



HAL
open science

Diversités taxonomique et fonctionnelle des communautés microbiennes en lien avec le cycle du carbone dans un gradient de sols multi-contaminés

Florian Lemmel

► **To cite this version:**

Florian Lemmel. Diversités taxonomique et fonctionnelle des communautés microbiennes en lien avec le cycle du carbone dans un gradient de sols multi-contaminés. Ecotoxicologie. Université de Lorraine, 2019. Français. NNT : 2019LORR0004 . tel-02130115

HAL Id: tel-02130115

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-02130115v1>

Submitted on 15 Jul 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE SIRENa



**Ecole Doctorale SIRENa
(Sciences et Ingénierie des Ressources Naturelles)**

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes »

par Florian LEMMEL

**Diversités taxonomique et fonctionnelle des
communautés microbiennes en lien avec le cycle du
carbone dans un gradient de sols multi-contaminés**

Soutenance publique le 14 janvier 2019

Membres du jury :

Rapporteurs :	M. Josselin BODILIS	MCf, Université de Rouen, LMSM, Mont Saint-Aignan
	M. Naoise NUNAN	CR, CNRS, iEES Paris, Paris
Examineurs :	M ^{me} Françoise BINET	DR, CNRS, ECOBIO, Rennes
	M. Stéphane UROZ	DR, INRA, IAM, Champenoux
	M ^{me} Aurélie CÉBRON	CR, CNRS, LIEC, Vandœuvre-lès-Nancy, <i>Directrice de thèse</i>
	M ^{me} Corinne LEYVAL	DR, CNRS, LIEC, Vandœuvre-lès-Nancy
Membre invité :	M ^{me} Florence MAUNOURY-DANGER	MCf, Université de Lorraine, CNRS, LIEC, Vandœuvre-lès-Nancy, <i>Co-directrice de thèse</i>

**Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux
UMR 7360 CNRS – Université de Lorraine**

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux. Ces 3 dernières années furent très enrichissantes, aussi bien professionnellement que personnellement, et ce grâce à de nombreuses personnes que je tiens maintenant à remercier. Je tiens à préciser que ces remerciements ne sont peut-être pas exhaustifs (désolé si j'ai oublié quelqu'un).

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury, Françoise Binet, Josselin Bodilis, Naoise Nunan et Stéphane Uroz, d'avoir accepté de juger mes travaux. Merci également à Françoise et Stéphane d'avoir accepté de suivre mon travail de thèse lors des réunions annuelles. Je remercie mes financeurs : la région Lorraine, le pôle OTELo (projet TraitMic), l'Agence Nationale de la Recherche (projet RhizOrg) et le programme national EC2CO (projet EcobioS). Je remercie Fabien Thomas, Christian Mustin et Laure Giamberini, à la direction du LIEC, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Je souhaite également exprimer, non sans émotion, toute ma gratitude à mes directrices de thèse : Aurélie Cébron, Florence Maunoury-Danger et Corinne Leyval. Un énorme merci pour votre patience (et il en aura fallu pour supporter mon stress !), votre disponibilité à tout instant, votre engagement, mais aussi pour vos conseils et encouragements, qui ont joué un rôle important dans l'aboutissement de cette thèse. Merci de vous être autant investies et de tout le temps que vous m'avez consacré malgré vos emplois du temps parfois très chargés. Un merci spécial pour Aurélie, particulièrement disponible. Tu auras su m'apporter conseils et aide, quelles que soient mes questions, même lorsque je passais 10 fois par jour à ton bureau. Enfin, merci à vous pour toute votre bienveillance, l'expression « maman de thèse » porte bien son nom 😊.

Je souhaite aussi remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ces travaux de thèse. Je remercie Géraldine Kitzinger, David Billet et Hervé Marmier pour les analyses physico-chimiques réalisées au LIEC. Merci Stéphane Uroz pour m'avoir apporté tes conseils et ton aide lors de l'utilisation de l'ultracentrifugeuse à l'INRA. Merci Albin Meyer, collègue Alsacien (!), pour m'avoir apporté une aide cruciale dans le traitement statistique de mes données.

Je voudrais aussi remercier tous mes amis et collègues du labo. Merci Christine pour nos pauses régulières, devenues indispensables sur la fin, et nos discussions et nos confidences

sur tout et n'importe quoi. Merci également pour ton aide précieuse dans la préparation de certaines expériences (je ne sais combien de milliers de tubes tu as annotés pour moi ^^). Merci Cécile pour ton écoute et ta gentillesse, et aussi pour le livre que tu m'as offert (il me sera très utile ☺). Merci Thierry pour cette bonne humeur et ton humour qui font du bien à la pause-café du matin. Merci à mes anciens collègues de bureau, Alexis et Coralie, pour ces échanges scientifiques mais aussi ces bons moments et votre esprit toujours positif. Je remercie mes nouveaux collègues de bureau, Clothilde, Axel, Camille, vous avez en charge l'aquarium, je compte sur vous ☺. Un grand merci Quentin Vincent pour ta sympathie et tes conseils (notamment en stats). Merci Nicolas pour ton optimisme, ton écoute et être toujours prêt à aider. Merci Céline, je me souviendrai de ton rire qui traverse les étages ☺ Merci Kévin, pour ta bonne humeur et tes playlists ; ps : tu gères à la guitare ! Merci Yu Yu, toujours joyeuse, avec un certain grain de folie ☺. Je remercie également les anciens ou actuels doctorants, post-doctorants et stagiaires que j'ai pu côtoyer au cours de ces 3 ans de thèse, Andrea, Erwin, Elise, Romain, Maxime, Vanessa, Anne, Jordan, Fadi, Johanne, Amélia, Marine, Bérénice, Charlotte et les collègues permanents Damien, Pierre, Patrick, Asfaw, Anne, Sylvie... Et tous ceux que j'aurais oublié ☺

Merci également à mes collègues doctorants du conseil OTELo, Séverine, Lionel et Gabriel pour ces moments sympas, notamment lors des journées prospectives au golf ☺

Je remercie aussi tous mes amis en dehors du labo, en particulier Thibaut, Marie et Marc. J'ai hâte qu'on se refasse des sorties !

Une pensée émue pour ma chère et tendre, Valériane, qui aura su m'apporter tout son soutien, sa force, sa bonne humeur et bien plus encore, particulièrement dans les moments difficiles. Tu es l'un des piliers de mon quotidien et cette thèse n'aurait pas été la même sans toi. Merci pour tous nos moments passés ensemble et pour tous ceux qui suivront.

Enfin, pour terminer, un merci très spécial à ma famille pour m'avoir soutenu autant qu'il était possible de le faire tout au long de cette thèse. Merci à ma Maman pour tes attentions, pour ces bons petits plats que tu me préparais le week-end et tant de choses ! Merci à mon Papa pour m'avoir aidé quand j'en avais besoin, pour m'avoir inculqué cette rigueur (perfectionnisme ?) et avoir éveillé en moi cet intérêt pour la science.

MERCI

TABLES DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART	5
1 LES SOLS.....	7
1.1 <i>Les fonctions des sols : définition</i>	7
1.2 <i>Le cycle du carbone dans les sols</i>	8
1.2.1 Les végétaux, producteurs primaires.....	9
1.2.2 Le pool litière.....	10
1.2.3 Le pool rhizodépôts et les exsudats racinaires	14
1.2.4 Effet rhizosphère et <i>priming effect</i>	17
1.3 <i>Dynamique du carbone dans les sols</i>	17
1.3.1 Processus de stabilisation de la matière organique.....	18
1.3.2 Influence des conditions environnementales sur la dégradation de la matière organique.....	20
1.4 <i>Les communautés microbiennes dans les sols</i>	21
1.4.1 La diversité taxonomique	21
1.4.2 La diversité fonctionnelle	25
1.4.3 Lien entre diversité et fonction	27
1.4.4 Facteurs édaphiques influençant la diversité microbienne	29
2 LES SOLS ANTHROPISES	31
2.1 <i>L'anthropisation</i>	31
2.2 <i>La sidérurgie : source de multi-pollution.....</i>	32
2.2.1 Brève histoire de l'industrie sidérurgique.....	32
2.2.2 Activité sidérurgique et pollutions associées.....	33
2.3 <i>Conséquence de la multi-contamination sur le cycle du carbone</i>	34
2.4 <i>La pollution organique dans les sols : le cas des HAP.....</i>	35
2.4.1 Origine des HAP	36
2.4.2 Devenir des HAP dans les sols	37
2.5 <i>La pollution métallique dans les sols.....</i>	42
2.5.1 Métaux et Eléments Traces Métalliques : définition	42
2.5.2 Origine et occurrence des ETM.....	42
2.5.3 La toxicité des ETM : Essentiel VS non essentiel.....	43
2.5.4 Devenir et disponibilité des ETM dans les sols	45
2.6 <i>Impact de la pollution sur la diversité et les fonctions des communautés microbiennes</i>	47
2.6.1 Impact des HAP.....	47
2.6.2 Impact de la pollution métallique.....	49
2.6.3 Impact de la multi-pollution métallique et organique.....	50
3 OBJECTIFS DE LA THESE	52
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES.....	57
1 LES SOLS.....	59
1.1 <i>Sites étudiés</i>	59
1.2 <i>Échantillonnage des sols</i>	60
1.3 <i>Estimation de la couverture arborée.....</i>	60
1.4 <i>Préparation pour les analyses</i>	61
2 ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES SOLS	62
2.1 <i>Caractéristiques physico-chimiques.....</i>	62
2.2 <i>Analyse des teneurs en éléments totaux et traces.....</i>	63
2.3 <i>Analyse des teneurs en HAP.....</i>	64
2.3.1 Extraction des HAP totaux	64
2.3.2 Extraction des HAP disponibles	65
2.3.3 Analyse des HAP	65

3	ANALYSES BIOLOGIQUES DES SOLS	66
3.1	<i>Quantification des bactéries cultivables</i>	66
3.2	<i>Analyse des capacités métaboliques des communautés microbiennes</i>	66
3.2.1	Principe des plaques Biolog®	66
3.2.2	Substrats analysés	67
3.2.3	Préparation des microplaques.....	67
3.2.4	Inoculation et incubation des microplaques.....	68
3.2.5	Mesure de l'utilisation des substrats.....	69
3.3	<i>Analyse des capacités métaboliques des communautés dans les sols</i>	69
3.3.1	Principe du MicroResp™	69
3.3.2	Expérimentation	70
3.3.3	Mesure de l'utilisation des substrats ajoutés	70
3.4	<i>Mesures de minéralisation</i>	71
3.4.1	Préparation des échantillons de sols	72
3.4.2	Incubation.....	72
3.4.3	Mesure du CO ₂ par détection du rayonnement infrarouge.....	73
3.5	<i>Lien entre diversité taxonomique et fonctions de dégradation du phénanthrène et de la cellulose .</i>	74
3.5.1	Préparation et incubation.....	74
3.5.2	Mesure du δ ¹³ C.....	75
3.6	<i>Analyse des communautés microbiennes</i>	76
3.6.1	Extractions des ADN génomiques.....	76
3.6.2	Séparation des ADN sur gradient de CsCl et précipitation	76
3.6.3	Quantification des microorganismes et de gènes fonctionnels par qPCR	79
3.6.4	Diversité taxonomique : PCR et séquençage	80
3.7	<i>Analyse des données</i>	85
3.7.1	Indices de diversité taxonomique.....	85
3.7.2	Indices de diversité fonctionnelle.....	86
3.7.3	Analyses statistiques uni-variées.....	86
3.7.4	Analyses statistiques multi-variées.....	87

CHAPITRE 3 : LES PROPRIETES ET LA MULTI-POLLUTION DU SOL AFFECTENT LA DIVERSITE TAXONOMIQUE ET FONCTIONNELLE DANS UNE GAMME DE SOLS PRESENTANT UN GRADIENT D'ANTHROPISATION **89**

ABSTRACT.....	93
1 INTRODUCTION	94
2 MATERIALS AND METHODS	96
2.1 <i>Study sites and soil sampling</i>	96
2.2 <i>Soil physico-chemical characteristics</i>	97
2.3 <i>PAH extraction and analysis.....</i>	97
2.4 <i>Carbohydrate, organic acid, and dissolved organic carbon measurements</i>	98
2.5 <i>Quantification of culturable bacteria.....</i>	98
2.6 <i>DNA extraction, real-time quantitative PCR, and sequencing.....</i>	99
2.7 <i>Carbon substrate utilisation using Biolog® plates and metal tolerance test</i>	100
2.8 <i>Soil metabolic profiling using the MicroResp™ method.....</i>	101
2.9 <i>Statistical analyses.....</i>	102
3 RESULTS.....	103
3.1 <i>Grouping of soils according to their physico-chemical characteristics</i>	103
3.2 <i>Bacterial taxonomic diversity.....</i>	106
3.3 <i>Metabolic functional diversity.....</i>	109
3.4 <i>Zinc tolerance.....</i>	112
3.5 <i>Effects of the soil characteristics on taxonomic and metabolic functional diversity.....</i>	113
4 DISCUSSION	116
4.1 <i>Non-impacted microbial parameters</i>	117
4.2 <i>Impact of metals on microbial diversity.....</i>	117
4.3 <i>Impact of PAH on microbial diversity</i>	119

4.4	<i>Impact of physico-chemical parameters on microbial diversity</i>	120
5	CONCLUSION	122
	ACKNOWLEDGEMENTS	122
CHAPITRE 4 : ETUDES DES COMMUNAUTES FONGIQUES DANS DES SOLS FRANÇAIS PRESENTANT UN GRADIENT D'ANTHROPISATION		123
	ABSTRACT	127
1	INTRODUCTION	128
2	MATERIALS AND METHODS	129
2.1	<i>Study sites and their physico-chemical characteristics</i>	129
2.2	<i>DNA extraction, real-time quantitative PCR, and sequencing</i>	130
2.3	<i>Statistical analysis</i>	130
3	RESULTS	131
4	DISCUSSION	137
	ACKNOWLEDGEMENTS	139
CHAPITRE 5 : MISE EN EVIDENCE D'UNE ACTIVITE ET D'UNE IDENTITE CONTRASTEES DE BACTERIES DEGRADANT LE PHENANTHRENE DANS UN GRADIENT DE SOLS ANTHROPISES PAR LA TECHNIQUE DE DNA-STABLE ISOTOPE PROBING		141
	ABSTRACT	145
1	INTRODUCTION	146
2	MATERIALS AND METHODS	148
2.1	<i>Soil sampling and characteristics</i>	148
2.2	<i>Soil respiration</i>	149
2.3	<i>Stable isotope probing incubations</i>	149
2.4	<i>Phenanthrene and ¹³C measurements</i>	150
2.5	<i>DNA extraction, isopycnic ultracentrifugation and gradient fractionation</i>	150
2.6	<i>Real-time quantitative PCR</i>	151
2.7	<i>Identification of phenanthrene-degrading bacteria</i>	152
2.8	<i>Statistical analyses</i>	153
3	RESULTS	154
3.1	<i>PAH contamination and PAH-dioxygenase genes of soils</i>	154
3.2	<i>Soil respirations of unspiked soils</i>	155
3.3	<i>¹³C-Phenanthrene dissipation in soils</i>	155
3.4	<i>Evidence for ¹³C-labelled DNA</i>	156
3.5	<i>Identity of PHE-degraders</i>	157
4	DISCUSSION	160
5	CONCLUSION	165
	ACKNOWLEDGEMENTS	165
CHAPITRE 6 : MISE EN EVIDENCE DES COMMUNAUTES BACTERIENNES ET FONGIQUES REPOUNDANT A LA CELLULOSE DANS UN GRADIENT DE SOLS ANTHROPISES PAR LA TECHNIQUE DE DNA-STABLE ISOTOPE PROBING		167
	ABSTRACT	171
1	INTRODUCTION	172
2	MATERIALS AND METHODS	174
2.1	<i>Soil sampling</i>	174

