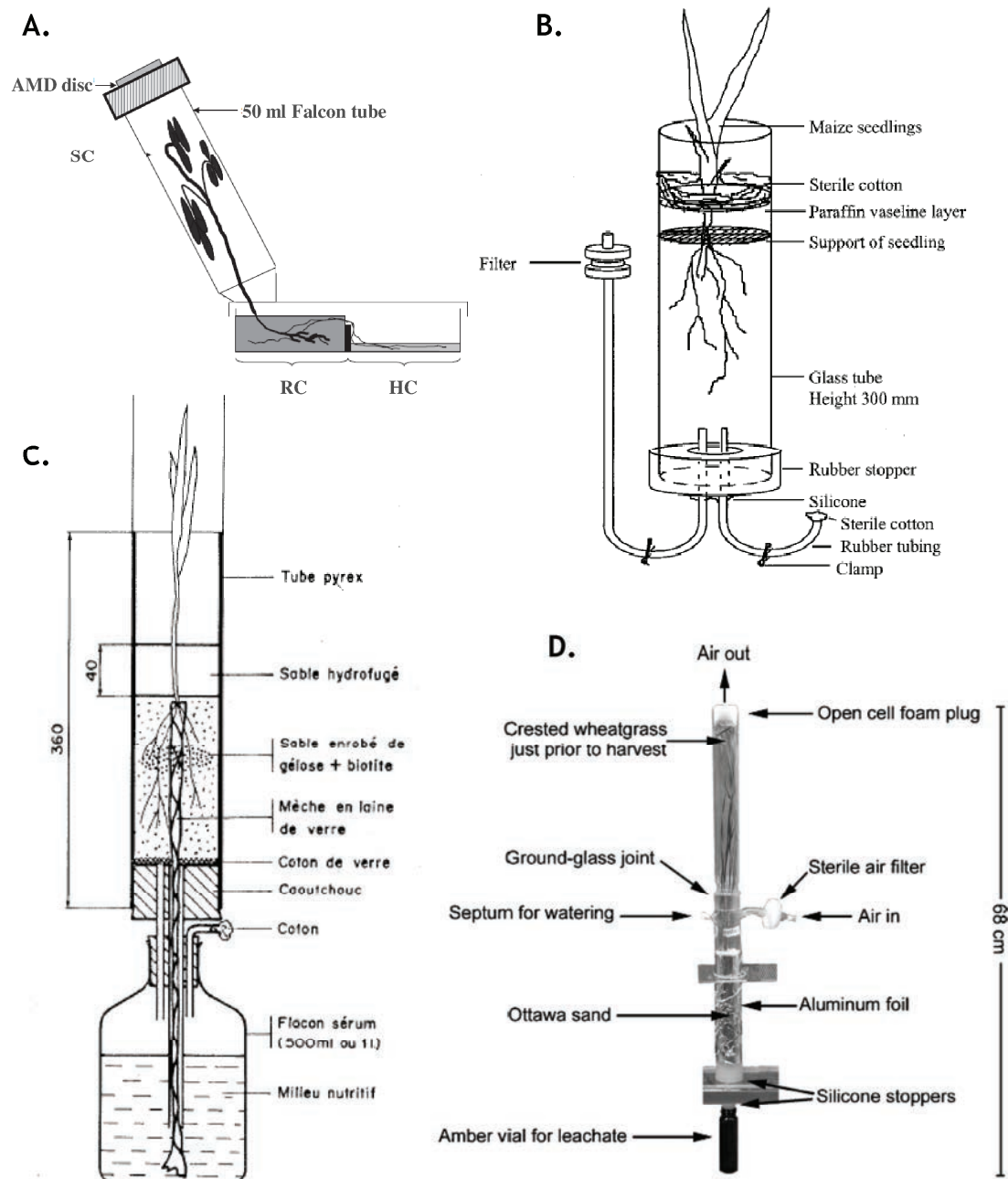


Figure 42. Exemples de dispositifs expérimentaux de culture axénique/monoxénique de plantes. A. Culture en milieu nutritif gélosé, SC : compartiment des feuilles, RC : compartiment pour racines et HC : compartiment pour les hyphes de champignons mycorhiziens, AMD disc : disque en polypropylène laminé empêchant la contamination microbienne et permettant les flux gazeux (De Boulois et al., 2006). B. Culture en hydroponie : les parties aériennes, exposées à l'air libre, sont séparées des parties racinaires, immergées dans une solution nutritive axénique, par un film de paraffine (Groleau-Renaud, 1998). C. Culture en sable stérile enrobé de gélose : les parties aériennes, exposées à l'air libre, sont isolées du sable par une couche de sable hydrofugé ; une mèche en laine de verre reliée au flacon de solution nutritive imbibe la colonne de sable par capillarité et un tube en verre fermé au coton cardé permet les échanges gazeux entre le sable et le milieu extérieur (Leyval, 1981). D. Culture en sable stérile avec système de récupération des lixiviats et exsudats racinaires : dans le compartiment racinaire, un gradient de granulométrie de sable est utilisé (les grains les plus gros à la base) ; les dispositifs sont maintenus sous hotte à flux laminaire ; un système de flux d'air traversant empêche la condensation sur les parois de la colonne en verre (Henry, 2006).

Les deux microorganismes ont survécu et se sont même multipliés au cours des 21 jours, comme l'ont montré les résultats de PCR en temps réel ciblant les gènes codant pour les ARNr 16S et 18S (Fig. 39). Cette croissance n'était en revanche pas significative lorsqu'elle était évaluée par comptage des UFC. De plus, alors qu'on observe peu de différence entre le nombre d'UFC d'*A. oxydans* et le nombre de copies de 16S, le nombre de copies de 18S était de trois à quatre ordres de grandeur supérieur au nombre d'UFC de *F. solani*, même lorsqu'il se trouvait à l'état de macrospores (J0). Ceci peut s'expliquer par un nombre de copies du gène codant l'ARNr 18S compris entre plusieurs dizaines et plusieurs milliers par génome chez les eucaryotes (Rooney & Ward, 2005). De plus, toutes les cellules des propagules, tant des macrospores que des hyphes, ne forment pas systématiquement de colonies distinctes sur boîte. La PCR en temps réel pourrait également avoir quantifié des gènes appartenant à des cellules mortes, mais les observations microscopiques suggèrent que le champignon était toujours viable après 21 jours (Fig. 40). Si le nombre de copies de gènes codant les ARNr ne peut pas être directement relié au nombre de cellules (Smith & Osborn, 2009), la PCR en temps réel, moins dépendante de l'état physiologique des cellules, s'est avérée la méthode la plus sensible dans le cadre de notre expérience.

F. solani et *A. oxydans*, possédant pourtant de bons potentiels de dissipation *in vitro* (voir Chapitres III-2 et III-3), n'ont pas influencé le devenir des HAP dans ces dispositifs après 21 jours lorsqu'ils étaient inoculés seuls. Toutefois, il faut souligner une variabilité importante des teneurs en HAP entre les réplicats. Par ailleurs, la diminution des teneurs en PHE dans tous les traitements, qui pourrait être liée en partie à des processus abiotiques comme la volatilisation et/ou l'adsorption sur les surfaces du dispositif en contact avec le sable (PVC) ou les racines de luzerne (Binet et al., 2000) a pu masquer un éventuel effet des microorganismes inoculés.

La co-inoculation par *A. oxydans* Pyr2MsHM11 et *F. solani* MM1 (A+F) n'a pas entraîné d'inhibition de la croissance des microorganismes par rapport aux dispositifs monoxéniques (A et F), indiquant l'absence d'effet antagoniste entre les deux souches dans du sable, contrairement à ce qui a été montré précédemment en milieu liquide (Chapitre III-3). Pour la bactérie, le nombre de copies de gènes codant les ARNr 16S semblait même supérieur en présence du champignon (Fig. 39). Or, bien que la concentration en PHE ait diminué dans tous les traitements au cours des 21 jours, cette diminution n'était significative que dans les dispositifs co-inoculés, suggérant un effet de la double inoculation sur la dissipation du PHE. Les teneurs en PYR et DBA n'ont en revanche pas été affectées significativement. La dissipation moins importante des HAP de poids moléculaires élevés est très souvent observée, qu'elle implique des processus abiotiques ou biotiques (Park et al., 1990; Corgié et al., 2006a; Zhou et al., 2009; Biache et al., 2011).

Bien que la biomasse des luzernes ait été très faible, les microorganismes introduits se sont installés. On peut s'interroger sur le substrat de croissance des deux souches dans le sable, où les seules sources de carbone étaient, d'une part, les HAP ajoutés et, d'autre part, les exsudats racinaires. Les deux

microorganismes ont pu bénéficier de l'apport de matière organique par les plantes. Nous avons montré dans le chapitre précédent (Chapitre III-3, Thion et al., 2012) que *F. solani* MM1 n'était pas capable de croissance sur HAP comme seule source de carbone. Dans cette expérience, *F. solani* a pu croître en utilisant les exsudats ou les racines mortes comme source de carbone (Kaur et al., 2010). Cette hypothèse est soutenue par les observations microscopiques montrant le champignon sous forme d'hyphes dans et sur les racines et sous forme de spores dans le sable plus éloigné des racines. En effet, ceci pourrait indiquer que la germination des spores inoculées a été induite par les racines, puisqu'il est connu que la germination des spores de *F. solani* peut être induite par l'exsudation de flavonoïdes par les légumineuses (Bagga & Straney, 2000). Le champignon pourrait également avoir sporulé dans le sable éloigné des racines car les conditions nutritives y étaient défavorables (Malloch & Blackwell, 1992). De plus, Wainwright (1992) mentionne de nombreuses études montrant l'oligocarbotrophie, c'est-à-dire la capacité à croître dans des milieux très pauvres en carbone, des champignons *Fusarium*. Considérant les résultats du Chapitre III-3 (Thion et al., 2012), *A. oxydans* a pu utiliser les deux sources de carbone, HAP comme exsudats racinaires. Par ailleurs, en utilisant le même calcul que celui présenté au Chapitre III-2, la masse nette de carbone correspondant à la biomasse bactérienne peut être évaluée à environ 27 µg par g de sable, valeur équivalente à celle des écarts types des teneurs en PHE (environ 30 µg.g⁻¹ de sable). Par conséquent, il est possible que le carbone nécessaire à la croissance bactérienne ait été issu des HAP, sans que cette consommation ne soit détectable avec les méthodes de dosages des HAP utilisées ici. Bien qu'il ne soit pas possible dans cette expérience de déterminer la source de carbone utilisée par les bactéries, il faut souligner qu'en présence d'exsudats racinaires, Louvel et al. (2011) ont observé un ralentissement de la dégradation du PHE par un consortium bactérien. L'internalisation des HAP par *F. solani*, préalablement mise en évidence en milieu liquide (Chapitre III-3, Thion et al., 2012), a été confirmée ici par l'observation microscopique de vésicules intracellulaires autofluorescentes aux UV. Là encore, les quantités accumulées par le champignon pourraient être inférieures au seuil de détection des méthodes de dosage.

Conclusion

Le travail présenté ici a abouti à la conception d'un dispositif expérimental de culture stérile de luzerne capable de maintenir le milieu stérile dans 78% des cas. Ce dispositif s'est avéré compatible avec la croissance de *F. solani* et *A. oxydans* Pyr2MsHM11 en présence de luzerne et de HAP, y compris lorsqu'ils étaient co-inoculés. La présence du champignon a même semblé favoriser la multiplication de la bactérie dans les dispositifs co-inoculés, dans lesquelles la dissipation du PHE en 21 jours était significative. Ce résultat contraste avec l'interaction négative observée dans les cocultures des deux microorganismes en milieu liquide qui avait affecté leurs potentiels de dissipation des HAP (Chapitre III-3). Une expérience de ce type réalisée avec du PHE marqué (SIP) pourrait s'avérer intéressante pour

déterminer la participation des deux souches à la dissipation observée. Par ailleurs, des modifications doivent être apportées à ce dispositif, notamment en termes d'aération, pour améliorer les conditions de croissance des plantes en présence de HAP.

Chapitre III-5 :

Etude de la dissipation des HAP dans
un sol non stérile, planté avec de la
luzerne (*Medicago sativa*), et inoculé
avec *Fusarium solani* et/ou
Arthrobacter oxydans

Résumé

Le champignon *F. solani* MM1 et la bactérie *A. oxydans* Pyr2MsHM11 isolés à partir du sol de Neuves-Maisons ont montré de bons potentiels de dissipation des HAP *in vitro* (Chapitre III-1 à III-3) et ont été capables de coloniser un sable pollué aux HAP et planté avec de la luzerne en conditions stériles (Chapitre III-4). Les objectifs de cette expérience étaient d'observer leur capacité à coloniser un sol pollué aux HAP en présence d'une microflore indigène et d'évaluer l'impact de la présence de plantes sur cette colonisation et sur leurs potentiels de dissipation des HAP. Les deux souches ont donc été inoculées ensemble ou séparément dans des microcosmes contenant un sol agricole (sol de la Bouzule, non stérile) artificiellement contaminé avec un mélange de trois HAP (PHE, PYR et DBA, à 500, 500 et 50 mg.kg⁻¹) et en présence ou non de luzerne. Des marqueurs génétiques ont été choisis comme indicateurs de la présence de *F. solani* MM1 et *A. oxydans* Pyr2MsHM11, sur la base de leur taxonomie (ITS des champignons du genre *Fusarium* et ARNr 16S des Actinobactéries) et de leur potentiel métabolique (gènes codant les (PAH-RHD) α des bactéries à Gram positif). Ces marqueurs, quantifiés par PCR en temps réel, ont bien permis de vérifier l'inoculation des souches au début de l'expérience, suggérant leur applicabilité à cette expérience. Cependant, aucune des deux souches n'était quantifiable après 46 jours, qu'elles aient été inoculées seules ou co-inoculées et en présence ou non de plante. La microflore indigène du sol de la Bouzule s'est adaptée très rapidement à la pollution aux HAP, comme le montre l'augmentation de deux ordres de grandeur de la proportion de bactéries à Gram positif capables de dégrader les HAP. Cette adaptation s'est traduite par une dissipation de 91% du PHE et 56% du PYR en 46 jours, sans effet significatif de l'inoculation, ni de la présence ou non de la luzerne. Par ailleurs, les structures des communautés bactériennes et fongiques ont été explorées par PCR-TTGE ciblant les gènes codant respectivement les ARNr 16S et 18S. La communauté bactérienne a été fortement influencée par la présence de plantes et, en absence de plante, par les inoculations. Par ailleurs, la diversité des bactéries était significativement plus élevée, et celle des champignons plus faible, dans le sol inoculé par *A. oxydans*. L'évolution de la structure de la communauté fongique en 46 jours n'a pas été influencée de manière aussi marquée par les plantes ou l'inoculation. L'indice de diversité de Shannon était moins élevé dans le sol planté, en raison d'une forte dominance des champignons du genre *Fusarium*. D'autres marqueurs, plus spécifiques des souches inoculées, devraient être développés pour suivre plus précisément leur capacité de colonisation. Par ailleurs, la part active des communautés microbiennes, y compris des inocula, pourrait être explorée par les mêmes méthodes de biologie moléculaire appliquées sur les ARN. Les résultats de cette expérience réalisée au laboratoire et à court terme, contrastant avec ceux obtenus *in situ* et à long terme (Chapitre III-1), illustrent la complexité des réseaux d'interactions rhizosphériques et mettent en évidence l'importance primordiale des échelles spatiales et temporelles dans l'observation de la structure des communautés microbiennes.

Introduction

Dans les expériences précédentes, le champignon *Fusarium solani* MM1 et la bactérie *Arthrobacter oxydans* Pyr2MsHM11, isolés à partir du sol multipollué aux HAP et aux ETM (Chapitre III-1), ont montré de bons potentiels de dissipation des HAP *in vitro* (Chapitre III-2 et III-3). Par ailleurs, alors que des interactions négatives ont limité la croissance et les potentiels métaboliques des deux souches lorsqu'elles étaient co-inoculées en culture liquide (Chapitre III-2), aucune des deux n'a montré d'inhibition de croissance dans des microcosmes stériles avec du sable en présence de plantes (Chapitre III-4). De plus, dans ces dispositifs stériles, la dissipation du PHE était significative uniquement dans les dispositifs co-inoculés. Ces précédentes conditions expérimentales restaient néanmoins assez éloignées du sol rhizosphérique d'origine des deux souches modèles, siège de nombreuses et complexes interactions, avec la plante mais aussi avec le reste de la microflore. De plus, les HAP étaient probablement très disponibles dans cette expérience car leur adsorption sur le sable est connue pour être très faible (Amellal et al., 2001b). L'objectif de cette expérience était donc d'évaluer les effets de la présence d'une plante, la luzerne, et de la microflore indigène sur la survie et le potentiel de dissipation des HAP de *F. solani* et *A. oxydans* dans des microcosmes de sol. Afin de s'affranchir des problèmes de très faible biodisponibilité des HAP dans les sols anciennement contaminés (Allard et al., 2000; Chiapusio et al., 2007; Alavi et al., 2008), il a été choisi de réaliser cette expérience dans un sol agricole artificiellement contaminé aux HAP, après un vieillissement de deux semaines, présentant une situation intermédiaire entre un sable et une contamination ancienne (Cébron et al., 2011). Dans ces conditions, des travaux précédents avaient montré que la dissipation de HAP de poids moléculaire relativement faible comme le PHE se produisait en quelques semaines, même lorsque la microflore de ces sols n'était pas pré-adaptée (Chiapusio et al., 2007; Zhou et al., 2009; Zhou, 2010). Par ailleurs, le sol a été pasteurisé, afin d'empêcher une éventuelle mycorhization des racines de luzerne, susceptible d'influencer la dissipation des HAP dans la rhizosphère (Binet et al., 2000; Joner & Leyval, 2003; Joner et al., 2006), puis réinoculé avec la microflore indigène. Les matériels et méthodes cités dans les paragraphes suivants sont détaillés dans le Chapitre II.

Matériel & Méthodes

Cette expérience a été réalisée en pots de 500 g contenant un mélange de sable et de sol, plantés ou non avec la luzerne et inoculés ou non avec *A. oxydans* Pyr2MsHM11 et *F. solani* MM1. Le sol utilisé a été stérilisé puis réinoculé avec la microflore du sol et artificiellement contaminé avec un mélange de trois HAP, PHE, PYR et DBA, pour obtenir une concentration finale de 500, 500 et 50 mg kg⁻¹.

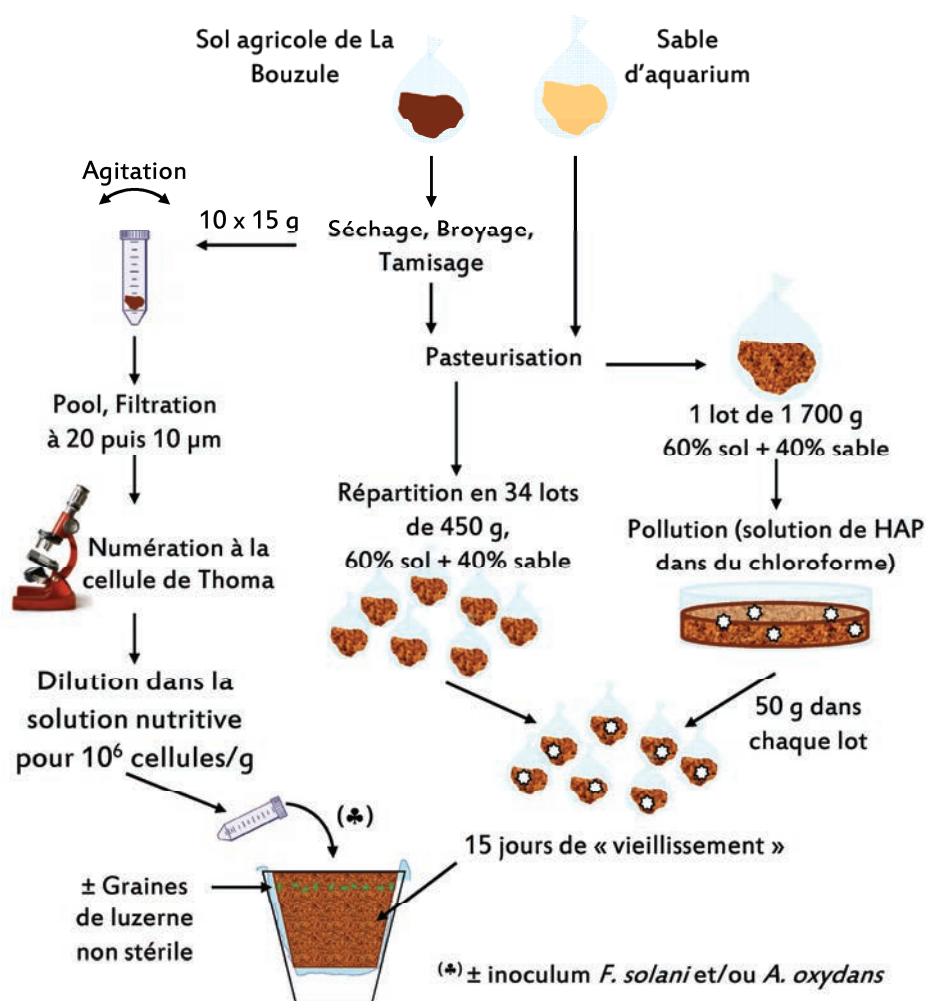


Figure 43. Schéma des différentes étapes de la préparation des microcosmes de sol non stérile.

La Figure 43 montre les différentes étapes de la préparation des microcosmes utilisés dans cette expérience, mises en place pour répondre aux contraintes énoncées dans l'introduction. Le sol agricole de La Bouzule, de nature assez argileuse (Chapitre II § 1.1.2.1), a été mélangé avec du sable d'aquarium avant la contamination (rapport sol-sable 60/40) afin d'optimiser la croissance racinaire. La pollution a été appliquée sur 10% du mélange sol-sable (50 g par pot réunis en un seul lot) qui ont ensuite été « dilués » dans les 34 sachets en plastique contenant les 90% des mélanges sol-sable non pollués (Figure 43), pour une masse finale de 500 g (Chapitre II § 1.1.2.2). Ces sachets ont ensuite été placés pendant 15 jours à l'obscurité et à 4°C pour permettre le « vieillissement » de la contamination. Après le vieillissement, les sachets ont été placés directement dans les pots lors de la mise en route de l'expérience. Le sable et le sol avaient été pasteurisés séparément avant la contamination (voir Chapitre II) et le mélange contaminé a été ré-inoculé avec une suspension de la microflore indigène (concentration théorique de 10^7 cellules par g de sol) préalablement filtrée à 10 µm de diamètre pour éliminer les spores de champignons mycorhiziens (Chapitre II § 1.2.3.4). Cet inoculum ainsi que les inocula des deux souches modèles (concentrations théoriques de 10^7 et 10^4 cellules par g de sol

respectivement pour *A. oxydans* et *F. solani*) ont été mélangés à la solution nutritive de Hewitt modifiée (Chapitre II § 1.3.3.2) pour un volume final de 104 ml par pot qui ont été dispersés à la surface du sol lors de la mise en route de l'expérience.

Huit traitements ont été appliqués, croisant les facteurs de végétation (P : planté et NP : non planté) et d'inoculation des souches modèles (NI : non inoculé où seule la microflore indigène a été ré-inoculée, F : inoculé avec *F. solani* MM1, A : inoculé avec *A. oxydans* Pyr2MsHM11 et A+F : co-inoculé avec les deux souches modèles). Quatre répétitions (=pots) ont été effectuées pour chaque traitement. Deux pots, un inoculé avec les deux souches modèles et la microflore indigène (T0 A+F) et un inoculé seulement avec la microflore indigène (T0 NI), ont été échantillonnés (3 prélèvements par pot) lors de la mise en place de l'expérience.

Dans les pots P, vingt graines de luzerne ont été semées dans chaque pot. Après la germination, le nombre de plantules a été ramené à 11 par pot en retirant les plantules surnuméraires. Les pots ont été placés dans une chambre de culture pendant 46 jours en conditions contrôlées (Chapitre II § 1.3) et ont été arrosées avec une solution nutritive de Hewitt modifiée (Chapitre II § 1.3.3.2).

Après 46 jours de culture, les biomasses aériennes et racinaires de la luzerne ont été récoltées, séchées et pesées. Au début et à la fin de l'expérience, le mélange sol-sable a été homogénéisé à la spatule stérile et échantillonné pour effectuer les analyses suivantes. Les HAP (PHE, PYR et DBA) ont été extraits à l'ASE puis dosés à l'HPLC (Chapitre II § 2.2.2). Les UFC bactériennes et fongiques ont été respectivement comptées sur milieu gélosé LB additionné de cycloheximide et ME additionné de streptomycine (Chapitre II § 2.1.1). Les acides nucléiques ont été extraits (Chapitre II § 2.1.2.1) et les nombres de copies de gènes codant les ARN 18S et 16S totaux ont été quantifiés par PCR en temps réel (Chapitre II § 2.1.2.5).

Afin d'évaluer l'inoculation, la survie et la croissance d'*A. oxydans* Pyr2MsHM11, une Actinobactérie possédant un gène codant pour la (PAH-RHD) α , les nombres de copies de gènes codant les ARNr 16S des Actinobactéries et les (PAH-RHD) α des bactéries à Gram positif, déterminés par PCR en temps réel ont été rapportés à l'abondance bactérienne totale et utilisés comme marqueurs. En parallèle, le nombre de séquences ITS spécifiques du genre *Fusarium* rapporté à l'abondance fongique totale, a été choisi comme indicateur de la survie et de la croissance de *F. solani* MM1. Par ailleurs, la structure des communautés fongiques, bactériennes et des Actinobactéries a été explorée par PCR-TTGE ciblant respectivement les gènes codant pour les ARNr 18S, 16S totaux et 16S d'Actinobactéries (Chapitre II § 2.1.2.6). Les produits des PCR réalisées sur les ADN génomiques des souches pures de *F. solani* MM1 (gels de TTGE 18S) et *A. oxydans* Pyr2MSHM11 (gels de TTGE 16S) ont été déposés sur chaque gel de TTGE comme indicateurs de la distance de migration des ribotypes d'intérêt. Les bandes migrant à la même distance que la bande de référence Pyr2MsHM11 sur les gels de TTGE ciblant les ARNr 16S bactériens, ainsi que les bandes majoritaires, ont été ré-amplifiées et séquencées et leurs séquences ont

été comparées à la base de données Genbank (Chapitre II § 2.1.2.6). La structure des communautés bactérienne et fongique après 46 jours de culture a été analysée par ACP sur la base des matrices générées à partir des fréquences relatives des bandes visualisées sur les gels de TTGE. Les résultats des concentrations en HAP, des données de PCR en temps réel, des indices de diversité de Shannon ainsi que des fréquences relatives des ribotypes correspondant à *A. oxydans* et *F. solani* mesurés à la fin de l'expérience, ont été analysés statistiquement par ANOVA à deux facteurs (plante x inoculum). Ces données ont également été comparées entre T0 NI et T0 A+F (excepté pour les teneurs en HAP où les T0 ont été considérés comme un seul échantillon, l'effet de l'inoculation étant négligeable sur ces variables) et entre le T0 et le 46ème jour (tous traitements confondus) par le test *t* de Student. Les taux de germination ainsi que les biomasses végétales pour les différents traitements ont été comparés par ANOVA à un facteur.

Résultats

1. Paramètres végétaux

Dans les pots semés avec la luzerne, une moyenne de 60% des graines a germé après 5 jours, sans effet significatif de l'inoculation. De la même manière, aucune différence significative dans la biomasse aérienne (130 mg par plante en moyenne) ou racinaire (135 mg par plante en moyenne) n'a été observée entre les traitements (Fig. 44). L'ensemble du volume du mélange sol-sable des pots plantés était colonisé par les racines, ainsi la totalité du mélange a donc été considéré comme rhizosphérique et homogénéisée pour réaliser les prélèvements. Par ailleurs, des observations microscopiques ont confirmé l'absence de colonisation par des champignons mycorhiziens.

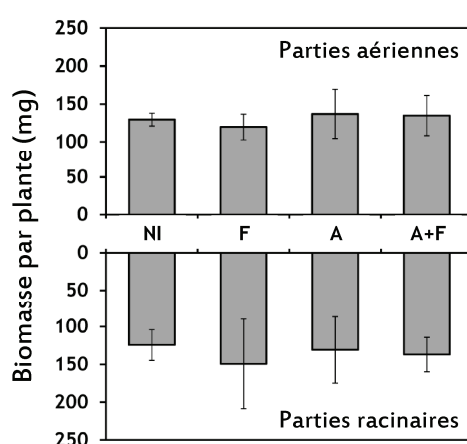


Figure 44. Biomasses aériennes et racinaire des luzernes après 46 jours de culture dans le mélange sol-sable artificiellement pollué aux HAP et non inoculé (NI), inoculé avec *F. solani* (F), *A. oxydans* (A) ou les deux (A+F). Moyennes $\pm$ écart-types ($n = 4$).

2. Communautés microbiennes et survie des microorganismes inoculés

Abondance des populations microbiennes mesurées en UFC et par PCR en temps réel

La Figure 45 présente les résultats des PCR en temps réel au début et à la fin de l'expérience. Pour les abondances des Actinobactéries, des *Fusarium* et des gènes codant pour une (PAH-RHD) α des bactéries à Gram positif, il a été choisi de présenter également les résultats en pourcentages, calculés sur la base du nombre de copies des gènes codant pour les ARNr 16S et 18S totaux. Le Tableau 20 présente les résultats des tests statistiques associés à ces données.

Au temps initial (T0), l'abondance bactérienne totale mesurée par PCR en temps réel était significativement cinq fois plus importante dans le traitement T0 A+F que dans le traitement T0 NI (Fig. 45.A). La même tendance a été retrouvée en UFC bactériennes sur milieu LB additionné de cycloheximide ($2,22.10^8$ pour T0 A+F contre $1,59.10^7$ UFC par g de sol pour T0 NI, $p = 0,057$). La quantité absolue des Actinobactéries était également plus élevée dans le traitement T0 A+F ($1,22.10^7$ copies de gènes codant les ARNr 16S des Actinobactéries par g de sol) que dans le traitement T0 NI ($2,97.10^6$ copies par g de sol) (Fig 45.E). Néanmoins, le pourcentage d'Actinobactéries dans la communauté bactérienne totale n'était pas significativement différent entre les deux traitements T0 (Fig. 45.H). D'autre part, l'abondance en quantités absolues des bactéries à Gram positif possédant le gène codant la (PAH-RHD) α était significativement supérieure dans le traitement T0 A+F, soit $2,43.10^5$ contre $4,21.10^4$ copies par g de sol dans le traitement T0 NI (Fig 45.D), de même que la proportion de cette population par rapport à la communauté bactérienne totale (Fig. 45.G). L'abondance fongique totale, mais également la proportion de champignons par rapport à la communauté bactérienne (rapport 18S/16S), étaient significativement plus élevées dans le traitement inoculé T0 A+F (Fig. 45.B et C). Comme pour les bactéries, la même tendance a été retrouvée en UFC, sur milieu ME additionné de streptomycine ($1,19.10^6$ UFC pour T0 A+F contre $5,53.10^5$ UFC pour T0 NI, $p = 0,101$). En revanche, si l'abondance des *Fusarium* exprimée en quantités absolues était plus élevée d'environ un ordre de grandeur dans le traitement T0 A+F (Fig. 45.F), leurs proportions par rapport à la communauté fongique totale étaient identiques entre les traitements T0 (Fig. 45.I).

Après 46 jours, aucun effet significatif de la plante n'était observable sur l'abondance bactérienne totale mesurée par PCR en temps réel, mais cette abondance a eu tendance à être plus importante dans les traitements A et A+F, inoculés avec *A. oxydans* ($p=0,069$, Fig. 45.A). Cette abondance, mesurée en UFC, était significativement plus élevée ($p=0,026$) dans les pots A+F ($1,01.10^9$ UFC par g de sol) que dans les pots A ($6,12.10^7$ UFC par g de sol). L'abondance des Actinobactéries était supérieure dans les traitements inoculés avec *A. oxydans* (A+F : $3,56.10^7$ et A : $3,24.10^7$ copies de gènes codant les ARNr 16S des Actinobactéries par g de sol) par rapport au traitement non inoculé (NI : $1,77.10^7$ copies par g de sol) (Fig. 45.E). Cependant en exprimant ces données en pourcentage d'Actinobactéries par rapport à la communauté bactérienne totale, cette différence n'était qu'une tendance ($p=0,060$) (Fig. 45.H). Le nombre de bactéries à Gram positif portant des gènes de (PAH-RHD) α et leur pourcentage dans la

communauté bactérienne ont augmenté de manière très importante en 46 jours (augmentation de 75 à 200 fois), passant de moins de 0,04% (moyenne des traitements T0, non significativement différent) à des valeurs de l'ordre de 3 à 8%, tous traitements confondus (Fig. 45.D et G). De plus, alors qu'aucun effet significatif de l'inoculation n'a été observé sur cette population fonctionnelle, son pourcentage par rapport à la communauté bactérienne totale (Fig. 45.G), mais également par rapport à la population des Actinobactéries (données non présentées), était significativement inférieur en présence de plantes.

Concernant les champignons, le nombre de copies de gènes codant les ARNr 18S fongiques totaux (Fig. 45.C), comme le nombre d'UFC ($3,3 \cdot 10^4$ UFC par g de sol en moyenne après 46 jours, tous traitements confondus), n'étaient pas influencés par la présence de plantes. En revanche, dans les pots inoculés avec *F. solani* (A+F et F), le nombre de copies de 18S ainsi que le ratio 18S/16S étaient significativement supérieurs à ceux observés dans les pots non inoculés par le champignon (NI et A) (Fig. 45.B et C). De plus, l'abondance des champignons du genre *Fusarium* a très fortement augmenté dans les pots plantés, pour atteindre $1,75 \cdot 10^5$ copies d'ITS de *Fusarium* par g de sol, soit 4 fois plus que dans les pots non plantés (Fig. 45.F). Cette augmentation est également significative quand les données sont exprimées en pourcentage de *Fusarium* dans la communauté fongique totale, elle est 3,4 fois supérieure en présence de plantes, tous traitements d'inoculation confondus (Fig. 45.I). En revanche, ce pourcentage n'était cependant pas modifié par l'inoculation (Fig. 45.I), malgré des quantités absolues de *Fusarium* supérieures dans les pots inoculés avec *F. solani* (A+F et F, Fig. 45.F).

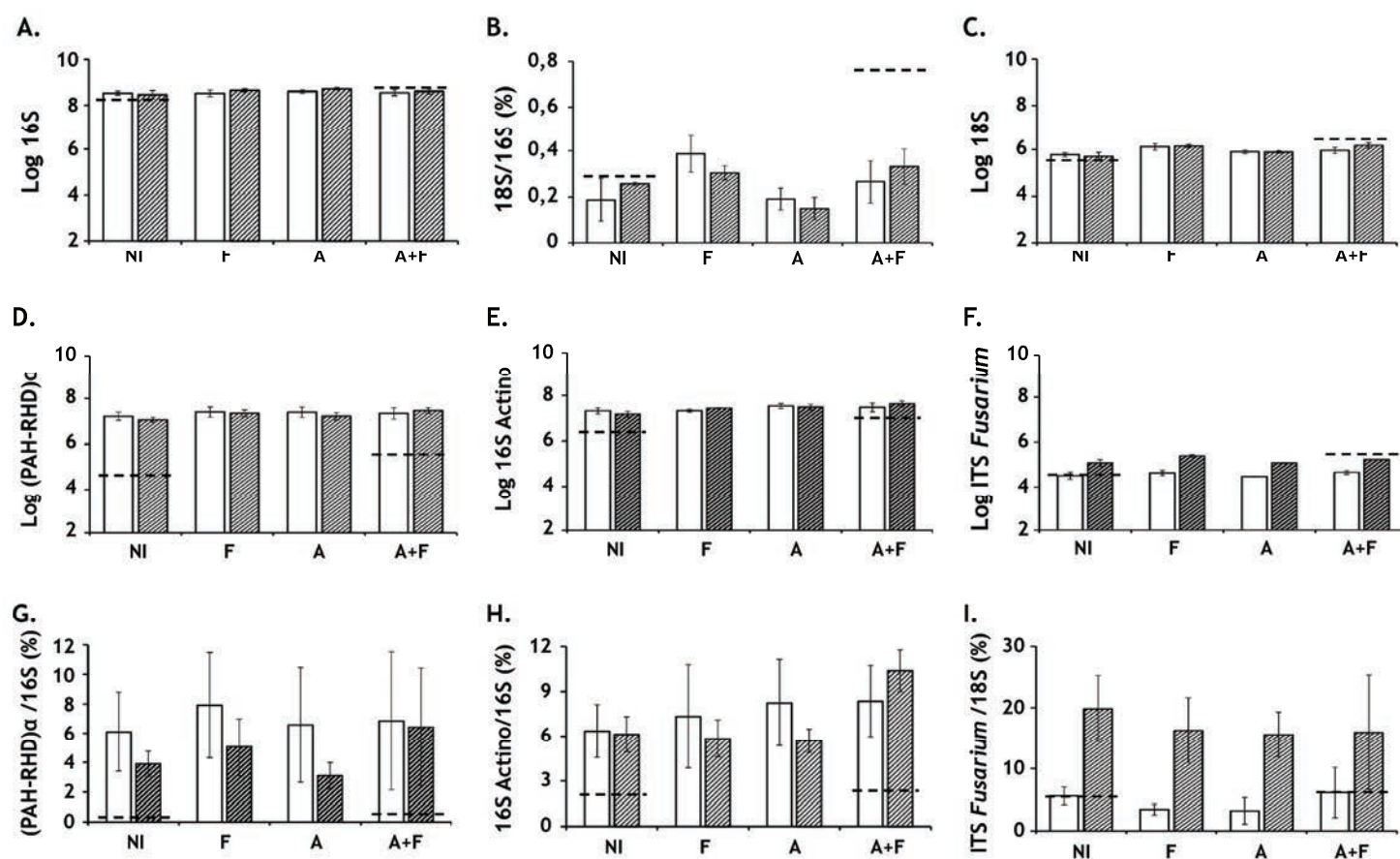


Figure 45. Abondances absolues et/ou relatives des différentes populations microbiennes, déterminées par PCR en temps réel, dans les pots non plantés (barres pleines) ou plantés avec de la luzerne (barres hachurées) et non inoculés (NI) ou inoculés avec *F. solani* (F), *A. oxycdans* (A) ou les deux (A+F). Les données sont présentées en log des valeurs absolues pour les nombres de copies de gènes codant les ARNr 16S bactériens (A), 18S fongiques (C), en pourcentage pour le rapport entre ces deux variables (B), en log des valeurs absolues et en pourcentages par rapport à la communauté bactérienne totale pour les nombres de gènes codant les (PAH-RHD) α des bactéries à Gram positif (D et G), les ARNr 16S des Actinobactéries (E et H) et en log des valeurs absolues et en pourcentages par rapport à la communauté fongique totale pour les ITS des *Fusarium* (F et I). Les lignes en pointillés correspondent aux moyennes des T0. Les moyennes et les écarts types sont présentés (n=4 excepté pour P A ou n=3). Les résultats des tests statistiques correspondants sont présentés dans le Tableau 20.

Variable	Test	Facteur	p-value	Effet		
16S	<i>Student</i>	Inoculation T0	0,002	NI ^a	A+F ^b	
	<i>ANOVA 2F</i>	Plante	0,145			
		Inoculum	0,069			
18S	<i>Student</i>	Inoculation T0	0,002	NI ^a	A+F ^b	
	<i>ANOVA 2F</i>	Plante	0,537			
		Inoculum	0,002	NI ^a	A ^{ab}	A+F ^b F ^b
18S/16S	<i>Student</i>	Inoculation T0	0,002	NI ^a	A+F ^b	
	<i>ANOVA 2F</i>	Plante	0,769			
		Inoculum	0,001	NI ^a	A ^a	A+F ^b F ^b
16S Actinobactéries	<i>Student</i>	Inoculation T0	0,008	NI ^a	A+F ^b	
	<i>ANOVA 2F</i>	Plante	0,681			
		Inoculum	0,003	NI ^a	F ^{ab}	A ^b A+F ^b
16S Actino /16S	<i>Student</i>	Inoculation T0	0,423			
	<i>ANOVA 2F</i>	Plante	0,522			
		Inoculum	0,060			
(PAH-RHD)α	<i>Student</i>	Inoculation T0	< 0,001	NI ^a	A+F ^b	
	<i>ANOVA 2F</i>	Plante	0,101			
		Inoculum	0,211			
(PAH-RHD)α /16S	<i>Student</i>	Inoculation T0	0,006	NI ^a	A+F ^b	
	<i>ANOVA 2F</i>	Plante	0,046	P ^a	NP ^b	
		Inoculum	0,483			
ITS Fusarium	<i>Student</i>	Inoculation T0	< 0,001	NI ^a	A+F ^b	
	<i>ANOVA 2F</i>	Plante	< 0,001	NP ^a	P ^b	
		Inoculum	< 0,001	A ^a	NI ^a	A+F ^b F ^b
ITS Fusarium /18S	<i>Student</i>	Inoculation T0	0,748			
	<i>ANOVA 2F</i>	Plante	< 0,001	NP ^a	P ^b	
		Inoculum	0,509			

Tableau 20. Synthèse des tests statistiques effectués sur les abondances absolues (exprimées en Log) et/ou relatives (exprimées en ratio et non en pourcentage) des différentes populations microbiennes présentées dans la Figure 45, déterminées par PCR en temps réel dans les pots non plantés (NP) ou plantés avec de la luzerne (P) et non inoculé (NI) ou inoculés avec *F. solani* (F), *A. oxydans* (A) ou les deux (A+F). Des lettres différentes indiquent, dans l'ordre croissant, des résultats significativement différents selon les tests de Student comparant les données des T0 NI et T0 A+F et les ANOVA à deux facteurs comparant les données après 46 jours de culture (aucun effet significatif des interactions des facteurs « plante » et « inoculum »).

Structure des communautés microbiennes

La structure de la communauté bactérienne, étudiée par PCR-TTGE ciblant les ARNr 16S totaux, a été modifiée au cours des 46 jours d'incubation, de manière différente selon les traitements (Fig. 46 et 47).

Tout d'abord, le nombre de ribotypes bactériens par pot a augmenté significativement, passant de 15,2 ribotypes en moyenne pour les T0, sans différence significative entre les NI et les A+F, à 22,2 en moyenne en 46 jours. A cette date, le nombre de ribotypes bactériens dans les pots inoculés avec *A. oxydans* (A) était significativement plus élevé que dans les autres traitements ($p=0,004$, Fig. 47). Cette différence a également été observée en calculant les indices de diversité de Shannon H' à partir de ces données (Fig. 46.A). Néanmoins, aucun effet de la plante sur le nombre de ribotypes bactériens, ni sur l'indice de diversité de Shannon H' , n'a été observé. L'effet de la plante était en revanche bien visible sur l'ACP, réalisée sur la base de la matrice des abondances relatives des ribotypes, qui montre une nette discrimination des traitements plantés et non plantés sur l'axe 1 et des dates de prélèvements (T0 et 46 jours) sur l'axe 2 (Fig. 46.B). Par ailleurs, alors que les traitements plantés sont tous regroupés sur l'ACP, l'axe F1 discrimine au sein des traitements non plantés les pots non inoculés (NP NI), les pots inoculés avec *F. solani* seul (NP F) et les pots inoculés avec *A. oxydans* seul ou en co-inoculation avec le champignon (NP A et A+F). Il faut noter toutefois que les axes de cette représentation graphique sont assez peu discriminants (seulement 26% de la variabilité expliquée). Les bandes migrant à la même distance que celle de la souche pure *A. oxydans* Pyr2MsHM11 présentaient toutes des identités de séquence supérieures à 99% avec celle de la souche modèle (Tableau 21). Néanmoins, l'abondance relative de ce ribotype ne présentait pas de différence significative entre les traitements, inoculés ou non par *Arthrobacter oxydans*, que ce soit à T0 comme après 46 jours (données non montrées). Les résultats des identifications des séquences obtenues à partir des bandes dominantes sur TTGE sont présentés dans le Tableau 21, ainsi que la comparaison de l'intensité relative de ces bandes entre les traitements. Si certains des ribotypes majoritaires n'ont pas été affectés par les différents traitements, les abondances relatives de certains autres ribotypes ont varié en fonction de la présence de plante et/ou de l'inoculation.

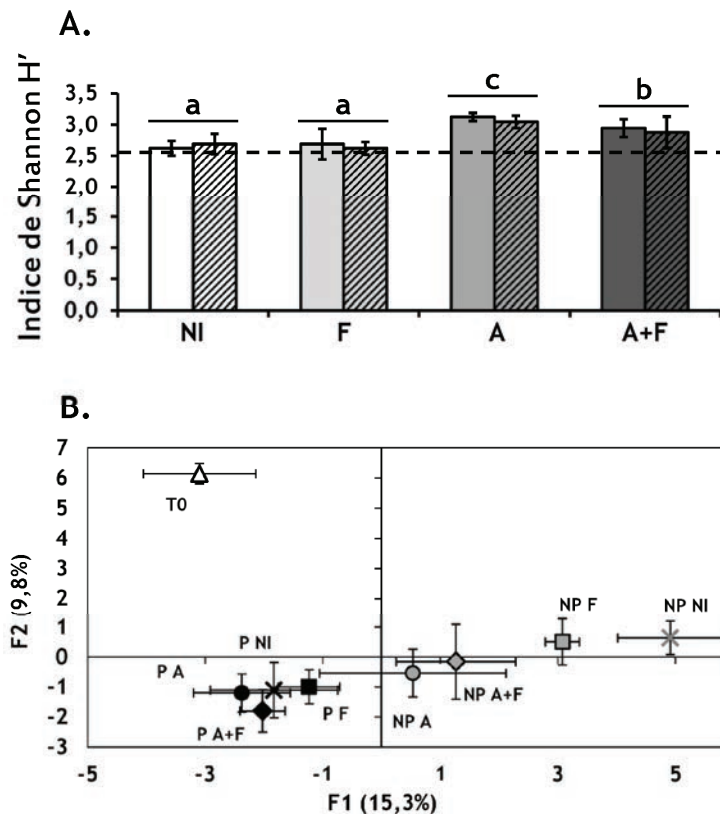


Figure 46. Indice de diversité de Shannon H' et analyse en composante principale de la structure des communautés bactériennes après 46 jours dans les pots non plantés ou plantés avec de la luzerne et non inoculé (NI) ou inoculés avec *F. solani* (F), *A. oxydans* (A) ou les deux (A+F). Résultats basés sur l'analyse de la matrice (présence/absence et abondance relative) des bandes sur gel TTGE ciblant les gènes codant les ARNr 16S bactériens. A : Indices de diversité de Shannon : la ligne en pointillé correspond aux moyennes des T0 ; les barres pleines correspondent aux pots non plantés, les barres hachurées aux pots plantés ; des lettres différentes indiquent une différence significative ; les moyennes et les écarts types sont présentés (n=4 excepté pour P A ou n=3). B. Analyse en Composantes Principales, réalisée sur la base d'une matrice de corrélation de Pearson.

Plus proche voisin	Rib.	N° d'Acc.	% id	Origine	Effet des traitements
<i>Arthrobacter oxydans</i>	1	JF345081	99	Souche Pyr2MsHM11 inoculée	-
<i>Xanthomonas</i> sp.	2	AF13997	98	Sédiments (souche alcalo-halophile)	-
<i>Verrucomicrobium</i> sp.	3	FN554391	97	Rhizosphère de l'ail	P > NP (p=0,006)
Acidobactérie non cultivée	4	HM062110	100	Agrosystème (rotation maïs, soja, blé)	-
Alphaproteobactérie non cultivée	5	EF540429	97	Sol pollué au coke de pétrole	P > NP (p<0,0001) A = A+F > F = NI (p<0,0001)
Alphaproteobactérie non cultivée	6	JF502995	100	Boues activées	NP > P (p<0,0001)

Tableau 21. Identification des ribotypes bactériens majoritaires (bandes les plus intenses sur gels TTGE ciblant les gènes codant les ARNr 16S), et pourcentage d'identité par rapport au plus proche voisin identifié dans les bases de données GenBank. Rib : numéro du ribotype sur la Figure 47. N° d'Acc : numéros d'accèsion Genbank ; % id : pourcentage d'identité. Les comparaisons de séquences ont été réalisées grâce au logiciel BlastN. Les effets des traitements présentés sont ceux révélés par les ANOVA à deux facteurs (plante x inoculum) sur les abondances relatives des ribotypes correspondants.

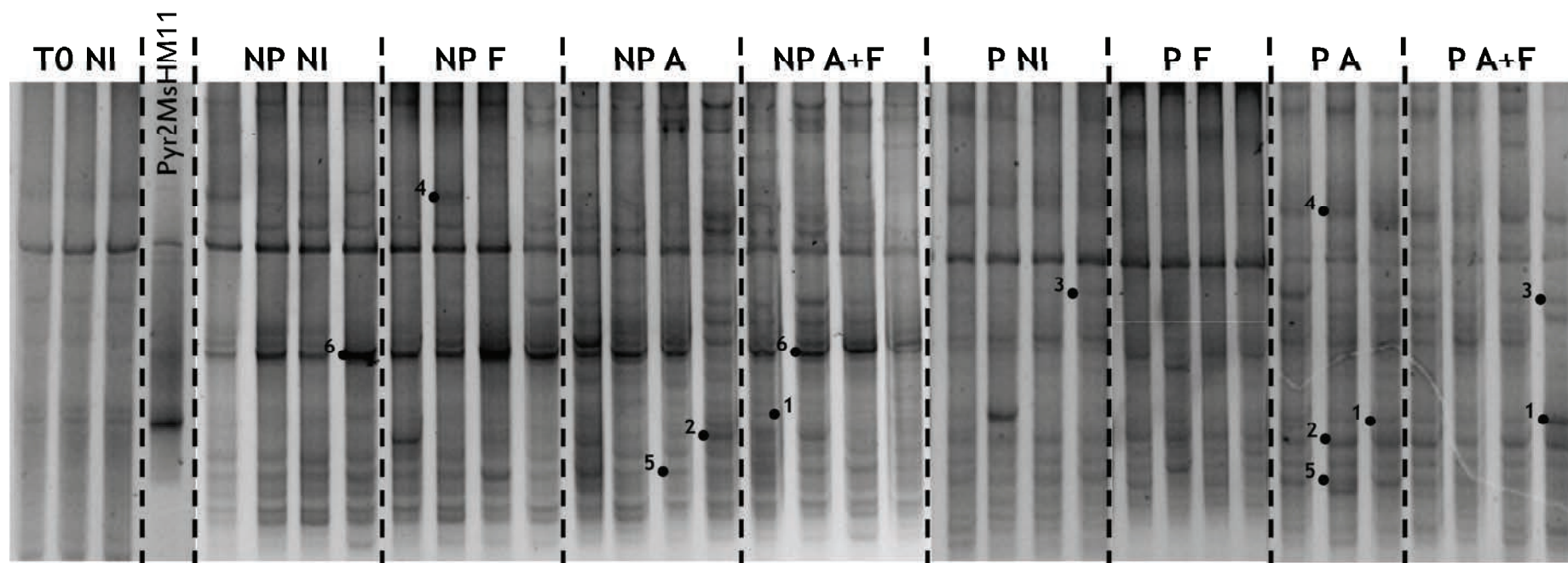


Figure 47. Gels de TTGE ciblant les gènes codant les ARNr 16S totaux au temps initial (T0) et après 46 jours dans les pots plantés (P) et non plantés (NP), non inoculés (NI) ou inoculés avec *F. solani* MM1 (F), *A. oxydans* Pyr2MsHM11 (A) ou les deux (A+F). Les bandes numérotées ont été découpées, ré-amplifiées et séquencées (voir Tableau 21).

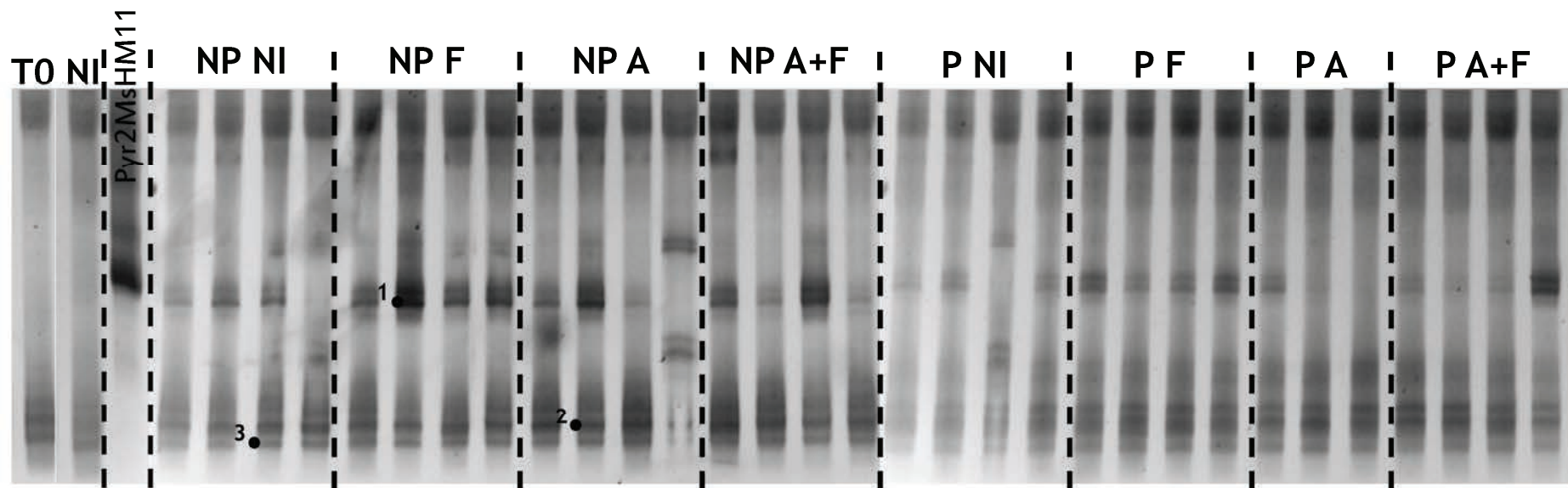


Figure 48. Gels de TTGE ciblant les gènes codant les ARNr 16S des Actinobactéries au temps initial (T0) et après 46 jours dans les pots plantés (P) et non plantés (NP), non inoculés (NI) ou inoculés avec *F. solani* MM1 (F), *A. oxydans* Pyr2MsHM11 (A) ou les deux (A+F). Les bandes numérotées ont été découpées, ré-amplifiées et séquencées (voir Tableau 22).

La structure de la population d'Actinomycètes a également été explorée par TTGE, mais les profils étaient tous très proches entre les différents traitements et entre le temps initial et le 46ème jour, présentant un nombre moyen de 7 ribotypes (Fig. 48). Les résultats des comparaisons des séquences des bandes majoritaires sont présentés dans le Tableau 22. Il faut noter qu'aucune bande migrant à la même distance que la bande de référence d'*A. oxydans* Pyr2MsHM11 n'a été détectée sur ces gels de TTGE.

Plus proche voisin	Rib.	N° d'Acc.	% id	Origine
<i>Mycobacterium vanbalenii</i>	1	JN590245	99	Sol pollué au pétrole brut
<i>Rhodococcus phenolicus</i>	2	JN180180	97	Sol (nd)
<i>Mycobacterium petroleophilum</i>	3	JN377676	97	Sol (nd)

Tableau 22. Identification des ribotypes d'Actinobactéries majoritaires (bandes les plus intenses sur gels TTGE ciblant les gènes codant les ARNr 16S des Actinobactéries), et pourcentage d'identité par rapport au plus proche voisin identifié dans les bases de données GenBank. Rib : numéro du ribotype sur la Figure 48. N° d'Acc : numéros d'accension Genbank ; % id : pourcentage d'identité. Les comparaisons de séquences ont été réalisées grâce au logiciel BlastN. Les effets des traitements présentés sont ceux révélés par les ANOVA à deux facteurs (plante x inoculum) sur les abondances relatives des ribotypes correspondants.

La diversité des champignons, qu'elle soit exprimée en nombre de ribotypes (8,2 ribotypes par pot en moyenne tous traitements confondus, données non présentées), ou exprimée par l'indice de diversité de Shannon H' (Fig. 49.A), est restée stable dans les pots non inoculés NI et les pots inoculés avec *F. solani*, seul ou en co-inoculation avec *A. oxydans* (F et A+F). En revanche, cette diversité était significativement inférieure dans les pots inoculés avec *A. oxydans* seul (A), ne présentant après 46 jours que 3,9 ribotypes par pot en moyenne et un indice H' deux fois inférieur à celui des autres traitements (Fig. 49.A). De plus, la présence de plante a eu globalement un effet négatif sur l'indice de diversité de Shannon H' ($p=0,034$). Cet effet n'est pas visible lorsqu'on considère le seul nombre de ribotypes par pot (données non présentées). Une dominance très marquée des champignons du genre *Fusarium* a été observée dans les pots plantés. En effet, le ribotype migrant à la même distance que la bande du produit de la PCR réalisée sur la souche pure *F. solani* MM1 présentait une abondance relative de 51% en moyenne dans les pots plantés et de seulement 13% dans les pots non plantés ($p<0,0001$, Fig. 50). L'effet de l'inoculation par la souche de *Fusarium solani* MM1 a été observé dans les pots inoculés avec le champignon seul (F), où l'abondance relative des champignons du genre *Fusarium* avait tendance ($p=0,108$) à être plus élevée que dans les pots non inoculés (NI) ou inoculés avec la bactérie seule (A). Dans cette expérience, la structure de la communauté fongique a subi des modifications moins nettes que celles observées pour la communauté bactérienne. En effet, une importante hétérogénéité entre les profils de TTGE des différents pots au sein d'un même traitement a abouti à l'absence de discrimination des traitements sur l'ACP correspondante, y compris entre les deux dates de prélèvement (Fig. 49.B). Comme pour les bactéries, il faut noter le faible pourcentage de la variabilité expliquée par les traitements (moins de 25%).

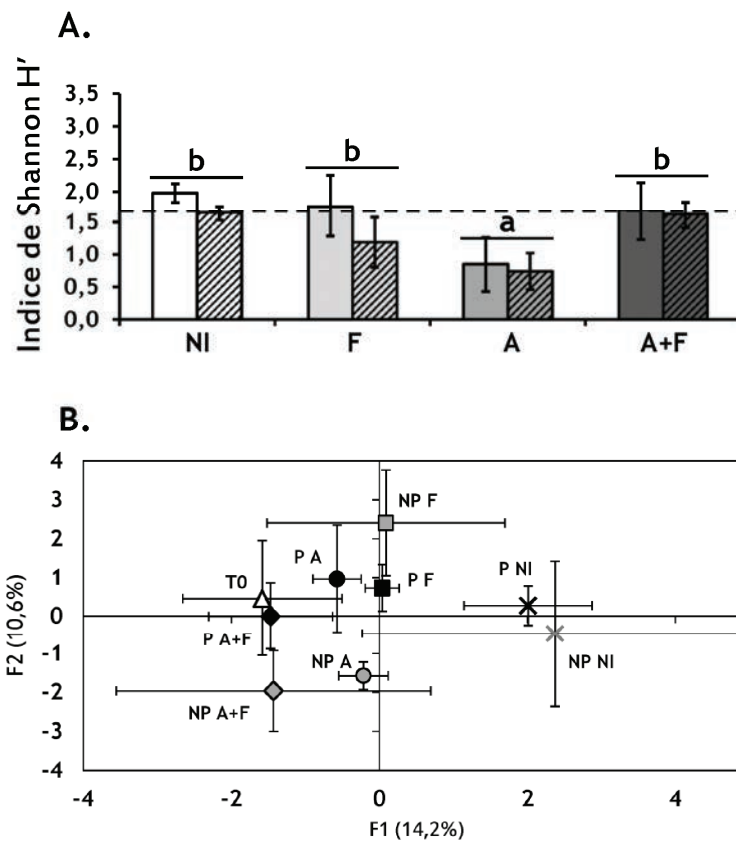


Figure 49. Indice de diversité de Shannon H' et analyse en composante principale de la structure des communautés fongiques après 46 jours dans les pots non plantés ou plantés avec de la luzerne et non inoculé (NI) ou inoculés avec *F. solani* (F), *A. oxydans* (A) ou les deux (A+F). Résultats basés sur l'analyse de la matrice (présence/absence et abondance relative) des bandes sur gel TTGE ciblant les gènes codant les ARNr 18S fongiques. A : Indices de diversité de Shannon : la ligne en pointillé correspond aux moyennes des T0 ; les barres pleines correspondent aux pots non plantés, les barres hachurées aux pots plantés ; des lettres différentes indiquent une différence significative ; les moyennes et les écarts types sont présentés ($n=4$ excepté pour P A ou $n=3$). B. Analyse en Composantes Principales, réalisée sur la base d'une matrice de corrélation de Pearson.

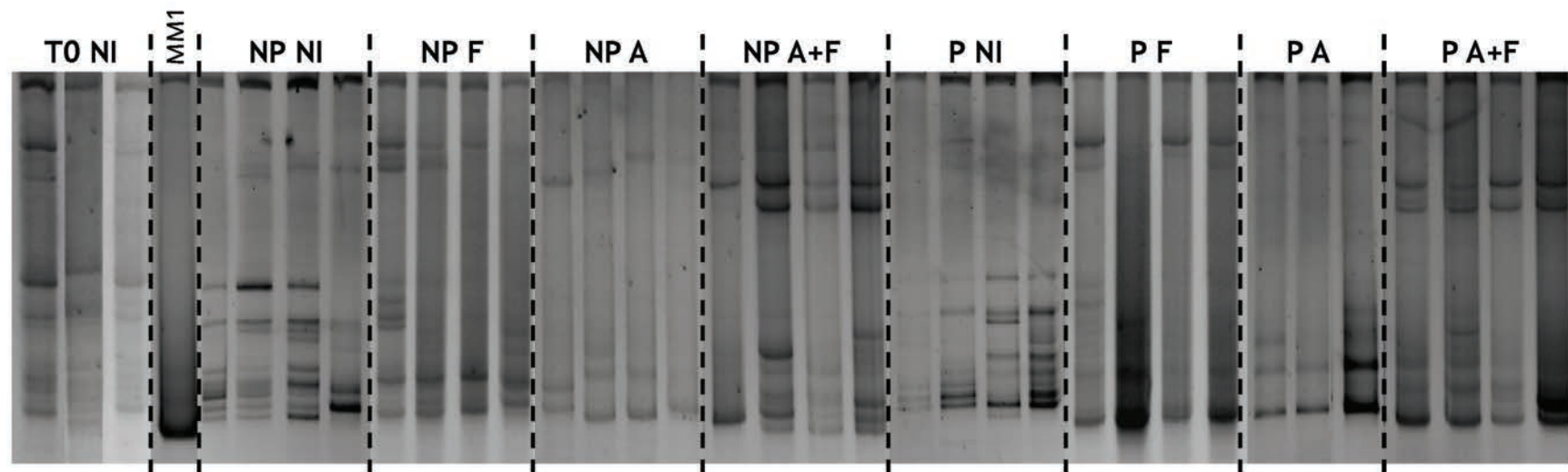


Figure 50. Gels de TTGE ciblant les gènes codant les ARNr 18S fongiques au temps initial (T0) et après 46 jours dans les pots plantés (P) et non plantés (NP), non inoculés (NI) ou inoculés avec *F. solani* MM1 (F), *A. oxydans* Pyr2MsHM11 (A) ou les deux (A+F).

3. Devenir des HAP

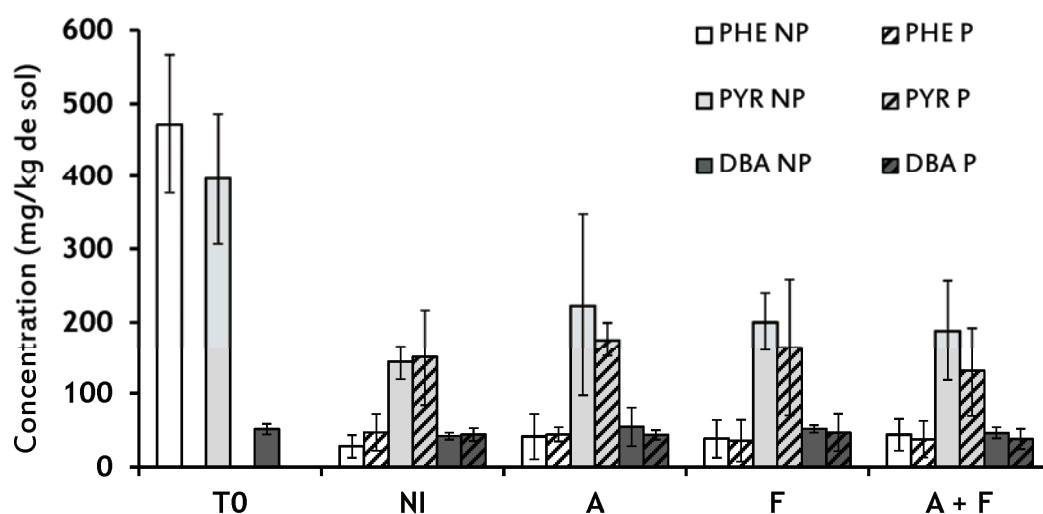


Figure 51. Teneurs en PHE, PYR et DBA au T0 et après 46 jours, dans les pots non plantés (NP, barres pleines) ou plantés avec de la luzerne (P, barres hachurées) et non inoculés (NI) ou inoculés avec *F. solani* (F), *A. oxydans* (A) ou les deux (A+F). Les moyennes et les écarts types sont présentés (n=4 excepté pour P A ou n=3). Les concentrations données pour les T0 sont les moyennes des T0 NI et A+F.

Les teneurs en PHE, PYR et DBA après 15 jours de vieillissement (T0) étaient très proches des concentrations théoriques (500, 500 et 50 mg par kg de mélange sol-sable) (Fig. 51). Après 46 jours, 91% du PHE et 56% du PYR ont été dissipés ($p < 0,0001$), tous traitements confondus. Après 46 jours, aucune différence significative n'a été observée pour aucun des 3 HAP entre les traitements. Le DBA n'a été dissipé significativement dans aucun des traitements mais la comparaison des teneurs en DBA dans les T0 et dans les pots plantés et inoculés par les deux souches (P A+F) par un test t de Student, a montré une tendance à la diminution ($p = 0,057$).

Discussion

Les objectifs de cette expérience étaient d'évaluer l'effet de la présence de plante sur la survie et la croissance des souches modèles *F. solani* MM1 et *A. oxydans* Pyr2MsHM11 inoculées dans une rhizosphère non stérile, c'est-à-dire en présence d'une microflore compétitrice, et sur leurs potentiels de dissipation des HAP. Les modifications des communautés bactériennes et fongiques de cette microflore sous l'influence des plantes et des inoculations ont également été suivies. De plus, les marqueurs génétiques taxons-spécifiques, des gènes codant les ARNr 16S des Actinobactéries et les (PAH-RHD) α des bactéries à Gram positif pour Pyr2MsHM11 et les ITS des champignons du genre

Fusarium pour MM1, ont été choisis comme indicateurs de l'inoculation, de la survie et de la croissance des souches inoculées.

Méthodes de détection des inocula bactériens et fongiques

Très souvent dans les expériences où des souches de bactéries et/ou champignons sont inoculées dans des sols contaminés, ni la présence ni la survie des souches ne sont suivies au cours du temps et quand les auteurs tentent de suivre leur inoculum, les méthodes de traçage des populations introduites restent très peu spécifiques (voir par exemple : Baldrian et al., 2003 ; Jacques et al., 2008 ; Colombo et al., 2011).

Dans le cas de l'inoculation de souches fongiques, le dosage de l'acide gras 18:2 ω 6,9 spécifique des eucaryotes ou des ergostérols spécifiques des champignons sont fréquemment utilisés (Andersson et al., 2000; D'Annibale et al., 2006; Byss et al., 2008). Au même titre que la quantification des ARNr 18S totaux, ce type d'analyse prend en compte, sans la discriminer, la part des populations fongiques indigènes du sol. Il faut noter que dans les études citées ci-dessus, les quantités de 18:2 ω 6,9 ou d'ergostérol étaient très inférieures dans les sols non inoculés, ce qui n'aurait pas été le cas dans notre expérience où l'abondance fongique totale était importante même dans le sol non inoculé par *F. solani*. Si la souche inoculée forme des colonies sur milieu gélosé possédant des caractéristiques macroscopiques rares, il est possible de compter simplement le nombre d'UFC d'intérêt parmi les UFC totales, comme Potin et al. (2004b) l'ont fait pour évaluer la survie dans un sol non stérile de *Cladosporium sphaerospermum* formant des colonies de couleur vert sombre. Bien que *F. solani* MM1 forme des colonies de couleur rouge sur milieu gélosé après 10-15 jours de culture à 24°C, l'aspect morphologique de ces colonies est assez commun avant ce délai. Le temps d'incubation des boîtes de milieu gélosé pour le comptage des UFC fongiques ne devant pas dépasser 4 à 5 jours pour éviter le chevauchement des colonies, cette méthode n'était pas applicable ici. De nombreux autres auteurs ont suivi la croissance des inocula fongiques par de simples observations du mycélium produit, à l'échelle microscopique, mesurant la longueur d'hyphes par g de sol (Gramss et al., 1999b; Gramss & Bergmann, 2007) et souvent même au niveau macroscopique, c'est-à-dire à l'échelle même du microcosme (Lang, 1998; Baldrian, 2003; Atagana et al., 2006; D'Annibale et al., 2006; Federici et al., 2007). Là encore, les auteurs ont admis que la totalité du mycélium visible était produit par la souche inoculée. De plus, ce type d'observations macroscopiques n'est possible qu'avec de très petits volumes de sol, comme dans les études citées ci-dessus, qui n'utilisaient pas plus de 40 g de sol par microcosme. Enfin, de nombreuses études ne font mention d'aucun contrôle ciblé de la croissance des souches fongiques inoculées, utilisant parfois des méthodes indirectes de mesure de l'activité microbienne totale, comme l'analyse des activités respiratoires ou enzymatiques globales (Canet et al., 2001; In Der Wiesche et al., 2003; Potin et al., 2004a; Mollea et al., 2005; Jacques et al., 2008). La PCR en temps réel ciblant les gènes codant les ARNr 18S fongiques totaux et les ITS des champignons du genre *Fusarium* apparaît comme une méthode de traçage de l'inoculum fongique plus spécifique que celles utilisées dans les études du même type. Néanmoins, si cette approche s'est révélée suffisamment efficace pour détecter

l'inoculation à T0, elle ne permettait pas de discriminer la souche inoculée des autres champignons du genre *Fusarium* et donc d'affirmer avec certitude que le champignon avait survécu jusqu'à la fin de l'expérience (voir § suivant). Il existe quelques précédents de modifications génétiques de souches de champignons du genre *Fusarium* qui pourraient être adaptées à la présente application bien qu'elles nécessitent un très important travail de mise au point. Différentes souches de *F. oxysporum*, notamment, ont été transformées pour exprimer constitutivement la GFP, dont la fluorescence dans des tissus végétaux a pu être suivie par des observations microscopiques (Li et al., 2011; Navarro-Velasco et al., 2011). On peut envisager de réaliser le même type de transformants à partir de la souche MM1 et de suivre par microscopie la colonisation du sol. Plus anciennement, Marek et al. (1989) ont créé génétiquement une souche de *F. solani* résistante à l'antifongique aminoglycoside G418. Une approche de ce type permettrait de compter simplement sur boîte de milieu gélosé additionné d'antifongique les UFC de la souche d'intérêt.

Les méthodes de suivi de souches bactériennes inoculées dans des sols, basées sur les techniques de biologie moléculaire, sont beaucoup plus développées (Widada et al., 2003). Il faut noter qu'ici encore, quelques récentes études de la littérature ne mentionnent pas de traçage des inocula (Colombo et al., 2011) ou uniquement un suivi de la croissance microbienne totale par exemple par la mesure de l'activité respiratoire (Jacques et al., 2008; Silva et al., 2009b) ou le comptage des bactéries cultivables totales (Coppotelli et al., 2008). Dans notre expérience, la survie d'*A. oxydans* Pyr2MsHM11 a été suivie par PCR en temps réel sur la base de sa taxonomie (ciblant les ARNr 16S des Actinobactéries) et de son potentiel métabolique (ciblant les gènes codant les (PAH-RHD) α des bactéries à Gram positif). Les résultats obtenus n'ont cependant pas permis d'affirmer la survie de l'inoculum bactérien dans notre expérience. De manière analogue, certains auteurs ont utilisé pour le traçage d'inocula bactériens des milieux de culture sélectifs d'un groupe taxonomique (Pu & Cutright, 2007; Taccari et al., 2011) ou d'un potentiel métabolique comme la capacité à dégrader un polluant d'intérêt (Teng et al., 2010; Plangklang & Reungsang, 2011). De manière très intéressante, Schwartz et al. (2000) ont dessiné un couple d'amorces de PCR spécifiques de la souche *Arthrobacter polychromogenes* RP17, inoculée dans un sol non stérile pollué au PHE, sur la base de sa séquence nucléotidique d'ARNr 16S, en ciblant une région hypervariable. Si quelques autres espèces appartenant au genre *Arthrobacter* étaient ciblées par ce couple d'amorce, la PCR compétitive utilisée n'a montré aucune amplification de la cible dans le sol non-inoculé. Notons qu'*A. oxydans* ne faisait pas partie des espèces reconnues par le couples d'amorces RP17, qui ne pouvait donc pas être utilisé pour notre travail. Une démarche de ce type aurait pu être adoptée mais aurait nécessité un important travail de mise au point pour dessiner et tester des amorces spécifiques de la souche Pyr2MsHM11. En parallèle, certaines études ont utilisé comme inoculum des souches de bactéries ayant acquis spontanément la résistance à un antibiotique, la rifampicine le plus souvent : le traçage de l'inoculum était alors effectué par étalement de suspensions de sol sur un milieu gélosé contenant l'antibiotique (Blumenroth & Wagner-Döbler, 1998; Mrozik et al., 2011), toutefois l'inoculation *in situ* à grande échelle de ces souches résistantes aux antibiotiques n'est pas envisageable.

D'autres travaux utilisent des techniques beaucoup plus sophistiquées, nécessitant un travail très important de mise au point. Lu et al. (2001) par exemple, ont suivi la croissance et la formation de biofilms dans des eaux usées par une souche de la bactérie *Zoogloea ramigera* par des techniques d'immunologie (immunofluorescence indirecte et immunomarquage enzymatique notamment) grâce à la préparation d'anticorps polyclonaux de lapin spécifiques de cette souche. Enfin, des souches de bactéries génétiquement modifiées, portant des marqueurs tels que les constructions de type *lux* ou *lacZ*, ont été beaucoup utilisées cette dernière décennie pour le suivi d'inocula dans divers environnements (Jernberg & Jansson, 2002; Choi et al., 2003; Widada et al., 2003), mais ces approches sont limitées à l'utilisation *in vitro* au laboratoire.

Suivi de l'inoculation et de la colonisation du sol par les inocula

Les résultats de PCR en temps réel obtenus à T0 suggèrent que les marqueurs génétiques utilisés dans la présente expérience étaient relativement bien choisis puisque tous ont été significativement détectés en quantités plus importantes dans le sol inoculé (T0 A+F) par rapport au sol non inoculé (T0 NI). Il faut noter toutefois que les ratios 16S des Actinobactéries/16S totaux et ITS des *Fusarium*/18S totaux ne présentaient pas de différences significatives au temps initial. Ceci pourrait être dû à la cumulation des variabilités déjà importantes des abondances des deux marqueurs génétiques de chaque ratio. Ces variabilités importantes à T0 s'expliquent probablement par la forte hétérogénéité dans le sol due à la méthode d'inoculation et d'échantillonnage à cette date. En effet, les deux souches d'intérêt comme la microflore du sol de La Bouzule, n'avaient pas encore colonisé la totalité des pots puisqu'ils ont été dispersés à la surface des pots et que l'ensemble des 500 g de mélange sol-sable a été homogénéisé à la spatule, pour n'en analyser que 3 fois 0,5 g sur lesquels ont été réalisées les extractions d'ADN. Par ailleurs, les Actinobactéries comme les champignons du genre *Fusarium* sont ubiquistes des sols (Heuer et al., 1997; Van Elsas et al., 2000; Fierer et al., 2005) et ont également été retrouvés en quantités très abondantes dans la microflore du sol de La Bouzule au début de l'expérience sans inoculation de *Fusarium solani* MM1 (T0 NI). On peut aussi supposer que les populations d'Actinobactéries et de champignons ont été moins affectées par la pasteurisation du sol de La Bouzule de par leur capacité de résistance (bactéries sporulantes et spores de champignons). Par conséquent, au début de l'expérience à T0, la communauté microbienne des pots était constituée de : i) l'inoculum de la microflore du sol de la Bouzule (concentration théorique de 10^6 par g de sol), ii) plus ou moins les inocula des souches modèles (concentrations théoriques respectives de 10^7 et 10^4 cellules par g de sol pour *A. oxydans* et *F. solani*), mais également iii) les cellules bactériennes et fongiques encore viables après la pasteurisation, ainsi que iv) l'ADN des cellules mortes lors de la pasteurisation et qui n'aurait pas été dégradé pendant les 15 jours de vieillissement. Cette part de la microflore résistante à la pasteurisation est cependant difficile à estimer. En revanche, en ce qui concerne le ratio (PAH-RHD) α /ARNr 16S totaux, la différence entre les pots T0 NI et T0 A+F est statistiquement significative. Le sol de La Bouzule n'est pas un sol pré-adapté à la pollution aux HAP et ne contenait donc au début de l'expérience qu'une très faible quantité de bactéries dégradantes (Cébron et al., 2008). *A. oxydans* a été inoculé en quantité théorique 10 fois

plus importante que la microflore du sol de La Bouzule et cette différence d'un ordre de grandeur a été retrouvée sur le nombre de copies de gènes codant les (PAH-RHD) α .

De nombreuses études ont montré la difficulté pour des souches inoculées, bactériennes comme fongiques, à s'implanter durablement dans un sol non stérile, même quand celui-ci était leur sol d'origine (Blumenroth & Wagner-Döbler, 1998; Lang, 1998; Andersson et al., 2000). L'inoculation est en général rapidement suivie d'un déclin de la population inoculée, appelé microbiostase, lié au stress causé par les facteurs environnementaux abiotiques (pH, granulométrie, disponibilité en eau, sources de nutriments organiques et minéraux) et surtout biotiques (compétition avec la microflore indigène, prédation par les protozoaires) (Vogel, 1996; van Veen et al., 1997; El Fantroussi & Agathos, 2005). Plusieurs auteurs ont d'ailleurs pour ces raisons fait le choix de réaliser leurs expériences dans des sols préalablement stérilisés (Bogan et al., 1996; Boonchan et al., 2000). Les résultats de PCR en temps réel concernant la survie d'*A. oxydans* Pyr2MsHM11 ne montrent pas clairement sa survie dans les microcosmes jusqu'à la fin de l'expérience. Le nombre de copies de gènes codant les ARNr 16S des Actinobactéries était plus important dans les pots inoculés avec la bactérie après 46 jours, mais la proportion dans la communauté totale ne montre qu'une tendance à être plus importante dans ces pots. De plus, l'abondance relative de la bande correspondant au ribotype de Pyr2MsHM11 sur les gels de PCR-TTGE ciblant les ARNr 16S totaux ne variait pas quel que soit le traitement, inoculé ou non. De plus, en ciblant les ARNr 16S des Actinobactéries la bande spécifique de Pyr2MsHM11 n'a pas été détectée sur les gels de PCR-TTGE quel que soit le traitement et même à T0. Enfin, l'abondance et la proportion des bactéries à Gram positif portant un gène codant la (PAH-RHD) α ne variaient pas non plus entre les traitements inoculés ou non. Ces dernières données suggèrent que la population d'*A. oxydans* Pyr2MsHM11 n'a pas survécu ou n'a pas été maintenue à un niveau suffisant pour être détectée après 46 jours ou que les méthodes de détection d'*A. oxydans* n'étaient pas suffisamment sensibles ou appropriées. De la même manière, lors d'une autre expérience en batch réalisée au laboratoire (projet EC2CO A. Cébron), où la même souche d'*A. oxydans* Pyr2MsHM11 a été inoculée dans le sol de Neuves-Maisons, ces mêmes marqueurs génétiques n'ont pas montré la persistance de la souche dans le sol. En revanche, des dosages en microplaques du nombre le plus probable (NPP) de bactéries dégradantes montrent clairement l'inoculation ($1,3 \cdot 10^6$ bactéries/g de sol) et le maintien d'une population bactérienne dégradant les HAP après 2 mois d'incubation ($6,6 \cdot 10^6$ bactéries/g de sol) plus importante que dans le sol non inoculé ($9 \cdot 10^5$ bactéries/g de sol). De même, nos résultats ne permettent pas d'affirmer que *F. solani* MM1 a survécu jusqu'à la fin de l'expérience, dans les pots où il était inoculé seul comme dans ceux où il était co-inoculé avec *A. oxydans* Pyr2MsHM11, en présence ou non de luzerne. En effet, le nombre de copies de gènes codant les ARNr 18S fongiques ainsi que le nombre de copies des ITS des champignons du genre *Fusarium* étaient significativement plus élevés dans les pots inoculés par le champignon mais le ratio de ces deux marqueurs génétiques n'était pas différent entre les traitements. Ici encore, la variabilité cumulée de ces deux variables pourrait avoir masqué un effet sur le ratio. Par ailleurs, après 46 jours, l'abondance relative du ribotype migrant à la

même hauteur que celui de *F. solani* MM1 sur les gels de PCR-TTGE ciblant les ARNr 18S tendait à être plus importante dans le sol inoculé par MM1. Néanmoins, cette bande n'a pas été séquencée et les expériences menées sur le sol de Neuves-Maisons (Chapitre III-1) ont montré que les ribotypes correspondant à différentes espèces de *Fusarium*, notamment *F. solani* et *F. oxysporum*, avaient des distances de migration très proches sur gels de TTGE. De plus, le couple d'amorces ITS-Fu-F et ITS-Fu-R n'est pas spécifique de la souche MM1, ni même de l'espèce *F. solani* (voir Chapitre II § 2.1.2.5.2). Il ne peut donc être exclu que les différences détectées soient imputables à d'autres champignons taxonomiquement proches, membres de la microflore indigène. On note d'ailleurs que dans cette expérience, la différence d'environ un ordre de grandeur entre le nombre d'UFC fongique et le nombre de copies de gènes codant les ARNr 18S par g de sol était beaucoup moins importante que dans l'expérience en microcosmes stériles (Chapitre III-4), ce qui pourrait être lié au fait qu'ici la microflore fongique est une communauté complexe. Ainsi, les différentes populations de cette communauté n'ont pas toutes les mêmes propriétés de cultivabilité au laboratoire ni le même nombre de copies d'opérons ribosomiques par cellule.

La microbiostase des inocula pourrait être la conséquence de différents facteurs, abiotiques et biotiques. Tout d'abord, les deux souches ont été isolées à partir du sol de Neuves-Maisons, historiquement pollué aux HAP, où les teneurs en HAP totaux sont très élevées, mais où la fraction biodisponible de ces HAP est très réduite (Ouvrard et al., 2011). Néanmoins, il a été observé que des concentrations en HAP équivalentes à celles utilisées ici n'étaient pas toxiques pour les deux souches en culture liquide (Chapitres III-2 et 3), ce qui tend à exclure la toxicité des HAP dans cette expérience. Cependant, les caractéristiques physico-chimiques du sol de la Bouzule, et du mélange de cette terre avec le sable, étaient différentes de celles du sol de Neuves-Maisons (Chapitre II, Tableaux X et X), ce qui a pu affecter la survie et la croissance des deux souches. Selon van Veen et al. (1997), lorsqu'un inoculum est impliqué dans un processus métabolique lui conférant un avantage sélectif, comme un potentiel de dégradation d'un xénobiotique, seul un petit nombre de cellules actives est nécessaire pour une inoculation efficace. Dans le cas présent, le potentiel de dégradation du PHE d'*A. oxydans* Pyr2MsHM11, pourtant inoculé en masse par rapport à la microflore indigène, n'a pas suffi à le rendre compétitif face à cette microflore. En effet, la microflore du sol de La Bouzule a montré un potentiel adaptatif important face à la pollution aux HAP, comme le montrent la dissipation très importante du PHE et du PYR en 46 jours et l'augmentation de deux ordres de grandeur de la proportion des bactéries à Gram positif dégradant les HAP. Cette capacité d'adaptation à très court terme de la microflore de La Bouzule a précédemment été observée dans les expériences de Zhou et al. (2010), dans lesquelles les pourcentages de bactéries à Gram positif et négatif possédant des gènes codant les (PAH-RHD) α atteignaient les mêmes ordres de grandeur après 6 semaines dans leur sol d'origine artificiellement pollué aux HAP. Cette adaptabilité résulte de la présence dans la microflore indigène d'un « réservoir » de microorganismes capables de dégrader les HAP, sélectionnés ici par la pollution. De plus, les gènes bactériens codant les enzymes impliquées dans la dégradation des HAP, souvent portés par des

plasmides, sont susceptibles d'être transmis horizontalement (Akhmetov et al., 2008) et il est connu que l'introduction massive d'une pollution est un facteur favorisant le transfert horizontal de gènes (Obayori & Salam, 2010). Ainsi, Cébron et al. (2008) ont montré que la proportion de bactéries, à Gram positif comme négatif, possédant un gène codant pour la (PAH-RHD) α dans différents sols était corrélée au niveau de pollution aux HAP de ces sols.

Structuration des communautés bactériennes et fongiques : effet de la luzerne et de l'inoculation

Il est intéressant de noter ici que les structures des communautés fongiques et bactériennes n'ont pas réagi de la même manière aux différents traitements. En premier lieu, la structure de la communauté bactérienne après 46 jours, y compris dans le sol non planté et non inoculé, était très divergente de celle du T0. Cette différence pourrait être attribuée à la présence de HAP, notamment au regard de l'augmentation de la proportion des bactéries capables de dégrader les HAP, mais aucun témoin non inoculé, non planté, non pollué n'a été laissé à incuber dans les mêmes conditions pour le vérifier. Par ailleurs, comme le montre la distribution des différents traitements sur l'ACP, l'évolution de la structure de la communauté bactérienne dans ce sol pollué a été dirigée ici par la présence de plantes et, en absence de plante, par les inoculations. L'influence de la luzerne sur la structure de la communauté bactérienne est un exemple d'effet rhizosphère qualitatif, observé à de nombreuses reprises dans d'autres études (Corgié et al., 2004; Phillips et al., 2006; Sanguin et al., 2006; Cébron et al., 2009). Dans notre expérience, l'effet rhizosphère ne portait pas sur le nombre de ribotypes ni sur l'indice de diversité de Shannon (donc la distribution de leurs abondances relatives) mais plutôt sur l'identité des ribotypes eux-mêmes. D'ailleurs, trois des ribotypes qui ont été séquencés montrent des différences significatives de leurs abondances relatives entre les sols plantés et non plantés. La différence de structure des communautés bactériennes entre les traitements non inoculés et inoculés par les souches pourrait suggérer que (i) les souches se sont maintenues après l'inoculation ou (ii) qu'elles ont servi de substrat de croissance à certains membres de ces communautés. L'inoculation par la bactérie *A. oxydans* Pyr2MsHM11 a entraîné l'augmentation du nombre de ribotypes, mais également homogénéisé la distribution des fréquences relatives des différents ribotypes (augmentation de l'indice de diversité de Shannon). Cet effet est intéressant et pourrait suggérer que l'entrée d'un nouveau compétiteur dans la communauté bactérienne, même si celui-ci n'a pas réussi à se maintenir dans la communauté bactérienne après 46 jours, pourrait indirectement influencer les interactions, de compétition probablement, entre les autres membres de microflore. A l'inverse, l'inoculation par *A. oxydans* Pyr2MsHM11 a réduit la diversité fongique de manière très significative et cet effet a été annulé par la co-inoculation avec *F. solani* MM1. Ce type d'effet différentiel illustre bien la très grande complexité du réseau des interactions microbiennes, directes, indirectes et croisées. De plus, contrairement à ce qui a été observé *in situ* (Chapitre I), la plante n'a pas eu d'influence visible sur la structure des communautés fongiques, qui ne sont pas discriminées sur l'ACP en fonction de la présence ou non de plantes, ni de l'inoculation, ni même entre les T0 et le 46ème jour. En revanche, la diminution de l'indice de diversité

de Shannon, sensible aux espèces rares, en présence de plante pourrait être due à la dominance du genre fongique *Fusarium*. Ce résultat est en adéquation avec les données connues de l'écologie des *Fusarium*, très fréquemment retrouvés dans les rhizosphères (Lueders et al., 2004; Wakelin et al., 2008; Manici & Caputo, 2009). De nombreuses études ont montré l'influence des plantes sur la structure des communautés fongiques (Marcial Gomes et al., 2003; Broeckling et al., 2008; Curlevski et al., 2010). De plus, l'étude des communautés fongiques des parcelles lysimétriques contenant le sol de Neuves-Maisons a montré une influence très marquée du couvert végétal sur la structure de ces communautés (Chapitre I). On peut émettre l'hypothèse qu'une durée d'incubation de 46 jours n'était pas suffisamment longue pour voir un effet sur la communauté fongique, évoluant moins rapidement que celle des bactéries, considérant que les expériences citées plus haut étaient effectuées sur des durées de plusieurs mois à plusieurs années. De plus, aucun dépôt de litière végétale, matière organique dégradée majoritairement par les champignons et favorisant leur dominance dans les expériences *in situ* (Strickland & Rousk, 2010), n'a eu lieu durant ce court temps d'incubation. Par ailleurs, comme souligné plus haut, Actinobactéries et champignons ont probablement été moins affectés par la pasteurisation, ce qui pourrait expliquer une évolution moins marquée depuis le T0 des profils de PCR-TTGE par rapport à ceux des bactéries totales.

Devenir des HAP

Un des principaux objectifs de cette expérience était d'évaluer l'effet de la présence de plantes sur les potentiels de dissipation des HAP des souches inoculées en association avec la microflore indigène. En effet, de nombreuses études ont porté sur la biodégradation des HAP dans la rhizosphère. L'influence des plantes sur cette biodégradation est très complexe, peut être positive ou négative, et dépendant de très nombreux paramètres tels que le type de sol (Chiapusio et al., 2007), l'espèce végétale (Liste & Alexander, 2000; Zhou, 2010), le statut de mycorhization (Joner & Leyval, 2003; Corgié et al., 2006e), ou encore les HAP étudiés (Liste & Prutz, 2006). Dans notre expérience, le PHE et le PYR ont été très largement dissipés, à hauteurs respectives de 91% et 56%, sans différence significative entre les traitements en seulement 46 jours. Zhou et al. (2010) avaient obtenu le même type de résultats avec le PHE et le PYR en polluant artificiellement le sol de La Bouzule planté avec différentes espèces végétales. De nombreux auteurs ont également utilisé des sols artificiellement pollués aux HAP pour s'affranchir des problèmes liés à la biodisponibilité des HAP (Sack, 1997b; 2001; Chiapusio et al., 2007; Jacques et al., 2008). Joner & Leyval (2001) ont artificiellement pollué un sol à l'ANT, au CHR et au DBA à des concentrations équivalentes à celles utilisées dans notre expérience et, malgré une phase de « vieillissement » de quatre semaines de cette pollution, 98% de l'ANT avait été dissipé après huit semaines dans le sol planté comme non planté. Cette dissipation très rapide des HAP, au moins de poids moléculaires relativement faibles, est à mettre en relation avec la rapide adaptation de la microflore indigène aux HAP, suggérée par l'augmentation très importante de la proportion des bactéries capables de les dégrader. Néanmoins, aucun effet des plantes n'est visible sur la dissipation du PHE ni du PYR, malgré un pourcentage significativement plus important des bactéries à Gram positif

possédant un gène codant la (PAH-RHD) α , par rapport à la communauté totale comme par rapport aux Actinobactéries dans le sol non planté. Bien sûr, les proportions des bactéries dégradantes à Gram négatif (*Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*...) ou de populations possédant d'autres gènes de dégradation, et surtout les niveaux d'expression de ces gènes, n'ont pas été déterminés dans notre expérience et pourraient avoir suivi des tendances différentes, expliquant que la dissipation des HAP et la quantité de bactéries dégradantes ne soient pas corrélées. Enfin, un éventuel effet des plantes et/ou de l'inoculation sur la dissipation des HAP pourrait avoir été masqué par la grande variabilité des teneurs en HAP dans les différents réplicats d'une même condition. Cette variabilité est probablement liée à l'hétérogénéité de la répartition spatiale des HAP dans les pots. La totalité du mélange sol-sable dans les pots plantés a été considéré comme rhizosphérique, sans séparer le sol adhérent aux racines du reste, ce qui pourrait avoir « dilué » un éventuel effet rhizosphère. De plus, les HAP se sont certainement adsorbés préférentiellement au sol très argileux de La Bouzule qu'aux grains de sable (Amellal et al., 2001b), et les prélèvements pour l'extraction des HAP ont été effectués sur le mélange sol-sable sans mesurer la part de l'un et de l'autre. Il faut noter toutefois qu'une grande variabilité des teneurs en HAP mesurées dans les sols, liée à ces problèmes d'hétérogénéité, est courante, comme le montrent de nombreuses études (Amellal et al., 2001b; Joner et al., 2006; Zhou, 2010).

Conclusion

Les marqueurs génétiques choisis comme indicateurs de la présence d'*A. oxydans* Pyr2MsHM11 et *F. solani* MM1 se sont révélés adéquats à T0, montrant bien l'inoculation des deux souches. En revanche, les résultats de biologie moléculaire ne permettent pas d'affirmer qu'*A. oxydans* comme *F. solani* étaient toujours présents dans le sol après 46 jours, qu'ils aient été inoculés ensemble ou séparément et en présence ou en absence de luzerne. Néanmoins, il est possible que les marqueurs n'aient pas été assez spécifiques des souches : un travail de mise au point d'une méthode fiable et simple de quantification des inocula devrait être développée pour confirmer ou infirmer ces résultats. Par ailleurs, la communauté bactérienne a été fortement influencée par la plante et, en absence de plante, par les inoculations. A l'inverse, la variabilité de la structure des communautés fongiques totales dans les différents réplicats d'un même traitement suggère que l'évolution de ces communautés depuis le T0 n'a pas été dirigée par la plante ni par l'inoculation. Dans tous les traitements, la microflore s'est adaptée rapidement à la présence des HAP, dissipant 91% du PHE et 56% du PYR en 46 jours, sans influence significative de la présence de plante ni de l'inoculation. Cette absence de différence pourrait être un artefact dû à la grande variabilité des teneurs en HAP entre les réplicats, liée à l'hétérogénéité de la distribution spatiale des HAP dans les sols. Par ailleurs, il ne peut être exclu qu'un temps d'incubation de 46 jours ait masqué d'éventuelles différences de dissipation des HAP entre les différents traitements d'inoculation, si par exemple l'activité de *A. oxydans* était plus importante dans les premiers jours de l'expérience. Il serait donc intéressant de réaliser un suivi dans le temps de cette dissipation. Nos

analyses, réalisées sur l'ADN génomique, ne révèlent pas la part active des populations microbiennes. Il serait donc intéressant de co-extraire les ADN et ARN, afin de comparer les structures des communautés actives dans les sols plantés et non plantés et inoculés ou non, et éventuellement de quantifier l'activité des souches inoculées.

Chapitre IV :

Discussion générale

Discussion générale

La dissipation des HAP dans les sols implique l'action conjointe des bactéries et des champignons, grâce à des processus métaboliques différents, mais complémentaires (Johnsen et al., 2005; Peng et al., 2008). Cependant dans les sols historiquement contaminés, en particulier lorsqu'ils présentent une multipollution aux HAP et ETM, la diversité phylogénétique et fonctionnelle ainsi que le rôle de ces microorganismes sont encore mal connus. Depuis plusieurs années, le LIMOS étudie l'écodynamique des HAP dans les sols de friches industrielles, comme dans le sol de Neuves-Maisons, qui est multipollué et historiquement contaminé et présente donc une très faible biodisponibilité des HAP (Programme ANR Multipolsite). Bien que la dissipation effective des HAP soit très lente dans ce sol, la multipollution a influencé la diversité bactérienne, sélectionnant des espèces possédant des gènes fonctionnels impliqués dans la dégradation des HAP et appartenant à des taxons adaptés aux fortes pollutions et aux milieux extrêmes (Cébron et al. 2009). En revanche, la diversité des communautés fongiques n'avait jusqu'alors pas ou très peu été étudiée dans de tels sols. Par ailleurs, les plantes pourraient favoriser dans certaines conditions la dégradation des HAP, en modifiant notamment l'abondance et la structure des communautés microbiennes (Binet et al., 2000; Corgié et al., 2006e; Liste & Prutz, 2006). Dans ce contexte, cette thèse visait à approfondir nos connaissances de l'écodynamique des HAP dans la rhizosphère, sous l'influence des bactéries mais également des champignons, ayant fait l'objet de moins d'études, ainsi que de leurs interactions. Pour répondre à ces objectifs, le présent travail s'est articulé autour de deux axes de recherche. Tout d'abord, la dynamique des communautés fongiques sous l'influence de plantes dans le sol NM ainsi que dans le même sol ayant subi un traitement de dépollution par désorption thermique, le sol TD, a été étudiée *in situ* et sur une période de cinq ans (Chapitre III-1). En parallèle, les interactions entre les microorganismes, les plantes et les HAP ont été étudiées au laboratoire grâce à l'isolement de deux souches microbiennes modèles à partir du sol NM, le champignon *Fusarium solani* MM1 et l'Actinobactérie *Arthrobacter oxydans* Pyr2MsHM11, de règnes différents et présentant des mécanismes d'action vis-à-vis des HAP très différents. Les deux souches ont été cultivées simultanément ou séparément dans différentes conditions, des plus simples aux plus complexes. Cette démarche a permis d'explorer les effets des interactions écologiques sur la dissipation des HAP par les microorganismes en observant différents niveaux d'interactions : entre les HAP et un microorganisme capable de les dégrader (Chapitre III-2), entre les HAP et deux microorganismes (Chapitre III-3), entre les HAP, deux microorganismes et une plante (Chapitre III-4) et entre les HAP, deux microorganismes, une plante et une microflore complexe (Chapitre III-5).