2.2	<i>Soil respiration</i>	176
2.3	<i>Stable isotope probing incubations</i>	177
2.4	$\delta^{13}\text{C}$ <i>measurements</i>	177
2.5	<i>DNA extraction, isopycnic ultracentrifugation and gradient fractionation</i>	178
2.6	^{13}C <i>labelled DNA isolation</i>	178
2.7	<i>Identification of cellulose-responsive bacteria and fungi</i>	179
2.8	<i>Statistical analyses</i>	180
3	RESULTS	181
3.1	<i>Respirations of initial soils</i>	181
3.2	^{13}C - <i>cellulose mineralisation in soils</i>	181
3.3	<i>Evidence for ^{13}C-labelled DNA</i>	184
3.4	<i>Identity of cellulose-responsive bacteria and fungi</i>	184
4	DISCUSSION	189
5	CONCLUSION	193
	ACKNOWLEDGEMENTS	193
	CHAPITRE 7 : DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES	195
1	QUELLE EST L'INFLUENCE DE LA POLLUTION HISTORIQUE DES SOLS SUR LA DIVERSITE TAXONOMIQUE MICROBIENNE ?	198
2	LA DIVERSITE FONCTIONNELLE MICROBIENNE EST-ELLE IMPACTEE PAR LA POLLUTION DES SOLS ?	199
3	QUEL LIEN UNIT LES DIVERSITES TAXONOMIQUE ET FONCTIONNELLE ?	202
4	QUELLES CONSEQUENCES DE LA MULTI-POLLUTION SUR LE FONCTIONNEMENT ET LA STABILITE DU CYCLE DU CARBONE, ET PLUS GLOBALEMENT DES ECOSYSTEMES ?	204
5	CONCLUSION GENERALE	206
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	209
	ANNEXES	245

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures du Chapitre 1

Figure 1.1. Schéma simplifié du cycle du carbone dans les couches superficielles du sol.....	9
Figure 1.2. Représentation schématique de l'hydrolyse de la cellulose microcristalline et amorphe. Schéma inspiré de Lynd et al. (2002).....	13
Figure 1.3. Représentation schématique de la rhizosphère.	14
Figure 1.4. Courbes de décomposition de divers groupes de constituants de la litière. Schéma modifié d'après Minderman (1968).	19
Figure 1.5. Abondance et composition des phylotypes bactériens dominants dans les sols à travers le monde. Figure extraite de Delgado-Baquerizo et al. (2018).	23
Figure 1.6. Représentation schématique des trois formes que peuvent prendre les relations positives entre la richesse en espèces et le taux/fonctionnement du processus. Modifié d'après Nielsen et al., (2011).....	28
Figure 1.7. Le gradient d'anthropisation des sols. Extrait de Barles et al. (1999).....	32
Figure 1.8. Schéma synthétique du fonctionnement de l'industrie sidérurgique et des déchets générés.	33
Figure 1.9. Impact de la multi-contamination aux HAP et aux ETM sur le cycle du carbone.....	35
Figure 1.10. Les 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques prioritaires selon l'US-EPA.	36
Figure 1.11. Principaux processus contrôlant le devenir des HAP dans les sols.	37
Figure 1.12. Voie métabolique bactérienne de la dégradation aérobie du phénanthrène par les bactéries du genre <i>Pseudomonas</i> (simplifiée). Adapté d'après Cerniglia, (1992), Fuchs et al. (2011) et Peng et al. (2008). ...	40
Figure 1.13. Relation entre la concentration et l'effet sur les microorganismes des ions métalliques essentiels et non essentiels. Figure extraite de Gadd (1992).	44
Figure 1.14. Action des plantes et des microorganismes contrôlant le devenir des ETM dans les sols.	46
Figure 1.15. Schéma conceptuel des différentes questions de la thèse.	55

Figures du Chapitre 2

Figure 2.1. Carte de la répartition géographique des sols étudiés.	59
Figure 2.2. Photos des 10 sites étudiés dans cette thèse.	60
Figure 2.3. Aspect des 10 sols après séchage et tamisage à 2 mm.....	61
Figure 2.4. Exemple de l'apparition de la coloration violette dans les puits où le substrat fourni a été consommé.....	67
Figure 2.5. Effet de différentes concentrations de zinc sur l'utilisation moyenne des substrats par 3 sols représentant les 3 groupes de sols de la collection, après 48 h d'incubation.	68
Figure 2.6. Principe du dispositif MicroResp™ (modifié d'après http://www.microresp.com/)	70
Figure 2.7. Illustration du dispositif utilisé pour les mesures de minéralisation.	72
Figure 2.8. Principe de la stratégie d'indexation double.	81

Figures du Chapitre 3

Figure 3.1. Principal Component Analysis (PCA) and correlation circle based on the physico-chemical, pollution, and texture characteristics of the ten soils.	105
Figure 3.2. Taxonomic composition of the bacterial communities of the ten soil samples.	108
Figure 3.3. Cumulated substrate-induced respiration (SIR) in the presence of six carbon sources, and basal soil respiration measured using the MicroResp™ method.	110
Figure 3.4. Catabolic richness and average well color development (AWCD) measured after 96 h of incubation using Biolog® microtiter plates.	112
Figure 3.5. Linear regression between the inhibition rate of carbon substrate utilisation measured using Biolog® microtiter plates (n = 3) with and without zinc addition, and available zinc concentrations in the ten soils.	113
Figure 3.6. Redundancy analysis (RDA) of soil bacterial community diversity (A), MicroResp™ soil catabolic diversity (B), and Biolog® catabolic diversity (C), each of them constrained by soil environmental characteristics.	115

Figures du Chapitre 4

Figure 4.1. Taxonomic composition of the fungal communities of the ten soil samples.	133
Figure 4.2. PCoA plots illustrating distances between fungal communities of the ten soils.	134
Figure 4.3. Heatmap based on the 96 predominant OTUs in the soil collection.	136

Figures du Chapitre 5

Figure 5.1. Percentage of dissipated ¹³ C and phenanthrene (PHE) at the end of SIP incubations (after 12 days).	156
Figure 5.2. Abundance of OTU groups representing the major active ¹³ C-labelled PHE degraders.	158
Figure 5.3. Correlations between the percentage of degraded PHE and biotic factors from unspiked soils (A and B) and from PHE-degrader communities found using SIP experiment (C, D and E).	160

Figures du Chapitre 6

Figure 6.1. Percentage of ¹³ C mineralised during SIP incubation based on δ ¹³ C measures on soil (blue) and CO ₂ (orange).	182
Figure 6.2. Correlation between the percentage of dissipated ¹³ C-cellulose mineralisation and biotic/abiotic factors measured on initial soils.	183
Figure 6.3. Abundance of OTU groups representing the major ¹³ C-labelled cellulose-responsive bacteria.	185
Figure 6.4. Abundance of OTU groups representing the major ¹³ C-labelled cellulose-responsive fungi.	187

Figures en Annexes

Figure S3.1. Heatmap based on the similarity matrix obtained from the PLSr analysis (implemented using 5 components).	247
Figure S5.1. Soil respirations without substrate (basal respiration, in blue) or after phenanthrene spiking (in orange) and difference of CO ₂ produced (in grey).	251

Figure S5.2. Quantification of bacterial 16S rRNA gene copy numbers in the 11 fractions (the fractions n°1 and 13 were eliminated) separated by CsCl gradients using real-time quantitative PCR for ¹² C (in blue) and ¹³ C (in orange) microcosms.....	252
Figure S5.3. CCA ordination of major bacterial PHE-degraders (squares) and percentage of PHE and ¹³ C dissipation (red points) showing the relationship between the abundance of major PHE-degraders and percentage PHE or ¹³ C dissipation.	253
Figure S6.1. Soil basal respiration (BR) and substrate induce respiration (SIR) after cellulose addition and difference of CO ₂ produced between BR and cellulose-SIR.....	254
Figure S6.2. Quantification using real-time quantitative PCR of bacterial 16S rRNA gene copy numbers in the 11 fractions (the fractions n° 1 and 13 were excluded) separated by CsCl gradients.	255
Figure S6.3. Quantification using real-time quantitative PCR of bacterial 18S rRNA gene copy numbers in the 11 fractions (the fractions n° 1 and 13 were excluded) separated by CsCl gradients.	256

Tableaux du Chapitre 1

Tableau 1.1. Exemple des composés retrouvés dans les exsudats racinaires chez la plante modèle Arabidopsis. D'après Badri et Vivanco (2009).....	16
Tableau 1.2. Gammes de valeurs de Zn, Pb, Cd, Cr, Cu, Ni, Co et Tl rencontrées dans des sols français « ordinaires » ou présentant des anomalies naturelles modérées ou fortes. Adapté d'après Baize (2000).	43

Tableaux du Chapitre 2

Tableau 2.1. Noms et séquences des amorces utilisées pour les amplifications par qPCR et pour le séquençage haut débit.....	79
Tableau 2.2. Programmes qPCR utilisés pour amplifier et quantifier les ADNr 16S des bactéries, les ADNr 18S des champignons et les ADNr 16S des archées, et les gènes PAH-RHD α des bactéries à GN et GP.....	80
Tableau 2.3. Noms et séquences des amorces utilisées pour les amplifications par PCR.	82
Tableau 2.4. Programmes PCR utilisés pour amplifier les ADNr 16S des bactéries et les ADNr 18S des champignons.....	83

Tableaux du Chapitre 3

Table 3.1. Physico-chemical characteristics of the ten soils.	104
Table 3.2. Microbial, taxonomic and functional characteristics of the ten soils.....	106

Tableaux du Chapitre 4

Table 4.1. Fungal abundance and taxonomic diversity indices of the ten soils.	131
--	-----

Tableaux du Chapitre 5

Table 5.1. PAH content and PAH-degradation gene copy number and abundance in the soils.	154
--	-----

Tableaux du Chapitre 6

Table 6.1. Physico-chemical and pollution characteristics of initial soils. Extracted from Lemmel et al. (in press; chap. 3).....	175
Table 6.2. Bacterial and fungal community characteristics in initial soils.....	176

Tableaux en Annexes

Table S3.1. Substrates used in the Biolog® and MicroResp™ experiments. Substrates classified in guilds based on Preston-Mafham et al. (2002).....	248
Table S3.2. The p values and F coefficients for axes and soil properties for the redundancy analyses presented on the Figure 6.	249
Table S5.1. Microbial and physico-chemical characteristics of unspiked soils.	250
Table S5.2. P-value and adjusted R-squared of soil physico-chemical characteristics tested in order to explain PHE degradation among soils.	250

SIGLES & ACRONYMES

ACN	Acétonitrile
AOA	<i>Ammonia-Oxidising Archaea</i>
AOB	<i>Ammonia-Oxidising Bacteria</i>
AWCD	<i>Average Well Color Development</i>
CAP	Composé Aromatique Polycyclique
CCA	<i>Canonical Correspondence Analysis</i>
CEC	Capacité d'Echange Cationique
CRP	<i>Catabolic Response Profile</i>
DAD	<i>Diode Array Detector</i>
DCM	Dichlorométhane
DOC	<i>Dissolved Organic Carbon</i>
ETM	Eléments (en) Trace Métallique (<i>Metallic Trace Elements - MTE</i>)
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons - PAH</i>)
IRMS	<i>Isotope Ratio Mass Spectrometry</i>
ITS	<i>Internally Transcribed Spacer</i>
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MOS	Matière Organique du Sol
MPN	<i>Most Probable Number</i> ou NPP – Nombre le Plus Probable
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> (Analyse en Composante Principale - ACP)
PCoA	<i>Principal Coordinate Analysis</i> (Analyse en Coordonnées Principales)
PCR - qPCR	<i>(Quantitative) Polymerase Chain Reaction</i>
PHE	Phénanthrène
PICT	<i>Pollution-Induced Community Tolerance</i>
PSLr	<i>Partial Least Square regression</i> (Régression des moindres carrés partiels)
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
PTEF	Plateforme Technique d'Ecologie Fonctionnelle
PTS	<i>Phosphotransferase System</i>
RDA	<i>Redundancy Analysis</i>
SIP	<i>Stable Isotope Probing</i>
SIR	<i>Substrate-Induced Respiration</i>
US-EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
WRC	<i>Water Retention Capacity</i>

Introduction générale

Introduction générale

Le développement croissant de nos sociétés et les modifications de son environnement par l'Homme ont conduit, aujourd'hui, à une anthropisation globale de la planète, impactant chacun des grands compartiments qui la compose : la biosphère, l'atmosphère, l'hydrosphère et la lithosphère. Pour qualifier cette période de profonds changements sans précédent, on parle généralement de l'anthropocène, autrement dit « l'ère des Hommes », bien que ce terme n'ait pas encore été officiellement reconnu. En effet, les siècles passés à utiliser des énergies fossiles et l'industrialisation croissante de nos sociétés ont fortement anthropisé et contaminé les écosystèmes continentaux. Les sols, principaux supports des activités, sont devenus l'un des réceptacles majeurs de cette pollution anthropique. Ainsi, les sols de friches industrielles, du fait de leur multi-contamination par des polluants organiques (e.g. les hydrocarbures aromatiques polycycliques, ou HAP) et métalliques (e.g. zinc, plomb, cadmium), sont parmi les plus impactés.

Les tendances observées actuellement montrent que cette anthropisation fragilise de plus en plus la diversité des organismes vivants, dans tous les milieux. Pourtant, la biodiversité joue un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes et contribue aux services rendus par ces derniers (e.g. une grande diversité de pollinisateurs améliore le rendement des cultures). On estime ainsi que plus de 26 000 espèces de la flore et de la faune (macroscopique) s'éteignent chaque année, plaçant l'érosion de la biodiversité au sein des grandes préoccupations environnementales actuelles. Par ailleurs, on oublie souvent que les microorganismes (i.e. bactéries, champignons et archées) sont aussi impactés par cette anthropisation. Or, ces derniers sont essentiels au fonctionnement des écosystèmes et notamment des sols, puisqu'ils assurent, *via* leurs fonctions, certaines étapes clés des cycles biogéochimiques, notamment du carbone, comme par exemple la dégradation des composés lignocellulosiques.