Dissipation des HAP par *F. solani* et *A. oxydans* : influence des conditions de culture (milieu liquide, sable ou sol) et des sources de carbone disponibles (HAP, glucose ou plantes)

Différentes souches microbiennes ont été isolées à partir du sol NM, parmi lesquelles le champignon *F. solani* MM1 et l'Actinobactérie *A. oxydans* Pyr2MsHM11 possédaient les meilleurs potentiels de dissipation des HAP, impliquant des processus métaboliques très différents (Fig. 52). En culture liquide, et en présence d'une source de carbone additionnelle indispensable à sa croissance, la souche fongique modèle *F. solani* MM1 s'est montrée capable de dissiper efficacement les trois HAP étudiés, de poids moléculaires moyen à élevé (Chapitre III-2, Fig 52). Cette dissipation impliquait pour un tiers l'absorption de ces HAP dans des vésicules intracellulaires, le reste des HAP étant effectivement biotransformé (Chapitre III-3). Si ce stockage des HAP dans des vésicules avait déjà été observé chez des champignons taxonomiquement proches (Verdin et al., 2005; Wu et al., 2009), la part de l'absorption n'avait, à notre connaissance, jamais été quantifiée directement. Ainsi, comme pour la quasi-totalité des souches fongiques capables de dégrader les HAP, le potentiel de dissipation de *F. solani* MM1 implique des voies de cométabolisme (Cerniglia, 1997; Peng et al., 2008). A l'inverse, la bactérie *A. oxydans* Pyr2MsHM11, possédant un gène codant pour une (PAH-RHD) α , a été capable de croissance dans un milieu contenant du PHE comme seule source de carbone, sans jamais dégrader le PYR ni le DBA, et la présence de glucose a inhibé ce potentiel (Chapitre III-2, Fig 52). Cette capacité à utiliser les HAP de poids moléculaire relativement faible comme substrat de croissance a déjà été observée pour de nombreuses souches de bactéries, notamment des Actinobactéries (Deziel et al., 1996; Kim et al., 2008; Kallimanis et al., 2011). Par ailleurs, Kallimanis et al. (2007) ont observé la répression catabolique par le glucose de l'internalisation et de la dégradation du PHE par *Arthrobacter phenanthrenivorans*. Ces différences de métabolisme entre les deux microorganismes, étaient ainsi susceptibles de favoriser une certaine complémentarité vis-à-vis de la dégradation des HAP et représentatives de la diversité métabolique de cette dégradation dans les sols. Cependant, elles ont aussi conduit à des difficultés expérimentales pour étudier les interactions écologiques.

Les souches *F. solani* MM1 et *A. oxydans* Pyr2MsHM11 pourraient en théorie être métaboliquement complémentaires vis-à-vis de la dissipation des HAP, le champignon transformant les HAP les plus lourds en métabolites intermédiaires plus facilement utilisables comme source de carbone pour la bactérie, comme cela a été observé dans d'autres associations entre champignons et bactéries (Sack, 1997b; Kotterman et al., 1998; Boonchan et al., 2000). Pourtant, la coculture en milieu liquide a révélé une compétition entre ces deux souches, aboutissant à l'inhibition de la croissance de l'un et/ou de l'autre et, probablement indirectement, de son potentiel de dissipation des HAP (Chapitre III-3, Fig. 52). Toutefois, le milieu liquide avec agitation ne permettait pas l'adhésion et la colonisation d'une surface solide et plaçait les deux microorganismes en contact direct, physique, ce qui a pu favoriser la compétition pour l'unique source de carbone facilement dégradable, le glucose.

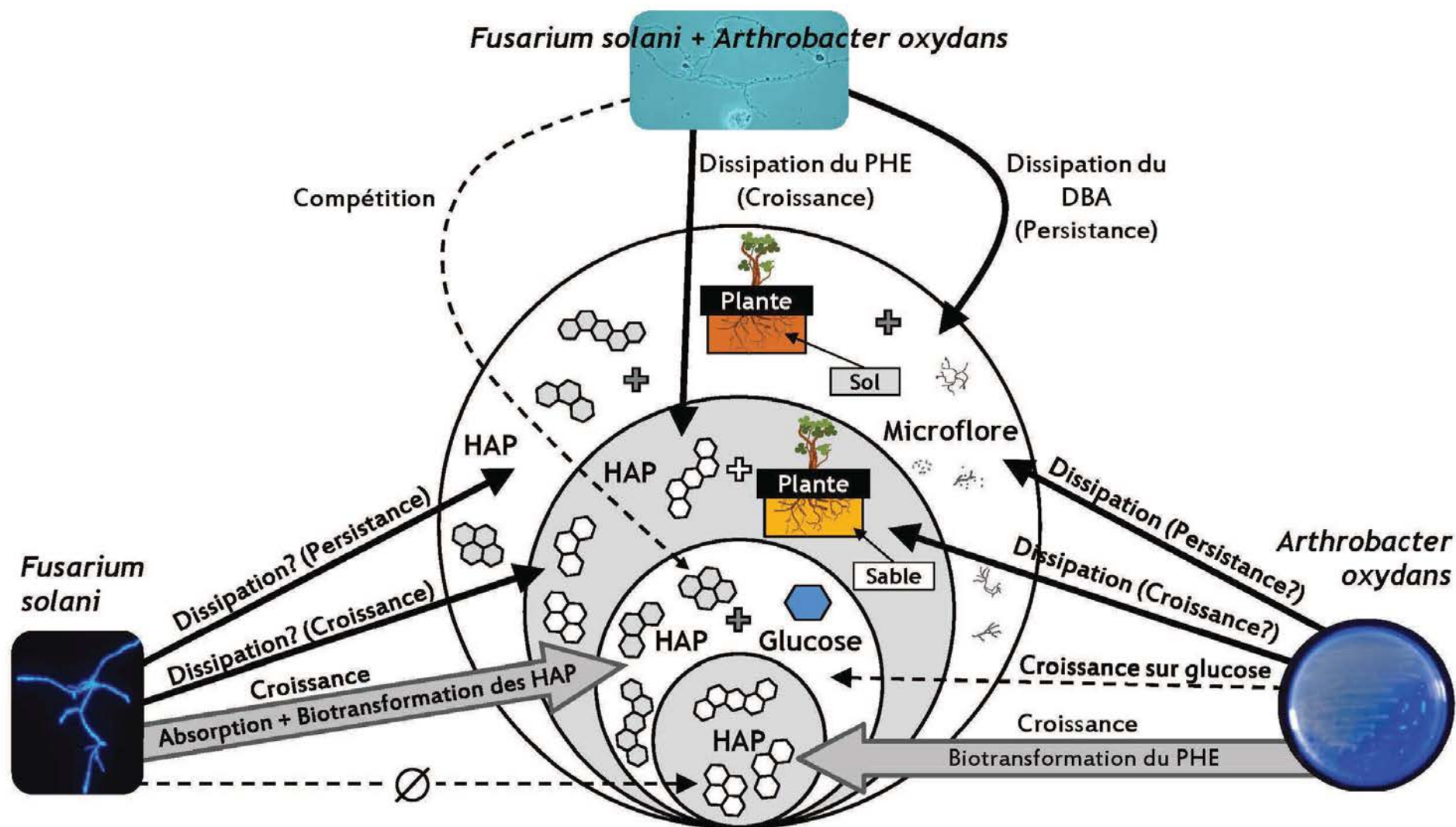


Figure 52. Schéma conceptuel illustrant l'effet des conditions expérimentales sur la dissipation des HAP par les souches *F. solani* MM1 et *A. oxydans* Pyr2MsHM11, cultivées simultanément ou séparément.

De plus, dans les cocultures non tamponnées, la viabilité de la bactérie a été fortement altérée par la baisse de pH entraînée par la croissance du champignon, phénomène très peu probable dans un sol, possédant un pouvoir tampon plus important qu'un milieu liquide. De fait, dans les dispositifs de culture stérile de luzerne, la compétition entre les deux souches n'a pas été observée (Chapitre III-4, Fig. 52). Dans ces conditions, *F. solani* MM1 comme *A. oxydans* Pyr2MsHM11 ont été capables de croissance lorsqu'elles étaient co-inoculées et la dissipation du PHE a même été favorisée. Ceci peut s'expliquer par la présence de plante, la biomasse et les exsudats racinaires constituant une source de carbone pour les deux microorganismes, et probablement par la présence de sable, substrat solide permettant l'adhésion de ces souches adaptées au milieu tellurique. Cette absence de compétition entre les deux souches a été retrouvée dans les microcosmes de sol pollué non stérile inoculé avec les deux souches, simultanément ou séparément (Chapitre III-5, Fig 52). Après 46 jours, les indicateurs de la croissance des inocula *A. oxydans* et *F. solani* étaient supérieurs dans les microcosmes respectivement inoculés par la bactérie et le champignon et n'étaient pas différents entre les microcosmes inoculés par les souches séparées et les microcosmes co-inoculés. Il faut noter que ceci a été observé dans les pots plantés comme non plantés et est probablement le résultat d'une multitude d'autres interactions complexes, directes et indirectes, avec la microflore indigène du sol. Par ailleurs, l'inoculation simultanée des deux souches semble avoir favorisé la dissipation du DBA après 46 jours.

Ecologie des communautés bactériennes et fongiques dans les sols contaminés aux HAP : influence des plantes et du traitement par désorption thermique

L'introduction d'un polluant dans un environnement est systématiquement suivie de l'adaptation de la microflore de ce sol, de la sélection de populations résistantes à sa toxicité voire capables de le dégrader (Van der Meer et al., 1992; Ojo, 2007). Les expériences réalisées au cours de ce travail ont permis d'observer l'impact des HAP et des plantes sur les communautés fongiques, à différentes échelles spatiales (parcelles lysimétriques in situ et microcosmes en conditions contrôlées) et temporelles (de un mois à cinq années). La proportion de bactéries à Gram positif possédant un gène codant pour une (PAH-RHD) α dans la communauté bactérienne totale dans le sol artificiellement contaminé avec trois HAP (Chapitre III-5) a été multipliée jusqu'à 200 fois et 91% du PHE et 56% du PYR ont été dissipés, 46 jours seulement après la contamination. Cette pression de sélection dans le sol historiquement contaminé non planté (NM-BS) a abouti à long terme à une diversité fongique (indice de Shannon) relativement faible, avec une forte dominance par un petit nombre de ribotypes et quelques espèces rares (Chapitre III-1, Fig. 53). Dans ce sol multipollué, les Ascomycètes ont exercé cette dominance au détriment des Basidiomycètes et Zygomycètes. En absence de plantes, l'Ascomycète *Geomyces* sp., précédemment retrouvé dans des environnements extrêmes comme un sol pollué par des ETM ou encore un désert polaire (Nordgren et al., 1985; Kirtsideli, 2007), s'est révélé être le plus compétitif après cinq années face à d'autres espèces moins adaptées comme *Phoma* sp., *Fusarium solani* ou *Penicillium purpurogenum*. Le même type de distribution des abondances relatives de champignons cultivables, avec une très forte dominance des Ascomycètes, avait été observé par

Obire & Anyanwu (2009) dans des sols pollués à la créosote, 18 semaines seulement après la contamination. A court terme dans les microcosmes de sol (Chapitre III-5), les communautés fongiques ont peu évolué, comme le montre l'absence de discrimination des structures des communautés des différentes modalités au sur l'ACP correspondante (Fig. 53).

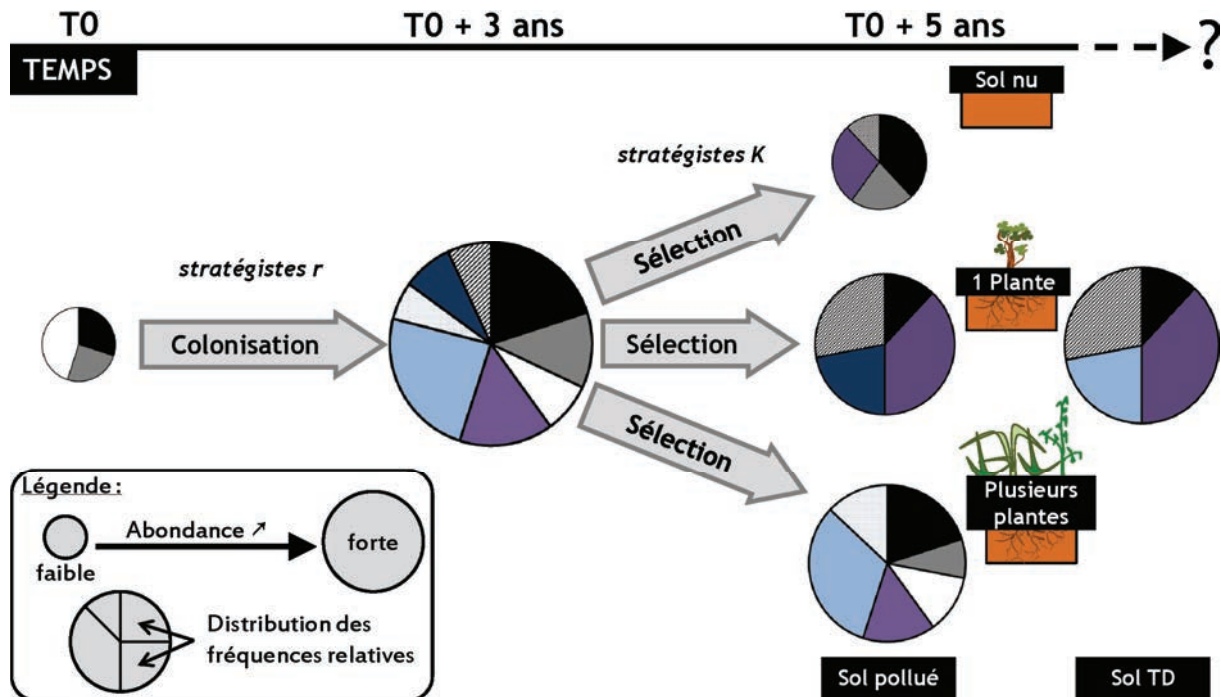


Figure 53. Schéma conceptuel illustrant la dynamique de l'abondance et de la structure des communautés fongiques dans le sol NM historiquement multipollué aux HAP et ETM. Le diamètre des diagrammes en camembert est proportionnel à l'abondance fongique et leur sectorisation illustre la distribution des abondances relatives des différentes espèces fongiques. TD : sol traité par désorption thermique.

Les plantes provoquent des modifications physico-chimiques dans la rhizosphère, notamment *via* l'exsudation racinaire de sucres, acides organiques ou composés antibiotiques (Hiltner, 1904). D'une manière générale, cet apport de matière organique facilement dégradable entraîne l'augmentation de l'abondance microbienne (Phillips & Fahey, 2007; Chen et al., 2008; Hannula et al., 2010). Dans le sol historiquement contaminé (Chapitre III-1), cet effet rhizosphère quantitatif a été retrouvé, avec une abondance fongique significativement plus élevée dans les parcelles plantées avec la luzerne (NM-Msm) et colonisées par la végétation spontanée (NM-SV), par rapport aux parcelles de terre nue (Fig. 53). Dans les microcosmes de sol artificiellement contaminé en revanche, aucun effet des plantes n'a été observé sur l'abondance des champignons en 46 jours (Chapitre III-5). D'un point de vue qualitatif, les populations les plus adaptées aux conditions rhizosphériques, qui peuvent être différentes selon

l'espèce, voire le cultivar, de la plante, ou son stade de développement, tendent à dominer la communauté au cours du temps (Kourtev et al., 2003; Nicol et al., 2003; Shaw et al., 2006; Broeckling et al., 2008). Ainsi, la présence d'une seule plante, la luzerne (parcelles NM-Msm), n'a pas conduit à une augmentation significative de la diversité fongique dans le sol NM sur le long terme (Fig. 53). Dans les microcosmes de sol artificiellement contaminé par des HAP, pourtant incubés sur une période relativement courte de 46 jours, on a même observé une réduction de la diversité fongique dans les pots plantés par rapport aux non plantés (Chapitre III-5). L'indice de diversité de Shannon pour les communautés bactériennes n'a en revanche pas été affecté par la présence de plantes dans ces microcosmes. Une diversité fongique moins importante dans un sol rhizosphérique (maïs) par rapport au même sol non planté, avait précédemment été observée par Marcial Gomes et al. (2003) avec des durées d'incubation de 20 à 90 jours. De plus, la structure des communautés bactériennes était différente dans les pots plantés et non plantés comme le montrait leur nette discrimination sur l'ACP alors que cette discrimination n'était pas visible pour les communautés fongiques dans les mêmes microcosmes.

Dans les parcelles lysimétriques NM-SV, portant un assemblage d'espèces végétales différentes (Ouvrard et al., 2011), le nombre de ribotypes fongiques comme l'indice de diversité de Shannon étaient plus importants que dans les parcelles de sol non planté (NM-BS). Dans la rhizosphère sous l'influence de ces différentes plantes (Fig. 54), les espèces fongiques peuvent coexister avec une distribution plus homogène avec le maintien d'espèces telles que *Phoma* sp. ou *Cyathus striatus* (Chapitre III-1). D'autres auteurs ont également montré une diversité plus importante dans des sols plantés avec des assemblages d'espèces végétales en rotations de culture ou cultures mixtes par rapport à des sols supportant une monoculture (Chen et al., 2008; Manici & Caputo, 2009). La multiplicité des sources de carbone disponibles liées à une plus grande variété des exsudats racinaires dans une rhizosphère « mixte » sous l'influence de plusieurs espèces végétales, pourrait expliquer cette observation. Il faut noter également que les biomasses végétales des parcelles lysimétriques NM-SV n'ont pas été récoltées chaque année comme celles des parcelles NM-Msm, entraînant la formation d'une litière végétale qui a pu permettre l'établissement d'espèces fongiques adaptées à la décomposition de cette litière. De plus, les signaux moléculaires de la compétition entre plantes (allélopathie) dans une communauté végétale complexe comme celle des parcelles NM-SV pourraient également avoir ouvert de nouvelles niches trophiques (Sanon et al., 2009). L'ensemble de ces résultats fait ressortir les réponses différentes des communautés fongiques aux pressions de sélection exercées par les plantes selon l'échelle temporelle (46 jours contre 5 années), l'importance du facteur temps ayant par ailleurs déjà été mise en évidence au Chapitre III-1, mais également de l'échelle spatiale (environ 3.10^{-3} m^3 dans les microcosmes contre $2,4 \text{ m}^3$ de sol dans les parcelles).

De manière surprenante, cette pression de sélection exercée par les plantes était plus déterminante dans les parcelles lysimétriques que le traitement de remédiation par désorption thermique, puisque ni l'indice de diversité de Shannon ni la structure de la communauté fongique n'étaient différents après 5

années entre le sol NM (parcelles NM-Msm) et le sol TD (parcelles NM-TD). Le traitement de dépollution par désorption thermique a pourtant affecté de nombreux paramètres physicochimiques du sol comme le degré de condensation de la matière organique, la teneur en N, donc le rapport C/N ou encore la porosité, facteur déterminant des flux d'eau (Biache et al., 2008; Ouvrard et al., 2011). L'abondance fongique était néanmoins plus élevée dans le sol TD, peut-être en raison de la quantité plus importante de matière organique apportée par la luzerne ayant mieux poussé dans ce sol. De plus, certaines espèces fongiques ont été favorisées dans le sol TD, comme le Basidiomycete *Clitopilus prunulus*. Cette observation indique que les caractéristiques physico-chimiques du sol ont quand même exercé une pression de sélection sur la communauté fongique, bien que moins importante que celle de la végétation (Fig. 54). De plus, il ne peut être exclu que les teneurs en ETM (notamment Cu, Cr, Pb et Zn) ont pu influencer la structure de la communauté fongique, comme certains auteurs l'ont montré (Macdonald et al., 2008; Marcial Gomes et al., 2010). En effet, si les teneurs en ETM étaient très élevées dans les deux sols, le transfert du Cu, du Zn, du Pb et de l'As aux parties aériennes de la luzerne plus faible dans le sol TD que dans le sol NM suggère une plus faible biodisponibilité des ETM dans le sol TD (Norini, 2007). Néanmoins, les analyses multivariées (tests de corrélations multiples) n'ont pas permis de mettre en évidence de corrélation entre l'abondance ou la diversité des champignons et les teneurs en ETM, totales ou extractibles à l'EDTA, dans ce dispositif (données non présentées). De manière contrastée, Cébron et al. (2009; 2011a) ont observé, dans le même dispositif expérimental, un effet globalement positif de la végétation sur l'abondance et la diversité bactérienne mais les communautés bactériennes étaient visiblement plus discriminées par le traitement de remédiation appliqué au sol, que par la présence de la végétation. D'autres auteurs ont constaté des effets différents, voire opposés, de facteurs environnementaux sur les communautés de ces deux règnes aux métabolismes et physiologies très différents (Williams & Rice, 2007; Lauber et al., 2008; Rousk et al., 2010). L'ensemble des données collectées *in situ* ont été combinées à d'autres paramètres biologiques mesurés sur les parcelles lysimétriques, notamment les abondances et diversités des bactéries, des protozoaires, des nématodes, des microarthropodes ainsi que les activités enzymatiques et respiratoires des sols pour effectuer une analyse multivariée par principal response curves (PRC) (Cébron et al., 2011). Les résultats de ce travail d'analyse statistique ont montré que le poids des bioindicateurs « abondance » et « diversité » (exprimés par l'indice de Shannon) fongiques était au moins aussi élevé, voire plus élevé, que celui des mêmes indicateurs concernant les bactéries. Ceci met en évidence l'importance de la prise en compte des communautés fongiques dans l'étude des modifications écosystémiques suivant une perturbation.

Limites de l'étude et perspectives de recherche

Evidemment, la complexité des mécanismes et interactions observés au cours de cette thèse a soulevé de nombreuses questions et certains verrous techniques devront être levés pour répondre à ces questions.

D'un point de vue méthodologique, l'hétérogénéité de la répartition de la pollution dans les microcosmes de sol a empêché l'observation d'éventuelles différences des taux de dissipation des HAP (Chapitre III-5). Ce problème, récurrent dans ce type d'expériences, était probablement lié à la nature très hydrophobe des HAP, s'adsorbant préférentiellement sur les particules organiques et/ou de petite taille (Amellal et al., 2001b). Néanmoins, la même hétérogénéité a été constatée dans l'expérience avec du sable, dont la variabilité de taille et de nature chimique était pourtant beaucoup moins importante que celle d'un sol. De fait, l'observation sous rayons UV de grains de sable pollués artificiellement a montré que les HAP étaient répartis de manière très hétérogène sur et entre les grains (données non présentées). Il semble donc que la variabilité des teneurs en HAP entre les différents réplicats d'un même traitement soit difficile à réduire, à moins d'augmenter la taille des échantillons destinés à l'extraction et au dosage des HAP. Dans les expériences effectuées au laboratoire, il est envisageable notamment d'effectuer les extractions de HAP sur un échantillon moyen issu du broyage fin de la totalité du volume de sol de chaque microcosme. Par ailleurs, les dispositifs de culture stérile de plantes mis au point au Chapitre III-4 devraient être perfectionnés pour permettre une meilleure croissance des plantes, au moyen notamment d'un système de renouvellement de l'atmosphère de l'enceinte stérile.

La présente étude ne visait pas à explorer les aspects mécanistiques de la dissipation des HAP par les souches isolées. Pourtant ces mécanismes moléculaires et leur régulation ont inévitablement influencé l'efficacité de la dissipation dans les différentes conditions environnementales. Les voies métaboliques impliquées dans la biotransformation des HAP par *F. solani* MM1 et *A. oxydans* Pyr2MsHM11 pourraient être élucidées selon différentes approches. Les métabolites produits lors de la dégradation pourraient être identifiés par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (Bezalel et al., 1996; Da Silva et al., 2004). Ainsi, les gènes et enzymes connus pour leur implication dans les voies de dégradation aboutissant à la formation de ces métabolites pourraient être recherchés chez les souches. Pour une recherche sans *a priori*, les protéomes et transcriptomes des souches pourraient être extraits de cultures avec et sans HAP. Les protéines surexprimées pourraient être détectées par électrophorèse 1- ou 2-D et identifiées par chromatographie couplée à la spectrométrie de masse (Cho & Kim, 2006; Kim et al., 2007). Le génome de certains membres du *Fusarium solani* Species Complex (FSSC) ont déjà été entièrement séquencés mais des chromosomes surnuméraires, impliquant donc un pool de gènes

différents, varient entre isolats (Coleman et al., 2009). Par ailleurs, il n'existe pas à notre connaissance de séquence complète du génome de souches de l'espèce *A. oxydans*. Il est envisagé dans le cadre du programme ANR Multipolsite de séquencer entièrement le génome des souches d'intérêt. Ceci permettrait notamment de concevoir des puces à ADNc permettant d'analyser les transcriptomes et détecter les gènes surexprimés en présence de HAP ou d'annoter plus précisément les protéomes (Kim et al., 2008; Filiatrault, 2011). De plus, il serait intéressant d'élucider les mécanismes impliqués dans la capacité de *F. solani* MM1 à internaliser jusqu'à 3% de sa masse en HAP. La transformation génétique de champignons du genre *Fusarium* ayant déjà été réalisée (Li et al., 2011; Navarro-Velasco et al., 2011), il est donc envisageable de construire des souches mutantes dérivées de MM1 et d'étudier leur capacité d'absorption par microscopie et dosage des HAP internalisés dans la biomasse. Les cibles de ces mutations pourraient être notamment des composants du cytosquelette intervenant dans la formation des vésicules d'endocytose et dans leur transport, la glutathion-S-transférase (GST) ou tout autre gène dont la surexpression aurait été détectée par l'approche décrite ci-dessus. L'expression de ces gènes et/ou l'activité de ces enzymes pourraient être ainsi étudiées dans diverses conditions, notamment (i) en coculture, pour détecter un éventuel effet direct de l'interaction entre les deux souches sur les potentiels de dissipation, (ii) en présence d'exsudats racinaires, de synthèse ou produits en hydroponie ou dans les dispositifs de culture stérile de luzerne, pour évaluer l'effet des plantes ou (iii) en présence d'ETM pour évaluer les effets des multipollutions.

Par ailleurs, pour continuer à utiliser les souches isolées dans ce travail dans le cadre de l'étude des interactions écologiques dans des milieux plus complexes, mais également dans une perspective appliquée de bioaugmentation, des indicateurs sensibles et spécifiques de leur croissance et de leur activité doivent être développés. Un travail de bioinformatique devrait être effectué pour dessiner des amorces de PCR spécifiques des souches en complément de la démarche d'identification des marqueurs génétiques impliqués dans la dissipation développée au paragraphe précédent. Il serait également très intéressant d'utiliser la SIP (marquage par des isotopes stables) en ciblant parmi les acides nucléiques marqués les marqueurs génétiques des souches inoculées pour déterminer leur participation à la dissipation observée (Pandey et al., 2009; Cébron et al., 2011b). Ainsi, différents effets complexes pourraient être étudiés en microcosmes de sol. La symbiose mycorhizienne est susceptible d'influencer la structure des communautés microbiennes et donc la dissipation des HAP dans la rhizosphère (Joner & Leyval, 2001; Zhou, 2010). Une expérience en microcosmes similaire à celle réalisée au Chapitre III-5 pourrait être réalisée en incluant un traitement de luzerne mycorhizée et différentes espèces de champignons mycorhiziens pourraient être testées. De la même manière, cette expérience en microcosmes pourrait être réalisée avec d'autres espèces de plantes, seules ou en assemblage, afin de déterminer l'influence de l'espèce végétale sur (i) l'adaptation de la microflore indigène à la pollution aux HAP et (ii) la compétitivité des souches inoculées face à cette microflore. Dans ces expériences, il paraît également essentiel de déterminer la part active des communautés microbiennes. L'activité globale de ces communautés peut être évaluée par exemple par la mesure du taux de transcription des

opérons ribosomiques (Hirsch et al., 2010). Les activités de dégradation, à mettre en relation avec la dissipation des HAP observée, pourraient être évaluées par la mesure de l'expression des gènes codant les enzymes connues pour être impliquées, comme les (PAH-RHD) α des bactéries à Gram positif et négatif, les catéchol-dioxygénases, les laccases fongiques ou encore les LME et/ou la mesure de l'activité de ces enzymes (Bogan et al., 1996; Collins & Dobson, 1997; Habe & Omori, 2003; Cébron et al., 2011b). Enfin, dans l'ensemble des expériences proposées, le facteur temps ne devrait pas être négligé : les paramètres microbiens et les teneurs en HAP devraient être mesurés de manière plus fréquente (une fois par semaine par exemple) que lors de l'expérience en microcosmes de sol, où il est difficile d'imaginer ce qu'il s'est produit entre le 1^{er} et le 46^{ème} jour.

D'autre part, l'étude des communautés fongiques des parcelles lysimétriques étudiées au Chapitre III-1 a été réalisée sur l'ADN ribosomique du sol et ne faisait donc pas état des populations réellement actives dans ce sol. L'influence du couvert végétal et du traitement de désorption thermique sur l'activité de la communauté pourrait être étudiée en réalisant la même analyse sur les ARN ribosomiques (voir paragraphe précédent). Les sols étant conservés à -80°C depuis leur prélèvement, il est envisageable d'en extraire les ARN totaux. Néanmoins à ce jour, l'extraction des ARN n'a pu être réalisée à partir du sol NM, en raison de la faible activité de la microflore dans ce sol et de ses caractéristiques physico-chimiques très particulières (teneur en S, notamment).

Conclusion générale

Les résultats de ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence l'importance fondamentale des différents niveaux d'interactions écologiques sur la dissipation des HAP par les microorganismes, par une double approche *in situ* et *in vitro*.

La présence de HAP dans un sol sélectionne des microorganismes fongiques et bactériens résistants et compétents en matière de dissipation des HAP. Dans les microcosmes de sol artificiellement pollué, cette adaptation a conduit très rapidement à l'augmentation de la proportion de bactéries dégradantes et à une importante dissipation des HAP. Dans le sol historiquement contaminé, cette pression de sélection semble avoir favorisé les Ascomycètes, aboutissant à un indice de diversité fongique de Shannon relativement faible avec une très forte dominance des quelques espèces les plus compétitives. Le champignon *Fusarium solani* MM1 et la bactérie *Arthrobacter oxydans* Pyr2MsHM11, isolées à partir du sol pollué de Neuves-Maisons et capables de dissiper efficacement les HAP *in vitro*, sont également des exemples de cette adaptation.

Lorsqu'elles étaient placées en coculture, une interaction négative entre les deux souches modèles a drastiquement réduit la croissance de l'une et/ou de l'autre et, indirectement, leur potentiel de

dissipation. Ceci met en évidence l'effet déterminant des interactions entre microorganismes sur l'expression de leurs potentiels métaboliques. Par ailleurs, les résultats obtenus suggèrent que le couvert végétal est un facteur déterminant de la croissance et de la structure des communautés fongiques. Cet effet pourrait même être plus important que celui d'un traitement de dépollution comme la désorption thermique, modifiant pourtant drastiquement les caractéristiques physico-chimique des sols. L'abondance fongique a été significativement augmentée en présence de plantes dans le sol de Neuves-Maisons, illustration de l'effet rhizosphère quantitatif. De plus, des modifications importantes de la structure des communautés fongiques ont été observées en présence de luzerne et la présence d'un assemblage de plantes d'espèces différentes a même eu un effet positif sur l'indice de diversité fongique de Shannon.

La présence de plantes pourrait représenter un avantage non négligeable pour les procédés d'atténuation naturelle impliquant la biomasse et l'activité microbiennes et pour le rétablissement de la diversité fonctionnelle après une perturbation environnementale. De plus, les effets observés *in situ* et sur le long terme n'ont pas toujours été retrouvés dans une expérience en microcosmes de sol à court terme, soulignant l'importance des échelles spatiales et temporelles sur la tendance et l'amplitude des pressions de sélection exercées par les HAP et les plantes. Par ailleurs, dans les mêmes conditions expérimentales, les communautés fongiques et bactériennes n'ont pas toujours répondu de la même façon à ces pressions de sélection. Considérant l'importance fondamentale des champignons dans le fonctionnement des écosystèmes, l'étude des communautés fongiques devrait donc être intégrée de manière systématique, au même titre que l'étude des communautés bactériennes, aux travaux d'évaluation de l'impact des pollutions.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abd-Elsalam KA, IN Aly, MA Abdel-Satar, MS Khalil et JA Verreet (2003) PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *African Journal of Biotechnology* **2**(4): 96-103.
- Abhilash PC, S Jamil et N Singh (2009) Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnology Advances* **27**(4): 474-488.
- Achten C, S Cheng, KL Straub et T Hofmann (2011) The lack of microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal-rich soils. *Environmental Pollution* **159**(2): 623-629.
- Aitken MD, WT Stringfellow, RD Nagel, C Kazunga et SH Chen (1998) Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Canadian Journal of Microbiology* **44**(8): 743-752.
- Akhmetov LI, AE Filonov, IF Puntus, IA Kosheleva, IA Nechaeva, DR Yonge, JN Petersen et AM Boronin (2008) Horizontal transfer of catabolic plasmids in the process of naphthalene biodegradation in model soil systems. *Mikrobiologiya* **77**(1): 29-39.
- Aksornchu P, P Prasertsan et V Sobhon (2008) Isolation of arsenic-tolerant bacteria from arsenic-contaminated soil. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **30**(SUPPL. 1): 95-102.
- Aksu Z (2005) Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry* **40**(3-4): 997-1026.
- Alavi SM, S Sanjari, F Durand, C Brin, C Manceau et S Poussier (2008) Assessment of the genetic diversity of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas fuscans* subsp. *fuscans* as a basis to identify putative pathogenicity genes and a type III secretion system of the SPI-1 family by multiple suppression subtractive hybridizations. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(10): 3295-301.
- Allard A-S, M Remberger et AH Neilson (2000) The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* **46**(1): 43-49.
- Amellal N, J Berthelin et JM Portal (2001a) Effect of soils structure on the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons within aggregates of a contaminated soil. *Applied Geochemistry* **16**: 1611-1619.
- Amellal N, JM Portal, T Vogel et J Berthelin (2001b) Distribution and location of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH-degrading bacteria within polluted soil aggregates. *Biodegradation* **12**(1): 49-57.
- Amezcuza-Allieri MA, JR Lead et R Rodriguez-Vazquez (2005) Impact of microbial activity on copper, lead and nickel mobilization during the bioremediation of soil PAHs. *Chemosphere* **61**(4): 484-491.
- Anastasi A, T Coppola, V Prigione et GC Varese (2009) Pyrene degradation and detoxification in soil by a consortium of basidiomycetes isolated from compost: Role of laccases and peroxidases. *Journal of Hazardous Materials* **165**(1-3): 1229-1233.

- Anderson IC et JWG Cairney (2004) Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environmental Microbiology* **6**(8): 769-779.
- Andersson BE, L Welinder, PA Olsson, S Olsson et T Henrysson (2000) Growth of inoculated white-rot fungi and their interactions with the bacterial community in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, as measured by phospholipid fatty acids. *Bioresource Technology* **73**(1): 29-36.
- Andreoni V, L Cavalca, MA Rao, G Nocerino, S Bernasconi, E Dell'Amico, M Colombo et L Gianfreda (2004) Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* **57**(5): 401-412.
- Andrews JH (1992). Fungal Life-History Strategies. *The Fungal Community*. G. C. Carroll and D. T. Wicklow. New-York/Basel/Hong Kong, Marcel Dekker, Inc: 119-145.
- Anglada Ñ, A Urtiaga et I Ortiz (2009) Contributions of electrochemical oxidation to waste-water treatment: Fundamentals and review of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **84**(12): 1747-1755.
- Arenz BE, BW Held, JA Jurgens, RL Farrell et RA Blanchette (2006) Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica. *Soil Biology and Biochemistry* **38**(10): 3057-3064.
- Aro TPMP (2005) Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* **29**(4): 719-739.
- Atagana H, R Haynes et F Wallis (2006) Fungal Bioremediation of Creosote-Contaminated Soil: A Laboratory Scale Bioremediation Study Using Indigenous Soil Fungi. *Water, Air & Soil Pollution* **172**(1): 201-219.
- Atagana HI (2003) Bioremediation of creosote-contaminated soil: a pilot-scale landfarming evaluation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**(6): 571-581.
- Atagana HI (2004) Bioremediation of creosote-contaminated soil in South Africa by landfarming. *Journal of Applied Microbiology* **96**(3): 510-520.

B

- Bagga S et D Straney (2000) Modulation of cAMP and phosphodiesterase activity by flavonoids which induce spore germination of *Nectria haematococca* MP VI (*Fusarium solani*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* **56**(2): 51-61.
- Balajee SA et KA Marr (2002) Conidial Viability Assay for Rapid Susceptibility Testing of *Aspergillus* Species. *Journal of Clinical Microbiology* **40**(8): 2741-2745.
- Baldrian P (2003) Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology* **32**(1): 78-91.
- Baldrian P (2008) Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: Ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecology* **1**(1): 4-12.

- Baldrian P, C in Der Wiesche, J Gabriel, F Nerud et F Zadrazil (2000) Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(6): 2471-8.
- Baldrian P et V Valaskova (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS Microbiology Reviews* **32**(3): 501-521.
- Baldrian P, J Voriskova, P Dobiasova, V Merhautova, L Lisa et V Valaskova (2011) Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant and Soil* **338**(1): 111-125.
- Baldwin BR, CH Nakatsu et L Nies (2003) Detection and Enumeration of Aromatic Oxygenase Genes by Multiplex and Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(6): 3350-3358.
- Banerjee S, R Palit, C Sengupta et D Standing (2011) Stress induced phosphate solubilization by arthrobacter sp. and bacillus sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop Science* **4**(6): 378-383.
- Barratt SR, AR Ennos, M Greenhalgh, GD Robson et PS Handley (2003) Fungi are the predominant micro-organisms responsible for degradation of soil-buried polyester polyurethane over a range of soil water holding capacities. *Journal of Applied Microbiology* **95**(1): 78-85.
- Baudoin E, E Benizri et A Guckert (2003) Impact of artificial root exudates on the bacterial community structure in bulk soil and maize rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* **35**: 1183-1192.
- Begonja Kolar A, D Hrsak, S Fingler, H Cetkovic, I Petric et NU Kolic (2007) PCB-degrading potential of aerobic bacteria enriched from marine sediments. *International Biodeterioration and Biodegradation* **60**(1): 16-24.
- Bekki K, H Takigami, G Suzuki, N Tang et K Hayakawaa (2009) Evaluation of toxic activities of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives using in vitro bioassays. *Journal of Health Science* **55**(4): 601-610.
- Bengtsson G, N Törneman et X Yang (2010) Spatial uncoupling of biodegradation, soil respiration, and PAH concentration in a creosote contaminated soil. *Environmental Pollution* **158**(9): 2865-2871.
- Bent SJ et LJ Forney (2008) The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME J* **2**(7): 689-95.
- Bezalel L, Y Hadar, PP Fu, JP Freeman et CE Cerniglia (1996) Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(7): 2554-2559.
- Biache C, T Ghislain, P Faure et L Mansuy-Huault (2011) Low temperature oxidation of a coking plant soil organic matter and its major constituents: An experimental approach to simulate a long term evolution. *Journal of Hazardous Materials* **188**(1-3): 221-230.
- Biache C, L Mansuy-Huault, P Faure, C Munier-Lamy et C Leyval (2008) Effects of thermal desorption on the composition of two coking plant soils: Impact on solvent extractable organic compounds and metal bioavailability. *Environmental Pollution* **156**(3): 671-677.
- Binet P, JM Portal et C Leyval (2000) Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant and Soil* **227**(1): 207-213.
- Binet P, JM Portal et C Leyval (2001) Application of GC-MS to the study of anthracene disappearance in the rhizosphere of ryegrass. *Organic Geochemistry* **32**(2): 217-222.

- Blumenroth P et I Wagner-Döbler (1998) Survival of inoculants in polluted sediments: Effect of strain origin and carbon source competition. *Microbial Ecology* **35**(3): 279-288.
- Bogan BW, B Schoenike, RT Lamar et D Cullen (1996) Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(7): 2381-2386.
- Bogan BW et WR Sullivan (2003) Physicochemical soil parameters affecting sequestration and mycobacterial biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Chemosphere* **52**(10): 1717-1726.
- Boonchan S, ML Britz et GA Stanley (2000) Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(3): 1007-19.
- Brezna B, AA Khan et CE Cerniglia (2003) Molecular characterization of dioxygenases from polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading *Mycobacterium* spp. *FEMS Microbiology Letters* **223**(2): 177-183.
- Brezna B, O Kweon, RL Stingley, JP Freeman, AA Khan, B Polek, RC Jones et CE Cerniglia (2006) Molecular characterization of cytochrome P450 genes in the polycyclic aromatic hydrocarbon degrading *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**(4): 522-532.
- Brodkorb TS et RL Legge (1992) Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(9): 3117-3121.
- Broeckling CD, AK Broz, J Bergelson, DK Manter et JM Vivanco (2008) Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(3): 738-744.
- Brul S, J Nussbaum et SK Dielbandhoesing (1997) Fluorescent probes for wall porosity and membrane integrity in filamentous fungi. *Journal of Microbiological Methods* **28**(3): 169-178.
- Bugg T, JM Foght, MA Pickard et MR Gray (2000) Uptake and active efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* LP6a. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(12): 5387-5392.
- Bumpus JA, M Tien, D Wright et SD Aust (1985) Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* **228**(4706): 1434-1436.
- Burke RM et JWG Cairney (2002) Laccases and other polyphenol oxidases in ecto- and ericoid mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **12**(3): 105-116.
- Butler JL, MA Williams, PJ Bottomley et DD Myrold (2003) Microbial Community Dynamics Associated with Rhizosphere Carbon Flow. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(11): 6793-6800.
- Byss M, D Elhottov, J Trlska et P Baldrian (2008) Fungal bioremediation of the creosote-contaminated soil: Influence of *Pleurotus ostreatus* and *Irpex lacteus* on polycyclic aromatic hydrocarbons removal and soil microbial community composition in the laboratory-scale study. *Chemosphere* **73**(9): 1518-1523.

C

- Cabrerizo A, J Dachs, C Moeckel, MJ Ojeda, G Caballero, D Barcelo et KC Jones (2011) Ubiquitous net volatilization of polycyclic aromatic hydrocarbons from soils and parameters influencing their soil:air partitioning. *Environmental Science and Technology* **45**(11): 4740-4747.
- Canet R, JG Birnstingl, DG Malcolm, JM Lopez-Real et AJ Beck (2001) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by native microflora and combinations of white-rot fungi in a coal-tar contaminated soil. *Bioresource Technology* **76**(2): 113-117.
- Cébron A, T Beguiristain, P Faure, MP Norini, JF Masfaraud et C Leyval (2009) Influence of vegetation on the *in situ* bacterial community and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degraders in aged PAH-contaminated or thermal-desorption-treated soil. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(19): 6322-6330.
- Cébron A, J Cortet, S Criquet, C Biaz, V Calvert, C Caupert, C Pernin et C Leyval (2011a) Biological functioning of PAH-polluted and thermal desorption-treated soils assessed by fauna and microbial bioindicators,. *Research in Microbiology* **162**(9): 896-907.
- Cébron A, B Louvel, P Faure, C France-Lanord, Y Chen, JC Murrell et C Leyval (2011b) Root exudates modify bacterial diversity of phenanthrene degraders in PAH-polluted soil but not phenanthrene degradation rates. *Environmental Microbiology* **13**(3): 722-736.
- Cébron A, MP Norini, T Beguiristain et C Leyval (2008) Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods* **73**(2): 148-59.
- Cerniglia CE (1993) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* **4**(3): 331-338.
- Cerniglia CE (1997) Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **19**(5-6): 324-333.
- Chaîneau CH, J Morel, J Dupont, E Bury et J Oudot (1999) Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Science of Total Environment* **227**(2-3): 237-247.
- Chen B, Y Wang et D Hu (2010) Biosorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solutions by a consortium of white-rot fungi. *Journal of Hazardous Materials* **179**(1-3): 845-851.
- Chen B, M Yuan et H Liu (2011) Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solution using plant residue materials as a biosorbent. *Journal of Hazardous Materials* **188**(1-3): 436-442.
- Chen M, B Chen et P Marschner (2008) Plant growth and soil microbial community structure of legumes and grasses grown in monoculture or mixture. *Journal of Environmental Sciences* **20**(10): 1231-1237.
- Chiapusio G, S Pujol, M Toussaint, P Badot et P Binet (2007) Phenanthrene toxicity and dissipation in rhizosphere of grassland plants (*Lolium perenne* L. and *Trifolium pratense* L.) in three spiked soils. *Plant and Soil* **294**(1): 103-112.

- Cho CW et CW Kim (2006) Toxicoproteomics in the study of aromatic hydrocarbon toxicity. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **11**(3): 187-198.
- Choi HY, MH Ryder, MR Gillings, HW Stokes, KM Ophel-Keller et DA Veal (2003) Survival of a lacZY-marked strain of *Pseudomonas corrugata* following a field release. *FEMS Microbiology Ecology* **43**(3): 367-374.
- Chojnacka K (2010) Biosorption and bioaccumulation - the prospects for practical applications. *Environment International* **36**(3): 299-307.
- Chroma L, M Mackova, P Kucerova, C in der Wiesche, J Burkhard et T Macek (2002) Enzymes in Plant Metabolism of PCBs and PAHs. *Acta Biotechnologica* **22**(1-2): 35-41.
- Chulalaksananukul S, GM Gadd, P Sangvanich, P Sihanonth, J Piapukiew et AS Vangnai (2006) Biodegradation of benzo(a)pyrene by a newly isolated *Fusarium* sp. *FEMS Microbiology Letters* **262**(1): 99-106.
- Civilini M, M De Bertoldi et G Tell (1999) Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* 2NR degrading naphthalene. *Letters in Applied Microbiology* **29**(3): 181-186.
- Coates JD, J Woodward, J Allen, P Philp et DR Lovley (1997) Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(9): 3589-3593.
- Coleman JJ, SD Rounsley et M Rodriguez-Carres (2009) The Genome of *Nectria haematococca*: Contribution of Supernumerary Chromosomes to Gene Expansion. *PLoS Genetics* **5**(8): e1000618.
- Collins PJ et ADW Dobson (1997) Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(9): 3444-3450.
- Colombo M, L Cavalca, S Bernasconi et V Andreoni (2011) Bioremediation of polyaromatic hydrocarbon contaminated soils by native microflora and bioaugmentation with *Sphingobium chlorophenolicum* strain C3R: A feasibility study in solid- and slurry-phase microcosms. *International Biodeterioration and Biodegradation* **65**(1): 191-197.
- Conney AH (1982) Induction of microsomal enzymes for foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Research* **42**(12): 4875-4917.
- Coppotelli BM, A Ibarrolaza, MT Del Panno et IS Morelli (2008) Effects of the inoculant strain *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA on soil bacterial community and biodegradation in phenanthrene-contaminated soil. *Microbial Ecology* **55**(2): 173-183.
- Corgié SC, T Beguiristain et C Leyval (2004) Spatial distribution of bacterial communities and phenanthrene degradation in the rhizosphere of *Lolium perenne* L. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(6): 3552-3557.
- Corgié SC, T Beguiristain et C Leyval (2006a) Differential composition of bacterial communities as influenced by phenanthrene and dibenzo[a,h]anthracene in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Biodegradation* **17**(6): 511-521.
- Corgié SC, T Beguiristain et C Leyval (2006b) Differential composition of bacterial communities as influenced by phenanthrene and dibenzo[a,h]anthracene in the rhizosphere of ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Biodegradation* **17**(6): 511-21.

- Corgié SC, T Beguiristain et C Leyval (2006c) Profiling 16S bacterial DNA and RNA: Difference between community structure and transcriptional activity in phenanthrene polluted sand in the vicinity of plant roots. *Soil Biology and Biochemistry* **38**(7): 1545-1553.
- Corgié SC, F Fons, T Beguiristain et C Leyval (2006d) Biodegradation of phenanthrene, spatial distribution of bacterial populations and dioxygenase expression in the mycorrhizosphere of *Lolium perenne* inoculated with *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **16**(3): 207-212.
- Cornelissen G, PCM Van Noort et HAJ Govers (1997) Desorption kinetics of chlorobenzenes, PAHs, and PCBs: sediment extraction with Tenax and effects of contact time and solute hydrophobicity. *Environ Toxicol Chem* **16**(1351-1357).
- Cosgrove L, PL McGeechan, PS Handley et GD Robson (2007) Effect of biostimulation and bioaugmentation on degradation of polyurethane buried in soil. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(3): 810-819.
- Crawford JW, JA Harris, K Ritz et IM Young (2005) Towards an evolutionary ecology of life in soil. *Trends in Ecology and Evolution* **20**(2): 81-87.
- Crestani J, M Fontes Landell, J Faganello, M Henning Vainstein, H Simpson Vishniac et P Valente (2009) *Cryptococcus terrestris* sp. nov., a tremellaceous, anamorphic yeast phylogenetically related to *Cryptococcus flavescens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **59**(3): 631-636.
- Criquet S, E Joner, P Leglize et C Leyval (2000) Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Biotechnology Letters* **22**(21): 1733-1737.
- Curlevski NJA, Z Xu, IC Anderson et JWG Cairney (2010) Converting Australian tropical rainforest to native *Araucariaceae* plantations alters soil fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry* **42**(1): 14-20.