Plusieurs questions se posent alors : Quel est l'impact de cette anthropisation sur la biodiversité microbienne ? Si le nombre d'espèces microbiennes diminue et que certains taxons disparaissent, les fonctions assurées par ces derniers sont-elles maintenues ? Dans le cycle du carbone, le processus de dégradation de la matière organique dans les sols implique de nombreuses fonctions microbiennes. Si certains taxons et leurs fonctions disparaissent, la dégradation de la matière organique est-elle encore assurée ? Le fonctionnement du sol, et

plus largement du cycle de carbone est-il perturbé ? Ces questions méritent d'être explorées, particulièrement dans le cadre de multi-contaminations.

Par ailleurs, contrairement aux organismes dits « supérieurs », les communautés microbiennes sont capables de s'adapter rapidement à des pollutions à moyen et long terme. Cette adaptation, qui passe par la sélection d'espèces plus tolérantes aux polluants et/ou capables de dégrader ces derniers (e.g. biodégradation des HAP), pourrait aussi constituer un intérêt pour améliorer la bioremédiation de certains environnements contaminés.

Dans ce contexte, ce travail de thèse s'est intéressé à la diversité taxonomique et fonctionnelle (en lien avec le cycle du carbone) des communautés microbiennes dans des sols présentant un gradient de multi-contamination (HAP, métaux).

Le premier chapitre de ce présent manuscrit fait l'état des lieux des connaissances actuelles concernant le cycle du carbone et les communautés microbiennes dans les sols. Ce chapitre aborde également l'anthropisation des sols et l'impact d'une pollution par des hydrocarbures aromatiques polycycliques et/ou par des éléments traces métalliques sur la diversité taxonomique et fonctionnelle des communautés microbiennes. Le second chapitre expose le matériel et les méthodes utilisés au cours de ce travail de thèse.

Le troisième chapitre présente la diversité taxonomique et fonctionnelle des communautés bactériennes dans la collection de sol et cherche à déterminer l'impact des polluants et des caractéristiques édaphiques sur ces diversités. Le quatrième chapitre complète le précédent, en décrivant la diversité et la structure des communautés fongiques des sols de la collection.

Les cinquième et sixième chapitres ont pour but d'étudier la dégradation de deux composés carbonés modèles et de relier les fonctions de dégradation de ces deux composés à la diversité taxonomique microbienne grâce à l'utilisation de composés marqués au ^{13}C et à la technique de *Stable Isotope Probing*. Le cinquième chapitre présente ainsi des résultats obtenus concernant l'étude de la fonction de dégradation d'un composé carboné d'origine anthropique (i.e. le phénanthrène), tandis que le sixième chapitre s'intéresse à la fonction de dégradation d'un composé carboné d'origine naturelle (i.e. la cellulose). Enfin, le septième chapitre est une discussion générale et synthétique de l'ensemble des résultats obtenus et propose des perspectives de recherches.

Chapitre 1 :
Etat de l'art

1 LES SOLS

« Le sol est la couche la plus externe, marquée par les êtres vivants, de la croûte terrestre. Il est le siège d'un échange intense de matière et d'énergie entre l'air, l'eau et les roches. Le sol, en tant que partie de l'écosystème, occupe une position clé dans les cycles globaux des matières. » (Gobat et al., 2010). En effet, le sol se situe à l'interface des quatre grands compartiments constituant la surface de la terre : la biosphère, l'atmosphère, l'hydrosphère et la lithosphère ; cette position centrale fait de lui un carrefour multifonctionnel où le rôle des organismes vivants a progressivement été démontré et pris en compte (Aubert and Boulaïne, 1967; Bonneau and Souchier, 1994). Ainsi, le sol héberge une très grande biodiversité et constitue également un réservoir nutritif où le stockage et le recyclage des matières organiques et minérales prennent place. Par ailleurs, de très nombreuses activités humaines (agricoles, urbaines, industrielles...) utilisent le sol directement comme milieu récepteur (épandages de produits phytosanitaires, construction de routes...), ou l'affectent indirectement (transferts de contaminants aux abords d'une route, pollutions atmosphériques...). Le sol se trouve ainsi fortement exposé aux agressions anthropiques. Le sol est également le siège de processus abiotiques et biotiques, où bon nombre des étapes clés des cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote, du phosphore ou encore du soufre prennent place. Ces dernières sont principalement réalisées par les micro-organismes et constituent les fonctions des sols. Toutefois, ces processus et fonctions constituent un équilibre fragile qui peut être mis à mal par de nombreux facteurs anthropiques, tels que la pollution.

1.1 Les fonctions des sols : définition

Bien que les sols aient de multiples fonctions pour l'Homme (i.e. services écosystémiques) selon l'usage qu'il en fait (fonction économique de production de biomasse, d'énergie et de matériaux, fonction de support des loisirs et activités humaines, fonctions écosystémiques d'épuration des eaux, de régulation des gaz à effet de serre et de biodiversité ; Wallace, 2007), nous considérerons dans le cadre de cette thèse les fonctions des sols comme celles réalisées par les micro-organismes telluriques. Les fonctions des sols sont donc les différentes étapes clés réalisées par les micro-organismes, au sein des processus qui constituent les grands flux des cycles biogéochimiques prenant place dans les sols. On peut, par exemple, citer la fonction d'hydrolyse de la cellulose en cellobiose *via* les exoglucanases produites par les

microorganismes cellulolytiques (e.g. *Streptomyces*), qui constitue l'une des étapes clés du processus de minéralisation de la cellulose, dans le cycle du carbone (Lynd et al., 2002). De la même manière, on peut mentionner la fonction de transformation de l'ammonium en nitrite (nitritation) réalisée par les bactéries oxydant l'ammonium (e.g. *Nitrosomonas*), qui constitue la première étape du processus de nitrification, dans le cycle de l'azote (Prosser, 1990).

O'Neill et al. (1986) considèrent qu'un écosystème qui fonctionne bien se caractérise par l'intégrité des cycles des éléments et des flux d'énergie, par sa stabilité, et par sa résilience face à des perturbations ou des stress. Les différentes fonctions et processus des cycles biogéochimiques sont à l'équilibre dans un sol qui fonctionnerait correctement, permettant, entre autres, le recyclage de la matière organique. Cependant, la pollution et l'anthropisation des sols peuvent perturber ces fonctions, entravant les cycles de la matière et, pouvant conduire *in fine* à l'accumulation de certains composés ou éléments, ou au contraire, à des carences en certains éléments essentiels (e.g. azote, phosphore) nécessaires au « bon » fonctionnement du sol et des organismes qu'il supporte (Girard et al., 2011). Ainsi, étudier les fonctions impliquées dans les cycles biogéochimiques, tels que le cycle du carbone, est d'une importance cruciale pour mieux comprendre l'impact de l'anthropisation sur le recyclage de la matière, et d'un point de vue plus général, le fonctionnement des sols perturbés par l'action de l'Homme.

1.2 Le cycle du carbone dans les sols

Le cycle du carbone est un des cycles biogéochimiques majeurs sur la Terre et interconnecte la biosphère, l'atmosphère, l'hydrosphère et la lithosphère. Dans cet état de l'art nous nous intéresserons à la biosphère, en nous concentrant sur les flux de carbone dans les sols, médiés par l'action des organismes vivants.

Brièvement, les végétaux sont les producteurs primaires des écosystèmes continentaux, ils fixent le carbone atmosphérique (CO₂) et le transforment en carbone organique. Ainsi, la principale entrée de carbone dans les sols correspond aux apports de matières végétales répartis en deux pools : les rhizodépôts et la litière (voir dans les paragraphes suivants). Ces pools de carbone, contenant des composés labiles et réfractaires, sont plus ou moins rapidement minéralisés, principalement par les communautés microbiennes (bactéries et champignons). De plus, au cours du temps et des saisons, une partie des organismes du sol meurent et forment la nécromasse qui réalimente les pools de carbone. Ainsi, ces différents pools forment, ensemble, la matière organique du sol (MOS). Cette dernière constitue une

source de carbone, d'énergie et de nutriments pour la faune et les microorganismes du sol, qui vont la dégrader, notamment pour synthétiser de la biomasse, mais également minéraliser une partie de ce carbone sous forme de CO_2 , *via* la respiration (**Figure 1.1**).

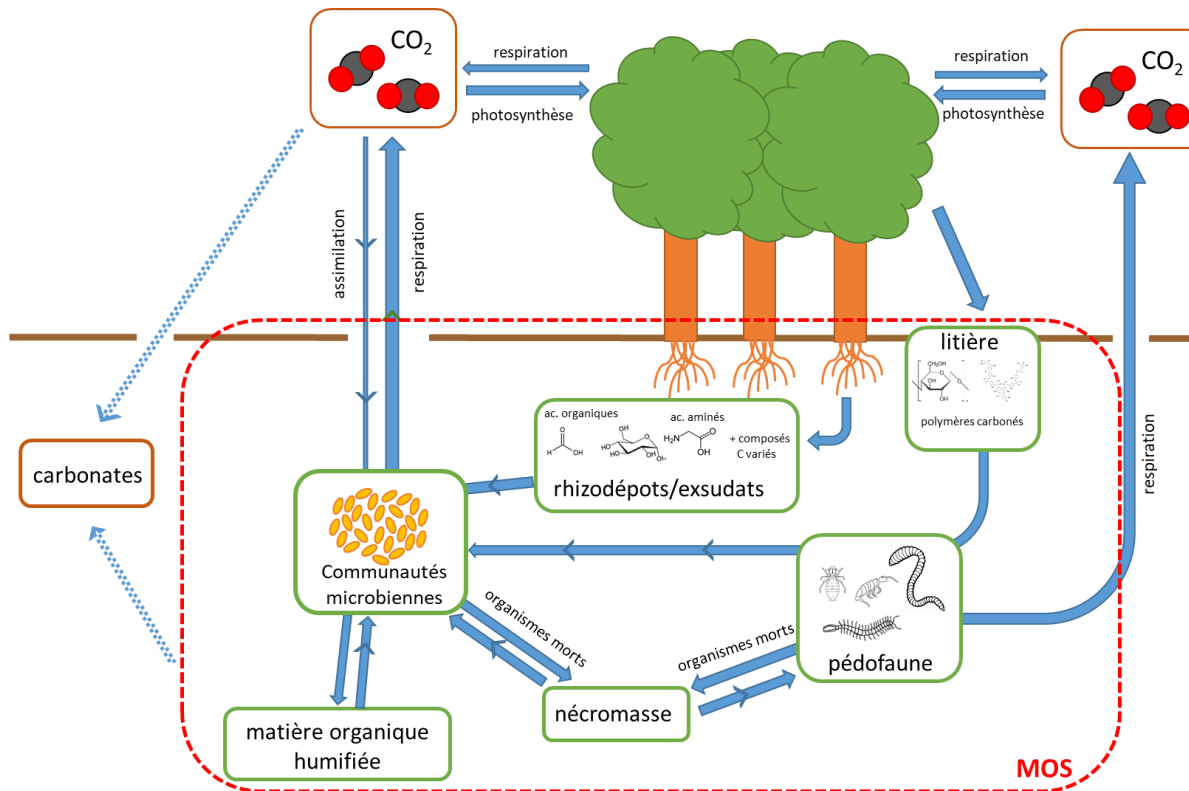


Figure 1.1. Schéma simplifié du cycle du carbone dans les couches superficielles du sol. Les encadrés verts et bruns et bleus représentent respectivement le carbone organique et le carbone minéral. Les végétaux bien que non encadrés peuvent aussi être considérés comme du carbone organique. L'encadré rouge correspond à la matière organique du sol (MOS). Les flèches plaines et en pointillées correspondent, respectivement, aux flux de carbone médiés et non médiés par les êtres vivants.

1.2.1 Les végétaux, producteurs primaires

En tant qu'organismes autotrophes, les végétaux ont la capacité d'utiliser le CO_2 atmosphérique pour produire de la matière organique en utilisant l'énergie lumineuse *via* la photosynthèse. Dans une moindre mesure, les algues du sol, les lichens (résultat de l'association symbiotique entre une algue et un champignon) et des bactéries photosynthétiques contribuent également à la fixation du CO_2 atmosphérique dans les écosystèmes terrestres. On estime ainsi qu'à l'échelle du globe, chaque année 120 Gigatonnes de carbone (Gt_c) sous forme de CO_2 est fixé par les plantes terrestres *via* la photosynthèse (Robert and Saugier, 2003). Le premier type de composés produits par la photosynthèse sont les hydrates de carbone, tels que le glucose. Ces composés entrent ensuite dans le

métabolisme des végétaux et leur devenir peut être réparti en 3 flux (Gobat et al., 2010) : i) Une partie est utilisée par les plantes comme source d'énergie, par respiration (à l'échelle du globe, 60 Gt_c libérés dans l'atmosphère par an ; Robert and Saugier, 2003). ii) Une partie est assimilée par les plantes pour produire de la biomasse lors de leur croissance, et chaque année, une fraction de la biomasse aérienne est redistribuée au niveau du sol sous forme de litière. En forêt tempérée, la masse de cette retombée annuelle est estimée à 2 à 4 tonnes de matière sèche par hectare et par an (Mangenot, 1980). iii) La dernière partie est libérée par les racines sous forme de rhizodépôts. Gobat et al. (2010) estiment que ce troisième flux représente 20 à 50% du carbone fixé *via* la photosynthèse. Ainsi, l'entrée principale de carbone dans les sols se fait *via* l'approvisionnement de matière organique issue des plantes (Hütsch et al., 2002). Si un sol présente un déficit en nutriments ou bien s'il est pollué en éléments toxiques pour les végétaux (e.g. inhibition de la germination), alors sa colonisation végétale sera potentiellement limitée, perturbant en conséquence l'approvisionnement en carbone des sols (Bourrelier and Berthelin, 1998; Adriano, 2001).

1.2.2 Le pool litière

1.2.2.1 Définition et composition

La litière végétale correspond à la litière aérienne et racinaire. Toutefois, comme l'explique Gobat et al. (2010), les données de littérature ne concernent généralement que la définition étroite de la litière (i.e. aérienne), oubliant la litière issue de la mort de racines. Pourtant, on estime qu'en forêt, 30 à 90% de la biomasse des racelles est renouvelée chaque année (Killham, 1994). La litière racinaire peut donc représenter une part importante du carbone entrant dans le sol. Néanmoins, dans la suite de cet état de l'art nous ne parlerons que de la litière aérienne. Le pool de carbone apporté *via* cette dernière correspond à l'ensemble des feuilles après abscission (50 à 80% de la matière sèche) et des débris végétaux morts (rameaux et écorces représentant 3 à 30% de la matière sèche), tombés au sol (Mangenot, 1980). La litière est connue pour être en grande partie composée de biopolymères carbonés tels que l'hémicellulose (10-19%), la cellulose (10-22%) et la lignine (5-8%) (Kögel-Knabner, 2002). Néanmoins, la composition chimique de la litière est très variable selon l'environnement, l'espèce végétale qui l'a produit ou encore son état de décomposition. Ainsi, la teneur en azote des feuilles est dépendante du taux de photosynthèse (lui-même lié à l'espèce végétale, au taux d'ensoleillement et à la température, notamment) et au taux d'absorption de l'azote par les racines (Smith and Smith, 2009). De la même manière, la concentration et la disponibilité des nutriments dans le sol (e.g. P, K, Ca, Mg) va impacter leurs teneurs dans les feuilles.

Ordoñez et al. (2009) ont ainsi observé que les teneurs en P et N des feuilles étaient, respectivement, positivement corrélées à la teneur en P total et négativement corrélées au ratio C:N dans le sol. Les litières produites sur des sols carencés auront tendance à être plus pauvres en N et P que les litières produites sur des sols plus riches (Vitousek, 1998). En outre, la pollution des sols va également impacter la composition chimique des feuilles et donc de la litière. Durand et al. (2010) ont ainsi observé que le stress toxique induit par une pollution en cadmium réduisait les taux de croissance et de photosynthèse des plantes, et influait sur la composition chimique de leurs feuilles en augmentant leur teneur en Ca, Mg et K. De la même manière, Lucisine et al. (2015) ont observé que les feuilles d'une litière provenant d'un site pollué par des métaux (Cd, Pb, Zn) contenaient significativement moins de lignine et de carbone et plus de cadmium et de zinc que les feuilles de litière produites sur des sols non pollués.

1.2.2.2 Processus de dégradation de la litière

La dégradation de la litière fait intervenir de nombreux organismes détritivores (organismes qui fragmentent et ingèrent de la litière, comme les vers de terre et de nombreux invertébrés du sol) et décomposeurs (organismes capables de libérer des exoenzymes qui dégradent certaines macromolécules de la litière, comme un certain nombre de bactéries et de champignons). Ces organismes font partie i) de la macrofaune (centimétrique) où l'on retrouve de nombreuses espèces de macro-invertébrés détritivores (e.g. cloportes, diplopodes), ii) de la mésofaune (millimétrique) constituée de micro-invertébrés (e.g. collemboles, acariens), et iii) de la microfaune (micrométrique) constituée de protozoaires et de nématodes saprophytes, et principalement de microorganismes hétérotrophes décomposeurs (bactéries, champignons). D'une manière générale, on admet que 40% de la litière est consommée par la macrofaune (Gobat et al., 2010). Ces organismes contribuent également à l'enfouissement et à la dispersion de la matière organique. Cependant, il faut préciser que les microorganismes sont les premiers organismes à coloniser la litière et constituent les principaux acteurs réalisant les étapes clés de la dégradation (Gobat et al., 2010).

1.2.2.3 Dégradation des polymères carbonés de haut poids moléculaire par les microorganismes

La litière est principalement composée de polymères carbonés de haut poids moléculaire (cellulose, lignine, hémicellulose), qui de par leurs structures sont relativement résistants à la dégradation. Ainsi, leur dégradation nécessite des fonctions spécifiques qui correspondent à divers types d'enzymes capables de dégrader les polymères carbonés de haut poids

moléculaire en composés de faibles poids moléculaires. Ces derniers pourront ensuite être incorporés par les microorganismes et entrer dans leur métabolisme.

La **cellulose** se compose de fibres formées de chaînes de glucose. Le processus de dégradation de la cellulose nécessite 3 fonctions qui vont être impliquées dans sa dépolymérisation en glucose (**Figure 1.2**). Ces 3 fonctions correspondent à 3 types d'enzymes qui, ensemble, forment un système à cellulase : i) Des endoglucanases, qui vont effectuer des hydrolyses internes (site amorphe) des chaînes de polysaccharides formant la cellulose, et générer des oligosaccharides de tailles variées. ii) Des exoglucanases qui vont agir de manière processive sur les extrémités des chaînes de polysaccharides et libérer du glucose ou des cellodextrines (polymères de glucose ; e.g. cellobiose). iii) Des β -glucosidases (ou plus globalement des cellobiases) qui vont hydrolyser les cellodextrines en glucose.

Bien que la plupart des organismes hétérotrophes (i.e. consommateurs de matière organique) ne possèdent pas les fonctions nécessaires au processus de dégradation de la cellulose, ces dernières sont relativement répandues chez les bactéries et surtout les champignons (Lynd et al., 2002; Cragg et al., 2015). Très récemment, des archées provenant de lacs salés (sédiment et eau) ont été isolées pour leur capacité à dégrader la cellulose (Sorokin et al., 2015). Chez les bactéries, la présence de ces 3 fonctions a principalement été identifiée chez des espèces appartenant aux Actinobactéries (e.g. *Streptomyces reticuli* ; *Cellulomonas flavigena*) et aux Firmicutes (e.g. *Bacillus pumilis* ; *Clostridium cellulolyticum*) et chez quelques Proteobactéries (e.g. *Cellvibrio fulvus*) et Bactéroidetes (e.g. *Sporocytophaga myxococcoides*). Chez les champignons, il s'agit surtout de genres appartenant aux Ascomycètes (e.g. *Bulgaria* ; *Chaetomium*), Basidiomycètes (e.g. *Coriolus* ; *Schizophyllum*) et aux Deutéromycètes (e.g. *Aspergillus* ; *Penicillium*). Chez les archées, les espèces identifiées appartiennent aux Haloarchées (e.g. *Halomicrobium mukohataei* ; *Haloterrigena longa*).

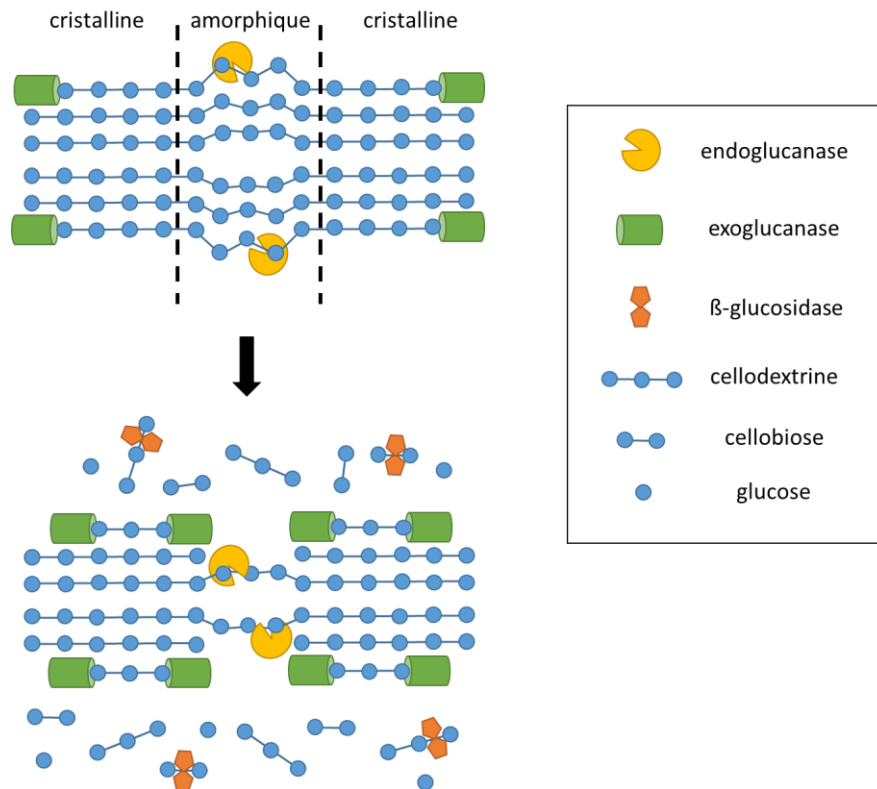


Figure 1.2. Représentation schématique de l'hydrolyse de la cellulose microcristalline et amorphe. Schéma inspiré de Lynd et al. (2002).

Les hémicelluloses, sont des composés constitués d'une chaîne de polymères saccharidiques, eux-mêmes constitués de monomères (xylose, mannose, galactose, rhamnose ou arabinose), qui présente des ramifications avec d'autres sucres. Naturellement, les hémicelluloses sont associées aux fibres de cellulose, ainsi il a été montré que les enzymes cellulolytiques peuvent également dégrader l'hémicellulose. Toutefois des enzymes spécifiques existent aussi, il s'agit de glycosides hydrolases et d'estérases, qui vont hydrolyser le squelette et les ramifications formant l'hémicellulose pour libérer *in fine* des sucres monomériques (Pérez et al., 2002; Cragg et al., 2015). Ces enzymes sont couramment coproduites par les organismes cellulolytiques (Lynd et al., 2002).

La composition de la **lignine** est très variable car sa synthèse dépend des conditions physico-chimiques du sol, mais elle est principalement constituée d'alcools phénoliques (i.e. alcool coumarylique, coniférylique et sinapylique). La dégradation de la lignine nécessite l'intervention d'une variété d'enzymes dont des laccases (phénol oxydases) et lignines peroxydases. Des gènes fonctionnels impliqués dans la dégradation de la lignine ont été majoritairement retrouvés chez les basidiomycètes de la pourriture blanche et brune (e.g. *Phanerochaete chrysosporium*, *Gloeophyllum trabeum*). Ces gènes ont également été

identifiés chez des espèces bactériennes appartenant aux Actinobactéries (e.g. *Streptomyces viridosporus*), Proteobactéries (e.g. *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas putida*) et Firmicutes (e.g. *Bacillus pumilus*). Enfin, la fonction laccase a également été retrouvée chez 3 espèces d'archées appartenant aux Haloarchées (e.g. *Haloferax volcanii*; *Haloterrigena turkmenica*) (Bugg et al., 2011; Tian et al., 2014; Cragg et al., 2015).

La dégradation des principaux polymères carbonés de la litière génère ainsi des composés de faibles poids moléculaires, plus simples et facilement assimilables, tels que des sucres monomériques, qui sont généralement utilisés par les organismes dégradeurs ou d'autres microorganismes pour leur métabolisme et leur croissance, *via* les mêmes processus que ceux décrits pour la dégradation des sucres fournis *via* les rhizodépôts (Cf. Chap. 1, § 1.2.3.2).

Par ailleurs, comme nous venons de le voir, les fonctions de dégradations des polymères carbonés de haut poids moléculaires sont relativement répandues chez les microorganismes. Toutefois, elles sont susceptibles d'être perturbées, voire de disparaître dans des sols soumis à de fortes pressions anthropiques chroniques, entravant de ce fait le fonctionnement du cycle du carbone.

1.2.3 Le pool rhizodépôts et les exsudats racinaires

1.2.3.1 Définition et composition

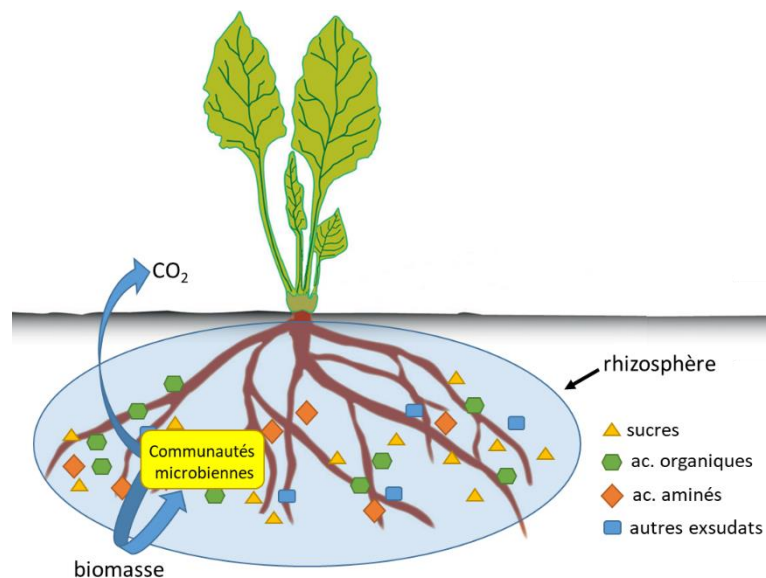


Figure 1.3. Représentation schématique de la rhizosphère. Les flèches bleues montrent l'utilisation des exsudats racinaires par les communautés microbiennes.

Les **rhizodépôts** sont libérés dans la rhizosphère, zone de sol sous l'influence des racines (**Figure 1.3**) (Gobat et al., 2010). Les rhizodépôts sont constitués de mucilage et de lysats solubles et volatiles produits par les cellules endommagées des racines, et d'exsudats racinaires libérés par les cellules végétales intactes (Dennis et al., 2010). Les exsudats racinaires se composent d'une très grande variété de molécules, principalement de faible poids moléculaire, comprenant des sucres, des acides organiques, des acides aminés, des composés phénoliques, des vitamines, des enzymes et des molécules de signalisation impliquées dans les interactions microorganismes-plantes (**Tableau 1.1**). La variété des exsudats racinaires et leur composition dépendent de l'espèce végétale, de l'âge de la plante, mais aussi des facteurs biotiques et abiotiques de la rhizosphère (e.g. pollution, carence en certains éléments, associations mycorhiziennes) (Jones et al., 2004). Par exemple, il a été montré qu'en cas de carence en phosphates, les racines du lupin exsudaient 13 à 40 fois plus d'acide malique et d'acide citrique (qui constituaient alors plus de 90% des exsudats totaux), et ce dans le but d'acidifier l'environnement proche pour faciliter la solubilisation du phosphate (Hoffland et al., 1989; Jones, 1998). De la même manière, Rovira, (1969) explique que les plants d'avoine et de pois relâchent davantage de sucres et d'acides aminés durant les 10 premiers jours de leur croissance. Différentes études ont également montré que la colonisation des racines par des champignons mycorhiziens à arbuscules modifiait la composition des exsudats (e.g. augmentation de la sécrétion d'azote, de composés phénoliques, de gibbérellines et réduction de la sécrétion des sucres, des ions potassiums et du phosphore) (Jones et al., 2004). Les exsudats étant constitués de nombreuses sources de carbone, ils vont induire à la fois une augmentation de l'abondance et de l'activité microbienne (on parle d'effet rhizosphère) et à la fois une compétition nutritionnelle entre les microorganismes selon leur capacité à dégrader les composés exsudés.

Tableau 1.1. Exemple des composés retrouvés dans les exsudats racinaires chez la plante modèle *Arabidopsis*. D'après Badri et Vivanco (2009).