D

- D'Annibale A, M Ricci, V Leonardi, D Quarantino, E Mincione et M Petruccioli (2005) Degradation of aromatic hydrocarbons by white-rot fungi in a historically contaminated soil. *Biotechnology and Bioengineering* **90**(6): 723-731.
- D'Annibale A, F Rosetto, V Leonardi, F Federici et M Petruccioli (2006) Role of autochthonous filamentous fungi in bioremediation of a soil historically contaminated with aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(1): 28-36.
- Da Silva M, E Esposito, JD Moody, VP Canhos et CE Cerniglia (2004) Metabolism of aromatic hydrocarbons by the filamentous fungus *Cyclothyrium* sp. *Chemosphere* **57**(8): 943-952.
- Davidova IA, LM Gieg, KE Duncan et JM Suflita (2007) Anaerobic phenanthrene mineralization by a carboxylating sulfate-reducing bacterial enrichment. *ISME Journal* **1**(5): 436-442.
- Dazy M, V Jung, J-F Férard et J-F Masfaraud (2008) Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: Role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. *Chemosphere* **74**(1): 57-63.

- De Bellis T, G Kernaghan et P Widden (2007) Plant community influences on soil microfungal assemblages in boreal mixed-wood forests. *Mycologia* **99**(3): 356-367.
- de Boer W, LB Folman, RC Summerbell et L Boddy (2005) Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews* **29**(4): 795-811.
- De Boulois HD, L Voets, B Delvaux, I Jakobsen et S Declerck (2006) Transport of radiocaesium by arbuscular mycorrhizal fungi to *Medicago truncatula* under in vitro conditions. *Environmental Microbiology* **8**(11): 1926-1934.
- de Kok TCM, HAL Driee, JGF Hogervorst et JJ BriedÈ (2006) Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. *Reviews in Mutation Research* **613**(2-3): 103-122.
- Debiane D, G Garon, A Verdin, J Fontaine, R Durand, A Grandmougin-Ferjani, P Shirali et AL-H Sahraoui (2008) In vitro evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environmental and Experimental Botany* **64**(2): 120-127.
- Demir I, Z Demirbag et AO Belduz (2000) Isolation and characterization of phenanthrene decomposing *Pseudomonas* sp. *Fresenius Environmental Bulletin* **9**(1-2): 009-016.
- Deziel E, G Paquette, R Villemur, F Lepine et J Bisaillon (1996) Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(6): 1908-1912.
- Ding GC, H Heuer, S Zühlke, M Spiteller, GJ Pronk, K Heister, I Kögel-Knabner et K Smalla (2010) Soil type-dependent responses to phenanthrene as revealed by determining the diversity and abundance of polycyclic aromatic hydrocarbon ring-hydroxylating dioxygenase genes by using a novel PCR detection system. *Applied and Environmental Microbiology* **76**(14): 4765-4771.
- Dirginciute-Volodkiene V et D Peciulyte (2011) Increased soil heavy metal concentrations affect the structure of soil fungus community. *Agriculturae Conspectus Scientificus* **76**(1): 27-33.
- Doddapaneni H et JS Yadav (2004) Differential regulation and xenobiotic induction of tandem P450 monooxygenase genes pc-1 (CYP63A1) and pc-2 (CYP63A2) in the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **65**(5): 559-565.
- Durrant LR (1996) Biodegradation of lignocellulosic materials by soil fungi isolated under anaerobic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation* **37**(3-4): 189-195.

E

- Edwards IP, RA Upchurch et DR Zak (2008) Isolation of fungal cellobiohydrolase I genes from sporocarps and forest soils by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(11): 3481-3489.
- Eggen T et A Majcherczyk (1998) Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **41**(2): 111-117.

- El-Alawi YS, BJ McConkey, D George Dixon et BM Greenberg (2002) Measurement of short- and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **51**(1): 12-21.
- El-Ani AS (1988) Chlamydospores in *Fusarium solani*. *Mycologia* **80**(8): 885-887.
- El Azhari N, M Devers-Lamrani, G Chatagnier, N Rouard et F Martin-Laurent (2010) Molecular analysis of the catechol-degrading bacterial community in a coal wasteland heavily contaminated with PAHs. *Journal of Hazardous Materials* **177**(1-3): 593-601.
- El Fantroussi S et SN Agathos (2005) Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Current Opinion in Microbiology* **8**(3): 268-275.
- Elshahed MS, NH Youssef et AM Spain (2008) Novelty and uniqueness patterns of rare members of the soil biosphere. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(17): 5422-5428.
- Enell A, F Reichenberg, G Ewald et P Warfvinge (2005) Desorption kinetics studies on PAH-contaminated soil under varying temperatures. *Chemosphere* **61**(10): 1529-1538.
- Enell A, F Reichenberg, P Warfvinge et G Ewald (2004) A column method for determination of leaching of polycyclic aromatic hydrocarbons from aged contaminated soil. *Chemosphere* **54**(6): 707-715.
- Eom IC, C Rast, AM Veber et P Vasseur (2007) Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **67**(2): 190-205.
- Errakhi R, A Lebrihi et M Barakate (2009) *In vitro* and *in vivo* antagonism of actinomycetes isolated from Moroccan rhizospheric soils against *Sclerotium rolfsii*: A causal agent of root rot on sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Applied Microbiology* **107**(2): 672-681.
- Essien JP, SI Eduok et AA Olajire (2011) Distribution and ecotoxicological significance of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments from Iko River estuary mangrove ecosystem. *Environmental Monitoring and Assessment* **176**(1-4): 99-107.

F

- Fan S, P Li, Z Gong, W Ren et N He (2008) Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Chemosphere* **71**(8): 1593-8.
- Federici E, V Leonardi, M Giubilei, D Quarantino, R Spaccapelo, A D'Annibale et M Petruccioli (2007) Addition of allochthonous fungi to a historically contaminated soil affects both remediation efficiency and bacterial diversity. *Applied Microbiology and Biotechnology* **77**(1): 203-211.
- Felske A, ADL Akkermans et WM De Vos (1998) Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(11): 4581-4587.
- Field JA, E De Jong, GF Costa et JAM De Bont (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(7): 2219-2226.

Fierer N, JA Jackson, R Vilgalys et RB Jackson (2005) Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Applied and Environmental Microbiology* **71**(7): 4117-4120.

Filiatrault MJ (2011) Progress in prokaryotic transcriptomics. *Current Opinion in Microbiology* **14**(5): 579-586.

Fismes J, C Perrin-Ganier, P Empereur-Bissonnet et JL Morel (2002) Soil-to-Root Transfer and Translocation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Vegetables Grown on Industrial Contaminated Soils. *Journal of Environmental Quality* **31**(5): 1649-1656.

Foght JM et DWS Westlake (1996) Transposon and spontaneous deletion mutants of plasmid-borne genes encoding polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Biodegradation* **7**(4): 353-366.

G

Gallou A, S Cranenbrouck et S Declerck (2009) *Trichoderma harzianum* elicits defence response genes in roots of potato plantlets challenged by *Rhizoctonia solani*. *European Journal of Plant Pathology* **124**(2): 219-230.

Gao Y and L Zhu (2004) Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere* **55**(9): 1169-78.

Garon D, S Krivobok et F Seigle-Murandi (2000) Fungal degradation of fluorene. *Chemosphere* **40**(1): 91-97.

Garon D, S Krivobok, D Wouessidjewe et F Seigle-Murandi (2002) Influence of surfactants on solubilization and fungal degradation of fluorene. *Chemosphere* **47**(3): 303-309.

Garon D, L Sage et F Seigle-Murandi (2004) Effects of Fungal Bioaugmentation and Cyclodextrin Amendment on Fluorene Degradation in Soil Slurry. *Biodegradation* **15**(1): 1-8.

Gehrig I, H-J Bart, T Anke et R Germerdonk (1998) Influence of morphology and rheology on the production characteristics of the basidiomycete *Cyathus striatus*. *Biotechnology and Bioengineering* **59**(5): 525-533.

Gerardi MH (2006). Wastewater Bacteria. Hoboken, Wiley-Intersciences.

Gianfreda L et MA Rao (2004) Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology* **35**(4): 339-354.

Gramss et H Bergmann (2007) Microbial competition, lack in macronutrients, and acidity as main obstacles to the transfer of basidiomycetous ground fungi into (organically or heavy-metal contaminated) soils. *Journal of Basic Microbiology* **47**(4): 309-316.

Gramss G, B Kirsche, KD Voigt, T Günther et W Fritsche (1999a) Conversion rates of five polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid cultures of fifty-eight fungi and the concomitant production of oxidative enzymes. *Mycological Research* **103**(8): 1009-1018.

- Gramss G, K-D Voigt et B Kirsche (1999b) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. *Biodegradation* **10**(1): 51-62.
- Gramss G, KD Voigt et B Kirsche (1999c) Oxidoreductase enzymes liberated by plant roots and their effects on soil humic material. *Chemosphere* **38**(7): 1481-1494.
- Griffiths BS, HL Kuan, K Ritz, LA Glover, AE McCaig et C Fenwick (2004) The relationship between microbial community structure and functional stability, tested experimentally in an upland pasture soil. *Microbial Ecology* **47**(1): 104-113.
- Griffiths BS, K Ritz, N Ebbelwhite et G Dobson (1998) Soil microbial community structure: Effects of substrate loading rates. *Soil Biology and Biochemistry* **31**(1): 145-153.
- Groleau-Renaud V, S Plantureux et A Guckert (1998) Influence of plant morphology on root exudation of maize subjected to mechanical impedance in hydroponic conditions. *Plant and Soil* **201**(2): 231-239.
- Gullotto A, S Branciamore, I Duchi, MFP CaÒo, D Randazzo, S Tilli, P Giardina, G Sannia, A Scozzafava et F Briganti (2008) Combined action of a bacterial monooxygenase and a fungal laccase for the biodegradation of mono- and poly-aromatic hydrocarbons. *Bioresource Technology* **99**(17): 8353-8359.

H

- Haase S, L Philippot, G Neuman, S Marhan et E Kandeler (2008) Local response of bacterial densities and enzyme activities to elevated atmospheric CO₂ and different N supply in the rhizosphere of *Plaseolus vulgaris*. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 1225-1234.
- Habe H et T Omori (2003) Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **67**(2): 225-243.
- Hakala T, K Hildén, P Maijala, C Olsson et A Hatakka (2006) Differential regulation of manganese peroxidases and characterization of two variable MnP encoding genes in the white-rot fungus *Physisporinus rivulosus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**(4): 839-849.
- Halsall DM (1993) Inoculation of wheat straw to enhance lignocellulose breakdown and associated nitrogenase activity. *Soil Biology and Biochemistry* **25**(4): 419-429.
- Hamayun M, SA Khan, AL Khan, G Rehman, EY Sohn, AA Shah, SK Kim, GJ Joo et IJ Lee (2009) *Phoma herbarum* as a new gibberellin-producing and plant growth-promoting fungus. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **19**(10): 1244-1249.
- Hammel KE, AN Kapich, KA Jensen et ZC Ryan (2002) Reactive oxygen species as agents of wood decay by fungi. *Enzyme and Microbial Technology* **30**(4): 445-453.
- Hannula SE, W De Boer et JA Van Veen (2010) *In situ* dynamics of fungal communities under different genotypes of potato, including a genetically modified cultivar. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 2211-2223.
- Haritash AK et CP Kaushik (2009) Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* **169**(1-3): 1-15.

- Hartley AJ, K De Mattos-Shipley, CM Collins, S Kilaru, GD Foster et AM Bailey (2009) Investigating pleuromutilin-producing *Clitopilus* species and related basidiomycetes. *FEMS Microbiology Letters* **297**(1): 24-30.
- Hatzinger PB et M Alexander (1995) Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science and Technology* **29**(2): 537-545.
- Henry A, W Doucette, J Norton, S Jones, J Chard et B Bugbee (2006) An axenic plant culture system for optimal growth in long-term studies. *Journal of Environmental Quality* **35**(2): 590-598.
- Heuer H, M Krsek, P Baker, K Smalla et EMH Wellington (1997) Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(8): 3233-3241.
- Hill TCJ, KA Walsh, JA Harris et BF Moffett (2003) Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* **43**(1): 1-11.
- Hiltner L (1904) Über neuere Erfahrung und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbacteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschafts-Gesellschaft* **98**: 59-78.
- Hirsch PR, TH Mauchline et IM Clark (2010) Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* **42**(6): 878-887.
- Holden PA, MG LaMontagne, AK Bruce, WG Miller et SE Lindow (2002) Assessing the Role of *Pseudomonas aeruginosa* Surface-Active Gene Expression in Hexadecane Biodegradation in Sand. *Applied and Environmental Microbiology* **68**(5): 2509-2518.
- Hollister EB, AS Engledow, AJM Hammett, TL Provin, HH Wilkinson et TJ Gentry (2010) Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments. *ISME Journal* **4**(6): 829-838.
- Hong JW, JY Park et GM Gadd (2010) Pyrene degradation and copper and zinc uptake by *Fusarium solani* and *Hypocrea lixii* isolated from petrol station soil. *Journal of Applied Microbiology* **108**(6): 2030-2040.
- Hong L, U Ghosh, T Mahajan, RN Zare et RG Luthy (2003) PAH sorption mechanism and partitioning behavior in lampblack-impacted soils from former oil-gas plant sites. *Environmental Science and Technology* **37**(16): 3625-3634.
- Houlden A, TM Timms-Wilson, MJ Day et MJ Bailey (2008) Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiology Ecology* **65**(2): 193-201.
- Hoyer PB (2001) Reproductive toxicology: Current and future directions. *Biochemical Pharmacology* **62**(12): 1557-1564.
- Hu X, P Wang et Hm Hwang (2009) Oxidation of anthracene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology* **100**(21): 4963-4968.
- Hua SST, MT Brandl, B Hernlem, JG Eng et SBL Sarreal (2011) Fluorescent Viability Stains to Probe the Metabolic Status of Aflatoxigenic Fungus in Dual Culture of *Aspergillus flavus* and *Pichia anomala*. *Mycopathologia* **171**(2): 133-138.
- Hybholt TK, J Aamand et AR Johnsen (2011) Quantification of centimeter-scale spatial variation in PAH, glucose and benzoic acid mineralization and soil organic matter in road-side soil. *Environmental Pollution* **159**(5): 1085-1091.

I

- In Der Wiesche C, R Martens et F Zadrazil (2003) The Effect of Interaction Between White-rot Fungi and Indigenous Microorganisms on Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil. *Water, Air & Soil Pollution* **3**(3): 73-79.
- Infantino A, M Kharrat, L Riccioni, CJ Coyne, KE McPhee et NJ Grünwald (2006) Screening techniques and sources of resistance to root diseases in cool season food legumes. *Euphytica* **147**(1-2): 201-221.

J

- Jacques RJ, BC Okeke, FM Bento, AS Teixeira, MC Peralba et FA Camargo (2008) Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresource Technology* **99**(7): 2637-43.
- Jansons VK et WJ Nickerson (1970) Induction, morphogenesis, and germination of chlamydospore of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* **104**(2): 910-921.
- Jensen Jr KA, CJ Houtman, ZC Ryan et KE Hammel (2001) Pathways for Extracellular Fenton Chemistry in the Brown Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. *Applied and Environmental Microbiology* **67**(6): 2705-2711.
- Jerke K, CH Nakatsu, F Beasley et A Konopka (2008) Comparative analysis of eight *Arthrobacter* plasmids. *Plasmid* **59**(2): 73-85.
- Jernberg C et JK Jansson (2002) Impact of 4-chlorophenol contamination and/or inoculation with the 4-chlorophenol-degrading strain, *Arthrobacter chlorophenolicus* A6L, on soil bacterial community structure. *FEMS Microbiology Ecology* **42**(3): 387-397.
- Johnsen A et U Karlson (2005) PAH Degradation Capacity of Soil Microbial Communities—Does It Depend on PAH Exposure? *Microbial Ecology* **50**(4): 488-495.
- Johnsen AR et U Karlson (2004) Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**(4): 452-459.
- Johnsen AR, S Schmidt, TK Hybholt, S Henriksen, CS Jacobsen et O Andersen (2007) Strong impact on the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading community of a PAH-polluted soil but marginal effect on PAH degradation when priming with bioremediated soil dominated by mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **73**(5): 1474-1480.
- Johnsen AR, LY Wick et H Harms (2005) Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution* **133**(1): 71-84.
- Joner E et C Leyval (2001) Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza* **10**: 155-159.

- Joner EJ, D Hirmann, OH Szolar, D Todorovic, C Leyval et AP Loibner (2004) Priming effects on PAH degradation and ecotoxicity during a phytoremediation experiment. *Environmental Pollution* **128**(3): 429-35.
- Joner EJ, A Johansen, AP Loibner, MA dela Cruz, OHJ Szolar, J-M Portal et C Leyval (2001) Rhizosphere Effects on Microbial Community Structure and Dissipation and Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Spiked Soil. *Environmental Science & Technology* **35**(13): 2773-2777.
- Joner EJ et C Leyval (2003) Rhizosphere Gradients of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Dissipation in Two Industrial Soils and the Impact of Arbuscular Mycorrhiza. *Environmental Science & Technology* **37**(11): 2371-2375.
- Joner EJ, C Leyval et JV Colpaert (2006) Ectomycorrhizas impede phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) both within and beyond the rhizosphere. *Environmental Pollution* **142**(1): 34-8.
- Juhasz AL, ML Britz et GA Stanley (2000) Evaluation of a creosote-based medium for the growth and preparation of a PAH-degrading bacterial community for bioaugmentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **24**(4): 277-284.
- Juhasz AL et R Naidu (2000) Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation* **45**(1-2): 57-88.

K

- Kallimanis A, S Frilingos, C Drinas et A Koukkou (2007) Taxonomic identification, phenanthrene uptake activity, and membrane lipid alterations of the PAH degrading *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**(3): 709-717.
- Kallimanis A, KM Labutti et A Lapidus (2011) Complete genome sequence of *Arthrobacter phenanthrenivorans* type strain (Sphe3). *Standards in Genomic Sciences* **4**(2): 123-130.
- Kanaly R, R Bartha, S Fogel et M Findlay (1997) Biodegradation of [¹⁴C]Benzo[a]pyrene Added in Crude Oil to Uncontaminated Soil. *Applied Environmental Microbiology* **63**(11): 4511-4515.
- Kandeler E, D Tscherko, KD Bruce, M Stemmer, PJ Hobbs, RD Bardgett et W Amelung (2000) Structure and function of the soil microbial community in microhabitats of a heavy metal polluted soil. *Biology and Fertility of Soils* **32**(5): 390-400.
- Kang H, SY Hwang, YM Kim, E Kim, YS Kim, SK Kim, SW Kim, CE Cerniglia, KL Shuttleworth et GJ Zylstra (2003) Degradation of phenanthrene and naphthalene by a *Burkholderia* species strain. *Canadian Journal of Microbiology* **49**(2): 139-144.
- Kaur R, J Kaur et RS Singh (2010) Nonpathogenic *Fusarium* as a biological control agent. *Plant Pathology Journal* **9**(3): 88-100.
- Kerem Z, D Friesem et Y Hadar (1992) Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(4): 1121-1127.

- Khan S, A El-Latif Hesham, M Qiao, S Rehman et JZ He (2010) Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. *Environmental Science and Pollution Research* **17**(2):288-296
- Khan S, A El-Latif Hesham, G Qing, L Shuang et J He (2009) Biodegradation of pyrene and catabolic genes in contaminated soils cultivated with *Lolium multiflorum* L. *Journal of Soils and Sediments* **9**(5):482-491
- Kim J-D et C-G Lee (2007) Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by bacterium-fungus co-cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **12**(4): 410-416.
- Kim SJ, RC Jones, CJ Cha, O Kweon, RD Edmondson et CE Cerniglia (2004) Identification of proteins induced by polycyclic aromatic hydrocarbon in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and *de novo* sequencing methods. *Proteomics* **4**(12): 3899-3908.
- Kim SJ, O Kweon, JP Freeman, RC Jones, MD Adjei, JW Jhoo, RD Edmondson et CE Cerniglia (2006) Molecular cloning and expression of genes encoding a novel dioxygenase involved in low- and high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(2): 1045-1054.
- Kim SJ, O Kweon, RC Jones, RD Edmondson et CE Cerniglia (2008) Genomic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Biodegradation* **19**(6): 859-881.
- Kim SJ, O Kweon, RC Jones, JP Freeman, RD Edmondson et CE Cerniglia (2007) Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. *Journal of Bacteriology* **189**(2): 464-472.
- Kim YH, JP Freeman, JD Moody, KH Engesser et CE Cerniglia (2005) Effects of pH on the degradation of phenanthrene and pyrene by *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *Applied Microbiology and Biotechnology* **67**(2): 275-285.
- Kirk JL, JN Klironomos, H Lee et JT Trevors (2005) The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution* **133**(3): 455-465.
- Kirtsideli IY (2007) Soil micromycetes from polar deserts ellef ringnes island (Canadian arctic archipelago). *Mikologiya i Fitopatologiya* **41**(3): 217-225.
- Koelmans AA, MTO Jonker, G Cornelissen, TD Bucheli, PCM Van Noort et O Gustafsson (2006) Black carbon: The reverse of its dark side. *Chemosphere* **63**(3): 365-377.
- Kotterman MJJ, EH Vis et JA Field (1998) Successive Mineralization and Detoxification of Benzo[a]pyrene by the White Rot Fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55 and Indigenous Microflora. *Applied and Environmental Microbiology* **64**(8): 2853-2858.
- Kourtev PS, JG Ehrenfeld et M Håggblom (2003) Experimental analysis of the effect of exotic and native plant species on the structure and function of soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* **35**(7): 895-905.
- Krauss M et W Wilcke (2002) Photochemical oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) in soils - A tool to assess their degradability? *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **165**(2): 173-178.
- Kreuz K, R Tommasini et E Martinoia (1996) Old enzymes for a new job: Herbicide detoxification in plants. *Plant Physiology* **111**(2): 349-353.

Krivobok S, S Kuony, C Meyer, M Louwagie, JC Willison et Y Jouanneau (2003) Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. strain 6PY1: Evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *Journal of Bacteriology* **185**(13): 3828-3841.

Krivobok S, E Miriouchkine, F Seigle-Murandi et JL Benoit-Guyod (1998) Biodegradation of Anthracene by soil fungi. *Chemosphere* **37**(3): 523-530.

L

Lang FNFZ (1998) Production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* in soil and lignocellulose substrate as influenced by soil microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* **167**(2): 239-244.

Lauber CL, MS Strickland, MA Bradford et N Fierer (2008) The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry* **40**(9): 2407-2415.

Laurent F, A Cébron, C Schwartz et C Leyval (2011) Oxidation of a PAH polluted soil using modified Fenton reaction in unsaturated conditions affects biological and physico-chemical properties. *Chemosphere* **86**:659-664.

Leonowicz A, A Matuszewska, J Luterek, D Ziegenhagen, M Wojtas-Wasilewska, N-S Cho, M Hofrichter et J Rogalski (1999) Biodegradation of Lignin by White Rot Fungi. *Fungal Genetics and Biology* **27**(2-3): 175-185.

Levine JM et J HilleRisLambers (2009) The importance of niches for the maintenance of species diversity. *Nature* **461**(7261): 254-257.

Leyval C (1981). Etude préliminaire de l'altération des minéraux par les microflores rhizosphériques de graminées et d'éricacées, Thèse de doctorat de l'Université de Nancy.

Leyval C (2005). Pollutions organiques agricoles, urbaines ou industrielles : cas des hydrocarbures aromatiques polycycliques. *Sol et environnement*. M.-C. Girard, C. Walter, J.-C. Rémy, J. Berthelin and J.-L. Morel. Paris, Dunod: 428-445.

Li C, S Chen, C Zuo, Q Sun, Q Ye, G Yi et B Huang (2011) The use of GFP-transformed isolates to study infection of banana with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. *European Journal of Plant Pathology* **131**(2): 327-340.

Lindstrom JE, RP Barry et JF Braddock (1999) Long-term effects on microbial communities after a subarctic oil spill. *Soil Biology and Biochemistry* **31**(12): 1677-1689.

Liste HH et M Alexander (2000) Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere* **40**(1): 7-10.

Liste HH et I Prutz (2006) Plant performance, dioxygenase-expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil. *Chemosphere* **62**(9): 1411-1420.

Liu SL, YM Luo, ZH Cao, LH Wu, KQ Ding et P Christie (2004) Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environmental Geochemistry and Health* **26**(2): 285-293.

- Long ER, DD Macdonald, SL Smith et FD Calder (1995) Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management* **19**(1): 81-97.
- Louvel B, A Cébron et C Leyval (2011) Root exudates affect phenanthrene biodegradation, bacterial community and functional gene expression in sand microcosms. *International Biodeterioration and Biodegradation* **65**(7): 947-953.
- Lu F, J Lukasik et SR Farrah (2001) Immunological methods for the study of *Zoogloea* strains in natural environments. *Water Research* **35**(17): 4011-4018.
- Lueders T, B Wagner, P Claus et MW Friedrich (2004) Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology* **6**(1): 60-72.
- Luthy RG, GR Aiken, ML Brusseau, SD Cunningham, PM Gschwend, JJ Pignatello, M Reinhard, SJ Traina, WJ Weber et JC Westall (1997) Sequestration of hydrophobic Organic Contaminants Geosorbents. *Environmental Science and Technology* **31**(12): 3341-3347.



- Macdonald CA, CD Campbell, JR Bacon et BK Singh (2008) Multiple profiling of soil microbial communities identifies potential genetic markers of metal-enriched sewage sludge. *FEMS Microbiology Ecology* **65**(3): 555-564.
- MacGillivray AR et MP Shiaris (1993) Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. *Applied and Environmental Microbiology* **59**(5): 1613-1618.
- Macleod CJA et KT Semple (2000) Influence of contact time on extractability and degradation of pyrene in soils. *Environmental Science and Technology* **34**(23): 4952-4957.
- Malloch D et M Blackwell (1992). Dispersal of fungal diaspores. *The Fungal Community*. G. C. Carroll and D. T. Wicklow. New-York/Basel/Hong Kong, Marcel Dekker, Inc: 147-171.
- Manici LM et F Caputo (2009) Fungal community diversity and soil health in intensive potato cropping systems of the east Po valley, northern Italy. *Annals of Applied Biology* **155**(2): 245-258.
- Manici LM et F Caputo (2010) Soil fungal communities as indicators for replanting new peach orchards in intensively cultivated areas. *European Journal of Agronomy* **33**(3): 188-196.
- Marcial Gomes NC, O Fagbola, R Costa, N Gouvea Rumjanek, A Buchner, L Mendona-Hagler et K Smalla (2003) Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(7): 3758-3766.
- Marcial Gomes NC, L Landi, K Smalla, P Nannipieri, PC Brookes et G Renella (2010) Effects of Cd- and Zn-enriched sewage sludge on soil bacterial and fungal communities. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **73**(6): 1255-1263.
- Marek ET, CL Schardl et DA Smith (1989) Molecular transformation of *Fusarium solani* with an antibiotic resistance marker having no fungal DNA homology. *Current Genetics* **15**(6): 421-428.

- Marr KA, M Koudadoust, M Black et SA Balajee (2001) Early Events in Macrophage Killing of *Aspergillus fumigatus* Conidia: New Flow Cytometric Viability Assay. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **8**(6): 1240-1247.
- Marschner P, DE Crowley et RM Higashi (1997) Root exudation and physiological status of a root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant and Soil* **189**(1): 11-20.
- Martin-Laurent F, S Piutti, S Hallet, I Wagschal, L Philippot, G Catroux et G Soulas (2003) Monitoring of atrazine treatment on soil bacterial, fungal and atrazine-degrading communities by quantitative competitive PCR. *Pest Management Science* **59**(3): 259-268.
- Martinez AT (2002) Molecular biology et structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme and Microbial Technology* **30**(4): 425-444.
- Masaphy S, D Levanon, Y Henis, K Venkateswarlu et SL Kelly (1995) Microsomal and cytosolic cytochrome P450 mediated benzo(a)pyrene hydroxylation in *Pleurotus pulmonarius*. *Biotechnology Letters* **17**(9): 969-974.
- Massaccesi G, MC Romero, MC Cazau et AM Bucsinszky (2002) Cadmium removal capacities of filamentous soil fungi isolated from industrially polluted sediments, in La Plata (Argentina). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **18**(9): 817-820.
- Mathur N, JSS Bohra, A Quaizi et A Vyas (2007) Arbuscular mycorrhizal fungi: A potential tool for phytoremediation. *Journal of Plant Sciences* **2**(2): 127-140.
- Meckenstock RU et H Mouttaki (2011) Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* **22**(3): 406-414.
- Merroun M, M Nedelkova, A Rossberg, C Hennig et S Selenska-Pobell (2006) Interaction mechanisms of bacterial strains isolated from extreme habitats with uranium. *Radiochimica Acta* **94**(9-11): 723-729.
- Mileski GJ, JA Bumpus, MA Jurek et SD Aust (1988) Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* **54**(12): 2885-2889.
- Millard PJ, BL Roth, HP Thi, ST Yue et RP Haugland (1997) Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(7): 2897-2905.
- Miyata N, K Iwahori, JM Foght et MR Gray (2004) Saturable, Energy-Dependent Uptake of Phenanthrene in Aqueous Phase by *Mycobacterium* sp. Strain RJGII-135. *Applied and Environmental Microbiology* **70**(1): 363-369.
- Mohan S, T Kisa, T Ohkuma, R Kanaly et Y Shimizu (2006) Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **5**(4): 347-374.
- Mohsenzadeh F, S Nasser, A Mesdaghinia, R Nabizadeh, D Zafari, G Khodakaramian et A Chehregani (2010) Phytoremediation of petroleum-polluted soils: Application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **73**(4): 613-619.
- Mollea C, F Bosco et B Ruggeri (2005) Fungal biodegradation of naphthalene: microcosms studies. *Chemosphere* **60**(5): 636-643.

Mrozik A, S Miga et Z Piotrowska-Seget (2011) Enhancement of phenol degradation by soil bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. JS150. *Journal of Applied Microbiology* **111**(6): 1357-1370.

Muratova AY, OV Turkovskaya, T Hübner et P Kuschik (2003) Studies of the Efficacy of Alfalfa and Reed in the Phytoremediation of Hydrocarbon-Polluted Soil. *Applied Biochemistry and Microbiology* **39**(6): 599-605.

N

Nakatsu CH, N Carmosini, B Baldwin, F Beasley, P Kourtev et A Konopka (2005) Soil microbial community responses to additions of organic carbon substrates and heavy metals (Pb and Cr). *Applied and Environmental Microbiology* **71**(12): 7679-7689.

Naranjo Briceño L, H Urbina, A De Sisto et V Leon (2007) Isolation of autochthonous non-white rot fungi with potential for enzymatic upgrading of Venezuelan extra-heavy crude oil. *Biocatalysis and Biotransformation* **25**(2-4): 341-349.

Naseri B et A Marefat (2011) Large-scale assessment of agricultural practices affecting *Fusarium* root rot and common bean yield. *European Journal of Plant Pathology* **131**(2): 179-195.

Navarro-Velasco GY, RC Prados-Rosales, A Ortez-Urquiza, E Quesada-Moraga et A Di Pietro (2011) *Galleria mellonella* as model host for the trans-kingdom pathogen *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology* **48**(12): 1124-1129.

Nelson DR, L Koymans et T Kamataki (1996) P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**(1): 1-42.

Nemir A, MM David, R Perrussel, A Sapkota, P Simonet, JM Monier et TM Vogel (2010) Comparative phylogenetic microarray analysis of microbial communities in TCE-contaminated soils. *Chemosphere* **80**(5): 600-607.

Nicol RW, L Yousef, JA Traquair et MA Bernards (2003) Ginsenosides stimulate the growth of soilborne pathogens of American ginseng. *Phytochemistry* **64**(1): 257-264.

Nordgren A, E Baath et B Soderstrom (1985) Soil microfungi in an area polluted by heavy metals. *Canadian Journal of Botany* **63**(3): 448-455.

Norini MP (2007). Ecodynamique des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques et des communautés microbiennes dans les sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique: Influence de la rhizosphère et de la mycorhization. Thèse de Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy.

Novak SM, O Banton et M Schiavon (2003) Modelling metolachlor exports in subsurface drainage water from two structured soils under maize (eastern France). *Journal of Hydrology* **270**(3-4): 295-308.

Novotny C, K Svobodov, P Erbanov, Ts Cajthaml, A Kasinath, E Lang et Vc Sasek (2004) Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology and Biochemistry* **36**(10): 1545-1551.

O

- O'Donnell K (2000) Molecular phylogeny of the *Nectria haematococca-Fusarium solani* species complex. *Mycologia* **92**(5): 919-938.
- Obayori OS et LB Salam (2010) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Role of plasmids. *Scientific Research and Essays* **5**(25): 4096-4109.
- Obire O et EC Anyanwu (2009) Impact of various concentrations of crude oil on fungal populations of soil. *International Journal of Environmental Science and Technology* **6**(2): 211-218.
- Oguntimehin I, N Nakatani et H Sakugawa (2008) Phytotoxicities of fluoranthene and phenanthrene deposited on needle surfaces of the evergreen conifer, Japanese red pine (*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.). *Environmental Pollution* **154**(2): 264-271.
- Ojo OA (2007) Molecular strategies of microbial adaptation to xenobiotics in natural environment. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* **2**(1): 001-013.
- Ong PT, JC Yong, KY Chin et YS Hii (2011) Bioaccumulation and depuration of anthracene in *Penaeus monodon* (Fabricius) through food ingestion. *Chemosphere* **84**(5): 578-584.
- Ouvrard S, Barnier C, Bauda P, Beguiristain T, Biache C, Bonnard M, Caupert C, Cébron A, Cortet J, Cotellet S, Dazy M, Faure F, Masfaraud JF, Nahmani J, Palais F, Poupin P, Raoult N, Vasseur P, Morel JL et Leyval C (2011) *In situ* assessment of phytotechnologies for multicontaminated soil management. *International Journal of Phytoremediation* **13**(sup1): 245-263.

P

- Pan B, B Xing, S Tao, W Liu, X Lin, Y Xiao, H Dai, X Zhang, Y Zhang et H Yuan (2007) Effect of physical forms of soil organic matter on phenanthrene sorption. *Chemosphere* **68**(7): 1262-1269.
- Pan B, BS Xing, WX Liu, S Tao, XM Lin, XM Zhang, YX Zhang, Y Xiao, HC Dai et HS Yuan (2006) Distribution of sorbed phenanthrene and pyrene in different humic fractions of soils and importance of humin. *Environmental Pollution* **143**(1): 24-33.
- Pandey J, A Chauhan et RK Jain (2009) Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation. *FEMS Microbiology Reviews* **33**(2): 324-375.
- Papadopoulou ES, DG Karpouzas et U Menkissoglu-Spirodi (2011) Extraction Parameters Significantly Influence the Quantity and the Profile of PLFAs Extracted from Soils. *Microbial Ecology*: 1-11.
- Park KS, RC Sims, RR Dupont, WJ Doucette et JE Matthews (1990) Fate of PAH compounds in two soil types: influence of volatilization, abiotic loss and biological activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* **9**(2): 187-195.

- Park SU, JG Kim, MJ Jeong et BJ Song (2011) Source identification of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in industrial complex using diagnostic ratios and multivariate factor analysis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **60**(4): 576-589.
- Patil S, S Sriram, MJ Savitha et N Arulmani (2011) Induced systemic resistance in tomato by non-pathogenic *Fusarium* species for the management of fusarium wilt. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* **44**(16): 1621-1634.
- Patrolecco L, N Ademollo, S Capri, R Pagnotta et S Polesello (2010) Occurrence of priority hazardous PAHs in water, suspended particulate matter, sediment and common eels (*Anguilla anguilla*) in the urban stretch of the River Tiber (Italy). *Chemosphere* **81**(11): 1386-1392.
- Peng RH, AS Xiong, Y Xue, XY Fu, F Gao, W Zhao, YS Tian et QH Yao (2008) Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* **32**(6): 927-955.
- Pennanen T, S Caul, TJ Daniell, BS Griffiths, K Ritz et RE Wheatley (2004) Community-level responses of metabolically-active soil microorganisms to the quantity and quality of substrate inputs. *Soil Biology and Biochemistry* **36**(5): 841-848.
- Phillips LA, JJ Germida, RE Farrell et CW Greer (2008) Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. *Soil Biology and Biochemistry* **40**(12): 3054-3064.
- Phillips LA, CW Greer et JJ Germida (2006) Culture-based and culture-independent assessment of the impact of mixed and single plant treatments on rhizosphere microbial communities in hydrocarbon contaminated flare-pit soil. *Soil Biology and Biochemistry* **38**(9): 2822-2833.
- Phillips RP et TJ Fahey (2006) Tree species and mycorrhizal associations influence the magnitude of rhizosphere effects. *Ecology* **87**(5): 1302-13.
- Phillips RP et TJ Fahey (2007) The influence of soil fertility on rhizosphere effects in Northern Hardwood forest soils. *SSSAJ* **72**(2): 453-461.
- Pina-Vaz C, F Sansonetty, AG Rodrigues, S Costa-Oliveira, C Tavares et J Martinez-de-Oliveira (2001) Cytometric approach for a rapid evaluation of susceptibility of *Candida* strains to antifungals. *Clinical Microbiology & Infection* **7**(11): 609-618.
- Plangklang P et A Reungsang (2011) Bioaugmentation of carbofuran residues in soil by *Burkholderia cepacia* PCL3: A small-scale field study. *International Biodeterioration and Biodegradation* **65**(6): 902-905.
- Potin O, C Rafin et E Veignie (2004a) Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* **54**(1): 45-52.
- Potin O, E Veignie et C Rafin (2004b) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology* **51**(1): 71-78.
- Pratt RG et H Tewolde (2009) Soil fungal population levels in cotton fields fertilized with poultry litter and their relationships to soil nutrient concentrations and plant growth parameters. *Applied Soil Ecology* **41**(1): 41-49.
- Pu X et TJ Cutright (2007) Degradation of pentachlorophenol by pure and mixed cultures in two different soils. *Environmental Science and Pollution Research* **14**(4): 244-250.

Pushparajah DS, M Umachandran, KE Plant, N Plant et C Ioannides (2008) Up-regulation of the glutathione S-transferase system in human liver by polycyclic aromatic hydrocarbons; comparison with rat liver and lung. *Mutagenesis* **23**(4): 299-308.

Puy-Azurmendi E, A Navarro, A Olivares, D Fernandes, E Martinez, M Lopez de Alda, C Porte, MP Cajaraville, D Barcelo et B Pina (2010) Origin and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution in sediment and fish from the biosphere reserve of Urdaibai (Bay of Biscay, Basque country, Spain). *Marine Environmental Research* **70**(2): 142-149.

R

Rabinovich ML, AV Bolobova et LG Vasil'chenko (2004) Fungal Decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **40**(1): 1-17.

Rafin C, E Veignie, A Fayeulle et G Surpateanu (2009) Benzo[a]pyrene degradation using simultaneously combined chemical oxidation, biotreatment with *Fusarium solani* and cyclodextrins. *Bioresource Technology* **100**(12): 3157-3160.

Rafin C, E Veignie, P Woisel, F Cazier et G Surpateanu (2006). Chapter 8: New potential of a Deuteromycete fungus *Fusarium solani* in benzo(a)pyrene degradation: an eco-physiological hypothesis? *New frontiers in environmental research*. M. P. Glazer, Nova Science Publishers, Inc.

Rama R, C Mouglin, F-D Boyer, A Kollmann, C Malosse et J-C Sigoillot (1998) Biotransformation of benzo[a]pyrene in bench scale reactor using laccase of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Biotechnology Letters* **20**(12): 1101-1104.

Raynal G (1989). Ennemis et maladie des prairies : maladies, ravageurs et parasites animaux, plantes parasites, troubles de la nutrition, Inra. Editions QUAE.

Redon PO, T Beguiristain et C Leyval (2009) Differential effects of AM fungal isolates on *Medicago truncatula* growth and metal uptake in a multimetallic (Cd, Zn, Pb) contaminated agricultural soil. *Mycorrhiza* **19**(3): 187-195.

Rep M et HC Kistler (2010) The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species. *Current Opinion in Plant Biology* **13**(4): 420-426.

Reynaud S et P Deschaux (2006) The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquatic Toxicology* **77**(2): 229-238.

Rezek J, C in der Wiesche, M Mackova, F Zadrazil et T Macek (2008) The effect of ryegrass (*Lolium perenne*) on decrease of PAH content in long term contaminated soil. *Chemosphere* **70**(9): 1603-1608.

Riaz MA, R Poupardin, S Reynaud, C Strode, H Ranson et JP David (2009) Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. *Aquatic Toxicology* **93**(1): 61-69.

Richardson M (2009) The ecology of the zygomycetes and its impact on environmental exposure. *Clinical Microbiology and Infection* **15**(SUPPL. 5): 2-9.

- Richardson RE, VK Bhupathiraju, DL Song, TA Goulet et L Alvarez-Cohen (2002) Phylogenetic characterization of microbial communities that reductively dechlorinate TCE based upon a combination of molecular techniques. *Environmental Science and Technology* **36**(12): 2652-2662.
- Rockne KJ, JC Chee-Sanford, RA Sanford, BP Hedlund, JT Staley et SE Strand (2000) Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(4): 1595-1601.
- Romero MC, MC Cazau, S Giorgieri et AM Arambarri (1998) Phenanthrene degradation by microorganisms isolated from a contaminated stream. *Environmental Pollution* **101**(3): 355-359.
- Rooney AP et TJ Ward (2005) Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: Birth and death of a concerted evolution paradigm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(14): 5084-5089.
- Ros M, I Rodriguez, C Garcia et T HernÁndez (2010) Microbial communities involved in the bioremediation of an aged recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. *Bioresource Technology* **101**(18): 6916-6923.
- Rousk J, E Baath, PC Brookes, CL Lauber, C Lozupone, JG Caporaso, R Knight et N Fierer (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME Journal* **4**(10):1340-1351

S

- Sack WF (1997a) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardii*. *FEMS Microbiology Letters* **152**(2): 227-234.
- Sack WF (1997b) Enhancement of pyrene mineralization in soil by wood-decaying fungi. *FEMS Microbiology Ecology* **22**(1): 77-83.
- Safinowski M, C Griebler et RU Meckenstock (2006) Anaerobic cometabolic transformation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons: Evidence from laboratory and field studies. *Environmental Science and Technology* **40**(13): 4165-4173.
- Sagova-Mareckova M, L Cermak, J Novotna, K Plhachova, J Forstova et J Kopecky (2008) Innovative methods for soil DNA purification tested in soils with widely differing characteristics. *Appl Environ Microbiol* **74**(9): 2902-7.
- Salicis F, S Krivobok, M Jack et JL Benoit-Guyod (1999) Biodegradation of fluoranthene by soil fungi. *Chemosphere* **38**(13): 3031-3039.
- Salvo VS, I Gallizia, M Moreno et M Fabiano (2005) Fungal communities in PAH-impacted sediments of Genoa-Voltri Harbour (NW Mediterranean, Italy). *Mar Pollut Bull* **50**(5): 553-559.
- Salzer P, A Bonanomi, K Beyer, R Vögeli-Lange, RA Aeschbacher, J Lange, A Wiemken, D Kim, DR Cook et T Boller (2000) Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**(7): 763-777.

- Samsøe-Petersen L, EH Larsen, PB Larsen et P Bruun (2002) Uptake of trace elements and PAHs by fruit and vegetables from contaminated soils. *Environmental Science and Technology* **36**(14): 3057-3063.
- Sandrin TR et RM Maier (2003) Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environmental Health Perspectives* **111**(8): 1093-1101.
- Sanguin H, B Remenant, A Dechesne, J Thioulouse, TM Vogel, X Nesme, Y Moënne-Loccoz et GL Grundmann (2006) Potential of a 16S rRNA-based taxonomic microarray for analyzing the rhizosphere effects of maize on *Agrobacterium* spp. and bacterial communities. *Applied and Environmental Microbiology* **72**(6): 4302-4312.
- Sanon A, Z Andrianjaka, Y Prin, R Bally, J Thioulouse, G Comte et R Duponnois (2009) Rhizosphere microbiota interferes with plant-plant interactions. *Plant and Soil* **321**(1): 259-278.
- Saraswathy A et R Hallberg (2005) Mycelial pellet formation by *Penicillium ochrochloron* species due to exposure to pyrene. *Microbiological Research* **160**(4): 375-383.
- Saul DJ, JM Aislabie, CE Brown, L Harris et JM Foght (2005) Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology* **53**(1): 141-155.
- Scervino JM, VL Papinutti, MS Godoy, MA Rodriguez, I Della Monica, M Recchi, MJ Pettinari et AM Godeas (2011) Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production. *Journal of Applied Microbiology* **110**(5): 1215-1223.
- Scheffknecht S, R Mammerler, S Steinkellner et H Vierheilig (2006) Root exudates of mycorrhizal tomato plants exhibit a different effect on microconidia germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* than root exudates from non-mycorrhizal tomato plants. *Mycorrhiza* **16**(5): 365-370.
- Schwartz E, SV Trinh et KM Scow (2000) Measuring growth of a phenanthrene-degrading bacterial inoculum in soil with a quantitative competitive polymerase chain reaction method. *FEMS Microbiology Ecology* **34**(1): 1-7.
- Scullion J (2006) Remediating polluted soils. *Naturwissenschaften* **93**(2): 51-65.
- Sei K, D Inoue, K Wada, K Mori, M Ike, T Kohno et M Fujita (2004) Monitoring behaviour of catabolic genes and change of microbial community structures in seawater microcosms during aromatic compound degradation. *Water Research* **38**(20): 4405-4414.
- Selesi D, N Jehmlich, M Von Bergen, F Schmidt, T Rattei, P Tischler, T Lueders et RU Meckenstock (2010) Combined genomic and proteomic approaches identify gene clusters involved in anaerobic 2-methylnaphthalene degradation in the sulfate-reducing enrichment culture N47. *Journal of Bacteriology* **192**(1): 295-306.
- Semple KT, NM Dew, KJ Doick et AH Rhodes (2006) Can microbial mineralization be used to estimate microbial availability of organic contaminants in soil? *Environmental Pollution* **140**(1): 164-172.
- Seo J-S, Y-S Keum, I Kyu Cho et QX Li (2006) Degradation of dibenzothiophene and carbazole by *Arthrobacter* sp. P1-1. *International Biodeterioration & Biodegradation* **58**(1): 36-43.
- Shaw LJ, P Morris et JE Hooker (2006) Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology* **8**(11): 1867-80.

- Shimada T (2006) Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug metabolism and pharmacokinetics* **21**(4): 257-276.
- Silva ÃS, CR De Menezes, AF De Faria, JG Da Costa, S Pepper, M Britz et LR Durrant (2010) Application of molecular fingerprinting for analysis of a PAH-contaminated soil microbiota growing in the presence of complex PAHs. *Acta Scientiarum - Biological Sciences* **32**(1): 63-69.
- Silva IS, M Grossman et LR Durrant (2009a) Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2-7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* **63**(2):224-229.
- Silva IS, EdCd Santos, CRd Menezes, AFd Faria, E Franciscan, M Grossman et LR Durrant (2009b) Bioremediation of a polyaromatic hydrocarbon contaminated soil by native soil microbiota and bioaugmentation with isolated microbial consortia. *Bioresource Technology* **100**(20): 4669-4675.
- Silver S (1996) Bacterial resistances to toxic metal ions - A review. *Gene* **179**(1): 9-19.
- Singer AC, DE Crowley et IP Thompson (2003) Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology* **21**(3): 123-130.
- Singh D et S Chen (2008) The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* : conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Singleton DR, LG Ramirez et MD Aitken (2009) Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon degradation gene cluster in a phenanthrene-degrading **Acidovorax** strain. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(9): 2613-2620.
- Smith CJ, DB Nedwell, LF Dong et AM Osborn (2006) Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environmental Microbiology* **8**(5): 804-815.
- Smith CJ et AM Osborn (2009) Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology* **67**(1): 6-20.
- Smith RV et JP Rosazza (1974) Microbial models of mammalian metabolism. Aromatic hydroxylation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **161**(2): 551-558.
- Sokhn J, FA De Leij, TD Hart et JM Lynch (2001) Effect of copper on the degradation of phenanthrene by soil micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* **33**(2): 164-8.
- Sonjak S, T Beguiristain, C Leyval et M Regvar (2009) Temporal temperature gradient gel electrophoresis (TTGE) analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with selected plants from saline and metal polluted environments. *Plant and Soil* **314**(1): 25-34.
- Sorkhoh NA, N Ali, H Al-Awadhi, N Dashti, DM Al-Mailem, M Elias et SS Radwan (2011) Phytoremediation of mercury in pristine and crude oil contaminated soils: Contributions of rhizobacteria and their host plants to mercury removal. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **73**(8): 1998-2003.
- Stemmer M, A Watzinger, K Blochberger, G Haberhauer et MH Gerzabek (2007) Linking dynamics of soil microbial phospholipid fatty acids to carbon mineralization in a ¹³C natural abundance experiment: Impact of heavy metals and acid rain. *Soil Biology and Biochemistry* **39**(12): 3177-3186.

- Strickland MS et J Rousk (2010) Considering fungal: Bacterial dominance in soils - Methods, controls, and ecosystem implications. *Soil Biology and Biochemistry* **42**(9): 1385-1395.
- Su D, PJ Li, S Frank et XZ Xiong (2006) Biodegradation of benzo[a]pyrene in soil by *Mucor* sp. SF06 and *Bacillus* sp. SB02 co-immobilized on vermiculite. *Journal of Environmental Science (China)* **18**(6): 1204-9.
- Suzuki MT, LT Taylor et EF DeLong (2000) Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Microbial Populations via 5'-Nuclease Assays. *Applied and Environmental Microbiology* **66**(11): 4605-4614.
- Swartz RC (1999) Consensus sediment quality guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**(4): 780-787.
- Swindell AL et BJ Reid (2006) Comparison of selected non-exhaustive extraction techniques to assess PAH availability in dissimilar soils. *Chemosphere* **62**(7): 1126-1134.

T

- Taccari M, V Milanovic, F Comitini, C Casucci et M Ciani (2011) Effects of biostimulation and bioaugmentation on diesel removal and bacterial community. *International Biodeterioration and Biodegradation* **66**(1): 39-46.
- Tarkka MT, A Sarniguet et P Frey-Klett (2009) Inter-kingdom encounters: Recent advances in molecular bacterium - Fungus interactions. *Current Genetics* **55**(3): 233-243.
- Téllez-Téllez M, FJ Fernandez, AM Montiel-Gonzalez, C Sanchez et G Diaz-Godinez (2008) Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **81**(4): 675-679.
- Teng Y, Y Luo, M Sun, Z Liu, Z Li et P Christie (2010) Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresource Technology* **101**(10): 3437-3443.
- Thakuria D, O Schmidt, M Mac Siurtain, D Egan et FM Doohan (2008) Importance of DNA quality in comparative soil microbial community structure analyses. *Soil Biology and Biochemistry* **40**(6): 1390-1403.
- Thion C, T Beguiristain, A Cebon et C Leyval (2012) PAH biotransformation and sorption by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed cocultures. *International Biodeterioration and Biodegradation* **68**:28-35
- Thuillier A, AA Ngadin, C Thion, P Billard, JP Jacquot, E Gelhaye et M Morel (2011) Fonctionnal diversification of fungal glutathion transferases from Ure2p class. *International Journal of evolutionary Biology* doi:10.4061/2011/938308
- Tiller CL et KD Jones (1997) Effects of dissolved oxygen and light exposure on determination of K(OC) values for PAHs using fluorescence quenching. *Environmental Science and Technology* **31**(2): 424-429.

- Tornberg K, E Bååth et S Olsson (2003) Fungal growth and effects of different wood decomposing fungi on the indigenous bacterial community of polluted and unpolluted soils. *Biology and Fertility of Soils* **37**(3): 190-197.
- Tosi S, N Kostadinova, E Krumova, S Pashova, V Dishliiska, B Spassova, S Vassilev et M Angelova (2010) Antioxidant enzyme activity of filamentous fungi isolated from Livingston Island, maritime Antarctica. *Polar Biology* **33**(9): 1227-1237.
- Treonis AM, NJ Ostle, AW Stott, R Primrose, SJ Grayston et P Ineson (2004) Identification of groups of metabolically-active rhizosphere microorganisms by stable isotope probing of PLFAs. *Soil Biology and Biochemistry* **36**(3): 533-537.
- Trillas MI et G Segarra (2009). Chapter 8 Interactions Between Nonpathogenic Fungi and Plants. *Advances in Botanical Research*. **51**: 321-359.
- Trinder P (1969) Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor. *Annals in Clinical Biochemistry* **6**: 24-25.
- Trouvelot A (1986). *Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire*. Paris, INRA.
- Tucker B, C Radtke, SI Kwon et AJ Anderson (1995) Suppression of bioremediation by *Phanerochaete chrysosporium* by soil factors. *Journal of Hazardous Materials* **41**(2-3): 251-265.
- Tukaj Z et A Aksmann (2007) Toxic effects of anthraquinone and phenanthrenequinone upon *Scenedesmus* strains (green algae) at low and elevated concentration of CO₂. *Chemosphere* **66**(3): 480-487.

U

- Umar M, HA Aziz et MS Yusoff (2010) Trends in the use of Fenton, electro-Fenton and photo-Fenton for the treatment of landfill leachate. *Waste Management* **30**(11): 2113-2121.
- Urich T, A Lanzen, J Qi, DH Huson, C Schleper et SC Schuster (2008) Simultaneous assessment of soil microbial community structure and function through analysis of the meta-transcriptome. *PLoS ONE* **3**(6): e2527.
- US-EPA (1993). Sediment quality criteria for the protection of benthic organisms: Phenanthrene., US Environmental Protection Agency.

V

- Valderrama C, R Alessandri, T Aunola, JL Cortina, X Gamisans et T Tuhkanen (2009) Oxidation by Fenton's reagent combined with biological treatment applied to a creosote-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* **166**(2-3): 594-602.
- Van der Meer JR, WM De Vos, S Harayama et AJB Zehnder (1992) Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. *Microbiological Reviews* **56**(4): 677-694.

- Van Elsas JD, GF Duarte, A Keijzer-Wolters et E Smit (2000) Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods* **43**(2): 133-151.
- van Veen JA, LS van Overbeek et JD van Elsas (1997) Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **61**(2): 121-135.
- Vandermeer KD et AJ Daugulis (2007) Enhanced degradation of a mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons by a defined microbial consortium in a two-phase partitioning bioreactor. *Biodegradation* **18**(2): 211-21.
- Vaughan BE (1983) State of research: Environmental pathways and food chain transfer. *Environmental Health Perspectives* **54**: 353-371.
- Veignie E, C Rafin, P Woisel et F Cazier (2004) Preliminary evidence of the role of hydrogen peroxide in the degradation of benzo[a]pyrene by a non-white rot fungus *Fusarium solani*. *Environmental Pollution* **129**(1): 1-4.
- Verdin A, A Lounès-Hadj Sahraoui, J Fontaine, A Grandmougin-Ferjani et R Durand (2006a) Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza* **16**(6): 397-405.
- Verdin A, A Lounès-Hadj Sahraoui, F Laruelle, A Grandmougin-Ferjani et R Durand (2006b) Effect of the high polycyclic aromatic hydrocarbon, benzo[a]pyrene, on the lipid content of *Fusarium solani*. *Mycological Research* **110**(4): 479-484.
- Verdin A, A Lounès-Hadj Sahraoui, R Newsam, G Robinson et R Durand (2005) Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environmental Pollution* **133**(2): 283-291.
- Verdin A, AL-H Sahraoui et R Durand (2004) Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *International Biodeterioration & Biodegradation* **53**(2): 65-70.
- Violi HA, JA Menge et RJ Beaver (2007) *Chaetomium elatum* (Kunze: *Chaetomiaceae*) as a root-colonizing fungus in avocado: Is it a mutualist, cheater, commensalistic associate, or pathogen? *American Journal of Botany* **94**(4): 690-700.
- Vivas A, B Moreno, C Del Val, C MacCi, G Masciandaro et E Benitez (2008) Metabolic and bacterial diversity in soils historically contaminated by heavy metals and hydrocarbons. *Journal of Environmental Monitoring* **10**(11): 1287-1296.
- Vogel TM (1996) Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology* **7**(3): 311-316.



Wainwright M (1992). The impact of fungi on environmental biogeochemistry. The fungal community: its organisation and role in the ecosystem. G. C. Carroll and D. T. Wicklow. New-York/Basel/Hong-Kong, Marcel Dekker, Inc: 601-618.

- Wakelin SA, RA Warren, L Kong et PR Harvey (2008) Management factors affecting size and structure of soil *Fusarium* communities under irrigated maize in Australia. *Applied Soil Ecology* **39**(2): 201-209.
- Walker TS, HP Bais, E Grotewold et JM Vivanco (2003) Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology* **132**(1): 44-51.
- Wang F, Q Bu, X Xia et M Shen (2011) Contrasting effects of black carbon amendments on PAH bioaccumulation by *Chironomus plumosus* larvae in two distinct sediments: Role of water absorption and particle ingestion. *Environmental Pollution* **159**(7): 1905-1913.
- Whipps JM (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **52**(suppl_1): 487-511.
- Widada J, H Nojiri, K Kasuga, T Yoshida, H Habe et T Omori (2002) Molecular detection and diversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from geographically diverse sites. *Applied Microbiology and Biotechnology* **58**(2): 202-209.
- Widada J, H Nojiri et T Omori (2003) Recent developments in molecular techniques for identification and monitoring of xenobiotic-degrading bacteria and their catabolic genes in bioremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**(1-2): 45-59.
- Wilcke W (2000) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in soils - a review. *Journal of Plant nutrition and soil science* **163**: 229-248.
- Williams MA et CW Rice (2007) Seven years of enhanced water availability influences the physiological, structural, and functional attributes of a soil microbial community. *Applied Soil Ecology* **35**(3): 535-545.
- Williams MA, EB Taylor et HP Mula (2010) Metaproteomic characterization of a soil microbial community following carbon amendment. *Soil Biology and Biochemistry* **42**(7): 1148-1156.
- Wu N, S Zhang, H Huang and P Christie (2008) Enhanced dissipation of phenanthrene in spiked soil by arbuscular mycorrhizal alfalfa combined with a non-ionic surfactant amendment. *Science of The Total Environment* **394**(2-3): 230-236.
- Wu YR, TT He, JS Lun, K Maskoui, TW Huang et Z Hu (2009) Removal of benzo[a]pyrene by a fungus *Aspergillus* sp. BAP14. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **25**(8): 1395-1401.

Y

- Yadav JS, H Doddapaneni et V Subramanian (2006) P450ome of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: structure, evolution and regulation of expression of genomic P450 clusters. *Biochemical Society Transactions* **34**(Pt 6): 1165-1169.
- Yang Y, S Tao, N Zhang, DY Zhang et XQ Li (2010) The effect of soil organic matter on fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil: A microcosm study. *Environmental Pollution* **158**(5): 1768-1774.
- Ye D, MA Siddiqi, AE Maccubbin, S Kumar et HC Sikka (1996) Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environmental Science and Technology* **30**: 136-142.

Yergeau E, KK Newsham, DA Pearce et GA Kowalchuk (2007) Patterns of bacterial diversity across a range of Antarctic terrestrial habitats. *Environmental Microbiology* **9**(11): 2670-82.

Z

Zafar S, F Aqil et I Ahmad (2007) Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology* **98**(13): 2557-2561.

Zak JC (1992). Response of fungal communities to disturbance. *The Fungal Community*. G. C. Carroll and D. T. Wicklow. New-York/Basel/Hong Kong, Marcel Dekker, Inc.: 403-425.

Zhang L, Z Xu et BKC Patel (2009) An improved method for purifying genomic DNA from forest leaf litters and soil suitable for PCR. *Journal of Soils and Sediments* **9**(3): 261-266.

Zhang X et LY Young (1997) Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(12): 4759-4764.

Zhang Y, Z Jiang, B Cao, M Hu, Z Wang et X Dong (2011) Metabolic ability and gene characteristics of *Arthrobacter* sp. strain DNS10, the sole atrazine-degrading strain in a consortium isolated from black soil. *International Biodeterioration and Biodegradation* **65**(8): 1140-1144.

Zhao Z, A Selvam et JWC Wong (2011) Effects of rhamnolipids on cell surface hydrophobicity of PAH degrading bacteria and the biodegradation of phenanthrene. *Bioresource Technology* **102**(5): 3999-4007.

Zhou J, MA Bruns et JM Tiedje (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology* **62**(2): 316-322.

Zhou W, J Yang, L Lou et L Zhu (2011) Solubilization properties of polycyclic aromatic hydrocarbons by saponin, a plant-derived biosurfactant. *Environmental Pollution* **159**(5): 1198-1204.

Zhou XB (2010). Experimental study of some parameters affecting polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) dissipation in the rhizosphere of mycorrhizal plants. Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré, Nancy.

Zhou XB, A Cébron, T Béguiristain et C Leyval (2009) Water and phosphorus content affect PAH dissipation in spiked soil planted with mycorrhizal alfalfa and tall fescue. *Chemosphere* **77**(6): 709-713.

Zourob M, S Elwary et A Turner (2008). Principles of bacterial detection: biosensors, recognition receptors and microsystems Springer.

ANNEXES



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

International Biodeterioration & Biodegradation

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ibiod



PAH biotransformation and sorption by *Fusarium solani* and *Arthrobacter oxydans* isolated from a polluted soil in axenic cultures and mixed co-cultures

Cécile Thion, Aurélie Cébron*, Thierry Beguiristain, Corinne Leyval

LIMOS, Nancy Université, CNRS UMR 7137, Faculté des Sciences, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 May 2011

Received in revised form

17 August 2011

Accepted 29 October 2011

Available online xxx

Keywords:

Fusarium solani

Arthrobacter oxydans

PAH biotransformation

Co-culture

PAH sorption

ABSTRACT

The polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation potential of *Fusarium solani* MM1 and *Arthrobacter oxydans* MsHM11, isolated from a PAH-polluted soil, was investigated in liquid cultures containing 500, 500, and 50 mg l⁻¹ of phenanthrene (PHE), pyrene (PYR), and dibenz(a,h)anthracene (DBA), respectively. The contributions of adsorption, absorption and biotransformation were evaluated separately by extracting and analysing PAHs from the biomass and from the culture medium. In the pure culture, *F. solani* dissipated approximately 30% of each tested PAH in 28 days when glucose was supplied as the carbon source. PAH adsorption on *F. solani* hyphae was negligible, whereas absorption was found to account for one-third of the dissipation. Absorbed PAHs, reaching 3% of the fungal dry biomass, could be visualised in autofluorescent intracellular vesicles. In contrast, *A. oxydans* grew on PAHs as sole carbon source and led to 55% dissipation of PHE in 28 days without any significant absorption. This dissipation potential was inhibited by the presence of glucose, and the PYR and DBA contents were never dissipated in the bacterial pure culture. In the mixed co-culture, the PAH dissipation rates were lower, showing that antagonistic interactions, such as pH changes or competition for carbon source, indirectly inhibited both microbial potentials.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are recalcitrant organic pollutants resulting from the incomplete combustion of organic carbon-based material associated with a wide range of human activities. Their persistence in environments and their toxicity increase with their hydrophobicity and molecular weight (MW) (Cerniglia, 1992). Among the different techniques of PAH remediation in soils, bioremediation (i.e., biodegradation by microorganisms) is of great interest because of its lower environmental and economic cost (Vogel, 1996; Mohan et al., 2006).

A wide range of bacteria is known to grow on PAHs as the sole carbon source, and their molecular degradation mechanisms are increasingly better understood (Kim et al., 2007; Peng et al., 2008). However, bacterial degradation mostly affects low-molecular-weight (MW) PAHs, i.e., those with up to four rings (e.g., Kang et al., 2003; Kallimanis et al., 2007; Kim et al., 2007). Fungi, however, have been shown to remove higher MW PAHs, i.e., up to 7 rings (e.g., Gramss et al., 1999; Juhasz and Naidu, 2000; Silva et al., 2009) via co-metabolism pathways. To date, there is no absolute

evidence of the existence of fungi able to use PAHs as a growth substrate (Cerniglia, 1997; Peng et al., 2008). It has also been shown that some fungi take up and store PAHs in lipid vesicles, although the extent of absorption and the mechanisms by which PAHs cross the cell wall are still unknown (Verdin et al., 2005; Wu et al., 2009).

During recent decades, great attention has been paid to ligninolytic fungi as potential PAH degraders through the secretion of non-specific lignin-modifying enzymes that can oxidise a wide variety of aromatic pollutants (Rabinovich et al., 2004). Still, these wood-inhabiting fungi are, by definition, not properly adapted to soil habitats. Ecological constraints, such as microbial competition, physical and chemical properties, and nutritional stress, strongly alter their survival and growth in soils (Baldrian, 2008). Therefore, an increasing number of studies has focussed on the bioremediation potential of pre-adapted fungi isolated from polluted soil (Verdin et al., 2004; Saraswathy and Hallberg, 2005; Atagana et al., 2006). Indeed, it has been shown that pollutant exposition tends to select resistant, if not degrading, microorganisms. All types of ecological interactions, from symbiosis to predation, can occur between bacteria and fungi (De Boer et al., 2005; Tarkka et al., 2009), and their effects on survival, growth, and metabolic activities, such as PAH dissipation, are quite variable. It has been suggested that fungi and bacteria could be metabolically complementary in regard to PAH degradation: fungi could transform PAHs into less insoluble

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 68 42 96; fax: +33 3 83 68 42 84.
E-mail address: aurelie.cebron@limos.uhp-nancy.fr (A. Cébron).

intermediates, which could be further mineralised by bacteria (Brodkorb and Legge, 1992; Kotterman et al., 1998). Boonchan et al. (2000) showed a noteworthy synergistic effect on high-MW PAH degradation when the fungus *Penicillium janthinellum* and the bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* were grown together, both in liquid media and in PAH-polluted soil. However, *Pleurotus ostreatus* has been shown to inhibit ^{14}C -pyrene mineralisation by indigenous microflora when inoculated in non-sterile soil, probably due to antagonistic interactions (In Der Wiesche et al., 2003).

The purpose of this work was to investigate the potential of two microbial strains isolated from an aged PAH-polluted soil – the fungus *Fusarium solani* MM1 and the actinobacterium *Arthrobacter oxydans* MsHM11 – to remove three PAHs with different MWs: phenanthrene (PHE; 3 rings), pyrene (PYR; 4 rings) and dibenz(a,h)anthracene (DBA; 5 rings) in axenic cultures or mixed co-cultures. Furthermore, we aimed to quantify the respective parts of sorption and biotransformation in the observed PAH dissipation.

2. Materials and methods

2.1. Isolation, conservation, and inoculation of microbial strains

Both microbial strains were isolated from a previously described aged PAH-contaminated soil from a former coking site (Biache et al., 2008; Cébron et al., 2009). The soil was sampled in October 2008, and the total concentration of the 16 priority PAHs from the Environmental Protection Agency was approximately 1800 mg kg^{-1} soil (dry weight). Briefly, soil was sampled from planted plots (*Medicago sativa* var. Europe) and suspended in NaCl 8.5‰. The suspension aliquots were incubated in the liquid basal salt medium (BSM) described below supplemented with PAHs without any additional carbon source. The cultures were spread and subcultured on agar plates (15 g l^{-1} agar) with the same nutrient medium as above until pure strains were obtained. The strains were identified by partial sequencing followed by comparison with GenBank Database (Blastn) of ITS and 16S rRNA gene for fungi and bacteria, respectively. MM1, which ITS showed 97% sequence identity among 224 pb with a strain of *F. solani*, accession number AM412623, was chosen among 24 isolated fungal strains, of which the *Fusarium* genus was strongly dominant. MsHM11, which 16S rRNA gene showed 100% identity among 1028 pb with a strain of *A. oxydans*, accession number AY785732, was chosen among more than a hundred isolated bacterial strains because of its ability to grow on PAHs as sole carbon source and because of the presence of a PAH-ring hydroxylating dioxygenase gene (Cébron et al., 2008). Both sequences were deposited in the GenBank database under the accession numbers JF345080 and JF345081 for *F. solani* MM1 ITS1 and the *A. oxydans* MsHM11 16S rRNA gene. After two weeks of growth at 24°C , *F. solani* MM1 was conserved on malt extract agar (MEA) plates (malt extract 20 g l^{-1} , glucose 20 g l^{-1} , peptone 1 g l^{-1} , agar 15 g l^{-1}) at 4°C and subcultured on fresh PAH-free plates every two months. *F. solani* MM1 was reactivated for inoculation on fresh MEA plates at 24°C for 7–10 days, and spores were collected from the plates with 15 ml sterile distilled water. The spore concentration was estimated using a Thoma hemocytometer, and the suspension was used as inoculum at a final concentration of 10^4 spores ml^{-1} culture. *A. oxydans* MsHM11 was precultured in Luria-Bertoni liquid broth (AthenaES™) for 3 days at 24°C under orbital shaking. The precultures were then centrifuged (4700 rpm, 10 min), washed three times with NaCl 8.5‰, and used as inoculum to a final DO_{600} of 0.02 (corresponding to 10^7 cells ml^{-1}).

2.2. Culture conditions with PAHs

Liquid culture experiments were conducted in 150-ml Erlenmeyer flasks containing 20 ml of BSM medium, i.e., a Buschnell-

Haas (BH) mineral medium composed of (g l^{-1} in distilled water) MgSO_4 0.2, CaCl_2 0.02, KH_2PO_4 1, K_2HPO_4 1, KNO_3 1 and FeCl_3 0.05, supplemented with a trace element solution, leading to final concentrations (mg l^{-1}) as follows: nitroloacetic acid 15, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15, $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 6, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1, ZnSO_4 1, CuSO_4 0.1, H_3BO_3 0.1, Na_2MoO_4 0.1 and $\text{Al}(\text{SO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.1, according to Saraswathy and Hallberg (2005). When required, a filter-sterilised ($0.22\text{-}\mu\text{m}$) glucose solution was added (20 g l^{-1} final concentration) and/or the culture medium was buffered at pH 6.8 with 5 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$.

The required amounts of PHE (Fluka™, >97% purity), PYR (SIGMA-ALDRICH®, >99% purity) and DBA (Acros Organics, >99%), i.e., 10 mg, 10 mg, and 1 mg, respectively, were dissolved in 9 ml chloroform and added to each Erlenmeyer flask. The autoclaved BSM (20 ml) was added after total chloroform evaporation under a fume hood, leading to theoretical initial concentrations of 500, 500 and 50 mg l^{-1} of PHE, PYR, and DBA, respectively. The flasks were then inoculated with *F. solani*, *A. oxydans*, or both, and they were incubated at 24°C in the dark with orbital shaking (150 rpm) (Thermo Fisher Scientific). After the scheduled incubation times (see Sections 2.3. and 2.4), glucose concentrations, pH, and bacterial colony-forming units (CFUs) were assessed, and the flasks were stored at -80°C until the PAHs were extracted. In all experiments, the abiotic controls were treated in the same conditions as the inoculated treatments, and each experiment was conducted in triplicate.

2.3. PAH dissipation experiments

A PAH dissipation experiment with *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 was performed for 14 days. The two strains were cultured separately in BSM supplemented with PAHs as described in Section 2.2 with and without glucose as an additional carbon source. Then, a PAH dissipation kinetics experiment was performed, with glucose-supplemented BSM and four different conditions: the abiotic control, the *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 axenic cultures, and the mixed co-culture. Triplicate specimens of each treatment were harvested and analysed after 0, 7, 14, 21, and 28 days. The same experiment was conducted in a buffered (pH 6.8) BSM medium.

The PAHs were successively extracted from the total cultures (i.e., liquid medium and biomass) three times with dichloromethane (DCM) (vol:vol) in separating funnels. We assumed that the PAHs that were absorbed or strongly adsorbed to the biomass were not extracted by this protocol. We thus used the term “dissipated”, which included biotransformation, absorption, and strong sorption, to characterise the difference between the extractable PAH concentrations in these extracts and the corresponding controls.

2.4. Estimation of sorption and biotransformation

We investigated the contribution of the sorption and of the effective biotransformation to the observed PAH dissipation when the fungal strain was present in the cultures. Twenty-eight-day cultures were conducted with four treatments: abiotic control, *F. solani* MM1 in pure culture, *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 in mixed co-cultures unbuffered or buffered to pH 6.8.

The PAHs were successively extracted from the culture medium and biomass and separately analysed. After total culture extraction in the separating funnels as described in Section 2.3, the biomass was collected by centrifugation from the aqueous phase and freeze-dried. Lyophilised pellets were then crushed in liquid nitrogen, mixed with diatomaceous earth (1:2, w:w), and extracted with DCM using accelerated solvent extraction (ASE®350, Dionex) with

two cycles of 5 min each at 130 °C. Biotransformed PAHs were estimated by calculating the difference between PAH dissipation and the PAH recovered from the biomass (absorbed and adsorbed PAHs).

To assess PAH adsorption on the fungal mycelium, *F. solani* MM1 was grown for 28 days in PAH-free BSM supplemented with glucose. Fungal biomass was killed by autoclaving (110 °C, 30 min), and it was then incubated for 2 h in PAH-containing BSM, thus allowing the adsorption mechanism (Binet et al., 2000). Fungal biomass was collected by centrifugation, and the PAHs were extracted as described above.

2.5. PAH analysis

The DCM extracts were evaporated in a SpeedVac Concentrator (Thermo Scientific RC1010), and the dried samples were dissolved in acetonitrile and filtered through Teflon filters (45- μ m). High-pressure liquid chromatography (HPLC) analysis was performed with a Dionex UltiMate 3000 System at 30 °C. The separation column (Supelco Ascendis® Express C18) was 100 mm long and had a 4.6-mm inside diameter and a 2.6- μ m granulometry. The injected volume was 10 μ l. The mobile phase was 100% acetonitrile with a 1.6 ml min⁻¹ flow rate. A photodiode-array detector was used for detection at 254 nm for PHE and PYR and 297 nm for DBA. The PAH recovery and dissipation in the inoculated cultures were calculated using the mean of quantities recovered in the corresponding abiotic treatment (control) as a 100% value calculated for each sampling time for the kinetics experiment to focus on biotic dissipation. In all abiotic treatments, the dissipation of any of the three PAHs was not significant ($p < 0.05$).

2.6. Measurements of pH and glucose

The pH was evaluated using indicator strips (Special indicator, Merck). The glucose concentration was measured using the colorimetric method Glucose GOD-PAP (BioLabo), as recommended by the manufacturer, with the absorbance reading at 505 nm (Xenius XML, SAFAS). The percentage of glucose recovery was estimated using the mean of glucose quantities recovered from corresponding abiotic treatment as a 100% value.

2.7. Microbial growth

Microbial biomass was collected by centrifugation of the aqueous phase after DCM extraction and weighed after complete drying. Otherwise, the number of bacterial colony-forming units (CFUs) was determined on Luria-Bertoni agar plates supplemented with 75 μ g ml⁻¹ cycloheximide (Carl Roth®, 96% purity) to inhibit fungal growth.

2.8. Real-time PCR assays

To evaluate the bacteria/fungi ratio after 28 days of co-culture in sorption assays, the 18S and 16S rRNA gene copy numbers per milligram of dry biomass were quantified by real-time PCR with the previously described primer pairs Fung5f-FF390r (Lueders et al., 2004) and 968F-1401R (Felske et al., 1998), respectively. DNA was extracted from 5 mg of lyophilised biomass using the QIAGEN® DNeasy Plant Mini Kit and quantified by spectrometry at 260 nm (Shimadzu UV 1800, with Hellma® Traycell). Real-time qPCR detection chemistry and temperature profiles were as previously described (Cébron et al., 2008) with slight modification for 18S rDNA quantification, i.e., annealing temperature of 50 °C, according to the Lueders et al. (2004) method. To prepare the 18S rDNA qPCR standards, a purified Fung5f-FF390r PCR fragment (QIAquick PCR

purification kit, QIAGEN) from *Russula* sp. was cloned into the pCR2.1 vector using the TOPO TA cloning method (Invitrogen). Plasmid was purified (QIAprep Spin Miniprep kit, Qiagen) and linearised using the restriction enzyme BglIII (Euromedex) to prevent an erroneous calibration curve due to coiled DNA (Suzuki et al., 2000). The plasmid concentration was quantified by spectrometry as described above. The copy number of standard plasmids was calculated according to the plasmid (3957 bp) plus insert (550 pb) lengths and assuming a molecular mass of 660 Da for a base pair. A standard DNA stock solution of 10⁹ copies of plasmid μ l⁻¹ and a standard 10-fold dilution series were prepared. Quantification of each target gene in each sample replicate was performed in triplicate with three independent real-time PCR runs using an iCycler iQ apparatus (Bio-Rad) associated with iCycler optical system interface software (version 2.3, Bio-Rad) for data collection and melting curve analysis.

2.9. Microscopic observations

All observations were performed with an epifluorescent microscope (Nikon Eclipse E600).

To estimate *A. oxydans* MsHM11 viability after 28 days of culture in sorption assays, the culture samples were stained with LIVE/DEAD® BacLight (Molecular Probes®) according to manufacturer instructions. The viability of *F. solani* MM1 was assessed using 25 μ l of 50 μ M FUN®1 cell stain (Molecular Probes®) on 0.5-mm mycelium pieces. The observations were performed with FITC (excitation: 565–495, emission: 515–555 nm) and G-2A (excitation: 510–560, emission: >590 nm) standard filter sets, and pictures were taken with a Nikon D70 camera. For FUN®1 visualisation, the red and green channels were merged with Image J Software, and hyphae showing Cylindrical Intra-Vacuolar Structures (CIVS; Millard et al., 1997) were assumed to be metabolically active. Ultraviolet fluorescent vesicles were observed without any previous staining in bright light and with a DAPI standard filter (excitation: 340–380, emission: 435–485 nm).

2.10. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using XLstat 2008 (Addinsoft) with $\alpha = 0.05$. Student *t* tests (inoculated culture vs. abiotic treatment) were applied for the initial dissipation assays. In the kinetics experiment, a two-way analysis of variance (ANOVA) was performed with time (considering that the cultures were sacrificed at each sampling time) and biotic treatments as independent factors. In the sorption assays, one-way ANOVA was used to separately compare PAH absorption, biotransformation, and recovery in the culture medium between inoculated treatments, whereas the PAH dissipation per unit biomass was analysed using two-way ANOVA with treatment and PAH as independent factors. All ANOVAs showing significant differences were followed by Newman–Keuls multiple comparison tests.

3. Results

3.1. PAH dissipation in pure cultures with or without glucose

The 14-day incubation of *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 in PAH-containing BSM with or without glucose highlighted two contrasted patterns of PAH dissipation (Table 1). The percentages of recovery were calculated considering the mean values measured in the abiotic control as references. Some values in Table 1 were slightly higher than 100%, which can be explained by the variability between replicates in these controls. *F. solani* MM1 could not grow with the PAHs as a unique growth substrate, and, thus, no

Table 1

Percentage of residual PAHs after 14 days of axenic culture of *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 in liquid basal salt medium (BSM) compared to abiotic treatment, with or without glucose.

Microbial strain	Phenanthrene		Pyrene		Dibenz(a,h)anthracene	
	BSM	BSM + glucose	BSM	BSM + glucose	BSM	BSM + glucose
<i>F. solani</i> MM1	92.8 ± 4.9	77.9 ± 3.7 ^a	85.8 ± 5.3	78.9 ± 6.5 ^a	93.0 ± 3.0	83.5 ± 13.7
<i>A. oxydans</i> MsHM11	33.5 ± 10.2 ^a	86.5 ± 5.2	88.8 ± 6.6	117.3 ± 11.8	88.6 ± 5.1	114.1 ± 10.7

^a Significant difference between biotic and corresponding abiotic treatments with $p < 0.01$ according to Student *t* tests.

dissipation could be observed in these conditions. However, when glucose was added, *F. solani* significantly dissipated 22% and 21% – i.e., 1.3 ± 0.3 mg each – of the added PHE and PYR, respectively. No significant dissipation of DBA was observed, which could be due to DBA having lower water solubility than PHE and PYR (i.e., 2400- and 270-fold, respectively). In contrast, *A. oxydans* was found to deplete 66% of PHE – i.e., 5.1 ± 0.8 mg – when the PAHs were provided as the sole carbon source ($p < 0.01$), but glucose addition in large excess inhibited this ability. Furthermore, the bacteria did never significantly removed PYR or DBA, even when no glucose was added. However, glucose addition was required in the co-culture experiments with *F. solani*. We hypothesised that when the glucose would be totally consumed in the co-cultures, *A. oxydans* would start to degrade phenanthrene.

3.2. PAH dissipation kinetics in buffered and unbuffered medium

The PAH dissipation kinetics experiment was conducted in unbuffered and buffered BSM containing PHE, PYR, and DBA (500, 500, and 50 mg l^{-1} , respectively) inoculated with *F. solani* MM1, *A. oxydans* MsHM11, or both microbes in co-culture. In the pure culture with unbuffered medium, the *F. solani* biomass reached a plateau from the 7th day concomitantly with the total disappearance of glucose (Fig. 1A). The pH remained statistically constant (6.8) throughout the experiment. A significant depletion of the three PAHs was measured from the 7th day ($p \leq 0.03$) and tended to increase with time, reaching 5.42 ± 0.15 mg of total PAHs dissipated after 28 days of culture, corresponding to 27%, 26%, and 24% dissipation for PHE, PYR, and DBA, respectively. The three PAHs followed the same kinetics pattern throughout the incubation.

In the pure culture of *A. oxydans*, the number of CFUs increased during the first 7 days of the experiment but quickly dropped from the 14th day of the culture (Fig. 1B). This was probably due to the drastic acidification to pH ~ 5 , a consequence of the bacterial growth. Approximately 11% of the PHE, i.e., 0.91 ± 0.34 mg, was significantly ($p \leq 0.03$) dissipated after 7 and 14 days, but no dissipation was noted after 21 and 28 days. No significant PYR or DBA dissipation could be measured at any sampling time.

No synergistic or even additive effect could be observed in the fungal-bacterial co-cultures with unbuffered medium. The microbial growth was slower than in the *F. solani* pure cultures, and the biomass continued to increase until the 28th day ($p \leq 0.04$; Fig. 1C), which was correlated with a delay in glucose consumption that was complete after 14 days. The bacterial viability was highly affected: no bacterial CFU could be counted from the 7th day (data not shown) when the pH had dropped to 4. Probably bacteria grew during the first few days, acidified the medium, and the low pH then affected their viability on the agar plate. The microbial growth is thus expressed in Fig. 1C in dry biomass. No significant dissipation of any of the three PAHs could be measured at any sampling time.

To avoid a negative interaction due to pH decrease, *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 were cultivated in BSM buffered to pH 6.8. When cultivated alone, *F. solani* quickly reached a two-fold higher biomass than in an unbuffered condition (Fig. 1D). Then the

biomass drastically declines. *Arthrobacter* completely lost viability from the 7th day, probably due to the high cell density. The PAH dissipation in the buffered pure cultures was nearly identical to what was observed in the unbuffered cultures, but a different pattern was observed in the co-cultures. Indeed, the three PAHs were linearly depleted with time ($r^2 = 0.95$, 0.95 and 0.88 for PHE, PYR, and DBA, respectively) throughout the experiment in the buffered co-culture, leading to a final dissipation of 23%, 17%, and 17%, respectively ($p < 0.01$, Fig. 1F). The biomass was not significantly different from the *F. solani* pure culture, and *A. oxydans* was no more cultivable after 7 days (data not shown). This buffered co-culture was thus dominated by fungal biomass (confirmed visually).

The dissipation efficiency was significantly higher with the fungus alone than in the co-culture for the three PAH compounds, and the PHE and PYR dissipation was significantly higher in the buffered co-cultures than in the *Arthrobacter* pure cultures ($p < 0.05$).

3.3. PAH adsorption, absorption, and biotransformation in *F. solani* pure cultures and co-cultures with *A. oxydans*

In the fungal cultures of the kinetics experiment, the PAH dissipation seemed to continue even after the biomass had stopped increasing. Moreover, the dissipation followed the same patterns, whatever the PAH molecular weight, indicating no selectivity for molecule type. We thus hypothesised that part of the observed depletion could be due to a passive mechanism, such as PAH sorption on (adsorption) or in (absorption) fungal cells. The PAHs recovered from the *F. solani* killed biomass were less than 0.2% of the total PAHs, i.e., less than $0.9 \mu\text{g PAHs mg}^{-1}$. Thus, the adsorption contribution to the dissipation was considered negligible. The absorption was then estimated in the 28-day PAH-containing cultures of *F. solani* MM1 and the co-cultures with *A. oxydans* in the unbuffered or buffered (pH 6.8) medium (Fig. 2). The PAHs were analysed separately from the liquid medium and the microbial biomass.

The respective contributions of *F. solani* and *A. oxydans* to the biomass were quantified using real-time PCR targeting the rRNA genes (Table 2). The DNA extraction yields (i.e., quantity of extracted DNA per milligram dry biomass) were significantly lower in the unbuffered co-cultures compared to the buffered ones. The fungal 18S rRNA gene copy number per nanogram DNA was 100-fold lower in the buffered co-cultures ($p < 0.05$) compared to the unbuffered. However, the bacterial 16S rRNA gene copy number per nanogram DNA was approximately 2000-fold higher in the buffered co-cultures ($p \leq 0.01$). Consequently, the 16S/18S copy number ratios were completely inverted in these two treatments because it was approximately 4×10^5 -fold higher in the buffered co-cultures ($p < 0.04$). This result suggests a great dominance of *A. oxydans* in the buffered co-cultures and of *F. solani* in the unbuffered cultures in this 28-day incubation experiment. Indeed, the visual aspect of the buffered co-cultures in this experiment (highly turbid liquid and yellow-coloured medium with numerous 5-mm mycelial pellets) was totally different from that observed in the unbuffered co-cultures and in the *F. solani* pure culture (with one large ~ 3 -cm-diameter mycelial pellet in a clear red aqueous medium).

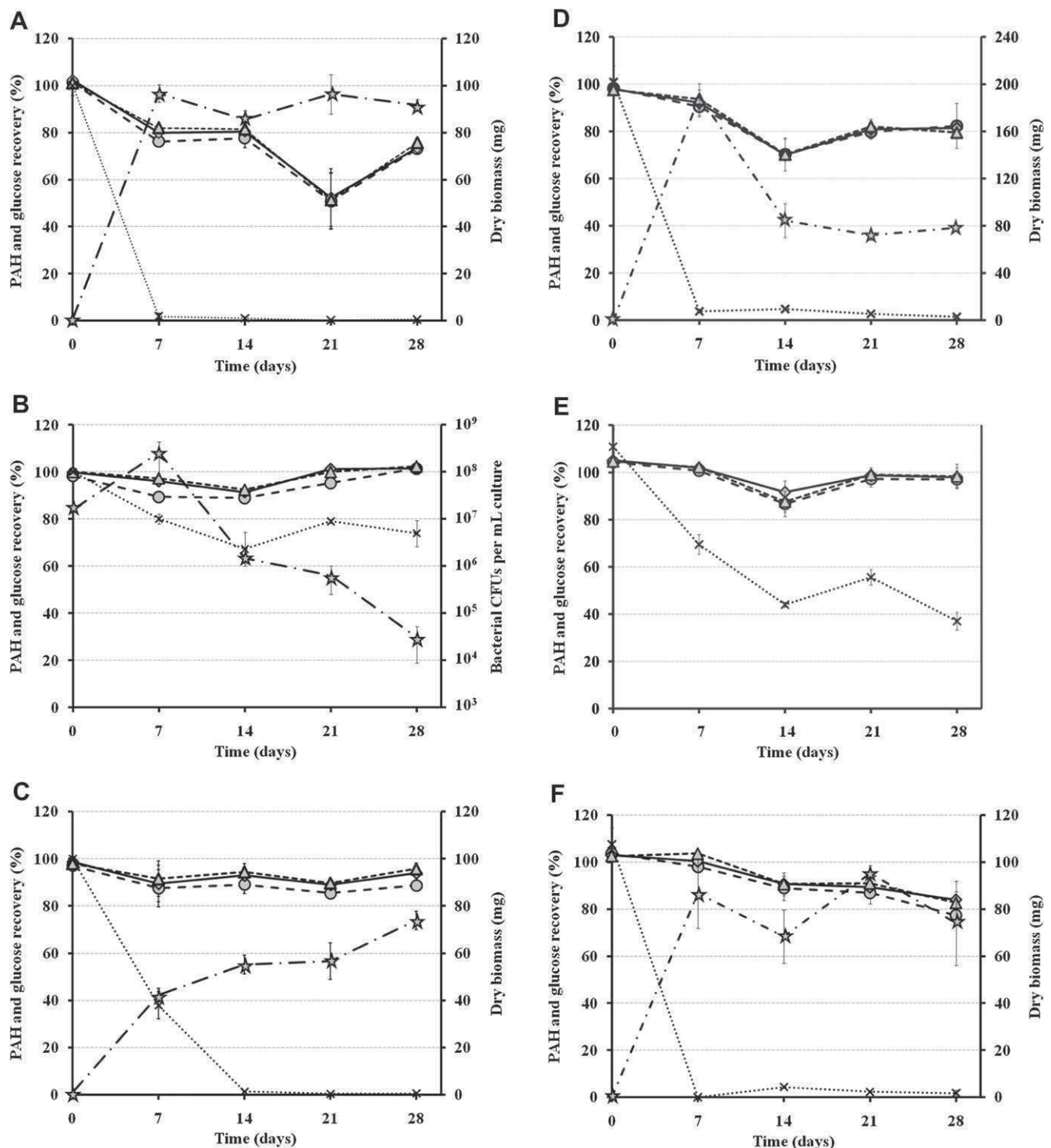


Fig. 1. Percentage of PHE (circles), PYR (rhombuses), DBA (triangles), and glucose (crosses) recovery and microbial growth (stars) in pure cultures of *F. solani* (A: unbuffered and D: buffered), *A. oxydans* (B: unbuffered and E: buffered), and fungal-bacterial co-cultures (C: unbuffered and F: buffered). One-hundred-percent PAH and glucose recovery are the means of extracted PAHs or glucose in abiotic treatments. Means $\pm$ SE, $n = 3$.

The microscopic observations, notably using viability staining, were conducted to assess morphologic and physiological changes. In the unbuffered co-cultures dominated by *F. solani* and in the pure fungal cultures, a microscopic observation of the bright field showed highly branched mycelium with relatively wide hyphae (5–10 μm in diameter) supporting chlamydospores containing refringent intracellular vesicles (Fig. 3a). After Fun[®]1 staining,

cylindrical intra-vacuolar structures could be observed in the hyphae and chlamydospores after 28 days, suggesting *F. solani* viability (Fig. 3c), which was consistent with the *F. solani* growth on agar plates. In the buffered co-cultures dominated by *A. oxydans*, the *F. solani* aspect was different: the hyphae were reduced to thin filaments (1–3 μm in diameter), supporting a greater number of chlamydospores, and only these spores were stained with FUN[®]1

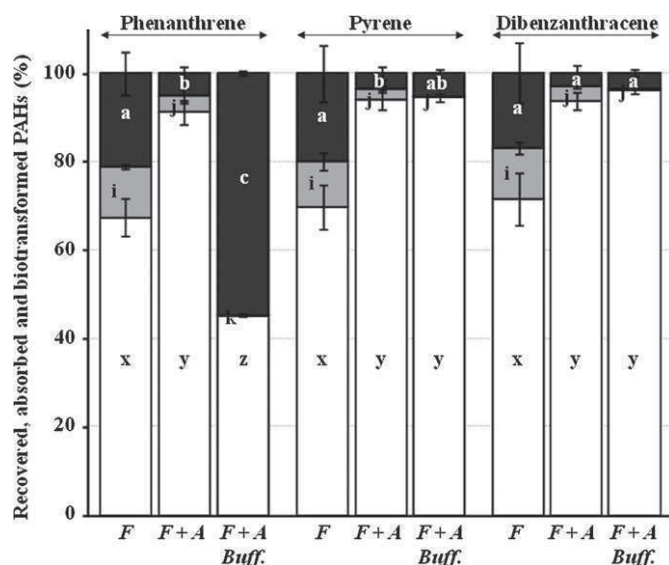


Fig. 2. Distribution between biotransformed (black areas), absorbed (grey areas), and residual (white areas) PAHs in 28-day-old pure cultures of *Fusarium solani* (F) or co-cultures of *F. solani* and *Arthrobacter oxydans* unbuffered (F+A) or buffered to pH 6.8 (F+A Buff.). Absolute values corresponding to 100% are means of the total extracted PAHs in the abiotic treatment. Means $\pm$ SE, $n = 3$. Different letters indicate a significant difference ($p \leq 0.05$) of biotransformed (a, b, c), absorbed (i, j, k), or residual (x, y, z) PAHs between treatments. Statistical analyses were performed independently for each PAH.

(Fig. 3d and f). Conversely, the *A. oxydans* viability, assessed by LIVE/DEAD® BacLight staining, was lower in the unbuffered co-cultures dominated by the fungus than in the buffered co-cultures dominated by the bacterium (data not shown).

The absorbed PAHs were found to be a highly significant part of the PAH dissipation in *F. solani* pure cultures and unbuffered co-cultures dominated by the fungus. In both cases, one-third of the dissipated PAHs were recovered from the biomass, reaching 2.01 ± 0.32 mg of the absorbed PAHs in the pure culture, i.e., $30 \mu\text{g mg}^{-1}$ biomass. The refringent vesicles in the chlamydospores, and some smaller ones located in hyphae, showed a high autofluorescence when observed with the DAPI standard filter (Fig. 3b). Such vesicles were never observed in the mycelium from the PAH-free cultures (data not shown), suggesting that the fluorescence was due to PAHs (UV autofluorescent). By contrast, the absorption part was negligible in the PHE dissipation observed in the buffered co-cultures dominated by *A. oxydans*, which is in concordance with the microscopic observations showing less refringent vesicles and a weaker UV autofluorescence (Fig. 3e).

In the *F. solani* pure cultures, the PHE, PYR, and DBA dissipation was 33%, 30%, and 29%, respectively, i.e., 5.88 ± 1.50 mg total PAHs (Fig. 2). These percentages did not significantly differ from the kinetics experiment, revealing a good reproducibility. The calculated biotransformed PAH quantities were 1.91 ± 0.75 mg, 1.78 ± 0.92 mg, and 0.19 ± 0.13 mg for PHE, PYR, and DBA, respectively. As in the kinetics experiment, in the unbuffered co-cultures the PAH dissipation was very weak for the three PAHs, with only PHE being significantly dissipated (i.e., 9% corresponding to 0.79 ± 0.43 mg; $p = 0.018$; Fig. 2). Even though *F. solani* dominated

and did not show any growth delay compared to the pure cultures (Table 2), other factors partly inhibited its remediation potential. In the buffered co-cultures, dominated by *Arthrobacter*, a high PHE dissipation ($p < 0.001$) was observed, reaching 55% (i.e., 4.94 ± 0.06 mg) after 28 days of culture (Fig. 2), which could be imputed exclusively to biotransformation. No significant dissipation was observed in this treatment for PYR or DBA, which is in accordance with the dominance by *A. oxydans*.

4. Discussion

The initial PAH concentrations in these experiments were deliberately very high compared with other studies because the soil from which both strains were isolated presented a 16-PAH concentration of approximately 1800 mg kg^{-1} (Biache et al., 2008). The effective exposition in the liquid cultures was even lower because of the very low PAH solubility in the aqueous medium. Furthermore, *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 did not show any growth delay when cultured with these PAH concentrations compared with the PAH-free cultures (data not shown).

The two microbial strains exhibited different PAH dissipation potential. *F. solani* could deplete the three PAHs, whatever their molecular weight, provided that an additional carbon source was added. Other *Fusarium* strains isolated from the polluted soils were successfully tested for their PAH bioremediation ability in various conditions, such as liquid cultures (Veignie et al., 2004; Silva et al., 2009), inoculation within a complex consortium in soil microcosms (Jacques et al., 2008), or even in association with plants (Mohsenzadeh et al., 2010). The PAH dissipation potential of *F. solani* MM1 seemed to include the uptake and storage of PAHs in intracellular vesicles. Such vesicles have been found in other fungal strains when incubated with PAHs (Verdin et al., 2005; Wu et al., 2009). Verdin et al. (2005) showed that these vesicles could be stained with lipid-specific dyes and that their formation did not depend on the cytoskeleton. They hypothesised that the PAH uptake involves passive diffusion through the lipidic membrane (Verdin et al., 2005). The fluorescence of the vesicles was highly intense (Fig. 3), and we could relate the presence of the PAH-containing vesicles to the large amounts of absorbed PAHs, representing 3% of the total fungal biomass. The fate of internalised PAHs is still unknown: this could be a strategy of protection against PAH cytotoxicity through pollutant containment or transitory storage until oxidation by enzymatic systems of detoxification. A significant part of the PAHs, i.e., $\sim 60 \mu\text{g mg}^{-1}$ biomass, was *de facto* biotransformed by *F. solani* MM1 because it could neither be recovered from the culture medium nor from the biomass. This value is rather high compared with other values calculated from the published data: $\sim 3 \mu\text{g PYR mg}^{-1}$ for *Penicillium ochrochloron* at 28 days (Saraswathy and Hallberg, 2005); $\sim 19 \mu\text{g anthracene, PYR or DBA (separately) mg}^{-1}$ for *F. solani* at 30 days (Verdin et al., 2004; 2005); and $\sim 41 \mu\text{g DBA mg}^{-1}$ for *Trichoderma viride* at 30 days (Verdin et al., 2004).

By contrast, *A. oxydans* MsHM11 could use the three-ring PAH phenanthrene as a growth substrate, biotransforming $73.1 \pm 16.1 \mu\text{g PHE mg}^{-1}$ biomass, and this potential was inhibited by the presence of glucose. The medium acidification was certainly due to bacterial growth and not to PAH dissipation metabolism since it occurred even when PHE dissipation was low. Members of the

Table 2

DNA extraction yields and 18S and 16S rRNA gene copy number, determined by real-time PCR, in 28-day-old *F. solani* axenic cultures and co-cultures with *A. oxydans*. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between treatments.