Class of compounds	Single components ^a
Carbohydrates	Arabinose, glucose, galactose, fructose, sucrose, pentose, rhamnose, raffinose, ribose, xylose and mannitol
Amino acids	All 20 proteinogenic amino acids, L-hydroxyproline, homoserine, mugineic acid, aminobutyric acid
Organic acids	Acetic acid, succinic acid, L-aspartic acid, malic acid, L-glutamic acid, salicylic acid, shikimic acid, isocitric acid, chorismic acid, sinapic acid, caffeic acid, <i>p</i> -hydroxybenzoic acid, gallic acid, tartaric acid, ferulic acid, protocatechuic acid, <i>p</i> -coumaric acid, mugineic acid, oxalic acid, citric acid, piscidic acid
Flavonols	Naringenin, kaempferol, quercetin, myricetin, naringin, rutin, genistein, strigolactone and their substitutes with sugars
Lignins	Catechol, benzoic acid, nicotinic acid, phloroglucinol, cinnamic acid, gallic acid, ferulic acid, syringic acid, sinapoyl aldehyde, chlorogenic acid, coumaric acid, vanillin, sinapyl alcohol, quinic acid, pyroglutamic acid
Coumarins	Umbelliferone
Aurones	Benzyl aurones synapates, sinapoyl choline
Glucosinolates	Cyclobrassinone, desuphugonapin, desulphoprogoitrin, desulphonapoleiferin, desulphoglucoalyssin
Anthocyanins	Cyanidin, delphinidin, pelargonidin and their substitutes with sugar molecules
Indole compounds	Indole-3-acetic acid, brassitin, sinalexin, brassilexin, methyl indole carboxylate, camalexin glucoside
Fatty acids	Linoleic acid, oleic acid, palmitic acid, stearic acid
Sterols	Campesterol, sitosterol, stigmasterol
Allomones	Jugulone, sorgoleone, 5,7,4'-trihydroxy-3', 5'-dimethoxyflavone, DIMBOA, DIBOA
Proteins and enzymes	PR proteins, lectins, proteases, acid phosphatases, peroxidases, hydrolases, lipase

1.2.3.2 Dégradation des composés carbonés de faible poids moléculaire

Les exsudats racinaires peuvent être dégradés par une très large variété de microorganismes. En effet, les fonctions de dégradation de la plupart des composés de faibles poids moléculaire (notamment des sucres simples) semblent être réparties de façon ubiquitaire au sein des communautés microbiennes (Macura and Kubátová, 1973), bien qu'elles ne soient pas présentes chez toutes les espèces microbiennes. En outre, une préférence d'utilisation existe entre les substrats carbonés ; celle-ci est liée à une régulation du métabolisme appelée « répression catabolique » (Stülke and Hillen, 1999). Ainsi, Macura et Kubátová (1973) ont observé que l'utilisation du galactose était inhibée en présence de glucose et augmentait seulement lorsque tout le glucose avait été consommé.

Par ailleurs, Jones et al. (2003) expliquent que les communautés microbiennes utilisent principalement les sucres et acides aminés pour leur croissance (assimilation), tandis que les acides organiques sont essentiellement utilisés pour la respiration (minéralisation). Ainsi, généralement 20–40% du carbone des acides aminés serait minéralisé, tandis que le reste serait incorporé dans la biomasse (Jones, 1999). Les acides carboxyliques, quant à eux, seraient principalement minéralisés en CO₂ (Jones et al., 1996).

Pour leur dégradation, ces composés de faible poids moléculaire doivent d'abord pénétrer dans la cellule *via* des transporteurs membranaires plus ou moins spécifiques (e.g. transporteur ABC ; transporteur de la superfamille des facilitateurs : MFS), avant leur prise charge et dégradation par le métabolisme. Par exemple, certains transporteurs des hexoses chez les bactéries sont des phosphotransférases (*PTS*, *phosphotransferase system*) qui sont

des complexes perméase sucre-spécifique (Simoni et al., 1976) dont le type définit les préférences métaboliques de chaque bactérie (Jojima et al., 2010). En plus de transporteurs spécifiques, la dégradation des substrats de faible poids moléculaire nécessite certains gènes fonctionnels métaboliques pour entrer dans le métabolisme central. Par exemple, chez *E. Coli*, la dégradation du D-arabinose passe par l'intervention d'une isomérase qui le transforme en D-ribulose conduisant ce composé vers la voie des pentoses phosphates ou la glycolyse (Boulter and Gielow, 1973; Caspi et al., 2014).

Néanmoins, les différents gènes fonctionnels ne sont pas portés par tous les microorganismes. Ces fonctions vont définir la gamme de composés utilisables et donc les préférences métaboliques de l'organisme et sont notamment utilisées dans leur typage fonctionnel (Truu et al., 1999).

1.2.4 Effet rhizosphère et *priming effect*

Les exsudats racinaires sont connus pour induire une augmentation de l'abondance et de l'activité microbienne, stimulant la minéralisation du carbone dans les sols : on parle d'effet rhizosphère. L'augmentation de la minéralisation du carbone est généralement attribuée au *priming effect* induit par les exsudats. Le mécanisme du *priming effect* n'étant pas totalement élucidé, il est souvent supposé que les composés exsudés biodisponibles induisent une augmentation de l'activité microbienne et de la production d'enzymes en servant de source d'énergie et de carbone rapidement biodisponibles (Kuzyakov et al., 2000; Fontaine et al., 2003). Par ailleurs, de récents travaux suggèrent un second mécanisme stimulant la minéralisation du carbone. Keiluweit et al. (2015) ont ainsi montré que l'acide oxalique provoque la libération des composés organiques protégés par une association avec les phases minérales du sol. Ainsi, en améliorant l'accès des microorganismes aux composés protégés par des minéraux, les exsudats (et notamment l'acide oxalique) stimuleraient également la minéralisation du carbone de manière indirecte.

1.3 Dynamique du carbone dans les sols

Dans les sols, le carbone (matière organique) est stocké durant une période plus ou moins longue, allant de quelques minutes à plusieurs centaines, voire milliers d'années. Ce temps de résidence dépend de la compétition entre les processus de **stabilisation** et de **dégradation** de la matière organique. Dans cet état de l'art, nous évoquerons d'abord les mécanismes permettant de protéger la matière organique de la dégradation microbienne (stabilisation),

puis nous aborderons l'influence des conditions environnementales sur l'activité de décomposition (dégradation).

1.3.1 Processus de stabilisation de la matière organique

La stabilisation fait référence aux mécanismes conduisant à une augmentation du temps de résidence de la matière organique, en retardant sa minéralisation par les microorganismes. On peut considérer 3 types de mécanismes conduisant à une protection de la matière organique (Lützow et al., 2006) :

i) La préservation sélective due à la **récalcitrance** de certaines molécules (Krull et al., 2003) de par leur structure **chimique** particulière et leur composition (Kleber, 2010). Les sucres simples (e.g. glucose) sont, par exemple, considérés comme les composés les plus labiles et facilement dégradables. À l'inverse, les composés possédant des noyaux aromatiques tels que la lignine sont beaucoup plus récalcitrants et résistants à la décomposition. Pour illustrer ceci, on peut citer Minderman (1968) qui a observé qu'au bout d'un an, 99% des sucres, contre 50% de la lignine initialement présents dans la litière étaient dégradés (**Figure 1.4**). La dégradation de composés récalcitrants nécessite des microorganismes hautement spécialisés, possédant souvent un grand nombre d'enzymes spécifiques pour réaliser l'ensemble des étapes de dégradation (Gleixner et al., 2001). Etant très spécialisées, ces fonctions sont généralement moins redondantes et moins répandues que les fonctions de dégradation de substrats simples. Enfin la récalcitrance est aussi **énergétique** puisque pour un composé récalcitrant chimiquement, les bénéfices énergétiques par unité de carbone seront plus faibles que pour un composé labile.

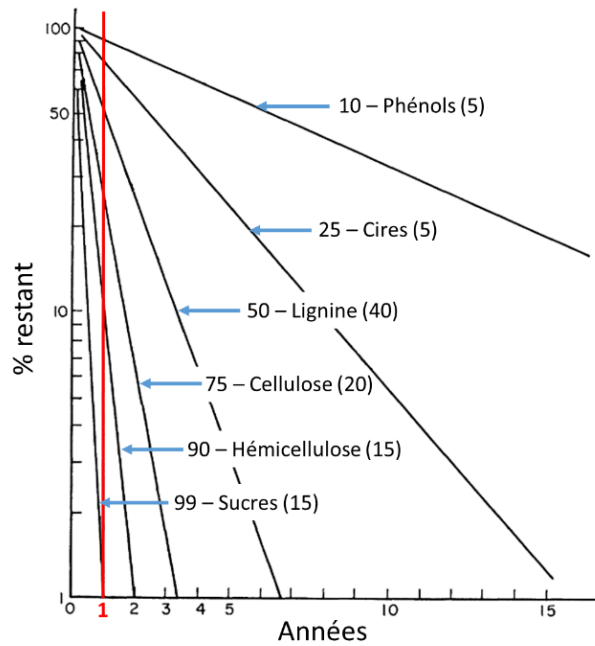


Figure 1.4. Courbes de décomposition de divers groupes de constituants de la litière. Schéma modifié d'après Minderman (1968). Les lignes noires représentent les courbes de décomposition (% de composé restant au cours du temps). Le premier nombre avant le nom des constituants indique le % décomposé au bout d'un an. Les intersections entre la ligne rouge et les courbes de décomposition permettent de visualiser ces valeurs. Les nombres après le nom des constituants représentent leur % massique dans la litière (avant le début du processus de décomposition).

ii) L'**inaccessibilité spatiale** vis-à-vis des organismes décomposeurs (Lützow et al., 2006). En effet, la matière organique peut être protégée par stabilisation physique (i.e. dans les micropores des agrégats ou par encapsulation), ce qui a pour effet de réduire physiquement l'accès des microorganismes et de leurs enzymes aux composés, limitant, voire empêchant leur dégradation. John et al. (2005) ont ainsi observé que l'âge moyen de la matière organique « libre » était de 22 ans, contre 83 ans pour la matière organique protégée au sein d'agrégats.

iii) La stabilisation par **interaction avec les surfaces minérales**. En effet, au travers de diverses liaisons chimiques (e.g. hydrogènes, covalentes, ioniques), la matière organique peut s'associer aux minéraux sous forme de couches successives. La dégradation de la matière organique par les microorganismes nécessite alors sa désorption des surfaces minérales qui est souvent énergétiquement défavorable. Ainsi, généralement les couches les plus profondes ne pourront être dégradées que si le minéral est dissout (Torn et al., 2009). Par ailleurs, l'adsorption des molécules organiques s'accompagne de changements structuraux qui peuvent rendre les molécules inattaquables par les enzymes extracellulaires (Lützow et al., 2006). Kalbitz et al. (2005) ont ainsi observé, en condition contrôlées, que la minéralisation

était réduite de 20 à 30% lorsque la matière organique était adsorbée sur les minéraux du sol, en comparaison de la minéralisation de la matière organique en solution.

1.3.2 Influence des conditions environnementales sur la dégradation de la matière organique

Le processus de dégradation d'un composé correspond à l'ensemble des étapes (fonctions) menant à sa minéralisation et/ou à son assimilation, majoritairement réalisées par les communautés microbiennes. Ainsi, à travers leur influence sur les communautés microbiennes, le climat (température, humidité) ou les propriétés physico-chimiques du sol (pH, texture, disponibilité en nutriments, ratio C:N) vont contrôler sa dégradation dans le sol.

La plupart des paramètres des sols s'influencent les uns les autres, il est difficile de faire des généralités concernant leur impact sur la dégradation de la matière organique du sol, cependant certaines tendances ont pu être observées pour certains paramètres clé tels que le pH et la disponibilité en azote. Rousk et al. (2009) ont étudié la croissance microbienne et la minéralisation du carbone dans des échantillons de sols présentant un gradient de pH 4 à 8. Ils ont observé que la croissance des bactéries et des champignons était, respectivement, positivement et négativement corrélée au pH. Ils ont également observé que le taux de minéralisation diminuait d'un tiers à pH acide. À l'inverse, en étudiant l'effet d'une augmentation de pH par ajout de chaux, Grover et al. (2017) ont observé une diminution du taux de minéralisation du carbone lorsque le pH augmente (d'environ 4,5 à 6-6,5) et supposent que le carbone était plutôt assimilé dans la biomasse microbienne que minéralisée.

De la même manière, différents auteurs ont observé que l'apport d'azote n'avait pas d'effet ou impactait négativement la minéralisation de la matière organique (Fog, 1988; Potila and Sarjala, 2004), tandis que la dégradation de la litière était positivement impactée par son taux d'azote et de phosphore (Zhang et al., 2008; Van Nevel et al., 2014). Par ailleurs, Craine et al. (2007) ont observé qu'un apport d'azote réduisait le taux de décomposition du carbone récalcitrant, tout en augmentant l'utilisation du carbone labile, ce qui se traduit, dans l'ensemble, par une diminution des taux de décomposition. Ces différentes observations pourraient s'expliquer par le processus « d'extraction d'azote microbien » (*Microbial nitrogen mining*). Brièvement, dans les sols pauvres en azote disponibles, les microorganismes utiliseraient l'azote contenu dans la matière organique récalcitrante (Moorhead and Sinsabaugh, 2006), un apport d'azote disponible diminuerait donc la minéralisation. Il apparaît donc que le ratio C:N du sol de même que celui du substrat (He and Yu, 2016) seraient tout

deux cruciaux pour l'efficacité de la dégradation de la matière organique, mais d'autres études sont encore nécessaires pour en comprendre toute la mesure.

1.4 Les communautés microbiennes dans les sols

Dans le sol, il existe une très grande variété de microorganismes, que l'on étudie généralement à l'échelle des communautés microbiennes. Ce terme se réfère à un ensemble de microorganismes qui partagent un espace de vie commun, au même moment, et interagissent entre eux et avec leur environnement (Atlas and Bartha, 1998). Une communauté microbienne constitue ainsi un assemblage dynamique de nombreuses espèces de bactéries, d'archées, de champignons, de microalgues et de protozoaires (Bertrand et al., 2011). Dans cette thèse, nous nous concentrerons sur les plus abondants d'entre eux, à savoir les bactéries, les champignons et les archées. L'intérêt d'étudier les microorganismes à l'échelle des communautés réside notamment dans le fait que, dans un écosystème, la communauté peut être considérée comme une sorte « d'unité microbienne », à la fois plus globale et plus intégrative que l'espèce pour l'étude du fonctionnement des sols. Par ailleurs, en écologie microbienne, les chercheurs tentent généralement de répondre à deux grandes questions : « qui est là ? » et « qui fait quoi ? » (Nealson, 1997). Ces deux questions peuvent être abordées (à l'échelle des communautés) *via* l'étude, respectivement, de la diversité taxonomique et de la diversité fonctionnelle.

1.4.1 La diversité taxonomique

La taxonomie est la science de la classification des êtres vivants, dont le but est de les décrire et les regrouper sous forme d'entités conceptuelles appelées taxons (e.g. phylum, genre, espèce), afin de les nommer et de les classer (Larousse, 2018). Pour les communautés microbiennes, la diversité taxonomique (diversité et répartition des taxons) est étudiée séparément pour les 3 grands règnes : bactéries, champignons et archées.