Treatment	Extraction yield (ng DNA mg^{-1} biomass)	18S copy number ng^{-1} DNA	16S copy number ng^{-1} DNA	Ratio 16S/18S
<i>F. solani</i>	$4.2 \times 10^2 \pm 1.6 \times 10^{2a}$	$8.6 \times 10^3 \pm 5.2 \times 10^{3a}$	—	—
<i>F. solani</i> + <i>A. oxydans</i> , non buffered	$2.8 \times 10^2 \pm 1.0 \times 10^{2a}$	$1.9 \times 10^4 \pm 1.6 \times 10^{4a}$	$7.3 \times 10^2 \pm 3.3 \times 10^{2a}$	$4.9 \times 10^{-2} \pm 2.2 \times 10^{-2a}$
<i>F. solani</i> + <i>A. oxydans</i> , buffered	$1.1 \times 10^3 \pm 2.0 \times 10^{2b}$	$1.7 \times 10^2 \pm 1.1 \times 10^{2b}$	$1.6 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^{5b}$	$1.9 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^{4b}$

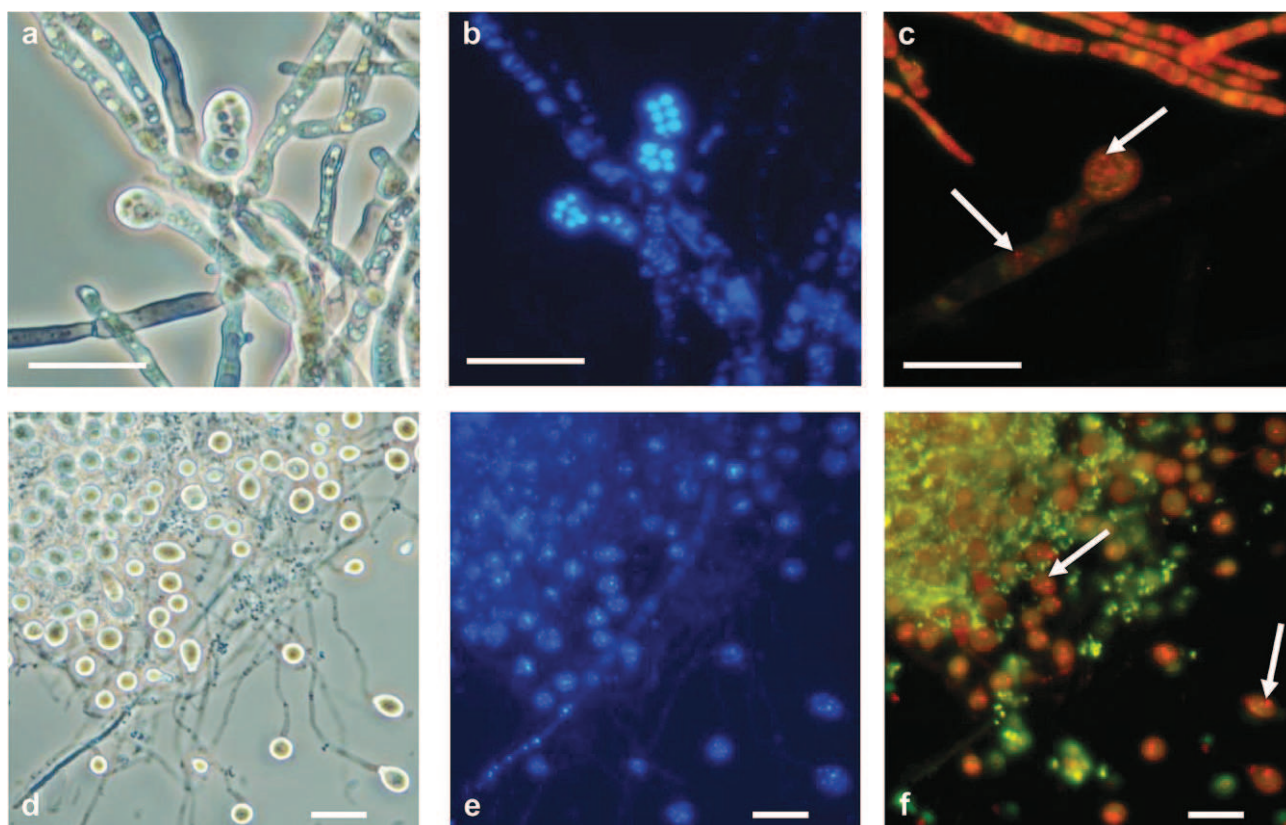


Fig. 3. Epifluorescence micrographs of *F. solani* in pure culture (a–c) or in co-culture with *A. oxydans* (d–f) after 28 days with PAHs. Bar = 20 μ m. The culture conditions are detailed in the materials and methods section. (a, d) bright field; (b, e) same field, autofluorescence using DAPI standard filter. Arrows indicate the UV fluorescent vesicles in the chlamydospores and hyphae never observed without PAHs; (c, f) fungal live/dead staining using FUN®1 cell stain. The present picture results from the merging of red and green channels using G-2A and FITC standard filters, respectively. Arrows indicate red fluorescent cylindrical structures showing fungal viability. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

genus *Arthrobacter* have been isolated from different PAH-polluted soils and were shown to efficiently remove low-molecular-weight PAHs, such as PHE, and some organic xenobiotics, such as carbazole (Seo et al., 2006; Johnsen et al., 2007; Kallimanis et al., 2007). Also, among the PAH-degrading bacteria isolated from the Neuves-Maisons wasteland soil, strains belonging to the genus *Arthrobacter* were frequent (Poupin P. and Bauda P., personal communication). Moreover, we previously showed, by using real-time PCR detection of the PAH-dioxygenase gene, that PAH degraders belonging to Gram-positive Actinobacteria were favoured compared with Gram-negative Proteobacteria in this soil (Cébron et al., 2009). Growth substrate competition took place in our experiment: *A. oxydans* preferentially used easily degradable glucose at the expense of PAH dissipation and PHE when glucose was not available. Kallimanis et al. (2007) also showed that PHE uptake by *Arthrobacter* sp. Sphe3, mediated by an inducible active transport mechanism, was inhibited in the presence of glucose. However, *Arthrobacter* sp. was favoured in the presence of an easily degradable carbon source (i.e., ray-grass root exudates) and was still active in phenanthrene degradation, as shown by a DNA-stable isotope probing experiment (Cébron et al., 2011).

Previous studies have shown a synergistic effect of the co-inoculation of fungi and bacteria on PAH depletion from artificial media and soils. For instance, Boonchan et al. (2000) showed a noteworthy synergistic effect on PAH biodegradation (benzo(a)pyrene and DBA in particular) when the fungus *Penicillium janthinellum* and the bacteria *Stenotrophomonas maltophilia* were grown together in liquid media and in PAH-polluted soil. Jacques et al. (2008) also observed that the co-inoculation of *Fusarium oxysporum* and a bacterial

consortium composed of 5 PAH-degrading bacterial strains strongly increased anthracene dissipation in soil compared with separate inoculations. The co-culture of the two microbial strains did not improve PAH depletion in our work. The results show that some negative interactions inhibited both partners' remediation potentials. In the co-cultures of the kinetics (Fig. 1) and 28-day incubation (Fig. 2) experiments, although the bacterial and fungal inocula were prepared using the same procedure, the results differed in terms of bacterial and fungal dominance. The co-culture led to the loss of cultivability and/or viability of *A. oxydans* in the co-cultures dominated by the fungus and to the extensive formation of chlamydospores by *F. solani* in the co-cultures dominated by the bacteria. The production of these thick-walled conservation spores was shown to be induced by stresses such as carbon starvation, pH variations, or bacterial colonisation (Jansons and Nickerson, 1970; El-Ani, 1988). In our experiments, the competition for the carbon source and the pH decrease (i.e., indirect antagonism) were also implicated. Indeed, when the samples were grown on the same MEA plates, no inhibition of growth was observed for either the fungus or the bacterium even when colonies were overlapping, suggesting no direct antagonism (e.g., antibiotic production) between the two model strains (data not shown).

5. Conclusion

The two isolated strains were shown to efficiently dissipate PAHs. To our knowledge, this is the first time that PAH absorption in fungal biomass has been accurately measured, and these results highlight that a significant part of fungal PAH dissipation could be

due to accumulation in intracellular vesicles. However, the PHE dissipation by *A. oxydans* was only due to biotransformation. Our results show that *F. solani* MM1 and *A. oxydans* MsHM11 are potential candidates for bioremediation. Although a significant portion of the PAHs was absorbed in the fungal biomass, an *in vitro* PAH-efficient biotransformation occurred. The mixed co-cultures showed that indirect antagonism, such as competition for carbon source or pH modifications, could impede PAH dissipation.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge GISFI (Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles, www.gisfi.fr) for providing field site equipment and the ANR program (MULTIPOLSITE, ANR-2008-CESA-010) for financial support.

References

- Atagana, H., Haynes, R., Wallis, F., 2006. Fungal bioremediation of creosote-contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. *Water, Air & Soil Pollution* 172, 201–219.
- Baldrian, P., 2008. Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: ecology and constraints for applicability in bioremediation. *Fungal Ecology* 1, 4–12.
- Biache, C., Mansuy-Huault, L., Faure, P., Munier-Lamy, C., Leyval, C., 2008. Effects of thermal desorption on the composition of two coking plant soils: impact on solvent extractable organic compounds and metal bioavailability. *Environmental Pollution* 156, 671–677.
- Binet, P., Portal, J.M., Leyval, C., 2000. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant and Soil* 227, 207–213.
- Boonchan, S., Britz, M.L., Stanley, G.A., 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1007–1019.
- Brodtkorb, T.S., Legge, R.L., 1992. Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3117–3121.
- Cébron, A., Beguiristain, T., Faure, P., Norini, M.P., Masfaraud, J.F., Leyval, C., 2009. Influence of vegetation on the *in situ* bacterial community and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degraders in aged PAH-contaminated or thermal-desorption-treated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6322–6330.
- Cébron, A., Louvel, B., Faure, P., France-Lanord, C., Chen, Y., Murrell, C., Leyval, C., 2011. Root exudates modify bacterial diversity of phenanthrene-degraders in PAH-polluted soil but not phenanthrene degradation rates. *Environmental Microbiology* 13, 722–736.
- Cébron, A., Norini, M.P., Beguiristain, T., Leyval, C., 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHDα) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *Journal of Microbiological Methods* 73, 148–159.
- Cerniglia, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3, 351–368.
- Cerniglia, C.E., 1997. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19, 324–333.
- De Boer, W., Folman, L.B., Summerbell, R.C., Boddy, L., 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 795–811.
- El-Ani, A.S., 1988. Chlamydospores in *Fusarium solani*. *Mycologia* 80, 885–887.
- Felske, A., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M., 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4581–4587.
- Gramss, G., Voigt, K.D., Kirsche, B., 1999. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons with three to seven aromatic rings by higher fungi in sterile and unsterile soils. *Biodegradation* 10, 51–62.
- In Der Wiesche, C., Martens, R., Zadrazil, F., 2003. The effect of interaction between white-rot fungi and indigenous microorganisms on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Water, Air & Soil Pollution* 3 (3), 73–79.
- Jacques, R.J., Okeke, B.C., Bento, F.M., Teixeira, A.S., Peralba, M.C., Camargo, F.A., 2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresource Technology* 99, 2637–2643.
- Jansons, V.K., Nickerson, W.J., 1970. Induction, morphogenesis, and germination of chlamydospore of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* 104, 910–921.
- Johnsen, A.R., Schmidt, S., Hybholdt, T.K., Henriksen, S., Jacobsen, C.S., Andersen, O., 2007. Strong impact on the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading community of a PAH-polluted soil but marginal effect on PAH degradation when priming with bioremediated soil dominated by mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1474–1480.
- Juhász, A.L., Naidu, R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation* 45, 57–88.
- Kallimanis, A., Frilingos, S., Drainas, C., Koukkou, A., 2007. Taxonomic identification, phenanthrene uptake activity, and membrane lipid alterations of the PAH degrading *Arthrobacter* sp. strain Sphe3. *Applied Microbiology and Biotechnology* 76, 709–717.
- Kang, H., Hwang, S.Y., Kim, Y.M., Kim, E., Kim, Y.S., Kim, S.K., Kim, S.W., Cerniglia, C.E., Shuttlesworth, K.L., Zylstra, G.J., 2003. Degradation of phenanthrene and naphthalene by a *Burkholderia* species strain. *Canadian Journal of Microbiology* 49, 139–144.
- Kim, S.J., Kweon, O., Jones, R.C., Freeman, J.P., Edmondson, R.D., Cerniglia, C.E., 2007. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. *Journal of Bacteriology* 189, 464–472.
- Kotterman, M.J.J., Vis, E.H., Field, J.A., 1998. Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and indigenous microflora. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 2853–2858.
- Lueders, T., Wagner, B., Claus, P., Friedrich, M.W., 2004. Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environmental Microbiology* 6, 60–72.
- Millard, P.J., Roth, B.L., Thi, H.P., Yue, S.T., Haugland, R.P., 1997. Development of the FUN-1 family of fluorescent probes for vacuole labeling and viability testing of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 2897–2905.
- Mohan, S., Kisa, T., Ohkuma, T., Kanaly, R., Shimizu, Y., 2006. Bioremediation technologies for treatment of PAH-contaminated soil and strategies to enhance process efficiency. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 5, 347–374.
- Mohsenzadeh, F., Nasser, S., Mesdaghinia, A., Nabizadeh, R., Zafari, D., Khodakaramian, G., Chehregani, A., 2010. Phytoremediation of petroleum-polluted soils: application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 613–619.
- Peng, R.H., Xiong, A.S., Xue, Y., Fu, X.Y., Gao, F., Zhao, W., Tian, Y.S., Yao, Q.H., 2008. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Letters* 282, 927–955.
- Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V., Vasil'chenko, L.G., 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40, 1–17.
- Saraswathy, A., Hallberg, R., 2005. Mycelial pellet formation by *Penicillium ochrochloron* species due to exposure to pyrene. *Microbiological Research* 160 (4), 375–383.
- Seo, J.S., Keum, Y.S., Kyu Cho, I., Li, Q.X., 2006. Degradation of dibenzothiophene and carbazole by *Arthrobacter* sp. P1-1. *International Biodeterioration and Biodegradation* 58, 36–43.
- Silva, I.S., Grossman, M., Durrant, L.R., 2009. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63, 224–229.
- Suzuki, M.T., Taylor, L.T., DeLong, E.F., 2000. Quantitative analysis of small-subunit rRNA genes in mixed microbial populations via 5'-nuclease assays. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4605–4614.
- Tarkka, M.T., Sarniguet, A., Frey-Klett, P., 2009. Inter-kingdom encounters: recent advances in molecular bacterium–fungus interactions. *Current Genetics* 55, 233–243.
- Veignie, E., Rafin, C., Woisel, P., Cazier, F., 2004. Preliminary evidence of the role of hydrogen peroxide in the degradation of benzo[a]pyrene by a non-white rot fungus *Fusarium solani*. *Environmental Pollution* 129, 1–4.
- Verdin, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Newsam, R., Robinson, G., Durand, R., 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environmental Pollution* 133, 283–291.
- Verdin, A., Lounès-Hadj Sahraoui, A., Durand, R., 2004. Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *International Biodeterioration and Biodegradation* 53, 65–70.
- Vogel, T.M., 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology* 7, 311–316.
- Wu, Y.R., He, T.T., Lun, J.S., Maskau, K., Huang, T.W., Hu, Z., 2009. Removal of benzo[a]pyrene by a fungus *Aspergillus* sp. BAP14. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 25, 1395–1401.



Biological functioning of PAH-polluted and thermal desorption-treated soils assessed by fauna and microbial bioindicators

Aurélie Cébron^{a,*}, Jérôme Cortet^b, Stéven Criquet^c, Asmaa Biaz^b, Virgile Calvert^c,
Cécile Caupert^a, Céline Pernin^{b,d}, Corinne Leyval^a

^a LIMOS, UMR 7137 CNRS – Nancy Université, Faculté des Sciences, BP70239, 54506 Vandœuvre-les-Nancy cedex, France

^b LSE, UMR 1120 INPL – INRA, 2 avenue de la forêt de Haye, BP 172, 54505 Vandœuvre-les-Nancy cedex, France

^c IMEP, UMR 6116 CNRS, Laboratoire d'Ecologie Microbienne – case 452, Université Paul Cézanne Aix-Marseille III, Faculté des Sciences de Saint-Jérôme, 13397 Marseille cedex 20, France

^d Université Lille Nord de France, Lille 1, LGCgE, EA 4515, Cité scientifique SN3, 59655 Villeneuve d'Ascq cedex, France

Received 5 October 2010; accepted 9 February 2011

Abstract

A large number of soil bioindicators were used to assess biological diversity and activity in soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and the same soil after thermal desorption (TD) treatment. Abundance and biodiversity of bacteria, fungi, protozoa, nematodes and microarthropods, as well as functional parameters such as enzymatic activities and soil respiration, were assessed during a two year period of in situ monitoring. We investigated the influence of vegetation (spontaneous vegetation and *Medicago sativa*) and TD treatment on biological functioning. Multivariate analysis was performed to analyze the whole data set. A principal response curve (PRC) technique was used to evaluate the different treatments (various vegetation and contaminated vs. TD soil) contrasted with control (bare) soil over time. Our results indicated the value of using a number of complementary bioindicators, describing both diversity and functions, to assess the influence of vegetation on soil and discriminate polluted from thermal desorption (TD)-treated soil. Plants had an influence on the abundance and activity of all organisms examined in our study, favoring the whole trophic chain development. However, although TD-treated soil had a high abundance and diversity of microorganisms and fauna, enzymatic activities were weak because of the strong physical and chemical modifications of this soil.

© 2011 Institut Pasteur. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Microorganisms; Enzyme activities; Fauna; Soil; Plant; PAH

1. Introduction

Wasteland soils resulting from 20th century intensive industrialization (i.e., coal tar or coking production or wood preservative plants) are now in great need of remediation because of high levels of multi-pollution. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals (HMs) have been demonstrated to be highly toxic for life and can alter biodiversity (Cerniglia, 1992; Cortet et al., 1999). The organisms on the first level of the trophic chain are often the most vulnerable

to these contaminants (Dawson et al., 2007). Therefore, if bacterial, fungal, micro- and meso-faunal community structures and functions are affected, the proper functioning of the entire soil could be disturbed.

To date, different approaches have been developed to remediate these soils. In situ degradation is often a slow process due to environmental constraints and low availability of PAHs in aged polluted soils (Wilson and Jones, 1993). Consequently, industrial thermal desorption (TD) treatments have been used to remove PAH compounds, but this type of treatment does not affect HM content. After such drastic treatment, soil characteristics are modified and most of the biological diversity and functions are likely to be altered (Cébron et al., 2009; Ouvrard et al. in press). It thus appears

* Corresponding author.

E-mail address: aurelie.cebron@limos.uhp-nancy.fr (A. Cébron).

essential to understand whether these soil populations can once again recover and colonize following TD treatment (Cébron et al., 2009). Other complementary remediation methods can be achieved through plant use via phytoremediation or natural attenuation. It has been shown that plants that can grow on contaminated soils could increase microbial density and activity in the rhizosphere (Smalla et al., 2001) and interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and plant roots are known to promote PAH dissipation (Joner and Leyval, 2003). Furthermore, the plant root system has been recognized as a hotspot of biodiversity involving many interactions between plants, microorganisms and fauna (Bonkowski et al., 2009).

Thus far, the notion of soil quality has been mainly confined to agricultural soils and refers to the impact of perturbation on soil functioning. Whereas soil “quality” assesses soil functionality, soil “health” is more concerned with conditions required for promoting plant, animal and human health and sustainability (Doran et al., 2002; Gil-Sotres et al. 2005). However, polluted and remediated soils may never resemble native soils in terms of quality and health criteria because of the diverse nature, origin and environmental impact of contaminants and treatments. Therefore, it is crucial to assess the ecology and functioning of these soils under various environmental conditions.

In soils, carbon and nutrient cycles are driven by bacteria (i.e. carbon mineralization, nitrification; Nannipieri et al., 2003), archaea (i.e. ammonia oxidation, C1-compound production; Timonen and Bomberg, 2009) and fungi (i.e. lignin and cellulose degradation; Rabinovich et al., 2004). The literature describes a balance between bacterial and fungal biomass in soil, depending on the content and status of carbon and nutrients. Indeed, Moore and Hunt (1988) reported that soil with recalcitrant C substrate is dominated by fungi, while soil with labile C is dominated by bacteria. This is the base of the trophic chain, and upper biological compartments (micro- and meso-fauna) are thus directly influenced by soil characteristics and the microbial community biomass and diversity (Neher, 1999). To assess the biological soil quality and impact of remediation treatments, various bioindicators referring to these first trophic levels, and recently reviewed (Bispo et al., 2010), have been proposed based either on measured diversity or functional parameters. Microorganisms (mainly bacteria and fungi) are reported to be efficient bioindicators, as they are ubiquitous and respond rapidly to physical and chemical changes in the soil (Kennedy and Smith, 1995). The abundance and diversity of bacteria and fungi can be rapidly assessed using molecular biological tools, including real-time quantitative PCR and fingerprinting techniques (Cébron et al., 2008, 2009). Global microbial activity and specific functions in C, N, P and S cycles can be determined by measurements of respiration and enzyme activity (Floch et al., 2009). The abundance and diversity of micro- and meso-fauna, including nematodes, protozoa and microarthropods, can be measured through direct observation and identified with morphological criteria (Griffiths et al., 2005; Pernin et al., 2006b). However, for any bioindicator, species abundance, diversity and functions acquired during the time

series are multivariate and thus difficult to interpret. Because the time vector is often not a straight line in multivariate diagrams (i.e., PCA, MDS), Van Den Brink and Ter Braak (1998) developed the principal response curve (PRC) method. PRC is multivariate analysis that evaluates time series data resulting from experiments in which several treatments are contrasted with a control. This statistical analysis has been employed with success for biomonitoring of water quality (Van den Brink et al., 2009). In this study, we applied PRC as a tool to visualize and compare soil treatments during time and to evaluate the pertinence of each bioindicator in assessing soil biological functioning.

A field study was set up in 2005 to study *in situ* the natural (spontaneous vegetation) and plant-assisted (*Medicago sativa*) attenuation of a multi-contaminated soil and the same soil after TD treatment (Cébron et al., 2009; Ouvrard et al., *in press*). Two years after set-up and plant colonization, various biological parameters (fauna and microbial indicators) were monitored for a further period of two years (2008–2009). In the present study, we evaluated the influence of remediation treatment (vegetation and thermal desorption) on biological diversity and activity in contaminated soil using a large range of soil bioindicators, including biodiversity of organisms (bacteria, fungi, protozoa, nematodes, microarthropods) and functional parameters (enzymatic activities and soil respiration). The large range of bioindicators aimed to evaluate the impact of soil modification on the trophic chain and possible redundancy between bioindicators.

2. Materials and methods

2.1. Experimental site and sampling

2.1.1. Plot device

The *in situ* plot devices, consisting of 24 stainless steel tanks (2 × 3 × 0.4 m, length × width × height) previously described in Cébron et al. (2009) and Ouvrard et al. (*in press*) and located at Homécourt (Meurthe et Moselle, France), were established in September 2005. Twenty plots were filled with contaminated soil (NM) from a former coking plant site (Neuves-Maisons, Meurthe et Moselle, France). Five different treatments with four replicates were tested, including bare soil (BS) prevented from growth of vegetation by hand, bare soil that had been tilled in March 2008 (BSt, previously called NC in Ouvrard et al., *in press*), soil sown with *M. sativa* L. cv. Europe (alfalfa) (Ms), soil sown with alfalfa and inoculated with two mycorrhizal fungal strains (*Glomus intraradices* and *Glomus mosseae*, Msm) and soil allowed to be colonized by spontaneous vegetation (SV). Four other plots were filled with the same soil treated by TD. TD consisted of heating the excavated soil to 500 °C, where mainly PAHs were transferred to gas phase. These plots were sown with alfalfa and inoculated with both mycorrhizal fungal strains as described above (Msm-TD). Contrary to spontaneous vegetation that was not disturbed, *M. sativa* plant biomass was harvested each year in September after the soil sampling.

2.1.2. Soil characteristics

Soil characteristics, previously described in detail by Ouvrard et al. (in press), are shown in Table 1 without distinction between plot treatments, since no significant differences were observed due to vegetation. The NM and TD soils had approximately the same texture: 12.1% and 10.4% clay, 22.1% and 19.5% silt and 65.8% and 70.1% sand, respectively. The main differences observed were: drastically reduced PAH levels in TD compared to NM soil and higher pH levels and C/N ratios (i.e. lower nitrogen content) in TD compared to NM soil (Table 1).

2.1.3. Soil sampling

Soil samples were collected two and a half years after stabilization of the plot devices. Sampling was performed twice a year in April 2008, September 2008, April 2009 and September 2009.

For bacteria, fungi and enzyme assessment, six subsamples per plot were collected with a hand auger and mixed into one mean sample per plot. Soil samples were directly sieved to <5 mm; a portion was stored at -20°C until DNA extraction and fresh soil was kept at 4°C for measurement of microbial activity.

For nematodes and protozoa, two separate composite soil samples were collected from the top 15 cm of each plot by randomly collecting six cores with a gouge auger (Eijkelkamp, Giesbeek, The Netherlands). The soil was sieved through a 4 mm diameter mesh and stored in sterile 50 mL plastic tubes at 4°C for transport to the laboratory.

For microarthropods (Collembola and Acari), three intact soil cores (5 cm depth, 5 cm diameter) were taken at each sampling date from the center of each plot to avoid a border effect.

2.2. Abundance and diversity of bacteria and fungi

2.2.1. DNA extraction

Total nucleic acids were extracted from 0.5 g of soil using a bead-beating procedure (Cébron et al., 2008) modified by addition of 200 mg of ion exchanged Dowex resin (Sigma–Aldrich) and equilibrated with a 5 M LiCl solution to exchange Li^{+} for Ca^{2+} ions from the soil solution and to prevent co-precipitation of insoluble CaSO_4 with DNA.

2.2.2. Abundance of total bacteria, fungi and PAH degraders

Real-time PCR was performed according to the procedure described in Cébron et al. (2008). Fungi, bacteria and two

groups of PAH degraders (Gram-positive and Gram-negative) were quantified by targeting 18S rRNA, 16S rRNA and PAH-dioxygenase genes using the primer sets FF390R/Fung5F (Lueders et al., 2004), 968F/1401R (Felske et al., 1998) and PAH-RHD α GP and GN (Cébron et al., 2008), respectively. Quantification was performed in triplicate using an iCycler iQ apparatus combined with an iCycler Optical System (Bio-Rad) and a standard plasmid dilution series from 10^8 to 10^1 gene copies μL^{-1} . Amplification reactions were carried out in a 20 μL volume using the iQ SYBR green SuperMix (Bio-Rad) as described previously in Cébron et al. (2008).

2.2.3. Community structure and diversity indices

Fungal 18S rDNA and bacterial 16S rDNA fragments were amplified using the same universal primer set described above but with addition of GC clamps on the reverse and forward primer, respectively. PCR was performed using an iCycler (Bio-Rad) in a 50 μL volume with Taq DNA polymerase (Invitrogen). The temperature profile was chosen according to Cébron et al. (2009) for 16S rDNA amplification and a traditional three-step program with 35 hybridization cycles at 50°C was used for 18S rDNA amplification. PCR products (500 ng) from all samples were loaded onto a temporal thermal gradient gel electrophoresis (TTGE) DCode system (Bio-Rad). TTGE was performed as previously described in Cébron et al. (2009) for 16S rDNA and with slight modification for 18S rDNA (5.5 M urea, running at 145 V with temperature increasing from 51.5 to 60.5°C at a 1.5°h^{-1} rate of increase). After migration, gels were stained with SYBR Gold (1/10,000 final, Molecular Probes) and analyzed on a GelDoc transilluminator (bio-rad). QuantityOne 4.0.1 software (Bio-Rad) was used for image and band pattern analysis. Shannon diversity indexes $H' (= -\sum p_i \cdot \ln p_i)$, where p_i is the proportion of the i th band based on its relative intensity against all the bands found in one sample lane, were calculated for all samples.

2.3. Abundance and diversity of micro- and mesofauna

2.3.1. Nematodes and protozoa

Nematodes were extracted from fresh soil using the Whitehead and Hemming tray technique (Whitehead and Hemming, 1965). Soil (ca. 20 g) was placed in a tissue-lined mesh-based (90 μm) plastic sieve and then into a Baermann funnel filled with enough water to cover the soil, but still contained within the sieve (Brown and Boag, 1988). After 48 h, nematodes were collected in a 50 mL tube, heat-killed in

Table 1
Soil characteristics.

	Date	pH	N (g/kg)	C/N	TOC (g/kg)	P ₂ O ₅ (g/kg)	Cu tot (mg/kg)	Pb tot (mg/kg)	Zn tot (mg/kg)	Σ 16 PAH (US-EPA) (mg/kg)
NM	April 2008	7.68 $\pm$ 0.14	2.52 $\pm$ 0.22	25.1 $\pm$ 1.3	63.3 $\pm$ 5.4	0.072 $\pm$ 0.008	135.7 $\pm$ 8.1	523.0 $\pm$ 127.0	2102 $\pm$ 220	1427.3 $\pm$ 114.9
	Sept. 2009	7.41 $\pm$ 0.09	2.54 $\pm$ 0.26	25.6 $\pm$ 1.6	64.9 $\pm$ 5.2	0.064 $\pm$ 0.008	137.5 $\pm$ 8.0	489.6 $\pm$ 38.1	2248 $\pm$ 171	894.5 $\pm$ 86.2
TD	April 2008	8.39 $\pm$ 0.20	1.09 $\pm$ 0.07	57.0 $\pm$ 3.0	62.0 $\pm$ 5.6	0.086 $\pm$ 0.008	114.7 $\pm$ 9.2	674.5 $\pm$ 70.9	2700 $\pm$ 285	62.4 $\pm$ 4.2
	Sept. 2009	7.69 $\pm$ 0.03	1.08 $\pm$ 0.08	57.3 $\pm$ 5.7	61.2 $\pm$ 2.1	0.070 $\pm$ 0.002	109.2 $\pm$ 2.6	677.7 $\pm$ 27.8	2775 $\pm$ 95	28.7 $\pm$ 3.8

Data for NM soil and TD soil are mean values from 20 to 4 plot analyses, respectively.

a water bath for 4 min at 65 °C and preserved in a 1% formaldehyde solution. The total number of nematodes was counted under a low power microscope.

The number of protozoa was estimated using a most probable number technique (Darbyshire et al., 1974) and the biomass was calculated using appropriate weight (Griffiths and Caul, 1993). A known weight (ca. 10 g) of soil was dispersed in 40 mL of Neff's modified amoeba saline medium (NMAS) (Page, 1976) by rolling at 20 °C for 1 h. Four 100 µL aliquots were placed in the first column of a sterile 96-well flat-bottomed microtiter plate. The remaining wells were filled with 100 µL of 1/10 nutrient broth (Oxoid) in NMAS, and a threefold dilution was carried out to the last column. To prevent desiccation, the dilution plates were wrapped in a polyethylene bag containing damp filter paper and incubated at 16 °C. The plates were examined for the presence of amoebae, ciliates and flagellates under an inverted microscope after 7, 14 and 21 d of incubation.

2.3.2. Microarthropods

Microarthropods were extracted from each soil sample using the Macfadyen method for a period of 1 week (Cortez et al., 2007) and identified and sorted using a dissecting stereomicroscope. Adult mites were identified to the suborder level (Actinedida, Gamasida, Oribatida, Acaridida) (Krantz, 1978). When possible, all collembolans were identified at the species level using different available keys (Gisin, 1960; Bretfeld, 1999; Potapov, 2001). For some analyses (see results), Collembola species were grouped into three morpho-ecological groups describing their habitat preferences combined with morphological parameters, including (i) epiedaphic, very mobile and living mainly in litter and topsoil; (ii) eu-edaphic, poorly mobile and living in soil macropores; and (iii) hemi-edaphic, an intermediate group (Gisin, 1943). All other microarthropods (such as pseudoscorpions and small millipedes) were grouped together. The abundance of each taxon was estimated per m².

2.4. Microbial activities

2.4.1. Respiration

Substrate-induced respiration was measured using an automated Oxytop apparatus (Oxytop® Model OC 110, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Munich, Germany). Glucose (100 mg) was added to soil samples (20 g) at water holding capacity (WHC), and O₂ consumption was

continuously monitored over 72 h at 20 °C. Substrate-induced respiration was expressed in mg O₂ g⁻¹ dry weight and per day (mg O₂ g⁻¹ DW d⁻¹).

2.4.2. Enzymatic activities

The enzymatic activity measured in this study included the following: arylamidase, arylsulfatase, cellulase, fluorescein diacetate hydrolase (FDase), lipase, alkaline and acid phosphomonoesterases and urease. These enzymes were chosen because of their involvement in the main biogeochemical cycles (C, N, P, and S) and degradation of major biopolymers potentially present in soils. Table 2 gives the corresponding methods used to measure their respective activities. Enzyme activity was calculated in units, defined as µmole of substrate hydrolyzed min⁻¹ and per g of soil dry weight (U g⁻¹ DW).

2.5. Multivariate statistical analysis

The effects of treatment on the soil community and functional parameters were analyzed by the principal response curve (PRC) method (Van den Brink, 1999) using CANOCO software (Ter Braak and Smilauer, 2002). The PRC method is multivariate analysis designed by Van Den Brink and Ter Braak (1998) for analysis of data from microcosm or mesocosm experiments to optimally show the effect of different treatments over time. This method, used by several authors in ecotoxicology (Pernin et al., 2006a) and field studies (Frampton et al., 2000; Pernin et al., 2006b), focuses on differences in taxonomic or biochemical composition between treatments and the control at each particular time point. The PRC results in a diagram showing the sampling date on the x-axis and the first or second principal component of the treatment effect on the y-axis. This yields a diagram representing deviations in time of treatment compared to the control. The bioindicator component weights, which appear on the right side of the figure, can be interpreted as the weight of each species or component with the response given in the diagram. The statistical significance of observed treatment effects at the community level and differences between treatments were also tested using Monte Carlo's permutation tests (Ter Braak and Smilauer, 2002) with 499 permutations. The same test was used to analyze the observed differences between treatments.

Three different PRCs were calculated on log-transformed, centered and standardized data to obtain similar weight in the analysis; one analysis was performed only on microbiological data (microbial activities, bacteria and fungi abundance, and

Table 2
Methods used for measurement of enzyme activity.

Enzyme activity	Substrate	Catalytic reaction	Reference
Arylamidase	L-Leucine b-naphtylamide	Amino acid hydrolysis	Acosta-martinez and Tabatabai (2000)
Arylsulfatase	p-nitrophenyl sulfate	Sulfoester hydrolysis	Tabatabai and Bremmer (1970)
Cellulase	Carboxynethylcellulose	Cellulose hydrolysis	Deng and Tabatabai (1994)
Fluorescein diacetate hydrolase (FDase)	Fluorescein diacetate	Ester hydrolysis	Green et al. (2006), Alarcon et al. (2008)
Lipase	p-nitrophenyl palmitate	Lipide hydrolysis	Gupta et al. (2002)
Alkaline and acid phosphomonoesterases	p-nitrophenyl phosphate	Phosphomonoester hydrolysis	Tabatabai and Bremmer (1969)
Urease	Urea	Urea hydrolysis	Kandeler and Gerber (1988)

the Shannon diversity index for bacteria and fungi); a second analysis was performed on fauna data (protozoa, nematodes, microarthropods, and Collembola identified at the species level); and a third analysis assessed all information collected, but with Collembola grouped into three ecomorphological groups (see 2.3.2.). For each PRC, diagrams representing deviations in time of treatments used BS as the reference treatment.

3. Results

3.1. Bioindicator levels

The abundance and diversity of bioindicators and activity levels are presented in Table 3. Among microorganisms, bacteria were more abundant than fungi. Microorganism abundance was significantly ($p < 0.001$) higher in September 2009 than for the 3 other sampling dates, and was higher in Msm-TD soil compared to other treatments. Abundance and diversity of fungi was significantly ($P < 0.001$) lower in bare soils (BS and BSt) compared to treatments with growing vegetation. Most microbial activity levels were significantly higher in planted soils (SV, Ms and Msm) compared to Msm-TD and bare soils (BS, BSt). Over time, activity levels were variable, with some increasing with time (FDase, arylamidase, urease) and some higher in September than in April (respiration, cellulase, acid and alkaline phosphomonoesterase). There was no significant difference with time and treatment for microfauna indicators except for amoeba, the most abundant protozoan group. Amoeba abundance was lower in Msm-TD soil, while the abundance of nematodes was higher in this treatment compared to other treatments. Mesofauna indicators were more abundant in April 2009. Microarthropods were significantly more abundant in SV and Msm-TD soils, while bare soil (BS and BSt) had a significant negative effect on their density.

3.2. Multivariate analyses

PRC calculated for microbiological data is presented in Fig. 1. The difference among sampling dates accounted for 41.1% of total variance; the treatment effect accounted for 36.3%. The first and second axes (Fig. 1A and B) explained 39.9% and 20.9% of variance captured by the treatment effect, respectively. The first axis distinguished planted contaminated soil treatments (SV, Ms and Msm) from bare soils (BS and BSt). At all sampling dates, microbial indicators of tilled bare soil treatment (BSt) were similar to control treatment (BS). Planted contaminated soil treatments (Ms, Msm and SV except for April 2009) were associated with high enzymatic activities (bioindicator weight of arylsulfatase: 1.89; acid phosphatase: 1.70; lipase: 1.49; alkaline phosphatase: 1.21; and arylamidase: 1.02) and a high abundance and Shannon diversity index for fungi (bioindicator weight of 0.52 and 0.73, respectively). The Msm-TD soil showed greater variability through time than other treatments. In April 2008, September 2008 and September 2009, Msm-TD soil was similar to bare soils (BS

and BSt), whereas in April 2009, it resembled planted contaminated soil treatments (SV, Ms and Msm). The second canonical axis of the PRC (Fig. 1B) for all sampling dates distinguished contaminated NM soil treatments from thermally desorbed soil treatment (Msm-TD). The Msm-TD treatment was associated with high microbial abundance and diversity (bioindicator weight of fungi abundance: 1.48, PAH-degrading Gram-positive bacteria: 1.40; bacteria abundance: 1.33; Shannon diversity index for fungi: 1.24) and low lipase activity (bioindicator weight of -2.04). This axis also highlighted a time effect in that all NM treatments tended, with time, to resemble the control BS. For all canonical axes, the results of Monte Carlo's test of significance showed a significant treatment effect ($p < 0.01$). Comparisons between treatments throughout the study are presented in Table 4. Significant differences ($p < 0.05$) were found between bare soils (BS and BSt) and *M. sativa*-planted contaminated soil treatments (Ms and Msm). Msm-TD was significantly different from all other treatments ($p < 0.05$).

PRC calculated for the fauna data set is presented in Fig. 2. The difference between sampling dates accounted for 21.7% of total variance; the treatment effect accounted for 31.3%. The first and second axes (Fig. 2A and B) explained 35.1% and 15.6% of the variance captured by the treatment effect, respectively. The first axis showed three groups of treatment: *M. sativa*-planted contaminated soil treatments (Ms and Msm), bare soils (BS and BSt) and two other treatments (SV and Msm-TD). SV and Msm-TD were associated with a high abundance of fauna (bioindicator weight of nematodes: 2.34, Gamasidae: 1.92, "other microarthropods": 1.55, Oribatidae: 1.30 and several Collembola species, including *Parisotoma notabilis*, *Pseudosinella sexoculata*, *Lepidocyrtus cyaneus*, *Mesaphorura* sp. and *Protaphorura* gr. *armata* with bioindicator weights from: 1.16 to 1.65). The second canonical axis of the PRC (Fig. 2B) showed fluctuation between sampling dates, but identified differences between Msm-TD and SV soil treatments. Msm-TD was associated with some microarthropods (bioindicator weight of *P. armata*: -2.12 , *Sminturin* *elegans*: -1.31 , and Acarididae: -1.62) for April 2009. SV was associated with other microarthropods (bioindicator weight of *Lepidocyrtus lignorum*: 2.67; *Isotoma* sp.: 2.33; *Lepidocyrtus* sp.: 1.38; and Oribatidae: 1.08) for September 2008. The results of Monte Carlo's test of significance performed on all canonical axes showed a significant treatment effect ($p < 0.01$). Comparisons between treatments throughout the study are presented in Table 4. All treatments were significantly different ($p < 0.05$) except for *M. sativa*-planted contaminated soil treatments (Ms and Msm) and Msm compared to BS.

PRC calculated for the global data set is presented in Fig. 3. The difference between sampling dates accounted for 35.5% of total variance; the treatment effect accounted for 37.1%. The first and second axes (Fig. 3A and B) explained 33.9% and 23.2% of variance captured by the treatment effect, respectively. The first axis distinguished vegetation treatments (SV, Ms, Msm, Msm-TD) from bare soils (BS, BSt). Vegetation treatments were associated with high fauna abundance

Table 3

Bioindicator levels for the 6 treatments studied and the 4 sampling dates.

				BS	BS	BS	BS	BSt	BSt	BSt	BSt	SV	SV	SV	SV
				April 2008	Sept. 2008	April 2009	Sept. 2009	April 2008	Sept. 2008	April 2009	Sept. 2009	April 2008	Sept. 2008	April 2009	Sept. 2009
Micro-organisms	Abundance	Bacteria	(16S rRNA gene copies $\times 10^6$ /g soil)	157	136	886	2184	195	177	706	2159	211	258	429	2588
		Fungi	(18S rRNA gene copies $\times 10^6$ /g soil)	2	1	4	22	1	1	5	12	6	4	7	28
	Shannon diversity index	Bacteria		2.96	3.01	2.77	2.62	3.16	3.01	2.56	2.71	3.03	2.98	2.69	2.31
		Fungi		2.11	1.76	1.65	1.77	1.80	1.65	1.92	1.96	2.18	2.57	1.85	2.07
	Activities	Respiration	(mgO ₂ /g soil/d)	0.13	0.31	0.13	0.40	0.15	0.41	0.15	0.47	0.15	0.17	0.20	0.19
		FDase	(mU/g soil)	3.6	6.1	22.6	22.2	3.0	16.1	16.5	15.2	3.5	21.9	20.2	26.5
		Arylamidase	(mU/g soil)	0.73	0.65	0.71	2.92	0.64	0.76	0.64	2.07	0.96	0.92	1.28	4.74
		Arylsulfatase	(mU/g soil)	0.26	0.08	0.15	0.06	0.02	0.10	0.16	0.05	0.39	0.43	0.33	0.19
		Cellulase	(mU/g soil)	2.0	3.8	0.7	5.2	2.6	3.0	0.6	1.7	1.6	5.6	0.9	8.2
		Lipase	(mU/g soil)	3.9	4.5	2.1	2.9	4.0	2.1	2.9	2.8	2.0	4.5	2.7	3.7
		Acid phosphomonoesterase	(mU/g soil)	2.2	4.9	3.8	5.2	2.5	4.2	3.1	4.3	2.7	5.4	44	6.2
		Alkaline phosphomonoesterase	(mU/g soil)	3.4	7.3	5.4	6.0	3.2	5.6	3.9	5.7	4.6	7.2	5.7	6.6
		Urease	(mU/g soil)	10.8	15.5	18.2	15.9	9.9	12.9	16.0	11.5	9.1	18.7	23.7	22.3
		Flagellates	(ng/g soil)	32	9	44	34	32	29	28	28	45	60	42	61
		Amoeba	(ng/g soil)	10433	1631	1048	471	2790	1425	1132	456	4964	1736	342	3639
		Ciliates	(ng/g soil)	32	9	44	34	32	29	28	28	45	60	42	61
Micro-fauna	Protozoa		(Abundance/g soil)	0.35	0.27	0.24	0.50	1.79	1.86	0.27	0.50	4.95	4.67	3.51	7.95
				8519	3921	35462	2594	1710	766	8136	1503	10435	14885	25999	14562
Meso-fauna	Nematodes		(Abundance/m ²)	2152	0	1091	0	295	88	383	29	1592	1233	2447	177
				5188	560	4510	1444	2093	619	2800	177	28593	14709	44393	11172
	Collembola	Epi-edaphic	(Abundance/m ²)	3095	2565	2299	737	2004	1268	1887	383	13000	5159	10700	3921
		Hemi-edaphic	(Abundance/m ²)	10435	3125	7900	2181	4392	1975	5070	590	43185	21106	57540	15269
		Eu-edaphic	(Abundance/m ²)	19396	8342	43656	4923	6367	2771	13707	2211	54652	37584	85485	31394
		Total collembola	(Abundance/m ²)												
	Total														
		micro-arthropods													

^a groups from two-way analysis of variance ANOVA ($p < 0.001$) and pair-wise multiple comparison test (Newman-Keuls).

(bioindicator weight of nematodes: -2.17 ; Gamasidae: -1.70 ; “other microarthropods”: -1.48 ; Oribatidae: -1.40 ; hemi-edaphic Collembola: -1.04), microbial enzymatic activities (bioindicator weight of arylsulfatase: -1.48 ; alkaline and acid phosphatase: -1.28 ; arylamidase: -1.21) and fungi abundance (bioindicator weight of -1.13). The second canonical axis of the PRC (Fig. 3B), for all sampling dates, distinguished contaminated NM soil treatments from thermally desorbed soil treatment (Msm-TD). Msm-TD treatment was associated with high fauna abundance (bioindicator weight of Acaridida: 1.62, nematodes: 1.10, and eu-edaphic Collembola: 0.94). In contrast, vegetation treatments were associated with high enzymatic activities (bioindicator weight of lipase: -2.70 ; acid phosphatase: -1.74 ; arylsulfatase: -1.71 ; urease: -1.11 ; and cellulase: -1.01). The results of Monte Carlo's test of significance performed on all canonical axes showed a significant treatment effect ($p < 0.01$). Comparisons between treatments throughout the study are presented in Table 4. All treatments were significantly different ($p < 0.05$) except for *M. sativa*-planted contaminated soil treatments (Ms and Msm).

4. Discussion

Our study highlights the value of using a range of complementary bioindicators (assessing diversity and functions) to evaluate the influence of vegetation and tillage and to distinguished polluted from thermal-desorption-treated soils. The fluctuation in the abundance of organisms (Table 3) did not drastically influence the treatment effect; indeed, using PRC analyses, differences between treatments did not appear

to vary much over time even when vegetation fluctuated and the PAH concentration decreased from April 2008 to September 2009 (Table 1). In the current study, plant influence was assessed by comparison between bare soil (BS) and planted contaminated soils (SV, Ms, and Msm), while the effect of tillage was assessed by comparison between BS and BSt and that of thermal desorption treatment was assessed by comparison between Msm and Msm-TD.

Vegetation appeared to be the major factor in discriminating between soil treatments. Indeed, vegetation consistently appeared on the first axis of the PRCs. Plants had an influence on all organisms examined in our study at all trophic levels. Plant organic matter has been shown to increase the abundance of fungi and enzymatic activities (Smith et al., 2008; Palmroth et al., 2007). As the resources for saprotrophic fauna increased, a higher abundance of nematodes, Oribatidae and Collembola was observed. Finally, predatory mites or Gamasidae were consistently increased. Our results confirmed models proposed concerning trophic patterns in the soil (Moore et al., 2005). Arylsulfatases, acid and alkaline phosphatases and lipases, with their higher bioindicator weight values, indicated that the most microbiologically active soils were Ms, Msm and SV. Regulation of enzyme production by microorganisms is strongly related to the richness, availability and quality of organic matter (OM) as well as mineral nutrient (N, P, K and S) content of soil (Alarcón-Gutiérrez et al., 2009; Criquet and Braud, 2008). Moreover, soils with vegetation were more abundantly enriched with easily degradable OMs originating from plant exudates, litter and root decay, explaining the greater abundance of fungi and enzyme

Ms	Ms	Ms	Ms	Msm	Msm	Msm	Msm	Msm-TD	Msm-TD	Msm-TD	Msm-TD	Effect of sampling date ^a				Effect of treatment ^a					
												April 2008	Sept. 2008	April 2009	Sept. 2009	BS	BSt	SV	Ms	Msm	Msm-TD
464	596	716	4393	860	186	1108	7964	907	548	2685	12760	B	B	B	A	C	C	C	C	B	A
31	5	10	62	8	2	14	82	41	2	38	165	B	B	B	A	CD	D	C	B	B	A
3.00	3.18	2.76	2.07	2.88	3.04	2.91	2.87	3.00	3.04	3.00	3.01	A	A	B	C	A	A	A	A	A	A
2.10	2.19	2.20	1.73	2.11	2.27	2.17	1.80	2.02	2.43	2.28	2.05	AB	A	AB	B	B	B	A	A	A	A
0.32	0.50	0.20	0.35	0.34	0.53	0.19	0.27	0.26	0.17	0.26	0.24	B	A	B	A	B	A	C	A	A	B
7.3	20.7	21.9	15.7	5.7	19.1	23.0	19.3	2.2	7.5	12.1	17.9	C	B	A	A	B	B	A	A	A	C
1.27	1.36	1.51	4.01	1.98	1.62	2.03	3.93	0.71	1.15	1.94	3.98	C	C	B	A	C	C	B	B	A	B
0.47	0.23	0.28	0.14	0.33	0.30	0.29	0.15	0.11	0.05	0.15	0.03	A	B	B	C	C	D	A	B	B	D
2.8	4.5	0.8	3.9	1.6	5.3	0.6	6.4	1.1	3.0	0.7	2.0	B	A	C	A	C	D	A	C	B	D
4.6	3.5	4.0	3.9	4.3	5.2	3.2	3.7	1.2	1.7	1.2	1.2	AB	A	B	B	B	B	B	A	A	C
5.1	6.9	5.8	6.0	4.5	7.7	5.5	9.4	1.9	3.8	4.5	4.0	C	A	B	A	CD	D	C	B	A	D
7.0	8.6	6.8	7.1	4.7	8.7	6.5	5.6	3.8	6.8	7.3	6.5	C	A	B	B	B	C	B	A	B	B
10.3	14.3	17.0	27.3	11.0	18.6	18.0	24.4	6.9	11.9	19.0	15.7	C	B	A	A	BC	C	A	AB	A	C
36	39	50	9	8	57	72	69	90	85	47	37	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
3226	1409	2686	498	2520	1756	1287	606	777	979	407	72	A	B	B	B	A	BC	AB	ABC	BC	C
36	39	50	9	8	57	72	69	90	85	47	37	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
4.30	6.52	4.15	4.50	3.61	4.23	2.48	3.11	6.61	8.95	14.48	12.15	A	A	A	A	C	C	B	B	B	A
8077	7812	26735	8313	6043	7812	27915	6750	6603	16390	40119	8342	B	B	A	B	A	B	A	A	A	A
501	118	884	59	737	0	1798	59	413	177	3419	206	B	C	A	C	ABC	C	A	BC	ABC	AB
13471	324	33722	413	8136	560	16537	1356	11673	5542	35756	2240	B	C	A	C	CD	D	A	BC	BCD	B
3301	3979	10730	560	3066	3360	6161	1533	9610	15594	26441	1533	B	B	A	C	C	C	B	C	C	A
17274	4422	45337	1032	11938	3921	24498	2948	21696	21312	65617	3979	B	C	A	C	BC	C	A	B	BC	A
28210	12557	74667	9698	19838	12410	54917	9846	31571	39205	116201	12734	B	BC	A	C	BC	C	A	B	B	A

activities (de Boer et al., 2005). Concerning Collembola, the increase was mainly observed in epi- and hemi-edaphic species. This is not surprising, as these Collembola benefit from the presence of litter (Gisin, 1943). It is interesting to note that spontaneous vegetation (SV) differed from *M. sativa*-planted soils (Ms and Msm) by harboring more micro-arthropods, especially epi-edaphic species like *Isotoma* sp. In contrast to spontaneous vegetation, *M. sativa* was harvested each year, leading to less organic matter in the soil and disruption of vegetation cover, which has been shown to decrease epi-edaphic Collembola (Gillet and Ponge, 2003). Moreover, PRCs showing fauna data identified differences between BSt and BS; fewer Gamasidae and nematodes were observed after soil tillage. These results confirm the notion that fauna is sensitive to physical disturbances in soil, such as during agricultural practices (Cortet et al., 2002, 2007). No difference between Ms and Msm was observed. We previously showed that mycorrhizal colonization of *M. sativa* roots with the two inoculated *Glomus* strains was very low (Ouvrard et al., in press), which could be due to soil toxicity with the combination of PAH and heavy metals (Leyval and Binet, 1998; Leyval et al., 1997) and possibly to high sulfate concentrations.

TD treatment appeared to be the second major factor in identifying differences in soil treatment on the second axis of the PRCs. Although this technique is among the most efficient methods for removing organic pollutants and is commonly used for PAH remediation, the long-term evolution of TD-treated soils has never been examined, especially regarding biological function. Little information on restoration

of biological diversity and function in this type of soil, considered to be an extreme environment, is available. In a previous study, we observed that during the first two years after TD treatment, the bacterial community of the TD soil re-colonized and diversified and the main bacterial representatives closely resembled bacteria detected in extreme environments (i.e. characterized by high pollution, low pH, high salinity, low nutrient availability; Cébron et al., 2009). Similarly, our results show that despite strong physical and chemical modifications (increased pH level, decreased nitrogen content and higher C/N ratio), biological communities (various trophic levels) re-colonized TD soil after more than two years on the site. Indeed, increases in bacteria, Gram-positive PAH-degrader abundance, fungi abundance and diversity were observed in the TD soil. Lower PAH concentrations might favor development of fungi (Blakely et al., 2002). Moreover, thermally desorbed soils as well as post-fire soils are known to be enriched in condensed and recalcitrant organic matter (González-Pérez et al., 2004; Biache et al., 2008). Changes in composition of organic matter and nitrogen limitation could favor fungal growth and colonization (Strickland and Rousk, 2010; Hong et al., 2010). Moreover, fungi and Actinobacteria (e.g., Gram-positive PAH degraders) are favored by vegetation (Smith et al., 2008; Cébron et al., 2009) and are commonly found in extreme environments, such as dry volcanic soils or deserts (Costello et al., 2009; Connon et al., 2007). Extreme soil environments and hostile conditions select for organisms with ecological strategies for survival under harsh conditions, such as dessication, freeze-thaw, UV resistance, and resting spore formation (Ensign,

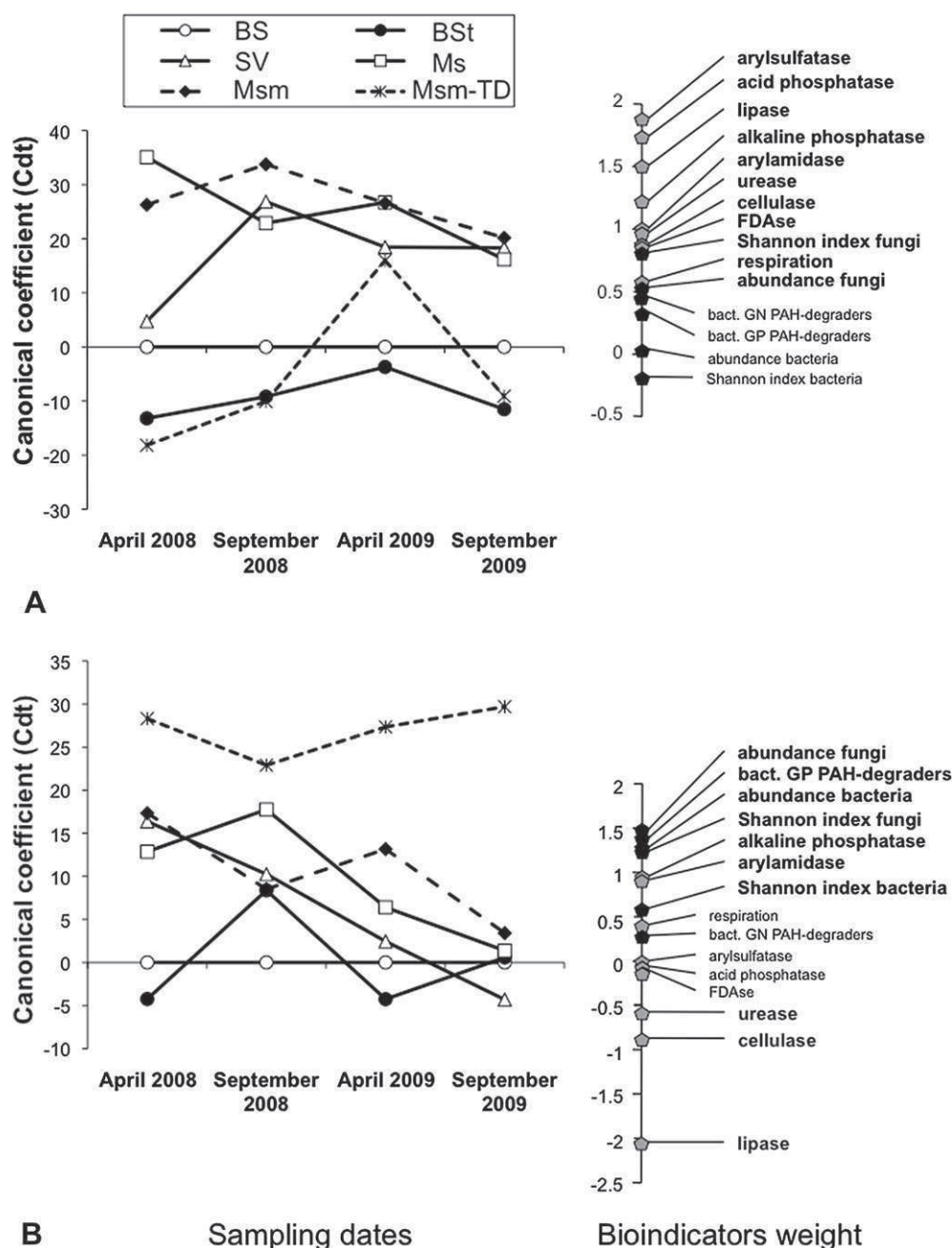


Fig. 1. Principal response curve (PRC) for the microbial data set (activities, abundance and diversity index). The first (A) and second (B) axes indicate differences between plot treatments. The lines represent the course of treatment over time. Values deviating from the reference value of 0 (BS control treatment) indicate treatment effects. The bioindicator weight can be interpreted as the affinity of the taxon with the principal response curves. Only species with a weight of 0.5 or higher and -0.5 or lower are considered significant indicators (bold type).

1978; Hong et al., 2010), and molecular techniques cannot distinguish spores from active cells. In our study, most of the enzymatic activities were decreased in Msm-TD compared to the contaminated soil, Msm. As soil enzyme activities are a direct response by the soil community to metabolic requirements and environmental stress (Caldwell, 2005), these data highlight the poor nutrient availability, physical disturbance and the particular organic matter composition and reactivity of TD soil. Lipase activity was especially low in TD soil. Such C-acquiring enzymes are known to be stimulated by

the availability of their own substrates (e.g. aliphatic carbon; Alarcón-Gutiérrez et al. 2009). On this point, Biache et al. (2008) demonstrated that the TD process strongly reduces the content of aliphatic C of soil, a decrease which may explain the lower lipase activity measured in TD soil. Concerning fauna, TD led to an increase in eu-edaphic Collembola species known to be sensitive to the presence of organic pollutants but tolerant to the presence of heavy metals, as previously shown for the species *P. armata* (Gillet and Ponge, 2003). Furthermore, the TD process induced an increase in pH

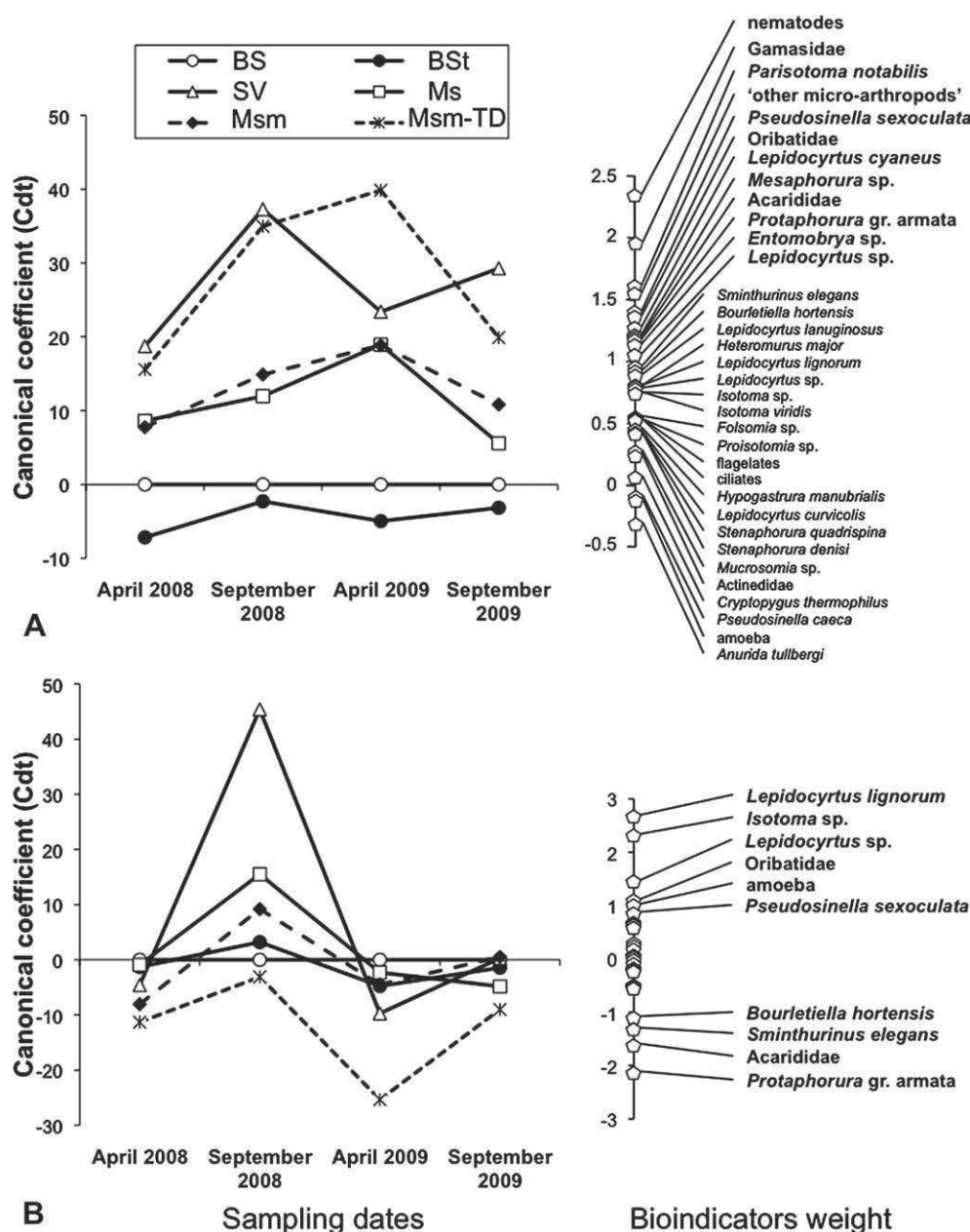


Fig. 2. PRC first (A) and second (B) axes for the micro- and mesofauna data set indicating differences between treatments. The lines represent the course of treatment over time. Values deviating from the reference value of 0 (BS control plots) indicate treatment effects. The bioindicator weight can be interpreted as the affinity of the taxon with the principal response curves. Only species with a weight of 1.0 or higher and -1.0 or lower are highlighted (bold type).

levels that may have modified the communities (Garnier and Ponge, 2004), and lower PAH content could explain increases in Acarididae and nematode abundance.

We used a number of bioindicator tests, including abundance, diversity and functional parameters. The principal response curve (PRC) technique had the advantage of multivariate analysis constrained by the evolution of treatments compared to a control over time. This statistical treatment is powerful and well-suited to compare bioindicator data. This type of analysis demonstrated that, depending on the observed treatment effects (vegetation or TD), the response of each bioindicator could differ. When considering the effect of vegetation, all trophic levels responded in a similar manner;

abundance of organisms and activities increased with the presence of vegetation, indicating redundancy when using all bioindicators together. For micro- and mesofauna development, the most important parameter is the food resource. Thus, abundance of fauna mainly depends on fungal and bacterial biomass and not on microbial diversity or community structure. This basic knowledge about the food web explains the redundancy among bioindicators referring to organism abundances. In contrast, when studying the effects of TD, various bioindicators appeared to be complementary because of contradictory responses (e.g. the high abundance and diversity of microorganisms was not linked to their low activity levels). A more in-depth characterization of phylogenetic diversity of

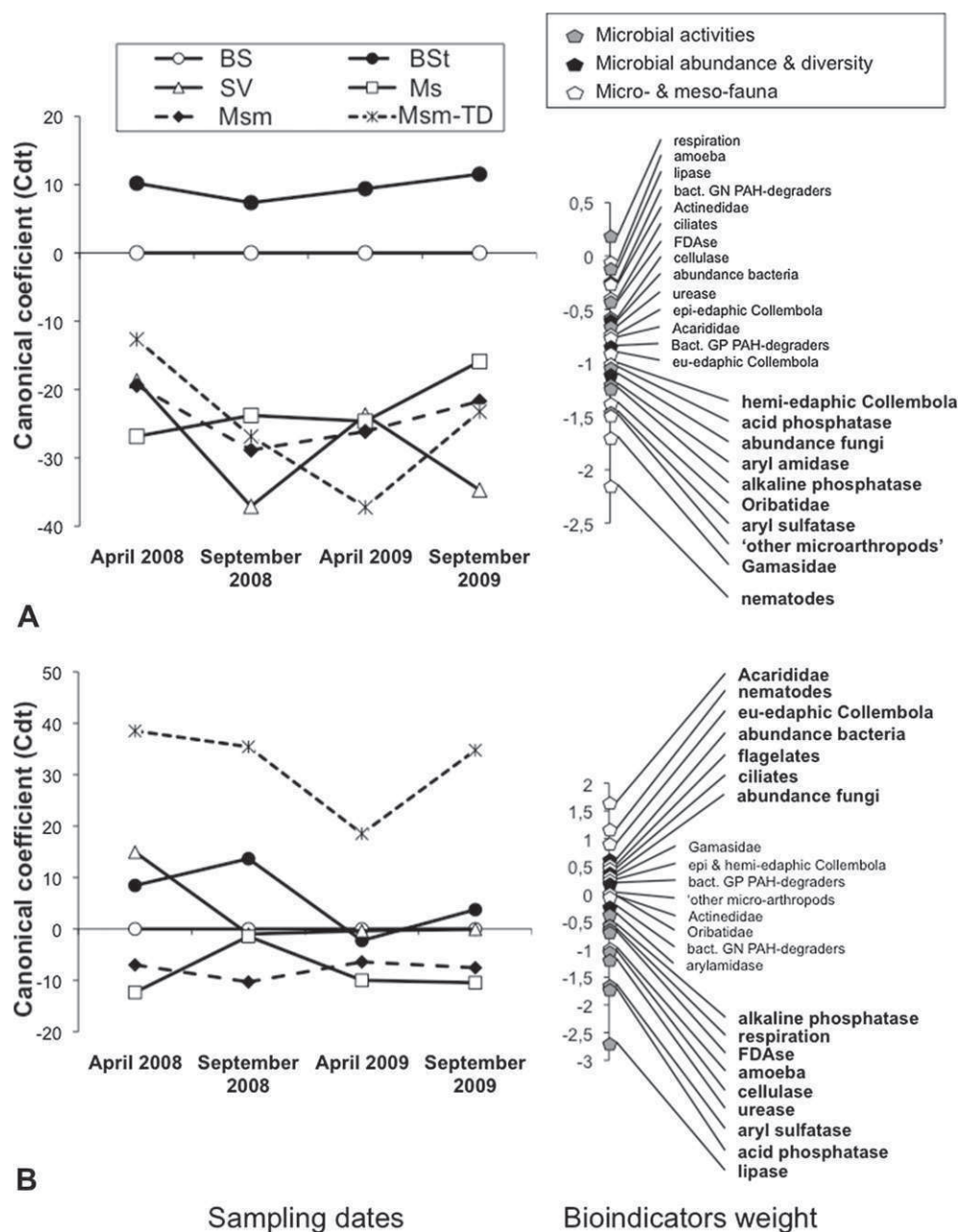


Fig. 3. PRC for all indicators studied (microbial data, except for the Shannon diversity index, and micro- and mesofauna data with Collembola grouped into three ecomorphological groups). The first (A) and second (B) axes indicate differences between plot treatments. The three ecomorphological groups of Collembola are the following: 1) epi-edaphic (*Entomobrya* sp., *Bourletiella hortensis*, *Isotoma* sp., *Isotoma viridis*), 2) hemi-edaphic (*Anurida tullbergi*, *Cryptopygus thermophilus*, *Folsomia* sp., *Heteromurus major*, *Hypogastrura manubrialis*, *Lepidocyrtus cyaneus*, *Lepidocyrtus lanuginosus*, *Lepidocyrtus lignorum*, *Lepidocyrtus curvicolis*, *Lepidocyrtus* sp., *Mucrosomia* sp., *Proisotoma minuta*, *Pseudosinella sexoculata*, *Pseudosinella caeca*, *Sminthurinus elegans*) and 3) eu-edaphic (*Mesaphorura* sp., *Protaphorura armata* group, *Stenaphorura denisi*, *Stenaphorura quadrispina*). The lines represent the course of treatment over time. Values deviating from the reference value of 0 (BS control plots) indicate treatment effects. The bioindicator weight can be interpreted as the affinity of the taxon with the principal response curves. Only species with a weight of 0.5 or higher and -0.5 or lower are considered significant indicators (bold type).

microorganisms (Buée et al., 2009) and their metabolic profiles (i.e. BIOLOG; Garland and Mills, 1991) would probably help to understand the functions and physiology of the microbial community. Activity levels directly depend on the functional diversity of microorganisms, but not necessarily on the phylogenetic diversity assessed here through molecular fingerprinting. Microorganisms were present but not active, indicating a narrow range of functions represented in the community (high functional redundancy or high specificity).

This could be due to specific and highly selective environmental conditions that differ from natural soil and, as a consequence, traditionally studied functions are not the best indicators for highly anthropogenic soils. Due to the special status of the soil after the TD remediation process, lipase activity could be an interesting bioindicator complementary to microorganism abundance, as explained above. It is thus important in this type of study to consider both diversity and functional bioindicators, since the ecology of anthropized soils

Table 4

Results of the Monte Carlo test of significance for all canonical axes.

	BS	BSt	SV	Ms	Msm	Msm-TD
Microbiological data	a	a	ab	bc	c	d
Micro- and meso- fauna data	a	b	c	d	ad	e
Global data	a	b	c	d	d	e

Significant treatment effects ($p < 0.01$) are shown and comparisons between treatments throughout the study were performed separately for the three PRC data sets (microbiological, micro- and mesofauna, and overall). Different letters between treatments indicate significant differences ($p < 0.05$).

is not well understood and the relationship between diversity and function is not as clear as in natural soils (Naeem et al., 2002; O'Donnell et al. 2001). Alternatively, we observed that the response of some parameters (e.g., protozoa, respiration and FDase activities) were less discriminative compared to others (e.g., nematodes, enzymatic activities, fungi and microarthropods). Furthermore, our study pointed out that the ecomorphological classification of Collembola could give patterns similar to those of classical Linnean species identification, suggesting that the life-trait-based classification of micro-arthropods is a very promising method for exploring data. Finally, it is essential to carry out a number of analyses, including organisms at several trophic levels, and structural and functional parameters.

Acknowledgements

We thank Sandra Caul from the SCRI, Dundee (UK) for microfauna (protozoa and nematode) analysis. This study was supported by the INSU-EC2CO-MicrobiEn program and the GISFI (www.gisfi.fr).

References

- Acosta-Martínez, V., Tabatabai, M.A., 2000. Arylamidase activity of soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 215–221.
- Alarcón-Gutiérrez, E., Floch, C., Augur, C., Le Petit, J., Ziarelli, F., Criquet, S., 2009. Spatial variations of chemical composition, microbial functional diversity, and enzyme activities in a Mediterranean litter (*Quercus ilex* L.) profile. *Pedobiologia* 52, 387–399.
- Alarcón-Gutiérrez, E., Floch, C., Ruadel, F., Criquet, S., 2008. Non-enzymatic hydrolysis of fluorescein diacetate (FDA) in a Mediterranean oak (*Quercus ilex* L.) litter. *Eur. J. Soil Sci.* 59, 139–146.
- Biache, C., Mansuy-Huault, L., Faure, P., Munier-Lamy, C., Leyval, C., 2008. Effects of thermal desorption on the composition of coking plant soils: impact on solvent extractable organic compounds and metal bioavailability. *Environ. Pollut.* 156, 671–677.
- Bispo, A., Cluzeau, D., Creamer, R., Dombos, M., Graefe, U., Krogh, P.H., Sousa, J.P., Peres, G., Rutgers, M., Winding, A., Römbke, J., 2010. Indicators for monitoring soil biodiversity. *Integrated Environ. Assess. Manag.* 5, 717–719.
- Blakely, J.K., Neher, D.A., Spongberg, A.L., 2002. Soil invertebrate and microbial communities, and decomposition as indicators of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination. *Appl. Soil Ecol.* 21, 71–88.
- Bonkowski, M., Villenave, C., Griffiths, B., 2009. Rhizosphere fauna: the functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. *Plant Soil* 321, 213–233.
- Bretfeld, G., 1999. Synopses on Palearctic Collembola. *Symphyleona*. Staatliches Museum für Naturkunde Görlitz.

- Brown, D.J.F., Boag, B., 1988. An examination of methods used to extract virus-vector nematodes (Nematoda: Longidoridae and Trichodoridae) from soil samples. *Nematol. Medit* 16, 93–99.
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S., Martin, F., 2009. 454 Pyrosequencing analyses of forest soils reveal an unexpectedly high fungal diversity. *New Phytol.* 184, 449–456.
- Cébron, A., Norini, M.P., Beguiristain, T., Leyval, C., 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J. Microbiol. Methods* 73, 148–159.
- Cébron, A., Beguiristain, T., Faure, P., Norini, M.P., Masfaraud, J.F., Leyval, C., 2009. Influence of vegetation on the in situ bacterial community and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degraders in aged PAH-contaminated or thermal-desorption-treated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6322–6330.
- Caldwell, B.A., 2005. Enzyme activities as a component of soil biodiversity: a review. *Pedobiologia* 49, 637–644.
- Cerniglia, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3, 351–368.
- Cortet, J., Gomot de Vaulery, A., Poinot-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., Cluzeau, D., 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *Eur. J. Soil Biol.* 35, 115–134.
- Cortet, J., Ronce, D., Poinot-Balaguer, N., Beaufreton, C., Chabert, A., Viaux, P., Cancela da Fonseca, J.P., 2002. Impacts of different agricultural practices on the biodiversity of microarthropod communities in arable crop systems. *Eur. J. Soil Biol.* 38, 239–244.
- Connon, S.A., Lester, E.D., Shafaat, H.S., Obenhuber, D.C., Ponce, A., 2007. Bacterial diversity in hyperarid atacama desert soils. *J. Geophys. Res. G: Biogeosciences*, 112 (4), G04S17.
- Cortet, J., Griffiths, B.S., Bohanec, M., Damsar, D., Andersen, M.N., Caul, S., Birch, E., Pernin, C., Tabone, E., de Vaulleury, A., Ke, X., Henning Krogh, P., 2007. Evaluation of effects of transgenic Bt maize on microarthropods in a European multi-site experiment. *Pedobiologia* 51, 207–218.
- Costello, E.K., Halloy, S.R.P., Reed, S.C., Sowell, P., Schmidt, S.K., 2009. Fumarole-supported islands of biodiversity within a hyperarid, high-elevation landscape on socompa volcano, puna de atacama, andes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 735–747.
- Criquet, S., Braud, A., 2008. Effects of organic and mineral amendments on available P and phosphatase activities in a degraded Mediterranean soil under short-term incubation experiment. *Soil Till. Res.* 98, 164–174.
- Darbyshire, J.F., Wheatley, R.E., Greaves, M.P., Inkson, R.H.E., 1974. A rapid method for estimating bacterial and protozoan populations in soil. *Rev. Ecol. Biol. Sol* 11, 465–474.
- Dawson, J.J.C., Godsiffe, E.J., Thompson, I.P., Ralebitso-Senior, T.K., Killham, K.S., Paton, G.I., 2007. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. *Soil Biol. Biochem.* 39, 164–177.
- de Boer, W., Folman, L.B., Summerbell, R.C., Boddy, L., 2005. Living in a fungal world: impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 795–811.
- Deng, S.P., Tabatabai, M.A., 1994. Cellulase activity of soils. *Soil Biol. Biochem.* 26, 1347–1354.
- Doran, J.W., Stamatiadis, S.I., Haberern, J., 2002. Soil health as an indicator of sustainable management. *Agric. Ecosys. Environ.* 88, 107–110.
- Ensign, J.C., 1978. Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annu. Rev. Microbiol.* 32, 185–219.
- Felske, A., Akkermans, A.D.L., De Vos, W.M., 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4581–4587.
- Floch, C., Capowiez, Y., Criquet, S., 2009. Enzyme activities in apple orchard agroecosystems: how are they affected by management strategy and soil properties. *Soil Biol. Biochem.* 41, 61–68.
- Frampton, G.K., Van Den Brink, P.J., Gould, P.J.L., 2000. Effects of spring precipitation on a temperate arable collembolan community analysed using principal response curves. *Appl. Soil Ecol.* 14, 231–248.
- Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2351–2359.

- Garnier, S., Ponge, J.F., 2004. Acid-tolerant Collembola cannot colonize metal-polluted soils at neutral pH. *Appl. Soil Ecol.* 26, 201–208.
- Gil-Sotres, F., Trasar-Cepeda, C., Leirós, M.C., Seoane, S., 2005. Different approaches to evaluating soil quality using biochemical properties. *Soil Biol. Biochem.* 37, 877–887.
- Gillet, S., Ponge, J.-F., 2003. Changes in species assemblages and diets of Collembola along a gradient of metal pollution. *Appl. Soil Ecol.* 22, 127–138.
- Gisin, H., 1943. Ökologie und Lebensgemeinschaften der Collembolen im Schweizerischen Exkursionsgebiet Basels. *Revue Suisse de Zoologie* 50, 131–224.
- Gisin, H., 1960. Collembolen Fauna Europas. *Museum d'Histoire Naturelle*, Genève.
- González-Pérez, J.A., González-Vila, F.J., Almendros, G., Knicker, H., 2004. The effect of fire on soil organic matter - a review. *Environ. Int.* 30, 855–870.
- Green, V.S., Stott, D.E., Diack, M., 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: optimization for soil samples. *Soil Biol. Biochem.* 38, 693–701.
- Griffiths, B.S., Caul, S., 1993. Migration of bacterial-feeding nematodes, but not protozoa, to decomposing grass residues. *Biol. Fertil. Soils* 15, 201–207.
- Griffiths, B.S., Caul, S., Thompson, J., Scrimgeour, C., Andersen, M.N., Cortet, J., Messean, A., Sausse, C., Lacroix, B., Krogh, P.H., 2005. A comparison of soil microbial community structure, protozoa and nematodes in field plots of conventional and genetically modified maize expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Plant and Soil* 275, 135–146.
- Gupta, N., Rath, P., Gupta, R., 2002. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Anal. Biochem.* 311, 98–99.
- Hong, J.W., Fomina, M., Gadd, G.M., 2010. F-RISA fungal clones as potential bioindicators of organic and metal contamination in soil. *J. Appl. Microbiol.* 109, 415–430.
- Joner, E.J., Leyval, C., 2003. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2371–2375.
- Kandeler, E., Gerber, H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 6, 68–72.
- Kennedy, A.C., Smith, K.L., 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil* 170, 75–86.
- Krantz, G.W., 1978. *A Manual of Acarology*. Oregon State University Book Stores, Inc, Corvallis.
- Leyval, C., Binet, P., 1998. Effect of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) in soil on arbuscular mycorrhizal plants. *J. Environ. Qual.* 25, 212–219.
- Leyval, C., Turnau, K., Haselwandter, K., 1997. Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* 7, 139–153.
- Lueders, T., Wagner, B., Claus, P., Friedrich, M.W., 2004. Stable isotope probing of rRNA and DNA reveals a dynamic methylotroph community and trophic interactions with fungi and protozoa in oxic rice field soil. *Environ. Microbiol.* 6, 60–72.
- Moore, J.C., Hunt, H.W., 1988. Resource compartmentation and the stability of real ecosystems. *Nature* 333, 261–263.
- Moore, J.C., McCann, K., de Ruiter, P.C., 2005. Modeling trophic pathways, nutrient cycling, and dynamic stability in soils. *Pedobiologia* 49, 499–510.
- Naeem, S., Loreau, M., Inchausti, P., 2002. In: Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P. (Eds.), *Biodiversity and Ecosystem Functioning: The Emergence of a Synthetic Ecological Framework. Biodiversity and Ecosystem Functioning. Synthesis and Perspectives*. Oxford University Press, Oxford, pp. 3–11 (Chapter 1).
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *Eur. J. Soil Sci.* 54, 655–670.
- Neher, D.A., 1999. Soil community composition and ecosystem processes. Comparing agricultural ecosystems with natural ecosystems. *Agroforestry Syst.* 45, 159–185.
- O'Donnell, A.G., Seasman, M., Macrae, A., Waite, I., Davies, J.T., 2001. Plants and fertilizers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant and Soil* 232, 135–145.
- Ouvrard, S., Barnier, C., Bauda, P., Beguiristain, T., Biache, C., Bonnard, M., Caupert, C., Cébron, A., Cortet, J., Cotel, S., Dazy, M., Faure, P., Masfaraud, J.F., Nahmani, J., Palais, F., Poupin, P., Raoult, N., Vasseur, P., Morel, J.L., Leyval, C., In situ assessment of phytotechnologies for multicontaminated soil management. *Int. J. Phytoremed.* in press.
- Page, F.C., 1976. Taxonomic criteria for *Limax* amoebae with descriptions of three new species of *Hartmanella* and three of *Vahlkampfia*. *J. Protozool.* 14, 499–521.
- Palmroth, M.R.T., Koskinen, P.E.P., Kaksonen, A.H., Münster, U., Pichtel, J., 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.
- Pernin, C., Ambrosi, J.-P., Cortet, J., Joffre, R., Le Petit, J., Tabone, E., Torre, F., Krogh, P.H., 2006a. Effects of sewage sludge and copper enrichment on both soil mesofauna community and decomposition of oak leaves (*Quercus suber* L.) in a mesocosm. *Biol. Fertil. Soils* 43, 39–50.
- Pernin, C., Cortet, J., Joffre, R., Le Petit, J., Torre, F., 2006b. Sewage sludge effects on mesofauna and cork oak (*Quercus suber* L.) leaves decomposition in a Mediterranean forest firebreak. *J. Environ. Qual.* 35, 2283–2292.
- Potapov, M., 2001. Synopses on Palearctic Collembola. Isotomidae. Staatliches Museum für Naturkunde Göttingen.
- Rabinovich, M.L., Bolobova, A.V., Vasil'chenko, L.G., 2004. Fungal decomposition of natural aromatic structures and xenobiotics: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 40, 5–23.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., Roskot, N., Heuer, H., Berg, G., 2001. Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4742–4751.
- Smith, R.S., Shiel, R.S., Bardgett, R.D., Millward, D., Corkhill, P., Evans, P., Quirk, H., Hobbs, P.J., Kometa, S.T., 2008. Long-term change in vegetation and soil microbial communities during the phased restoration of traditional meadow grassland. *J. Appl. Ecol.* 45, 670–679.
- Strickland, M.S., Rousk, J., 2010. Considering fungal: bacterial dominance in soils - methods, controls, and ecosystem implications. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1385–1395.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1969. Use of p-nitrophenylphosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol. Biochem.* 1, 301–307.
- Tabatabai, M.A., Bremner, J.M., 1970. Arylsulfatase of soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 34, 225–229.
- Ter Braak, C.J.F., Smilauer, P., 2002. *CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination*. Microcomputer Power, Ithaca, NY, USA, p. 500.
- Timonen, S., Bomberg, M., 2009. Archaea in dry soil environments. *Phytochem. Rev.* 8, 505–518.
- Van den Brink, P.J., Ter Braak, C.J.F., 1998. Multivariate analysis of stress in experimental ecosystems by Principal Response Curves and similarity analysis. *Aquat. Ecol.* 32, 163–178.
- Van den Brink, P.J., 1999. Principal Response Curves: analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 138–148.
- Van den Brink, P.J., den Besten, P.J., bij de Vaate, A., Ter Braak, C.J.F., 2009. Principal response curves technique for the analysis of multivariate biomonitoring time series. *Environ. Monitor. Assess.* 152, 271–281.
- Whitehead, A.G., Hemming, J.R., 1965. A comparison of some quantitative methods of extracting small vermiform nematodes from soil. *Ann. Appl. Biol.* 55, 25–38.
- Wilson, S.C., Jones, K.C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ. Pollut.* 81, 229–249.

IN SITU ASSESSMENT OF PHYTOTECHNOLOGIES FOR MULTICONTAMINATED SOIL MANAGEMENT

S. Ouvrard,¹ C. Barnier,¹ P. Bauda,² T. Beguiristain,³
C. Biache,⁴ M. Bonnard,² C. Caupert,³ A. Cébron,³ J. Cortet,¹ S.
Cotelle,² M. Dazy,² P. Faure,⁴ J. F. Masfaraud,² J. Nahmani,² F.
Palais,² P. Poupin,² N. Raoult,⁵ P. Vasseur,² J. L. Morel,¹
and C. Leyval³

¹Laboratoire Sols et Environnement, Nancy-Université, INRA,
Vandœuvre-lès-Nancy, France

²Laboratoire des Interactions Écotoxicologie, Biodiversité, Écosystèmes,
UMR 7146, Université de Metz, CNRS, Metz, France

³Laboratoire Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les
Sols, UMR 7137, Nancy Université, CNRS, Vandœuvre-lès-Nancy, France

⁴Laboratoire Géologie et Gestion des Ressources Minérales et Energétiques,
Nancy Université, CNRS, Vandœuvre-lès-Nancy, France

⁵Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles,
Vandœuvre-lès-Nancy, France

*Due to human activities, large volumes of soils are contaminated with organic pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons, and very often by metallic pollutants as well. Multipolluted soils are therefore a key concern for remediation. This work presents a long-term evaluation of the fate and environmental impact of the organic and metallic contaminants of an industrially polluted soil under natural and plant-assisted conditions. A field trial was followed for four years according to six treatments in four replicates: unplanted, planted with alfalfa with or without mycorrhizal inoculation, planted with *Nocca caerulea*, naturally colonized by indigenous plants, and thermally treated soil planted with alfalfa. Leaching water volumes and composition, PAH concentrations in soil and solutions, soil fauna and microbial diversity, soil and solution toxicity using standardized bioassays, plant biomass, mycorrhizal colonization, were monitored. Results showed that plant cover alone did not affect total contaminant concentrations in soil. However, it was most efficient in improving the contamination impact on the environment and in increasing the biological diversity. Leaching water quality remained an issue because of its high toxicity shown by micro-algae testing. In this matter, prior treatment of the soil by thermal desorption proved to be the only effective treatment.*

KEY WORDS: field trial, multi-contaminated soil, PAH, phytoremediation, heavy metals

INTRODUCTION

The end of industrial activities based on coal use (e.g., coking or manufactured gas plants) in France in particular has led to thousands of hectares of derelict land. In many

Address correspondence to Stephanie Ouvrard, Laboratoire Sols et Environnement, Nancy-Université, INRA, 2 avenue de la Forêt de Haye, B.P. 172, F-54505 Vandœuvre lès Nancy, France. E-mail: Stephanie.Ouvrard@ensaia.inpl-nancy.fr

cases these are contaminated by organic and/or metallic compounds and represent a threat to both the environment and human health. Among pollutants, PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) are of particular concern given their ubiquity, toxicity and persistence in the environment, due to their high hydrophobicity and low degradability. They are often associated with metallic contaminants (Sandrin and Maier 2003) but these multiple pollution situations have seldom been studied. It is therefore necessary to evaluate their consequences on the environment and human health and try to propose management practices or treatment that may limit their overall negative impact.

The present work describes long-term field experiment to assess the fate of multi-contamination under various management practices, from natural attenuation, as defined by USEPA (1999), to phytoremediation associated or not with thermal desorption. Since both pollutant fate and the environmental impact of the treatments were of interest, a multidisciplinary approach regarding most environmental compartments and organisms was applied. Indeed disciplines such as geochemistry, microbiology, toxicology, and soil science contributed to (1) monitoring pollutants in soil, soil solutions and vegetation; (2) measuring the toxicity of the different media (solid or liquid); (3) evaluating the treatment and pollutant impacts on vegetation development (cultivated or naturally present), soil fauna and microbial functional diversity.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Set-Up

Soil origin and properties. The soil was sampled in October 2004 during reclamation operations of a former industrial site located in the eastern part of France. Coking activities and steel industry had started on this site at the beginning of the 20th century and had ended in 1983. This site had also been used as a dump from 1953 to 1990. In the past 15 years, the slag resulting from previous industrial activities has been exploited.

The soil (NM) was mechanically homogenized and sieved at 8 cm to comply with the desorption unit requirements. A sample of 175 tons was put aside for research purposes. The remaining soil was treated on site by a mobile thermal desorption unit (TD) (Deep Green). The thermal treatment is a treatment process where the soil is heated to 650°C to eliminate the volatile and semi-volatile compounds (de Percin 1995). This has proved particularly efficient for PAH removal and may be used in site reclamation for highly contaminated soils (Costes and Druelle 1997). The original NM soil and 5 tons of the treated material TD were stored on site prior to use in the experimental plots.

Experimental design. An *in situ* field experiment was set up on the experimental site of the French Scientific Interest Group – Industrial Wasteland (GISFI) (<http://www.gisfi.fr>), Homécourt (49°21367N, 5°99608E), north-eastern France, in June 2005. The climate is continental with a mean rainfall of 760 mm year⁻¹ and a mean temperature of 10°C (extreme values: -21.6°C to 37.6°C). Twenty-four stainless steel lysimeter plots (2 × 3 m wide and 0.7 m deep) were installed on the ground and individually equipped with leaching water collection systems consisting in a drain connected to stainless steel tanks (0.4 × 0.48 m wide and 0.6 m deep). The entire device was buried to limit boundary effect. Each plot from bottom to top consisted of 30 cm gravel, a geotextile membrane and 40 cm of soil. Twenty plots were filled with the untreated soil (NM) and four of them with the thermally treated one (TD).

Treatments. Six treatments corresponding to different management practices of the soil were conducted in four replicates in a fully randomized way. The four plots containing the thermally treated soil (TD) were planted with *Medicago sativa* (alfalfa) and inoculated with mycorrhizal. The five treatments of the untreated soil NM were a control or bare soil (BS), a naturally colonized treatment with spontaneous vegetation (SV) and three cultivated with *Noccaea caerulea* (formerly *Thlaspi caerulea*) (NC), *Medicago sativa* (MS), and *Medicago sativa* with a mycorrhizal inoculate (MSm). Mycorrhizal inoculation was performed twice on TD and MSm plots, the first time with *Glomus intraradices* fungus in September 2005 and the second in March 2008 with two fungi to improve mycorrhizal colonization chances: *Glomus intraradices* and *Glomus mosseae* (Redon et al. 2009). Previous studies have shown that alfalfa is a good candidate for phytoremediation of organics (Wiltse et al. 1998; Fan et al. 2008). It is a perennial, high-quality, adaptable, forage crop grown throughout the world. It has an extensive, widely branched root system providing a large root surface for the growth of microbial populations. Furthermore, alfalfa is one of the legumes which is nitrogen independent and that is an important factor in contaminated soils often characterized by a high C/N ratio. *Noccaea caerulea* is a metal tolerant hyperaccumulator plant that has proved most efficient in cadmium and zinc hyperaccumulation (Brown et al. 1994; Schwartz et al. 2003). The thermal desorption treatment was considered as part as a management practice leading to a fully restored soil and no treatment with the TD soil without plant cover was studied.

Sampling and Analysis

Soil composition. Soil samples were collected twice a year, before and after the growing period: in September 2005 before sowing (T0), May 2006 (T1), September 2006 (T2), May 2007 (T3), September 2007 (T4), April 2008 (T5), September 2008 (T6), April 2009 (T7), and September 2009 (T8). Six sub-samples per plot were collected with a hand auger and mixed to obtain one mean sample per plot. Analysis of all sub-samples taken at T0 gave an estimate of soil heterogeneity and showed that this sampling procedure guaranteed a representative sample of the plot. Soil samples were analyzed for agronomic properties, pollutants (heavy metals and PAH), microbial activity and toxicity. Soil sample characteristics were analyzed at the LAS-INRA laboratory (Arras) using standardized methods. The main parameters are listed in Table 1.

Organic pollution characterization. For total organic pollution characterization, soil samples were freeze-dried. Two series of extractions with an automated extractor Dionex[®] ASE (Accelerated Solvent Extractor) 200 were carried out on 1 g or 12 g of lyophilized samples respectively for NM and TD soils, according to their respective TOC concentration and the treatment undergone, for qualitative and quantitative analyses. Qualitative analyses were performed once on each sample at 100°C and 130 bars with dichloromethane (DCM). Copper powder, in order to eliminate the molecular sulphur, Na₂SO₄, to remove the remaining molecules of water, and Fontainebleau sand, to increase the extraction yield, were added to the samples prior to the extraction. The extracts were then diluted with DCM at 5 to 20 mL, according to the concentration, and an aliquot was sampled and dried under nitrogen to determine the solvent extractable organic matter (EOM) yield. Asphaltene (ASP) were isolated from EOM by asphaltene precipitation in *n*-pentane. The separation of the aliphatic (SAT), aromatic (ARO) and resins (RES) was performed on alumina and silica columns as described by Jeanneau et al. (2006). The aliphatic and aromatic hydrocarbons and low molecular weight resins were isolated from high molecular weight

Table 1 Soil main initial properties. Mean values of 20 or 4 mean plot samples for respectively NM and TD $\pm$ standard deviation. EOM: extractable organic matter; ASP: asphaltenes; SAT : saturated hydrocarbons; ARO: aromatic hydrocarbons; RES : resins

	Particle size distribution (g kg ⁻¹)				
	Clay (<2 mm)	Fine silt (2–20 mm)	Coarse silt (20–50 mm)	Fine sand (50–200 mm)	Coarse sand (200–2000 mm)
NM	123 $\pm$ 21	148 $\pm$ 28	75 $\pm$ 13	83 $\pm$ 15	571 $\pm$ 62
TD	104 $\pm$ 5	97 $\pm$ 10	98 $\pm$ 4	141 $\pm$ 8	560 $\pm$ 13
	Agronomic parameters (g kg ⁻¹)				
	pH	C org	Total N	P ₂ O ₅	CaCO ₃
NM	7.0 $\pm$ 0.2	62.0 $\pm$ 3.6	2.7 $\pm$ 0.1	0.050 $\pm$ 0.008	19.2 $\pm$ 3.2
TD	8.0 $\pm$ 0.0	58.4 $\pm$ 2.4	0.94 $\pm$ 0.04	0.082 $\pm$ 0.010	49.2 $\pm$ 3.8
	Pollutants (mg kg ⁻¹)				
	16 PAH	Zn	Cd	Pb	Ni
NM	1924 $\pm$ 258	2086 $\pm$ 229	2.66 $\pm$ 0.06	482 $\pm$ 58	97.3 $\pm$ 4.1
TD	106 $\pm$ 4	2745 $\pm$ 26	2.14 $\pm$ 0.08	673 $\pm$ 23	102.3 $\pm$ 2.1
	Organic fractions (g kg ⁻¹)				
	EOM	ASP	SAT	ARO	RES
NM	13.9	5.2	1.1	5.3	2.3
TD	0.6	0.2	0.1	0.2	0.1

polar compounds on an alumina column, eluted successively with DCM and a mixture of DCM:methanol (1:1). The DCM fraction was then eluted on a silica column successively with *n*-hexane, a mixture of *n*-hexane:DCM (2:1), and a mixture of DCM:methanol (1:1), to recover respectively aliphatic hydrocarbons, aromatic hydrocarbons and resins. They were then diluted to 5 mL and a 500 μ L aliquot was dried and weighed to determine the mass proportion of each fraction. Resins were analyzed by capillary GC-MS after derivatization using a mixture of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) and trimethylchlorosilane (TMSC) (99/1, v/v), while aliphatic and aromatic fractions were analyzed without further treatment. GC-MS analyses were performed with a Hewlett Packard G1800A equipped with a capillary column DB 5-MS (length: 60 m; diameter: 0.125 mm) coupled with a mass spectrometer operating in the fullscan mode, according to the method described in Jeanneau et al. (2006).

Quantitative series were performed once on each sample with ASE 200 at 130°C and 130 bars with DCM, to assay PAH contents. In addition to activated copper, Na₂SO₄ and Fontainebleau sand, Florisil was added to trap macromolecules. The DCM was exchanged with chloroform, concentrated with a Turbovap® to 5 mL. An internal PAH standard mix (naphthalene d8, acenaphthene d10, phenanthrene d10, chrysene d12, perylene d12, supplied by Cluzeau®) was added to the diluted extract before being injected into an Agilent Technologies 6890N gas chromatograph equipped with a capillary column in silica glass DB 5-MS (60 m $\times$ 0.125 mm i.d. $\times$ 0.1 μ m film thickness). This was coupled

to an Agilent technologies 5973 mass spectrometer used as an inert detector on the full scan mode, using a time-window-scheduled acquisition with the diagnostic ions at m/z 128, 136, 152, 154, 164, 166, 178, 188, 202, 228, 240, 252, 264, 276, and 278. The temperature program was the following: from 70°C to 130°C at 15°C min⁻¹, then from 130°C to 315°C at 3°C min⁻¹ and then a 15 min hold at 315°C. The carrier gas used was helium at 1.4 mL min⁻¹ constant flow.

PAH availability was estimated on BS and SV undisturbed soil samples only to avoid any structural artifact induced by sampling. The method used involved a solid phase extraction using Tenax[®] resin with a protocol adapted from Cornelissen et al. (1997) to represent the aged pollution behavior observed in contaminated soils (Barnier 2009). Briefly, two grams of air-dried soil were agitated during 30 hours with 2 g of Tenax[®] and 300 mL of a 0.01 M CaCl₂ and 200 mg L⁻¹ NaN₃ solution. The Tenax beads were then recovered and extracted twice with a 1:1 acetone hexane mix. The extract was further transferred to acetonitrile and analyzed with an HPLC line equipped with fluorescence detector. All chemicals used were of analytical or HPLC grade.

Soil fauna. In September 2007 and 2008, three intact soil cores (5 cm depth, 5 cm diameter) were taken from the center of each plot. Microarthropods were then extracted from the soil samples using the Macfadyen method for a period of 1 week (Cortet et al. 2007). Using a dissecting stereomicroscope, microarthropods from each sample were identified and sorted. Adult mites were identified to the suborder level (Actinedida, Gamasida, Oribatida, Acaridida) (Krantz 1978). When possible, all collembolans were identified at the species level using different available keys (Gisin 1960; Bretfeld 1999; Potapow 2001). All other microarthropods (pseudoscorpions, small millipeds . . .) were grouped together. The abundance of each taxon was assessed.