Aujourd'hui, moins de 1% des microorganismes sont cultivables. Ainsi, l'une des méthodes les plus couramment utilisées pour estimer la diversité taxonomique se base sur le séquençage haut-débit (e.g. Illumina ; Gloor et al., 2010) de régions d'ADN conservées, permettant de s'affranchir des méthodes culturales. La diversité taxonomique des bactéries et des archées est ainsi obtenue par séquençage d'une partie du gène codant l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), tandis que la diversité fongique peut être établie *via* le séquençage d'une partie de l'ADNr 18S ou d'un ITS (*internally transcribed spacer* ; i.e. région situées entre les ADNr 18S,

5,8S et 28S ; Bertrand et al., 2011). Les séquences présentant un grand pourcentage de similarité (généralement 97%) sont ensuite regroupées en OTU (*operational taxonomic unit*). Ces dernières sont utilisées pour calculer différents indices mathématiques reflétant la diversité taxonomique (Hill et al., 2003 ; chap. 2 § 3.7.1), et permettent également, par affiliation taxonomique, d'estimer la composition taxonomique de la communauté. Néanmoins les classifications évoluent rapidement et de nouveaux groupes phylogénétiques sont régulièrement décrits à mesure que de nouvelles espèces sont mises en évidence.

1.4.1.1 Communautés bactériennes

Avec une estimation allant de 10^3 à 10^7 "espèces" retrouvées en moyenne dans un échantillon de sol (Curtis et al., 2002; Torsvik et al., 2002; Gans et al., 2005), les bactéries sont généralement considérées comme le groupe de microorganismes du sol le plus divers (Buckley and Schmidt, 2002). Par ailleurs, la diversité taxonomique des communautés bactériennes est extrêmement variable selon l'environnement d'où elles proviennent. Néanmoins, à partir d'une variété de sols, Janssen (2006) a observé que les séquences d'ADNr 16S étaient majoritairement affiliées aux phyla des Protéobactéries (40%), Acidobactéries (20%), Actinobactéries (13%) et Verrucomicrobia (7%). Par une approche similaire Roesch et al. (2007) ont également observé que plus de 40% des séquences correspondaient aux Protéobactéries tandis que les Acidobactéries et Actinobactéries ne représentaient chacun qu'environ 3 à 10% des séquences et les Verrucomicrobia moins de 5%. Par ailleurs, Delgado-Baquerizo et al. (2018) ont étudié la composition des communautés bactériennes provenant d'échantillons de plus de 200 sols prélevés à travers le monde. Ils ont ainsi montré que les phylotypes¹ majoritaires ne représentaient que 2% du nombre total de phylotypes détectés, mais constituaient 41% de la totalité des séquences d'ADNr 16S. Ces phylotypes majoritaires étaient affiliés aux Protéobactéries (37%) aux Actinobactéries (31%) et aux Acidobactéries (13%) (**Figure 1.5**). Ces différents travaux illustrent bien la très grande variabilité de composition des communautés, mais montrent toutefois que certains phyla tels que les Protéobactéries, Actinobactéries et Actinobactéries sont ubiquitaires et dominant la plupart les communautés bactériennes des sols.

¹ Il s'agit d'une sorte d'unité taxonomique, mais qui se différencie des OTU dans le sens où le regroupement se fait par similarité avec une séquence d'ADN de référence, appartenant à un jeu de données préexistant, et à laquelle est souvent lié un nom taxonomique.

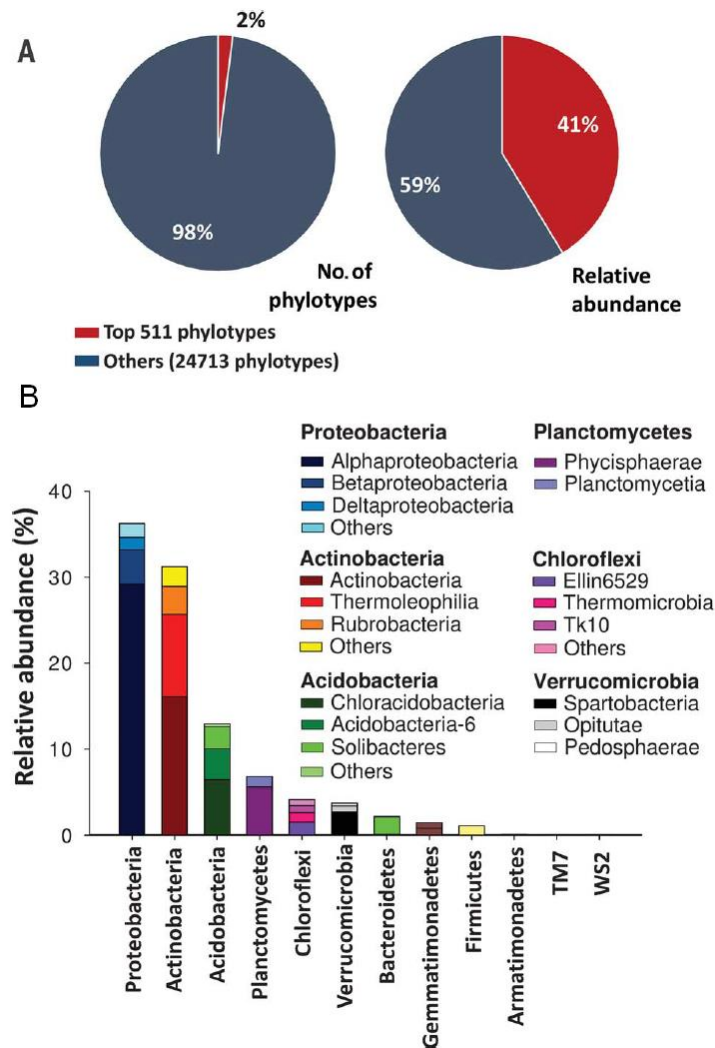


Figure 1.5. Abondance et composition des phylotypes bactériens dominants dans les sols à travers le monde. Figure extraite de Delgado-Baquerizo et al. (2018). (A) Pourcentage des phylotypes et relative abondance des gènes d'ARNr 16S représentant les phylotypes bactériens dominants versus les phylotypes bactériens restants. (B) Composition taxonomique des phylotypes dominants. Les phylotypes assignés aux phyla les moins abondants ne sont pas montrés (avec notamment *Armatimonadetes* = 0,08%, *TM7* = 0,05% et *WS2* = 0,03%).

1.4.1.2 Communautés fongiques

À l'heure actuelle, plus de 10^5 espèces de champignons ont été décrites, mais on estime que la diversité totale des champignons sur la Terre s'élèverait à près de 5×10^6 espèces (Blackwell, 2011). Comme les bactéries, la composition des communautés fongiques est variable d'un sol à un autre. Toutefois, en analysant les séquences d'ADNr 18S provenant de plus de 350 sols d'origines variées (forêt tempérée, boréale, tropicale, savane, prairie, toundra arctique...), Tedersoo et al. (2014) ont observé qu'en moyenne, les Basidiomycètes, les Ascomycètes, les Mortierellomycètes et Mucoromycètes représentaient respectivement 55,7%, 31,4%, 6,3% et 4,4% des organismes dans les communautés fongiques. À l'aide d'une approche semblable sur

un sol forestier tempéré, Buée et al. (2009) ont obtenu des résultats similaires : les Basidiomycètes (44%), Ascomycètes (17%) et *Mortierella* (8%) représentaient les taxons les plus abondants.

1.4.1.3 Communautés archées

Pendant longtemps, les archées ont été associées aux environnements dits « extrêmes ». Néanmoins, de plus en plus d'archées sont identifiées dans une grande variété d'environnements tels que les milieux aquatiques marins ou d'eau douce (Keough et al., 2003; DeLong, 2005; Kim et al., 2005; Knittel et al., 2005) mais également dans les sols forestiers, agricoles ou de tourbières (Ochsenreiter et al., 2003; Galand et al., 2005; Kemnitz et al., 2007; Gubry-Rangin et al., 2010; Uroz et al., 2016), ou encore associés aux racines de plantes (Simon et al., 2000). On sait aujourd'hui que les archées constituent une fraction significative des procaryotes dans le sol, représentant en général 10% des phylotypes totaux (Robertson et al., 2005; Uroz et al., 2016). En comparant la composition des communautés d'archées d'une large diversité d'écosystèmes, Auguet et al. (2010) ont observé que la diversité des archées des sols était réduite et que la majorité de ces archées appartenaient à quelques groupes phylogénétiques, notamment au groupe 1.1b des Crenarchaeota. À noter que depuis, le groupe 1 des Crenarchaeota, qui correspond à des archées mésophiles, a été reclassifié pour devenir le phylum des Thaumarchaeota (Brochier-Armanet et al., 2008, 2011). De manière similaire, en étudiant environ 150 sols, Bates et al. (2011) confirme le résultat d'Auguet et al. (2010) et indique que 90,9% des séquences d'archées appartenaient au groupe 1.1b. En outre dans des sols forestiers ou de savane acide, les Thaumarchaeota serait le phylum dominant (Catão et al., 2013; Uroz et al., 2016). Ce phylum est connu pour contenir les archées oxydant l'ammonium (*ammonia-oxidising archaea*, AOA).

L'étude de la diversité taxonomique par séquençage apporte de nombreuses informations sur les taxons présents dans la communauté mais ne fournit pas réellement de renseignement sur le rôle fonctionnel de ces derniers dans l'environnement. En effet, bien que certains taxons et groupes fonctionnels (souvent monophylétiques) soient connus pour posséder des fonctions spécifiques (e.g. bactéries nitrifiantes, méthanogènes, ou encore sulfato-réductrices), les fonctions portées par la plupart des taxons ne peuvent pas être prédites à partir de leur affiliation taxonomique.

1.4.2 La diversité fonctionnelle

Le rôle clé des communautés microbiennes du sol dans le fonctionnement des écosystèmes terrestres est assuré, certes par leur diversité taxonomique, mais surtout par leur diversité fonctionnelle. Classiquement, la diversité fonctionnelle est définie comme la diversité des traits, ces derniers étant des caractéristiques morphologiques, phénotypiques, biochimiques, physiologiques, structurales, génomiques ou comportementales des organismes (Violle et al., 2007). Néanmoins, bien que la notion de traits soit bien adaptée aux macro-organismes tels que les plantes, elle est plus difficilement transposable aux communautés microbiennes. Ainsi dans cette thèse nous considérerons la diversité fonctionnelle comme la diversité des fonctions (voir définition au Chap. 1, § 1.1) réalisées par une communauté microbienne donnée. De plus, cette thèse s'attache à étudier le fonctionnement du cycle du carbone, c'est pourquoi nous aborderons essentiellement la diversité des fonctions liées à ce cycle biogéochimique.

Il existe différentes méthodes pour étudier la diversité fonctionnelle, qu'on peut classer en méthodes « moléculaires » (basées sur les ADN, ARN et protéines) et en méthodes de « mesures d'activités microbiennes ».

À l'aide d'approches de méta-génomique, méta-transcriptomique ou méta-protéomique, on peut ainsi étudier la diversité et l'abondance de gènes, de transcrits ou d'enzymes qui reflètent la présence des différentes fonctions. À titre d'exemple, on peut citer l'utilisation de la PCR quantitative en temps réel ou des puces à ADN/ARN (ou « *microarray* ») qui permettent de quantifier des gènes ou leur expression et d'en déduire la présence de fonctions (Cébron et al., 2008; Liang et al., 2009). De la même manière, des approches isotopiques, telle que la technique de *Stable Isotope Probing* (SIP), permettent d'étudier les fonctions impliquées dans la dégradation d'un substrat (marqué au ^{13}C), et même de relier ces fonctions à une diversité taxonomique (Dumont and Murrell, 2005). Par exemple, dans une étude sur les communautés de sols agricoles Chen et al. (2018) ont mis en évidence que des bactéries non-cultivées du genre *Pseudonocardia* étaient les acteurs majeurs de la dégradation du pyrène. Il a également été montré que l'exploitation forestière induisait une augmentation de l'abondance relative des champignons cellulolytiques (i.e. Chaetomiaceae) couplée à une diminution de l'abondance relative des bactéries cellulolytiques (i.e. Opitutaceae, *Caulobacter*, et Streptomycetaceae), conduisant à une diminution de la respiration et de l'activité de dégradation de la cellulose (Wilhelm et al., 2017). Les approches en « -omique » ont l'avantage d'apporter de nombreuses informations, permettant de déduire une diversité

fonctionnelle mais sont limitées par nos connaissances des gènes fonctionnels identifiés à l'heure actuelle. À l'inverse, les approches isotopiques ont l'avantage d'étudier la ou les fonctions directement à partir de son expression/activité dans un échantillon et sans a priori génétique, mais ne permettent d'examiner qu'un nombre plus restreint de fonctions.

Les méthodes de mesures d'activité microbienne ont l'avantage d'étudier la présence d'une fonction en mesurant directement son activité. La méthode la plus simple consiste en la mesure d'activités enzymatiques à partir d'échantillons de sols, les plus mesurées étant les activités β -glucosidase et dehydrogenase (cycle C), Uréase (cycle N), Arylsulfatase (cycle S) et alcaline phosphatases (cycle P) (Hemida et al., 1997; Andreoni et al., 2004; Shen et al., 2005; Winding and Hendriksen, 2007). Néanmoins, les activités enzymatiques couramment étudiées sont mesurées dans des solutions tampons et sont loin de représenter les activités réelles de l'échantillon *in situ*. Par ailleurs, les résultats peuvent parfois être compliqués à interpréter en terme de diversité fonctionnelle des communautés car les activités mesurées résultent de l'activité des microorganismes mais aussi des enzymes extracellulaires présentes dans le sol, dont l'origine n'est pas systématiquement microbienne (e.g. enzymes sécrétées par les racines), ces enzymes pouvant rester actives et persister dans les sols assez longtemps (Nannipieri et al., 2003).

Afin d'estimer la diversité fonctionnelle de manière plus exhaustive, on peut déduire un profil de réponse catabolique (CRP, *catabolic response profile*) à partir de l'analyse des capacités d'utilisation d'une variété de substrats carbonés grâce à l'outil Biolog[®], ou *via* la mesure de la respiration induite après l'ajout du substrat (SIR, *substrate-induced respiration*). En effet, l'outil Biolog[®] permet d'étudier la cinétique d'utilisation d'une variété de substrat carbonés (Zak et al., 1994; Konopka et al., 1998) dans un milieu de culture défini, et donc d'étudier la présence et l'expression de la variété des fonctions associées (cf. Chap. 2, § 3.2). Les données obtenues permettent de calculer l'AWCD (*Average Well Color Development* ou coloration moyenne des puits) qui représente l'activité moyenne de la communauté vis-à-vis des substrats testés. Néanmoins, les microplaques Biolog[®] ne permettent pas de mesurer les capacités fonctionnelles de l'ensemble de la communauté microbienne, mais seulement d'une partie correspondant à la fraction microbienne capable d'être active dans le milieu de culture et à partir des sources de carbone fournies (Preston-Mafham et al., 2002). Pour s'affranchir de ce biais et déterminer les capacités fonctionnelles de la communauté entière directement dans son environnement (i.e. le sol), on peut faire des mesures de SIR. Ces mesures peuvent être effectuées directement par mesure du rayonnement infrarouge du CO₂ (respiromètre)

ou indirectement à l'aide de l'outil MicroResp™ (cf. Chap. 2, § 3.2). Cette mesure, bien que plus proche des conditions réelles, nécessite davantage de matériel, de quantité d'échantillons et de temps pour tester la dégradation d'un nombre de substrats équivalent à la technique Biolog®. Les données obtenues à l'aide des méthodes de mesures d'activité microbiennes permettent d'estimer la diversité fonctionnelle sous forme d'indices de diversité fonctionnelle. Ainsi, on peut définir la richesse fonctionnelle, c'est-à-dire le nombre de substrats consommés par la communauté, et calculer un indice de Shannon fonctionnel, associé à un indice d'équitabilité (Pielou) fonctionnel tenant compte des taux de consommation de chaque substrat (cf. Chap. 2, § 3.7.2).