In 2009, epigeic soil macrofauna was sampled with pitfall traps. One trap was placed in the centre of each plot during the season (four replicates per treatment). The traps were made of glass cups (9 cm deep, 5 cm diameter) filled with white vinegar. Because density of macrofauna changes during season, the traps were set out in June and October. Each time the traps were open for 7 days. All invertebrates captured were sorted, and subsequently enumerated.

Soil microbiology. Cultivable total and PAH-degrading bacterial counts were performed by spreading soil dilution series (in 0.85% NaCl) on Plate Count Agar (PCA) plates and phenanthrene (PHE) or pyrene-sprayed (PYR) Mineral Salt (MS) plates, respectively (Pagnout et al. 2007). The CFU of total bacteria, PHE-degrading bacteria and PYR-degrading bacteria were counted after 12, 24 and 45 days growth, respectively. Moreover, DNA was isolated using a bead beating method and phenol-chloroform purification as reported in Cébron et al. (2008). Real-Time PCR assays using Sybr Green detection and MyiQ Thermal cycler (BioRad) were performed to quantify fungal biomass, bacterial biomass and PAH-degrading bacteria. Gene copy densities of 18S rDNA, 16S rDNA, PAH-dioxygenase GN (from Gram negative bacteria) and PAH-dioxygenase GP (from Gram positive bacteria) in DNA extracts were measured as described in Cébron et al. (2008).

Soil toxicity. The *Eisenia fetida* earthworm species and the *Folsomia candida* collembolae species were used to assess the toxicity of the soil samples. The soil invertebrates originated from our lab culture and were tested according to the ISO 11268-1 (1993) standard method for earthworms and the ISO 11267 (1999) for collembolae. Effects on survival and reproduction were measured for both species. These time-consuming tests

Table 2 Bioassays selected to assess the toxicity of the contaminated soils and the water extracts to aquatic and terrestrial organisms

	Test species	Duration	Parameters measured	Standard method
Acute toxicity	Bacteria <i>Vibrio fischeri</i> (Microtox®)	30 min	luminescence inhibition	ISO 11348-3 (1999)
Chronic toxicity	Daphnid (<i>Daphnia magna</i>)	24, 48 hrs	immobilization	ISO 6341 (1996)
	Ceriodaphnid (<i>Ceriodaphnia dubia</i>)	7 days	reproduction	AFNOR NF T90-376 (2000)
	Micro-algae (<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>)	72 hrs	population growth inhibition	ISO 8692 (1996)
	Earthworm (<i>Eisenia fetida</i>)	14 days	survival	ISO 11268-1 (1993)
		28, 56 days	reproduction	ISO 11268-2 (1998)
	Collembola (<i>Folsomia candida</i>)	28 days	survival, reproduction	ISO 11267 (1999)
	Plant (<i>Vicia faba</i>)	48 hrs	genotoxicity, micronucleus test	AFNOR NF T90-327 (2004)

were conducted on the initial materials NM and TD at T0 and once during the study in September 2007 (T4) to check for any evolution.

Leached water. Leached water volumes and quality were estimated throughout the year with water depth measurements as well as pH, conductivity and dissolved organic carbon (DOC) in collection tanks after every significant rainfall. Water samples were collected twice a year in March or April and in September or October for additional chemical and toxicological analysis. Trace elements were analyzed by ICP-MS at the SARM laboratory. PAHs were quantified by a certified laboratory according to the AFNOR NF EN ISO 17993 (2004) standard method.

Toxicity of leachates was studied to assess acute and chronic toxic effects of the water-extractable fraction of those soil pollutants which may endanger surface and ground waters (Eom et al. 2007). Toxicity was studied on species representative of microorganisms, photosynthetic species, and primary consumers. All bioassays were performed according to standard methods (Table 2). The acute toxicity was determined by measuring luminescence inhibition of the bacteria *Vibrio fischeri* (Microtox test) and mobility inhibition of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. Chronic toxicity was measured on the reproduction of the invertebrate *Ceriodaphnia dubia* and on population growth of the microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. Genotoxicity of leachates was evaluated using the micronucleus test on roots of *Vicia faba*. Toxicity results were expressed as the percentage of the water sample in the test medium (volume/volume%) reducing by 50% the endpoints measured compared to controls (EC50).

Plant growth. Aboveground biomass of all plots of *Medicago sativa* and *Noccaea caerulea* were collected once a year in September and characterized for nutrient and pollutant contents. Plant biomass was first air-dried at room temperature for a week and then dried to constant mass at 70°C. Roots of alfalfa were sampled twice a year to follow mycorrhizal colonization. Mycorrhizal colonization of roots was determined by Trypan blue staining as described by Phillips and Hayman (1970) and notation was performed using the Trouvelot et al. (1986) method.

Plant communities colonizing the polluted soil NM (SV plots) were described through the determination of species richness, Shannon-Weaver diversity and Pielou evenness indices according to Shannon and Weaver (1963) and Pielou (1966) respectively. To this

end, Braun-Blanquet cover values (Braun-Blanquet 1932) were converted to percentage of cover. We used 0.05 for the class (1) cover < 5%; 0.15 for the class (2) 5% < cover < 25%; 0.375 for the class (3) 25% < cover < 50%; 0.625 for the class (4) 50% < cover < 75%; 0.875 for the class (5) cover > 75%. Finally, for the “+” class, we used the frequency 0.0125. These results were compared to those obtained on control plots containing uncontaminated soil exhibiting similar physico-chemical properties. They were located in an adjacent area and no vegetation was detected at the beginning of the experiment.

Statistical Data Analysis

The toxicity endpoints, such as the effective concentration values (EC_{50}) that were used for *C. dubia* and *D. magna*, were estimated using the bootstrap method in the REGTOX Excel macro (E. Vindimian, Cemagref, Montpellier, France), available from http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html. It models the data set by using the Hill model. The software estimates the parameters of the model by means of non-linear regression (confidence intervals are estimated by a bootstrap simulation). The results are expressed as EC_x values with their confidence intervals. Statistical analyses were performed with Statistica for Windows ($p < 0.05$: STATISTICA version 5.1 for Windows, Statsoft, Tulsa, OK, USA).

Microbial abundance data were treated with a two-way analysis of variance followed by a pairwise multiple comparison test (Newman-Keuls) using XLStat 2008 software. Significant differences ($p < 0.05$) between plots were indicated by different letters.

For soil fauna data, a redundancy analysis (RDA) was performed on the abundance of the whole dataset, including 144 samples (2 sampling dates, 24 plots, 3 samples per plot), 24 taxa, and 6 environmental variables, corresponding to the six treatments. Data were log-transformed before analysis. The statistical significance of treatment effects at the community level was also tested using Monte Carlo permutation tests with 499 permutations (TerBraak and Smilauer 2002).

Differences in macrofauna abundances between the six treatments and between seasons were tested by the non-parametric Kruskal-Wallis and post-Hoc tests.

RESULTS AND DISCUSSION

This project includes many aspects and huge amounts of data. Only the most relevant points are presented below. Some more detailed and specific features have been reported in former publications.

Soil Quality and Functioning

Total organic pollution. The initial 16 PAH content in untreated soils (NM) was between 1800 to 2100 mg kg⁻¹ of dry soil (Table 1 and Figure 1). Even if the 16 PAH content decreased with time by around 20% whatever the treatment, the organic extract content remained stable. The composition of the organic extract was characterized by a relative stability of the aliphatic and aromatic hydrocarbons and resins over time representing respectively 8.5%, 37.0%, and 14.9% of the EOM. On the other hand, the asphaltene proportion increased progressively from 38% to 48% over four years. This evolution suggests that PAH were not removed by (bio)degradation leading to a total mineralization, but on the contrary by a transfer of PAH to the asphaltene fraction by

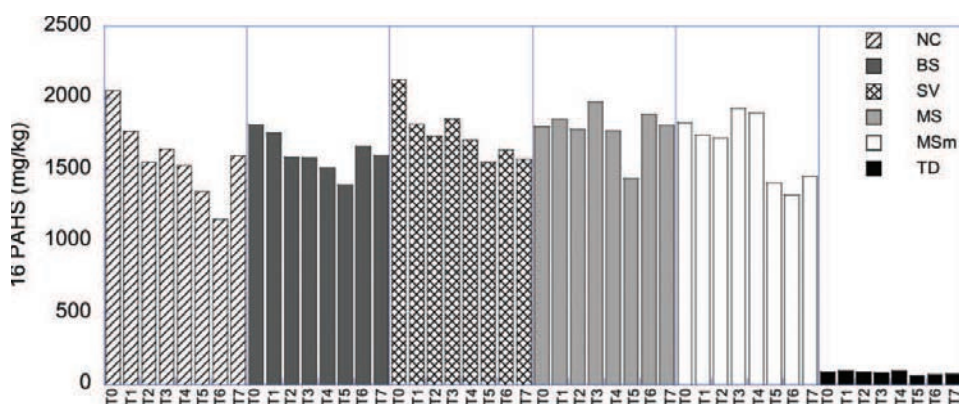


Figure 1 16 PAH evolution with time for the different treatments. (Color figure available online).

incorporation (condensation) as already proposed by Biache et al. (2008) in the case of thermal desorption (~ 2 hour at 500°C).

The molecular fingerprints of aliphatic and aromatic hydrocarbons and resins were studied over time by gas chromatography–mass spectrometry. Aromatic hydrocarbons and resins did not exhibit distribution changes at molecular level. Aromatic hydrocarbons were dominated by parent PAH of molecular weight ranging from 128 to 326 g mol^{-1} molecules. Substituted PAHs which were low in abundance, were compatible with soils contaminated by coking plant activities (especially coal tar contribution). In the resin fraction, nitrogen-bearing PAHs and oxygen-bearing PAHs occurred with a wide molecular range (from 2 to more than 6 rings). S-PAHs occurred in lower proportions. Even if these two fractions (resins and aromatic hydrocarbons) exhibited a high molecular diversity, their respective distribution remained stable with time.

In contrast, aliphatic hydrocarbons exhibited molecular evolution for planted treatments (SV, MS and MSm). Aliphatic hydrocarbons in initial soils were dominated by an unresolved complex mixture (UCM), of *n*-alkanes in small proportions and pentacyclic-triterpanes (especially hopanes). With the duration of the experiment, *n*-alkanes with an odd over even carbon number predominance in the 23 to 35 carbon range, were observed to increase. Such distribution is typical of cuticular wax contribution inherited from higher plants (Bray and Evans 1961). Indeed, carbon preference index (CPI) increased from 1.35 ± 0.06 at T0 to 2.10 ± 0.28 at T7. In non-planted treatments (BS and NC), such signatures did not appear and CPI remained more steady, starting at 1.36 ± 0.01 at T0 and reaching 1.51 ± 0.19 at T7.

The evolution of the organic pollution signature in the TD soil was relatively close to untreated soils. The 16 PAH content decreased in the same range ($\sim 20\%$), even though the initial content was much lower ($\sim 90\text{ mg kg}^{-1}$). The proportion of the different organic constituents (asphaltenes, resins, aliphatic, and aromatic hydrocarbons) remained stable over the time as did the molecular distributions. Only the aliphatic hydrocarbon fingerprint exhibited the appearance of typical higher plant contribution (odd over even *n*-alkanes predominance in the $\text{C}_{23}\text{-C}_{35}$ range) in accordance with occurrence of *Medicago sativa* plantation for this treatment. In this case, CPI strongly increased from 1.57 at T0 to 7.42 at T7.

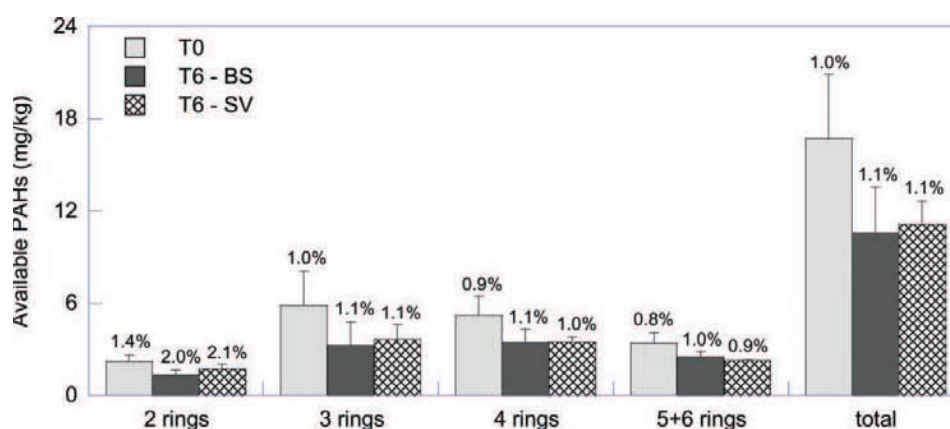


Figure 2 Available PAH concentrations. Indicated values are relative percentages to corresponding total amount. (Color figure available online).

Available PAHs. The initial PAH available fraction was very low and estimated to represent 1% of the total fraction. Only slight differences were observed between molecules, the lighter fraction of two aromatic ring compounds reaching 1.4%. No significant differences appeared for higher molecular weight molecules. The available fraction decreased slightly with time between T0 and T6 (Figure 2). This was concomitant with the total concentration decrease and the available proportion of PAHs remained steady at around 1%. Furthermore, no distinctive behaviors between compounds and no significant plant-cover effect were observed.

Microorganism densities. Total microbial biomass was estimated using cultivable and molecular biological techniques. These two approaches gave contrasting results. Over the five years, no significant difference was observed in fungal and bacterial densities, based on rRNA gene quantification, between various plot types, except for MSm and TD plots where densities were higher in September 2009 (Cébron et al. 2009). Moreover, vegetated plots (SV, MS, MSm and TD) favored a higher density of cultivable total bacteria with 3 to 20 times more bacteria in alfalfa and spontaneous vegetation rhizosphere compared to bare soil. This is an expected rhizosphere effect. Indeed, high concentrations of readily available carbon sources from root exudates usually increase microbial populations. Such a phenomenon has already been observed by Fan et al. (2008), who found 5 to 7.5 times more total bacteria using the CFU method in the rhizosphere of alfalfa in a pyrene-contaminated soil than in the non-rhizospheric soil.

The functional PAH-degrading bacterial population was also studied by both approaches. Over the time, PAH-degrading bacteria, based on quantification of PAH-dioxygenase gene from Gram positive bacteria (Figure 3) and cultivable PHE- and PYR-degraders, were globally more abundant in vegetated plots of contaminated NM soil (SV, MS and MSm) (Cébron et al. 2009). Previous findings already showed that, using culture-dependent methods, enzymatic analyses, or molecular gene detection-based studies, the density of PAH-degrading bacteria increased by about 4.5- to 15-fold in rhizosphere compared to that in bulk soil (Joner et al. 2002; Johnson et al. 2005; Miya and Firestone 2000). It appeared clearly that a substantial PAH-degrading bacterial population could only be maintained and increased on cultivated plots, whereas it decreased slowly over time on bare plots.

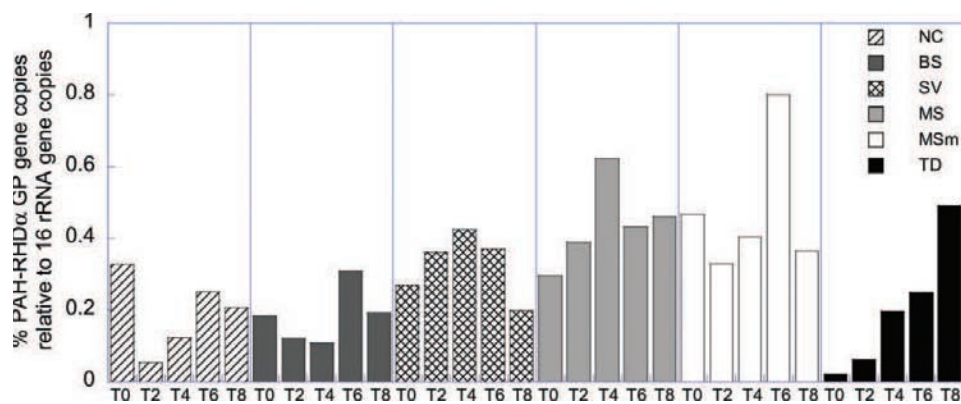


Figure 3 Microbial abundance expressed as percentage of PAH-degrading Gram positive bacteria deduced from PAH-dioxygenase gene copy measurement. Mean values based on the four replicate plots of each treatment are presented. For clarity sake statistical treatment is not presented on the graph but explained in the text. (Color figure available online).

Mesofauna. The results of the redundancy analysis (RDA) showed a clear discrimination of community structures according to treatments that explained 26.6% of the variance. The plane formed by axis 1 (17.9% of the variance) and axis 2 (4.7% of the variance) of the RDA (Figure 4) discriminated three kinds of treatment: (1) NC and BS, which were characterized by a very low abundance of most micro-arthropods, except the Collembola species *Hypogastrura manubrialis*; (2) SV and to a lesser extend MS and MSm, characterized by a high abundance of mites, but also of epi-edaphic species, like *Isotoma viridis* and *Lepidocyrtus* sp.; (3) TD which was characterized by a high abundance of mites, but also eu-edaphic species, like *Protaphorura* sp. and *Mesaphorura* sp. Thus, about 30% of the micro-arthropod community structure was explained by the treatments, which is a relatively high percentage, considering that other factors, particularly climate, can have a strong influence on soil fauna. Furthermore, the Monte Carlo permutation test showed a significant effect of treatments ($p < 0.0001$) on the community structure.

These results confirm that the vegetation cover allows epi-edaphic species to colonize and increase the soil fauna biodiversity, especially when vegetation is diverse and soil is not disturbed by agricultural practices (SV compared to MS and MSm). However, eu-edaphic Collembola species would appear to only be able to colonize soils that had been previously thermally desorbed (TD), which is probably due to the remaining pollution in other treatments. In any case, NC and BS, with no plants and still high pollutant concentrations represented the worst situation for the micro-arthropod biodiversity. These results confirm that soil micro-arthropods, and particularly their life history traits, can be used for soil pollutant monitoring (Cortet et al. 1999; Gillet and Ponge 2003).

Macrofauna. Significant differences in macrofauna abundances, dominated by arachnids and coleoptera (mainly carabidae and staphylinidae), were found between treatments (Figure 5). Results showed that soil macrofauna was significantly more abundant in June than in October for each treatment ($p < 0.001$). Moreover, significant differences between the six treatments in June were observed, with an abundance significantly higher in soils with *Medicago sativa* with or without mycorrhization and with a spontaneous vegetation, than in soil thermally desorbed, and much higher than in soil with *Noccaea caerulea* and bare soils ($p < 0.001$).

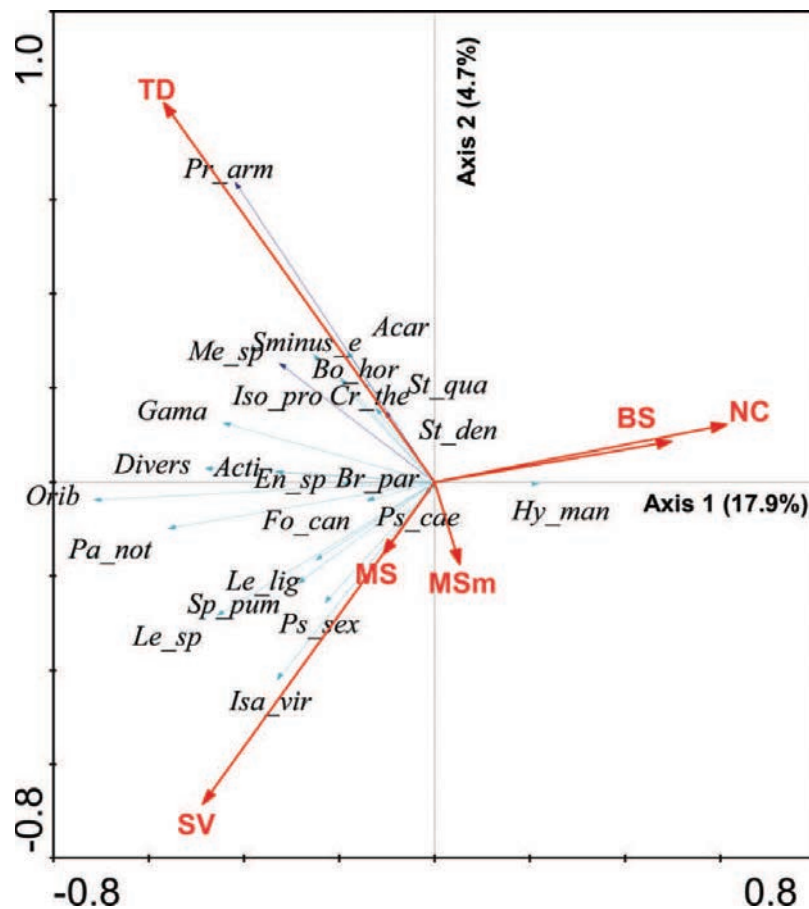


Figure 4 Axis 1 and 2 from redundancy analysis (RDA) performed on soil micro-arthropods. Acar: Acaridida, Acti: Actinedida, Orib: Oribatida, Gama: Gamasida, Divers: other micro-arthropods than mites and Collembola, Hy_man: *Hypogastrura manubrialis*, Isa_vir: *Isotoma viridis*, Le_sp: *Lepidocyrtus* sp., Pa_not: *Paristoma notabilis*, Ps_sex: *Pseudosinella sexoculata*, Sp_pum: *Spaeridia pumilis*, Le_lig: *Lepidocyrtus lignorum*, Fo_can: *Folsomia candida*, Br_par: *Brachystomella parvula*, En_sp: *Entomobrya* sp., Iso_pro: *Isotomodes productus*, Me_sp: *Mesaphorura* sp., Sminus.e: *Sminthurinus elegans*, Bo_hor: *Bourletiella hortensis*, Cr_the: *Cryptopygus thermophilus*, St_qua: *Stenaphorura quadrispina*, St_den: *Stenaphorura denisi*, Pr_arm: *Protaphorura armata*. (Color figure available online).

Vegetation Growth

Cultivated species. It appeared impossible to grow *Noccaea caerulea* on the contaminated soil. Over the first year, autumn sowing at 200 seeds m^{-2} yielded only 2.2% germination in spring and only 16 individuals survived until the sampling time T2 (September 2006). Though scarce, plants that survived presented a rather high biomass yield of 2.9 g $plant^{-1}$ on average and an accumulation of 1000 mg Zn kg dry biomass $^{-1}$ and 7.7 mg Cd kg dry biomass $^{-1}$. The second year resulted in similar results with a slightly better survival rate but with much smaller plants. Direct juvenile plant input did not improve *N. caerulea* colonization in the third year. There appeared to be a strong phytotoxicity of the NM soil for this species. Further laboratory research did not allow the parameter

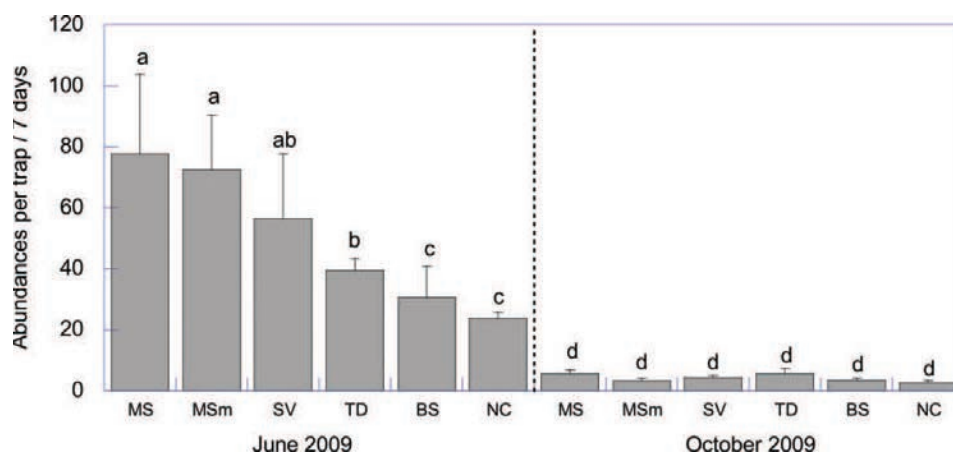


Figure 5 Macrofauna abundance in the six treatments in June and October 2009. Letters indicate significant differences between treatments (Kruskal-Wallis, $p = 0.0330$). (Color figure available online).

responsible for this toxicity to be identified. Organic compound removal did not improve germination yields in any way. *N. caerulea* proved to be sensitive to sulphur content which is very high on NM. However, this parameter alone could not explain the effects observed on the soil. Further investigations are still needed to understand this phytotoxicity and new hyper-accumulating species are being currently tested to replace *N. caerulea*. To sum up, NC plots could be mostly considered as bare plots.

For all the plots planted with alfalfa (MS, MSm, and TD), the two first growing seasons (2006 and 2007) did not produce significantly different biomass yields (Figure 6). These biomass yields were low compared to those obtained in field experiments with the same plant growing on post-mining soils (Pucek and Pys 1999), thus suggesting a strong toxicity of the soil for this species. A strong toxicity of this soil was also observed for the inoculated mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*), as no mycorrhizal colonization was observed in the roots of alfalfa during the two first seasons.

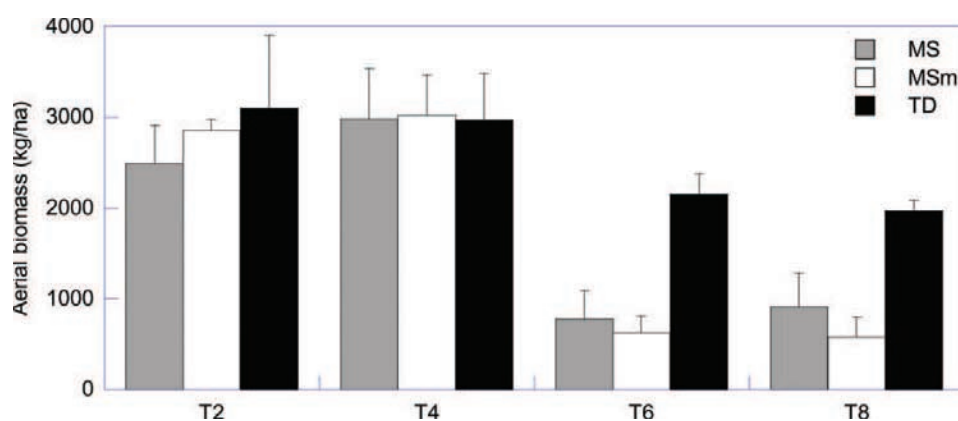


Figure 6 Aerial biomass of alfalfa on MS, MSm and TD plots. Mean values based on the four replicate plots of each treatment are presented with their corresponding standard errors. (Color figure available online).

Table 3 Plant community indices determined for control area and polluted soil. S, H' and J stand for species richness, Shannon-Weaver diversity and Pielou evenness indices respectively

	Control area	Polluted soil – SV
2007		
S	24.25 ± 1.50	16.5 ± 1.73*
H'	3.53 ± 0.17	3.06 ± 0.2*
J	0.77 ± 0.03	0.76 ± 0.04
2009		
S	16.75 ± 0.5	11.5 ± 2.52*
H'	3.03 ± 0.2	1.89 ± 0.41*
J	0.75 ± 0.04	0.54 ± 0.08*

*: $p < 0.05$, t test.

Following the second inoculation, over the third and fourth growing season (2008 and 2009), a strong effect of soil management was observed on alfalfa growth. On untreated polluted soil (MS and MSm plots) alfalfa biomass yields were lower than for the two first years, but no significant difference was observed between the two treatments (with or without inoculation). Indeed, both plant roots were slightly colonized by mycorrhizal fungi (mycorrhizal frequency around 25%), but no difference was observed between inoculated and non-inoculated plots, suggesting a natural colonization of this soil by indigenous mycorrhizal fungi. On soil treated by thermal desorption (TD), alfalfa growth was positively affected by soil management, with much higher biomass yields than those obtained on NM soil. Roots of these plants were strongly colonized by mycorrhizal fungi (mycorrhizal frequency around 90%), which could explain their better development.

Spontaneous vegetation. Two years after the lysimeters were filled with the polluted soil, various herbaceous plant species established successfully. However, community structures differed notably with the unpolluted control plots, which began to be colonized at the same time as the lysimeters (Table 3). Indeed, plant communities established on polluted soils exhibited a loss of species richness and diversity when compared to control soil plant communities. These differences were confirmed in 2009. Also, for both control and polluted soils, a decrease was observed in species richness and diversity by comparison to 2007. This could be explained by the establishment on both plots of the highly competitive goldenrods (*Solidago canadensis*), an invasive plant commonly found in mid-successional habitats and known for its high growth rate and its ability to form highly selective monoclonal patches (Bazzaz 1996).

Soil Toxicity

The initial soil samples NM and TD and those collected from plots in spring 2007 were tested for their chronic toxicity on terrestrial invertebrates. No toxicity was registered on the survival and reproduction of the collembolae *Folsomia candida* after 28 days of exposure. Nor was toxicity recorded on the survival and reproduction of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to the untreated contaminated soil. No significant reduction in the production of cocoons and juveniles was registered after 28 and 56 days of exposure, respectively.

As for earthworms exposed to the soil treated by thermodesorption, the production of cocoons and juveniles decreased by 20% and 30% respectively, but the decrease was

not significant. These last results were in line with a higher genotoxic potential of the thermo-desorbed soil, compared to the untreated one found by Bonnard et al. (2010).

Impact of Leached Waters

Water balance. From September 2006 (T2) to September 2009 (T8), drainage water represented 30.4% and 30.2% of incoming rainfall for respectively bare plots BS and NC and for vegetated plots 29.9% for SV, 25.7% for MS, 25.4% for MSm, and 20.2% for TD. These results were perfectly consistent with vegetation cover densities. The main differences were observed over the spring and summer periods (from the end of March until the end of September) with almost no water leaving the TD plots (4% of incoming rainfall) and average drainage water ranging from 10% for MS and MSm to 17% for NC and BS. Moreover, this absence of water leaching from the TD plots usually lasted until the beginning of November.

Water chemistry. The main feature of the water leaching from the plots was its very high salinity. On all plots filled with NM material, conductivity values started at about 4.8 mS cm^{-1} to slowly decrease over time and reach 2.8 mS cm^{-1} in September 2009. For TD plots, initial values were lower, at around 3.4 mS cm^{-1} and slowly decreased to 2.5 mS cm^{-1} . This salinity was mostly explained by very high concentrations of sulfate in solution with initial concentrations of 3.4 g L^{-1} for NM plots and 2.1 g L^{-1} for TD plots. These concentrations slowly decreased with time and were only of 1.5 g L^{-1} for all plots after four years. These were compensated for by calcium and magnesium cations. These species were present in the soil and reflect the very high sulfur values measured in the soils, respecting the difference in materials. Water pH values were slightly higher for TD plots, at about 8.3 against 8.0 for NM plots. No significant difference appeared with treatments and values only slightly decreased by 0.1–0.2 units with time.

No significant trace element concentrations were detected in waters, as could be expected from the alkaline pH values. The highest values were obtained for Ni at $50\text{--}70 \mu\text{g L}^{-1}$ and Zn $20\text{--}30 \mu\text{g L}^{-1}$. All other elements analyzed (As, Cd, Cr, Pb) were close to detection limits or well-below drinking water standards. PAH analysis gave results below detection limits for all 16 US-EPA PAHs.

DOC values averaged 53 mg L^{-1} through the years for NM plots on all treatments, with transitory peaks of around 80 mg L^{-1} in the first waters leaching from the plots after the dry season. Values in waters leaching from TD plots were much lower, at around 6 mg L^{-1} . These values were consistent with the water colors: yellowish to brown in the first case and clear in the second.

Water toxicity. Leachates presented no acute toxicity either on the Microtox test or on the freshwater invertebrates *Daphnia magna* after 24 h and 48 h of exposure. No genotoxicity was detected with the micronucleus test conducted on 5-day roots of *Vicia faba*. However, a high chronic toxicity was recorded on the growth of micro-algal suspensions and on the reproduction of the freshwater invertebrates *Ceriodaphnia dubia* with leachates from plots filled with the non-treated contaminated soil (NM). The concentrations of the leachates (volume/volume%) in the test medium that reduced algal growth by 50% after 72 h of exposure (EC50–72 h) were around 2–3% in spring 2006 and in the range of 0.2–0.7% in spring 2009 (Figure 7). Leachates from plots planted with *Medicago* (with or without mycorrhization) were less toxic. Yet, the difference was not significant due to variations registered between plots. Leachates from plots filled with the TD soil were much less toxic on micro-algae with EC50–72h values between 30 and 50%.

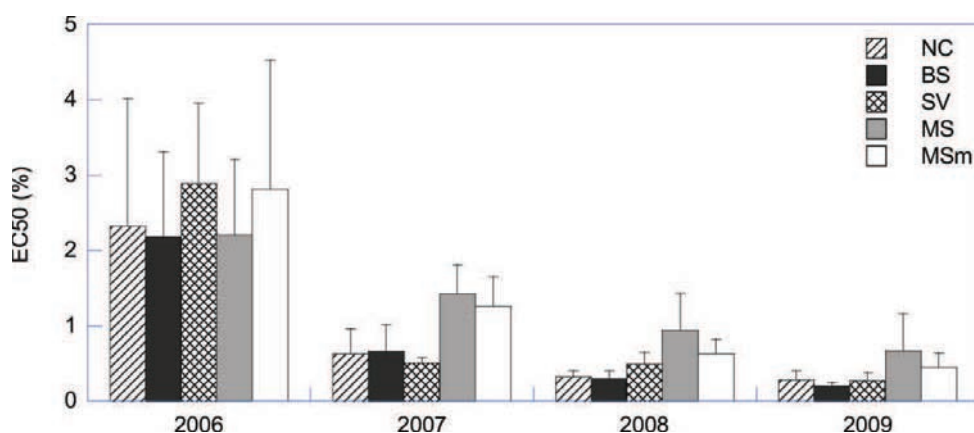


Figure 7 Algal toxicity of the leachates from plots filled with NM soil from 2006 to 2009. Toxicity is expressed by the concentration (in volume /volume%) of the leachate in the test medium that inhibits the growth of *Pseudokirchneriella subcapitata* suspensions by 50% after 72 h of exposure (EC50–72h). (Color figure available online).

The same pattern of toxicity was recorded on reproduction of *Ceriodaphnia dubia* after 7 d of exposure. At the onset of the study, the EC50–7d values were between 1% and 3%. Toxicity increased over time, but to a lesser extent in the plant-covered plots. After five years of phytoremediation, the EC50–7d values of leachates from non-vegetated plots were below 0.5%, while the values were about 1.5% in leachates from plots planted with *Medicago* with or without mycorrhization.

The results indicated a reduction trend in the chronic toxicity of leachates from vegetated soils. These results were in line with the ones on mesofauna and macrofauna abundance that were shown to be favored by vegetation. The chemical composition of leachates was studied to determine which fraction could be responsible for the toxicity. Polycyclic aromatic hydrocarbons were removed in leachates at very low concentrations and could not be responsible for the toxicity on algal growth and invertebrates reproduction at the concentrations tested in test media. The high saline fraction was suspected to be toxic, but calcium, sodium and magnesium salts could not explain toxicity to aquatic species. Chlorides and sulfates tested at a range of concentrations similar to leachates concentrations were not toxic to algae and *Ceriodaphnia*. The same remark can be made for metal cations, such as zinc, nickel and copper that could not be implicated in the toxic effects registered. Their concentrations in test media were below $\mu\text{g L}^{-1}$ and much lower than the concentrations known to inhibit algal growth and daphnids reproduction. In leachates of other contaminated soils, copper had been identified as the probable algal toxic agent by Eom et al. (2007), but copper could not explain toxicity here because its concentrations never exceeded $25 \mu\text{g L}^{-1}$ in the present leachates. The hypothesis that multiple contaminants removed at low concentrations in leachates may interact could not be excluded. Ecotoxicity studies of the organic fractions of leachates are still in progress.

Overall Impact of the Different Management Practices

As an attempt to summarize and cross-examine the different information obtained in this study, all treatments have been qualitatively scored against the different

Table 4 Global comparison of treatment effects on pollution behavior and impact as explained by the different parameters studied

Parameter considered	Treatments					
	BS	NC	SV	MS	MSm	TD
Total contamination	0	0	0	0	0	+++
Available PAHs	0	n.a.	0	n.a.	n.a.	n.a.
Microbial abundance	0	0	+	+	+	++
Soil fauna	0	0	++	++	++	+++
Plant development	n.a.	–	+	++	++	+++
Soil toxicity	0	0	0	0	0	–
Water volume limitation	0	0	+	++	++	+++
Leaching water toxicity	—	—	–	–	–	+

n.a.: not applicable.

parameters followed (Table 4). The TD treatment clearly appeared as the most advantageous management with smallest transfer (water volumes and concentrations), highest biological diversity (meso and macrofauna) and lowest toxicity (for plants, mycorrhiza, and water). The phyto-treatment applied with MS, MSm, and to a lesser extent SV plots gave significant improvement to the contaminated soil impact by limiting water fluxed and by improving biological diversity and abundance (microbial, fauna). Highly toxic leaching water, although less so than that of bare soil, still remained an issue and showed the limit of phyto-management as a stand-alone practice. The attempt at co-remediation with the hyper-accumulating species *Noccaea caerulescens* proved impossible due to some unidentified phytotoxicity factor and illustrated the difficulties when dealing with multi-contaminated media. This toxicity probably affected mycorrhizal establishment as well.

From a more methodological point of view, classical chemical approaches clearly showed their limits. None of those tested here could really assess the respective extents of treatment impacts. Biological indicators (microbial communities, soil fauna) and ecotoxicological approaches were the keys for realistic environmental assessment.

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

Plant establishment appeared to be a good solution for multi-contaminated soil management. It had a particularly beneficial effect on soil biological diversity and leaching water volume limitation. However, the remaining contamination degraded very slowly and had a toxic effect preventing more advanced management practices (hyper-accumulating species, mycorrhizal colonization). Plant cover alone could not prevent leaching water toxicity resulting in the potential dissemination of toxic compounds and thus a negative impact on the environment. Thermal desorption, coupled to vegetation cover, appeared to be the best management practice for soil fauna biodiversity recovery and overall toxic impact mitigation.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are grateful to A. Bouchard, L. Charrois, C. Messana, A. Rakoto, C. Rast for technical help. This study was supported by the French National Research Agency, under reference ANR-2008-CESA-010 and by the GISFI (<http://www.gisfi.fr>).

REFERENCES

- Association Française de Normalisation (AFNOR NF EN ISO 17993). 2004. Water quality—Determination of 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in water by HPLC with fluorescence detection after liquid-liquid extraction. Saint Denis (France): Afnor.
- Association Française de Normalisation (AFNOR NF T90-327). 2004. Qualité du sol—Evaluation des effets génotoxiques sur végétaux supérieurs—Evaluation de la fréquence d'apparition de micronoyaux dans les racines secondaires de *Vicia faba*. Saint Denis (France): Afnor.
- Association Française de Normalisation (AFNOR NF T90-376). 2000. Qualité de l'eau—Détermination de la toxicité chronique vis à vis de *Ceriodaphnia dubia* en 7 jours—Essai d'inhibition de la croissance de la population. Saint Denis (France): Afnor.
- Barnier C. 2009. Disponibilité des HAP dans les sols de friches industrielles et influence des conditions rhizosphériques [PhD dissertation]. [Nancy (France)]: Institut National Polytechnique de Lorraine. 212 P.
- Bazzaz FA. 1996. Plants in changing environments: linking physiological, population, and community ecology. Cambridge (UK): Cambridge University Press. 320 P.
- Biache C, Mansuy-Huault L, Faure P, Munier-Lamy C, Leyval C. 2008. Effects of thermal desorption on the composition of two coking plant soils: impact on solvent extractable organic compounds and metal bioavailability. *Environ Pollut.* 156:671–677.
- Bonnard M, Devin S, Leyval C, Morel J, Vasseur P. 2010. The influence of thermal desorption on genotoxicity of multipolluted soil. *Ecotoxicol Environ Saf.* 73:955–960.
- Braun-Blanquet J. 1932. Plant sociology: the study of plant communities. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc. 439 P.
- Bray EE, Evans ED. 1961. Distribution of n-paraffins as a clue to recognition of source beds. *Geochim Cosmochim Acta.* 22:2–15.
- Bretfeld G. 1999. Synopses on palaeartic collembola. 2, Symphypleona. Görlitz (Germany): Staatliches Museum für Naturkunde Görlitz. p. 318.
- Brown SL, Chaney RL, Angle JS, Baker AJM. 1994. Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and bladder campion for zinc- and cadmium-contaminated soil. *J Environ Qual.* 23:1151–1157.
- Cébron A, Beguiristain T, Faure P, Norini M, Masfaraud J, Leyval C. 2009. Influence of vegetation on the *in situ* bacterial community and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degraders in aged PAH-contaminated or thermal-desorption-treated soil. *Appl Environ Microbiol.* 75:6322–6330.
- Cébron A, Norini M, Beguiristain T, Leyval C. 2008. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD α) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J Microbiol Methods.* 73:148–159.
- Cornelissen G, Noort PCMV, Govers HAJ. 1997. Desorption kinetics of chlorobenzenes, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorinated biphenyls: sediment extraction with Tenax[®] and effects of contact time and solute hydrophobicity. *Environ Toxicol Chem.* 16:1351–1357.
- Cortet J, Griffiths BS, Bohanec M, Demsar D, Andersen MN, Caul SE, Birch AN, Pernin C, Tabone E, de Vaufléury A, Ke X, Krogh PH. 2007. Evaluation of effects of transgenic Bt maize on microarthropods in a European multi-site experiment. *Pedobiologia.* 51:207–218.
- Cortet J, Gomot-de Vaufléury A, Poinso-Balaguer N, Gomot L, Texier C, Cluzeau D. 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *Eur J Soil Biol.* 35:115–134.
- Costes J, Druelle V. 1997. The polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: the former industrial sites remediation. *Rev Inst Fr Pét.* 52:425–440.
- de Percin PR. 1995. Application of thermal desorption technologies to hazardous waste sites. *J Hazard Mater.* 40:203–209.
- Eom I, Rast C, Veber A, Vasseur P. 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicol Environ Saf.* 67:190–205.
- Fan S, Li P, Gong Z, Ren W, He N. 2008. Promotion of pyrene degradation in rhizosphere of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Chemosphere.* 71:1593–1598.

- Gillet S, Ponge J. 2003. Changes in species assemblages and diets of Collembola along a gradient of metal pollution. *Appl Soil Ecol.* 22:127–138.
- Gisin H. 1960. Collembolenfauna Europas. Genève (Switzerland): Museum d'Histoire Naturelle. p. 312.
- International Standard Organization (ISO 11267). 1999. Soil quality—Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants.
- International Standard Organization (ISO 11268-1). 1993. Soil quality—Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*)—Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrates.
- International Standard Organization (ISO 11268-2). 1998. Soil quality—Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*)—Part 2: Determination of effects on reproduction.
- International Standard Organization (ISO 6341). 1996. Water quality—Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Ciadocera, Crustacea)—Acute toxicity test;
- International Standard Organization (ISO 8692). 1996. Water quality—Freshwater algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*.
- International Standard Organization (ISO NF EN 11348-3). 1999. Water quality—Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test, part 3).
- Jeanneau L, Faure P, Montarges-Pelletier E, Ramelli M. 2006. Impact of a highly contaminated river on a more important hydrologic system: changes in organic markers. *Sci Total Environ.* 372:183–192.
- Johnson D, Anderson D, McGrath S. 2005. Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil. *Soil Biol Biochem.* 37:2334–2336.
- Joner EJ, Corgié SC, Amellal N, Leyval C. 2002. Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biol Biochem.* 34:859–864.
- Krantz GW. 1978. Manual of Acarology. 2nd ed. Corvallis (OR): Oregon St Univ. 509 P.
- Miya RK, Firestone MK. 2000. Phenanthrene-degrader community dynamics in rhizosphere soil from a common annual grass. *J Environ Qual.* 29:584–592.
- Pagnout C, Frache G, Poupin P, Maunit B, Muller J, Féraud J. 2007. Isolation and characterization of a gene cluster involved in PAH degradation in *Mycobacterium* sp. strain SNP11: expression in *Mycobacterium smegmatis* mc2155. *Res Microbiol.* 158:175–186.
- Phillips J, Hayman D. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc.* 55:158–161.
- Pielou EC. 1966. Shannon's formula as a measure of specific diversity: its use and misuse. *Am Nat.* 100:463–465.
- Potapow M. 2001. Synopses on paleoarctic collembola. Isoetomida. Görlitz (Germany): Staatliches Museum für Naturkunde Görlitz. 603 P.
- Pucek TR, Pys JB. 1999. The nutritive value and yield of alfalfa cultivated on sulphur postmining lands. *J Agron Crop Sci.* 182:185–192.
- Redon PO, Beguiristain T, Leyval C. 2009. Differential effects of AM fungal isolates on *Medicago truncatula* growth and metal uptake in a multimetallic (Cd, Zn, Pb) contaminated agricultural soil. *Mycorrhiza.* 19:187–195.
- Sandrin T, Maier R. 2003. Impact of metals on the biodegradation of organic pollutants. *Environ Health Perspect.* 111:1093–1101.
- Schwartz C, Echevarria G, Morel JL. 2003. Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil.* 249:27–35.
- Shannon CE, Weaver W. 1963. The mathematical theory of communication. Urbana (IL): University of Illinois Press. 144 P.
- TerBraak CJF, Smilauer P. 2002. CANOCO Reference manual and CanoDraw for Windows User's guide: software for canonical community ordination. Ithaca (NY): Microcomputer Power. 500 P.

- Trouvelot A, Kough JL, Gianinazzi-Pearson V. 1986. Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche de méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S, eds. Physiological and genetical aspects of mycorrhizae. Paris: INRA. p. 217–221.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1999. Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCA Corrective Action, and Underground Storage Tank Sites, EPA RCA 9200.4-17P. Washington (DC): Office of Solid Waste and Emergency Response. 41 P.
- Wiltse CC, Rooney WL, Chen Z, Schwab AP, Banks MK. 1998. Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes. *J Environ Qual.* 27:169–173.

Résumé

La dissipation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP), polluants persistants majoritaires des sols de friches industrielles, implique l'action de microorganismes bactériens et fongiques. Cependant, leur contribution relative à la dissipation *in situ*, en fonction des interactions entre ces microorganismes ou avec les plantes et les polluants, est mal connue et les communautés fongiques ont été très peu étudiées dans de tels environnements. L'objectif de cette thèse était de préciser l'écodynamique des HAP dans la rhizosphère sous l'effet des microorganismes et de leurs interactions et d'évaluer la diversité fongique dans des sols contaminés. La dynamique des communautés fongiques a été étudiée *in situ* pendant 5 années, par PCR en temps réel et Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE), dans un sol historiquement contaminé en présence ou non de plantes et dans le même sol ayant subi un traitement de remédiation par désorption thermique. Les plantes avaient un effet positif sur l'abondance et la diversité des champignons et étaient le facteur déterminant la structure des communautés fongiques, dominées par les Ascomycètes. D'autre part, des souches bactériennes et fongiques ont été isolées de ce sol et testées pour leur capacité à dégrader les HAP *in vitro*. Parmi celles-ci, la bactérie *Arthrobacter oxydans* Pyr2MsHM11 et le champignon *Fusarium solani* MM1 ont été choisies comme souches modèles pour étudier leur action individuelle ou conjointe sur la dissipation de trois HAP, dans différentes conditions, des plus simples (cultures liquides) aux plus complexes (microcosmes de sol planté en présence d'une microflore). Les résultats ont montré l'importance fondamentale des interactions entre microorganismes, notamment des phénomènes de compétition, pour la croissance des souches modèles et pour l'expression de leurs potentiels de dissipation des HAP.

Mots Clés : Communautés fongiques, sols pollués, HAP, rhizosphère, interactions microbiennes, *Fusarium solani*, *Arthrobacter oxydans*

Abstract

The dissipation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), very common and persistent pollutants in soils from industrial wastelands, involve the action of bacterial and fungal microorganisms. However their respective contribution, and the influence of the microbial and plant-microbe interactions on *in situ* PAH dissipation, are poorly known and fungal communities were scarcely studied in such environments. This work aimed to study the fate of PAHs in rhizosphere under the influence of microorganisms and their interactions and to estimate the fungal diversity in contaminated soils. The dynamic of fungal communities was monitored *in situ* for 5 years, by real-time PCR and Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE) in an aged PAH-polluted soil and in the same soil treated by thermal desorption. The results showed that plants had a positive effect on fungal abundance and diversity and were the main driver of fungal community structure, dominated by Ascomycetes. Besides, bacterial and fungal strains were isolated from this soil and screened for their ability to dissipate PAHs *in vitro*. Among them, the bacteria *Arthrobacter oxydans* Pyr2MsHM11 and the fungus *Fusarium solani* MM1 were chosen as model strains to study their individual and simultaneous effect on PAH dissipation in different experimental conditions, from liquid cultures to planted soil microcosms with a complex microflora. It was found that interactions between microorganisms, notably competition, had a crucial influence on their growth and on the expression of their PAH dissipation potential.

Key words: Fungal communities, polluted soils, PAH, rhizosphere, microbial interactions, *Fusarium solani*, *Arthrobacter oxydans*