Le fonctionnement du cycle du carbone dans les sols nécessite la présence d'une multitude de fonctions qui peuvent être réalisées par une multitude d'organismes. La présence de ces fonctions est une sorte d'indicateur du fonctionnement du cycle du carbone.

1.4.3 Lien entre diversité et fonction

La diversité taxonomique et la diversité fonctionnelle sont 2 composantes de la biodiversité des communautés microbiennes, liées l'une à l'autre. Toutefois la relation entre ces 2 diversités reste encore très méconnue. Par ailleurs, la très grande richesse en espèces des communautés microbiennes en comparaison du nombre plus limité de fonctions dans les sols a mené à l'hypothèse d'une forte redondance fonctionnelle parmi les microorganismes (Bengtsson, 1998). La compréhension de ce lien et de l'importance de la redondance fonctionnelle est donc cruciale pour mieux comprendre le fonctionnement des écosystèmes et les conséquences de fortes pressions anthropiques (Gans et al., 2005).

Cette relation entre diversité et fonction a été étudiée par exemple sur les processus de décomposition (souvent en mesurant une perte de masse) ou sur la respiration (basale ou après l'ajout d'un substrat), notamment en faisant varier le niveau de richesse spécifique (obtenu par construction ou érosion de la biodiversité). Les différents auteurs ont ainsi observé des relations neutres (Griffiths et al., 2001b, 2000), négatives (où la compétition interspécifique peut surpasser l'effet positif dû à la complémentarité de niche ; Griffiths et al., 2001b, 2000; Toljander et al., 2006) ou positives (où la complémentarité des niches écologiques et les interactions de facilitation -i.e. commensalisme et mutualisme- sont majoritaires; Nielsen et al., 2011). Les relations positives peuvent être de 3 types (**Figure 1.6**) : linéaire (Tiunov et Scheu, 2005), asymptotique (Bell et al. 2005; Setälä et McLean 2004), ou idiosyncratique (Liebich et al. 2007; Wohl et al., 2004).

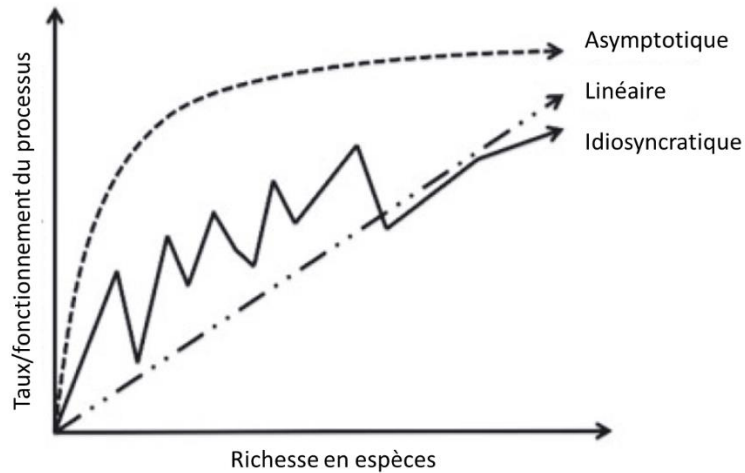


Figure 1.6. Représentation schématique des trois formes que peuvent prendre les relations positives entre la richesse en espèces et le taux/fonctionnement du processus. Modifié d'après Nielsen et al., (2011). *La relation positive linéaire se produit lorsque chaque espèce possède une ou des fonctions uniques, l'augmentation du nombre d'espèces aura donc une incidence positive sur les processus et le taux de décomposition. La relation de forme asymptotique se produit lorsque de multiples espèces partagent des fonctions communes. L'ajout d'une nouvelle espèce améliorera donc les processus de décomposition jusqu'à un seuil limite de richesse en espèces et au-delà, les fonctions apportées par une nouvelle espèce seront redondantes. La relation idiosyncratique aurait lieu lorsque des espèces possédant des fonctions similaires diffèrent dans leur capacité à améliorer un processus ou si les interactions biotiques améliorent (facilitation) ou inhibent (compétition) le fonctionnement / taux du processus ; dans cette relation la présence ou l'absence de certaines espèces bien spécifiques est plus important que la richesse en espèces elle-même, et une diversité minimum est nécessaire pour des fonctions et processus spécifiques.*

La plupart des études ayant exploré la relation entre la richesse spécifique (microbienne) et le fonctionnement des processus du cycle du carbone ont observé des relations asymptotiques ou idiosyncratiques, suggérant que les fonctions liées au cycle du carbone sont pour la plupart redondantes, mais que le niveau de redondance varie selon la fonction considérée. En plus de l'influence sur les processus du cycle du carbone en terme d'amplitude, la richesse en espèces peut également affecter le fonctionnement du cycle du carbone en terme de stabilité, c'est-à-dire de résistance et/ou de résilience à une perturbation. Comme précédemment, cette influence semble pouvoir être neutre, positive ou négative et suivre différentes formes (Griffiths et al., 2000, 2001b, 2004). Toutefois ces relations sont souvent observées pour des communautés simplifiées, il faut donc faire preuve de prudence quant à la transposition de ces résultats à l'échelle des communautés naturelles, dont la complexité est bien supérieure, justifiant la poursuite des études sur le lien diversité-fonction pour comprendre la relation entre la diversité taxonomique et la stabilité des processus du cycle du carbone.

1.4.4 Facteurs édaphiques influençant la diversité microbienne

Selon certains auteurs, l'**humidité** est l'un des principaux facteurs impactant la diversité et la structure des communautés. Par exemple, il a été montré une corrélation positive entre l'humidité et la biomasse microbienne totale (Brockett et al., 2012) mais également entre l'humidité et l'abondance des Protéobactéries (Zhang et al., 2013). De plus lorsque les précipitations augmentaient, les indices de diversité taxonomique (i.e. Chao1, Shannon et Simpson) ne changeaient pas alors que les abondances relatives des Protéobactéries, Bactéroidetes et Acidobactéries augmentaient, et celles des Actinobactéries, Chloroflexi et Gemmatimonadetes diminuaient mais ce phénomène pourrait s'expliquer par une augmentation de la couverture végétale et du C et N total et une diminution du pH (Yao et al. 2017). Par ailleurs, la sécheresse pourrait impacter négativement (dans un sol à 40% WRC, *water retention capacity* ; Wang et al. 2017) ou positivement (dans un sol plus sec à 15% WRC ; Klimek 2013) l'activité et la diversité fonctionnelle bactérienne (mesurées *via* l'outil Biolog®), tandis que ni l'activité ni la diversité fonctionnelle fongique ne seraient affectées par la température ou par l'humidité. Ces observations très variables entre les sols pourraient s'expliquer par le fait qu'au sein d'une communauté microbienne, les bactéries peuvent être soit sensibles, soit tolérantes, soit opportunistes face aux variations d'humidité et que cela dépend du taxon considéré (Evans and Wallenstein, 2014) ; les bactéries oligotrophes étant généralement plus résistantes au stress hydrique (de Vries and Shade, 2013; Evans and Wallenstein, 2014), tandis les copiotrophes y seraient plus sensibles (de Vries and Shade, 2013).

De la même manière, la **température** est un facteur contrôlant la diversité microbienne. Par exemple, Andrews et al. (2000) ont observé que la richesse en espèces (bactériennes) était plus faible à basse température (4°C) qu'à haute température (> 20°C). L'augmentation de la température pourrait d'une part diminuer la biomasse bactérienne et fongique, ce qui diminuerait l'utilisation des substrats carbonés (Frey et al., 2008), mais d'autre part favoriser les champignons par rapport aux bactéries (Zhang et al., 2005). L'impact de la température sur la diversité taxonomique bactérienne varie selon le type de sol et leur situation géographique (Lauber et al., 2013). Même si la biomasse microbienne est négativement affectée par une augmentation de la température, celle-ci stimule l'activité de dégradation de substrats carbonés dans un sol semi-aride (N. Zhang et al., 2013). Toutefois, en étudiant un gradient de sols allant du désert aride à la région méditerranéenne humide, Sherman et

Steinberger (2012) ont constaté que la diversité fonctionnelle microbienne était plus forte dans les sols humides, tandis que l'utilisation des substrats augmentait dans les sols arides.

L'**acidité** d'un sol est un autre paramètre majeur influençant la diversité microbienne mais son influence est différente selon les taxons. Pour un même sol présentant un gradient de pH, Rousk et al. (2010) ont montré que l'abondance bactérienne et les indices de diversité taxonomique apparaissent corrélés positivement au pH, alors que pour les champignons, seule la diversité semblait faiblement impactée par l'acidité du sol. Sur une plus large variété de sols, il semblerait que le pH modifie les abondances relatives des phyla bactériens (Lauber et al., 2009; Nacke et al., 2011) : les pH acides favoriseraient les α -Protéobactéries et les Acidobactéries tandis que les pH plus basiques favoriseraient les β -Protéobactéries, les Actinobactéries et les Bactéroidetes. Une diminution du pH pourrait aussi conduire à une baisse de la diversité fonctionnelle microbienne (Liu et al. 2018). Pourtant, en comparant des sols aux pH contrastés (pH 4 et 8), Malik et al. (2017) ont observé une faible diversité taxonomique dans les sols acides comparés aux sols basiques, mais pas de différence de diversité fonctionnelle catabolique.

Le contenu en **azote** total et en **carbone** organique, ainsi que le ratio **C:N** du sol sont également connus pour influencer la diversité bactérienne. Ainsi Will et al. (2010) ont montré une corrélation positive entre la diversité taxonomique et la quantité de carbone organique, d'azote total et le ratio C:N dans le sol. En étudiant l'impact du carbone, Fierer et al. (2007, 2012) ont décrit une abondance élevée d'Acidobactéries (et plus globalement de bactéries oligotrophes) dans un sol pauvre en matière organique et au contraire une abondance élevée de Bactéroidetes ou de β -Protéobactéries (bactéries copiotrophes) dans les sols contenant une grande quantité de carbone biodisponible. Les études suggèrent aussi que la diversité fonctionnelle métabolique est liée au contenu en carbone/matière organique du sol (Gomez et al., 2006; Zhao et al., 2013), ou aux fractions légères/labiles de la matière organique (Murphy et al., 2011; Tian et al., 2015). L'amendement en azote altérerait également la composition des communautés bactériennes, en augmentant l'abondance relative des Actinobactéries et des Firmicutes et, en diminuant celle des Acidobactéries et des Verrucomicrobia (Ramirez et al., 2010). Cette augmentation de l'azote, engendrerait aussi une diminution des activités microbiennes à cause d'un changement des capacités métaboliques (Ramirez et al., 2010) et une diminution de la diversité fonctionnelle (He et al., 2013; Li et al., 2013).

Finalement, il apparait que l'influence des facteurs environnementaux sur la diversité microbienne ne n'est pas encore complètement connue et que les résultats des études dépendent largement du type d'écosystème étudié. Ainsi, l'étude des liens entre les conditions physico-chimiques d'un milieu et la diversité des communautés microbienne doit encore être approfondie.

2 LES SOLS ANTHROPISES

2.1 L'anthropisation

L'anthropisation se définit comme un « processus par lequel les populations humaines modifient ou transforment l'environnement naturel » (Larousse, 2018). En effet, depuis plusieurs siècles, le développement exponentiel des sociétés humaines a considérablement impacté les 4 compartiments majeurs (i.e. biosphère, atmosphère, hydrosphère et lithosphère) de la surface terrestre, ayant de fait une forte incidence sur le fonctionnement des sols. L'anthropisation des sols concerne toutes les actions de l'Homme modifiant, d'une manière ou d'une autre, et plus ou moins fortement, le sol. Parmi les principaux facteurs d'anthropisation des sols, on peut citer la fertilisation et l'amendement, l'irrigation, ou encore l'élevage, utilisés pour améliorer/augmenter la production alimentaire, mais également la déforestation, l'urbanisation ou encore le développement des activités minières et industrielles, conduisant souvent au déversement volontaire ou non de déchets engendrant une pollution.

Bien que la notion de sol anthropisé soit facilement compréhensible, il n'existe pas de limite clairement définie entre un sol qu'on qualifierait de « naturel » ou « non anthropisé » et un sol anthropisé. L'anthropisation des sols s'exprime plutôt comme un gradient (**Figure 1.7**) allant de sols pas ou peu anthropisés, développés sous une végétation naturelle (e.g. certaines forêts), à des sols très anthropisés, complètement réaménagés en milieux urbains et/ou industriels (e.g. sols de friches).

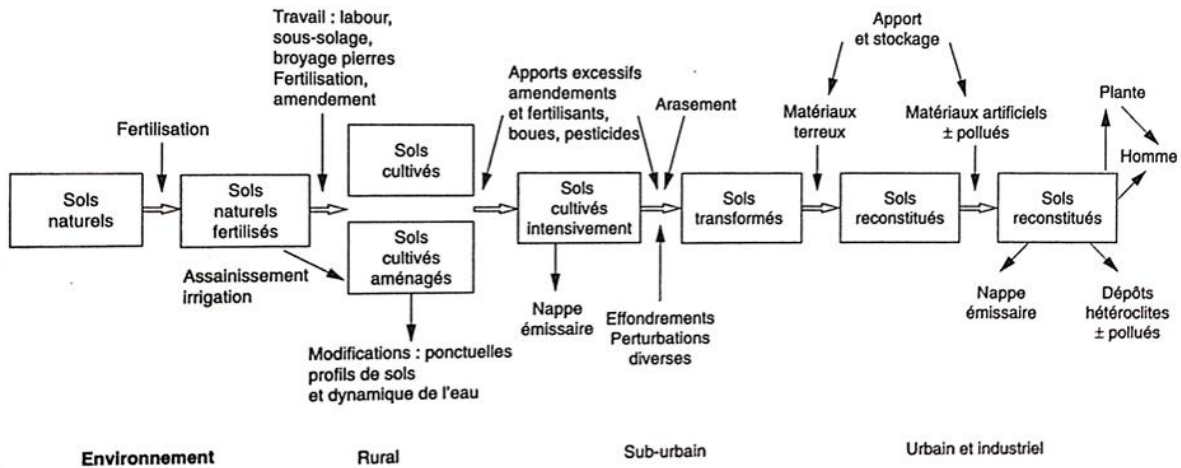


Figure 1.7. Le gradient d'anthropisation des sols. Extrait de Barles et al. (1999).

Parmi les sols que l'on peut considérer comme très anthropisés, nombre d'entre eux sont retrouvés sur les sites de friches industrielles. Or, ces dernières sont souvent multi-contaminées et leur gestion et leur réhabilitation/requalification constituent un enjeu sociétal croissant. Dans ce contexte, il y a un besoin de mieux comprendre le fonctionnement des sols de ces friches, pour mieux en évaluer les risques. Ainsi, dans cette thèse, nous nous intéresserons particulièrement aux sols de friches industrielles, avec comme modèle d'études les friches résultant de l'industrie sidérurgique.

2.2 La sidérurgie : source de multi-pollution

2.2.1 Brève histoire de l'industrie sidérurgique

Au début du XIX^{ème} siècle, l'industrie sidérurgique s'est particulièrement développée dans toute l'Europe. En France, la Lorraine a connu un essor de cette industrie grâce à l'exploitation du minerai de fer local (Minette de Lorraine) et au développement du procédé de la fonte au coke. Cependant, après plus d'un siècle d'exploitation, la Minette, relativement pauvre en fer (28 à 34%) a progressivement été remplacée par les minerais provenant de l'étranger, plus riches (60%), menant à la crise de la métallurgie en France. S'en est alors progressivement suivi l'abandon et le démantèlement des sites dédiés, laissant place à des friches souvent multi-contaminées par des hydrocarbures et des éléments en traces métalliques (ETM) liés à ces activités passées. Aujourd'hui, on recense près de 6000ha de friches industrielles en Lorraine, répartis sur environ 350 sites ("BASOL", 2016; DREAL, 2016). Devenu un enjeu sociétal, ces sites font, depuis plusieurs dizaines d'années, l'objet d'études en vue de leur rémediation et restauration (Biache et al., 2008; Ouvrard et al., 2011).

2.2.2 Activité sidérurgique et pollutions associées

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse ont porté sur l'étude de sols issus de sites d'anciennes cokeries, crassiers et bassins à boues de hauts fourneaux lorrains, particulièrement pollués par ces activités passées. Le type de pollution majoritairement retrouvé sur ces sites dépend généralement de leur rôle dans l'industrie sidérurgique (Figure 1.8).

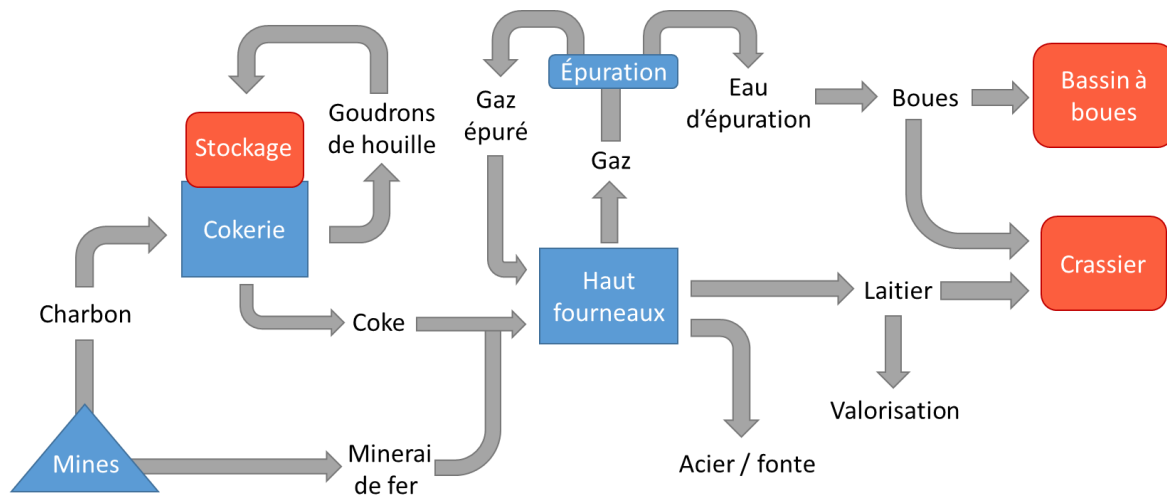


Figure 1.8. Schéma synthétique du fonctionnement de l'industrie sidérurgique et des déchets générés. Les encadrés bleus représentent les installations industrielles et les encadrés rouges les sites de stockage des déchets d'où proviennent les sols étudiés dans cette thèse.

Les cokeries sont des usines produisant du coke à partir du charbon brut par un procédé appelé cokéfaction. Lors de cette étape de transformation, des sous-produits sont formés, tel que du goudron de houille (Duchêne et al., 1991). Ce dernier constitue la source de contamination organique majeure (Luthy et al., 1994) et est à l'origine de la forte pollution aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) retrouvée sur les sites d'anciennes cokeries (Allard et al., 2000).

Le coke est ensuite utilisé comme combustible dans un haut fourneau afin de faire fondre le minerai de fer. Durant cette étape, des sous-produits sont également formés : le laitier, issu de la fusion des minéraux, de la gangue du minerai, et des gaz chargés de fines particules de coke et de minerai (Burteaux, 1991; Huot, 2013). Lorsqu'il n'était pas valorisé (e.g. matériau de remblai pour les routes), le laitier était stocké sous forme de terrils, aussi appelés crassiers. Ainsi, sur ces sites, on retrouve une pollution de nature organique (hydrocarbures) et métallique (e.g. Zn, Cd, Pb, Ni ; Ouvrard et al., 2011).

Les gaz étaient quant à eux valorisés, afin d'en réutiliser le pouvoir calorifique durant la fonte du minerai. Cette valorisation faisait intervenir une étape d'épuration par voie humide (Dhelt, 1994) produisant des eaux de lavages chargées de particules fines, qui sont ensuite mises à décanter, générant des boues avec une pollution organique (hydrocarbures) et métallique (principalement, Zn, Pb et Cd ; Mansfeldt and Dohrmann, 2004). Ces boues étaient ensuite stockées dans des bassins dédiés : les bassins à boues. Selon les sites, une partie de ces boues était parfois également déposée « au crassier » ("BASOL", 2016).

2.3 Conséquence de la multi-contamination sur le cycle du carbone

Dans les sols de friches industrielles sidérurgiques, la multi-contamination par des HAP et des ETM peut avoir diverses conséquences sur le fonctionnement du cycle du carbone (**Figure 1.9**).

La contamination par des HAP peut être vue sous 2 angles différents :

- i) Les HAP sont des composés xénobiotiques connus pour leur potentielle toxicité vis-à-vis de la plupart des êtres vivants (US EPA, 1985; Eom et al., 2007).
- ii) Les HAP sont des hydrocarbures, donc des molécules carbonées. À ce titre, ils constituent aussi un pool de carbone, et peuvent ainsi être potentiellement utilisés par les microorganismes possédant les fonctions nécessaires à leur dégradation et favoriser le développement de ces taxons spécialisés.

Très peu d'études montrent l'influence des HAP sur le fonctionnement des cycles biogéochimiques. Pourtant il a été montré que les HAP induisaient un enrichissement et/ou une diminution de certaines fonctions/gènes impliqués dans les cycles du carbone et de l'azote (Liang et al., 2009). Ainsi, la contamination par des HAP pourrait induire une pression de sélection sur les organismes impliqués dans les processus du cycle du carbone, et donc potentiellement altérer son fonctionnement. Toutefois, ce champ de recherche reste largement à explorer.

Les ETM, comme les HAP, sont connus pour leur effets toxiques sur les organismes vivants, et notamment les communautés microbiennes (Lemire et al., 2013), mais contrairement aux HAP, ils ne constituent pas une source de carbone. Il a par exemple été montré qu'une forte pollution au ETM pouvait inhiber l'activité nitrification, et donc le fonctionnement du cycle de l'azote (Yan et al., 2013; Yang et al., 2005). Ainsi, les ETM pourraient donc également exercer

une pression de sélection sur les acteurs du cycle du carbone, modifiant alors potentiellement son fonctionnement.

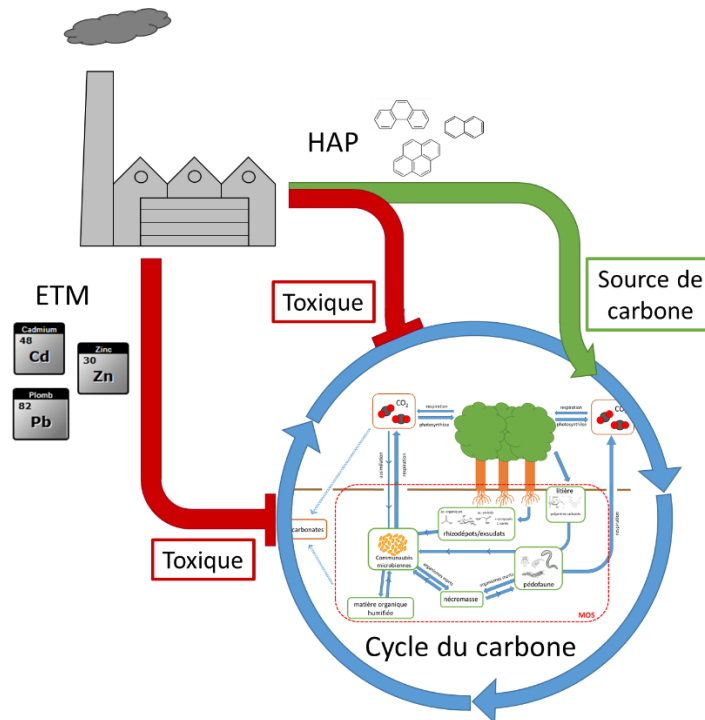


Figure 1.9. Impact de la multi-contamination aux HAP et aux ETM sur le cycle du carbone.

2.4 La pollution organique dans les sols : le cas des HAP

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques ou HAP, sont un groupe de composés organiques apolaires constitués d'au moins 2 cycles benzéniques accolés. *Stricto sensu*, ils ne sont constitués que d'atomes de carbone et d'hydrogène. Néanmoins des atomes d'oxygène, d'azote ou de soufre leur sont parfois associés sous forme d'hétérocycles ou de groupement fonctionnels (Andersson and Achten, 2015), on parle alors de CAP (composés aromatiques polycycliques). Il existe plus d'une centaine de HAP identifiés (ATSDR, 1995). Mais, au regard de leurs potentiels effets néfastes sur la santé (toxiques, cancérigènes et mutagènes), 16 HAP ont été définis comme prioritaires (**Figure 1.10**) par l'Agence Américaine pour la Protection de l'Environnement (US-EPA), dont 15 sont classés potentiellement cancérigènes par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC, 2008).

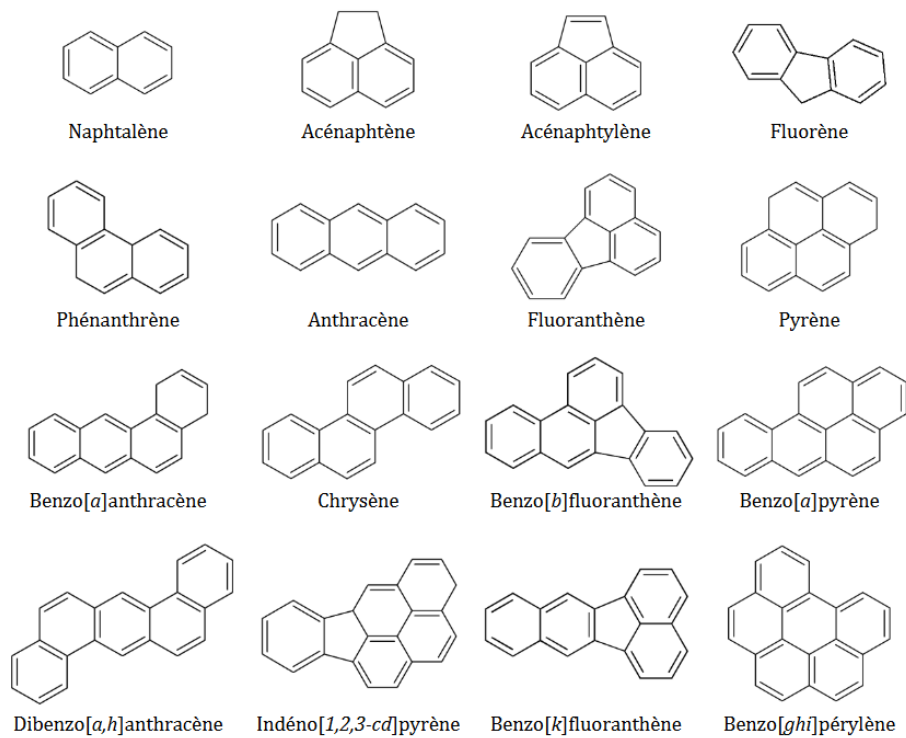


Figure 1.10. Les 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques prioritaires selon l'US-EPA.

Les 16 HAP réglementaires peuvent être classés en 2 groupes sur la base du nombre de cycles benzéniques : d'une part les HAP dits « légers », constitués de 2 à 3 cycles et d'autre part les HAP dit « lourds », formés de 4 à 6 cycles. Le niveau d'hydrophobicité et la volatilité de chaque HAP sont directement liés à leur nombre de cycles benzéniques et à leur agencement. Ainsi, plus un HAP aura de cycles et un poids moléculaire élevé, moins il sera volatile et soluble dans l'eau, et inversement (Mackay et al., 1992). Par exemple, le naphtalène qui possède 2 cycles benzéniques est soluble dans l'eau à 25°C à hauteur de 31 000 $\mu\text{g l}^{-1}$, tandis que le phénanthrène (3 cycles) ou le benzo[a]anthracène (4 cycles) sont respectivement solubles à hauteur de 1 100 et 11 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Maagd et al., 1998).

2.4.1 Origine des HAP

Les HAP peuvent avoir des origines différentes (naturelles ou anthropiques) et être générés selon des processus différents. On distingue ainsi les HAP formés selon des processus biogéniques, diagéniques et pyrogéniques (Tolosa et al., 1996). Les HAP biogéniques correspondent aux HAP biosynthétisés par des êtres vivants (tel que la formation de benzo[a]pyrène dans des jeunes plants de blé et de seigle ; Suess, 1976). Les HAP diagéniques (aussi appelés pétrogéniques) peuvent être formés lors des processus de diagénèse qui donnent naissance au pétrole et au charbon sur de longues périodes de temps. Hormis lors de

déversement dans l'environnement provoqués par l'action de l'Homme, les HAP diagéniques peuvent être considérés comme d'origine naturelle. Enfin, les HAP pyrogéniques sont issus de la combustion incomplète de la matière organique (i.e. bois, combustible fossile) à haute température (à partir de 350°C et jusqu'à plus de 1200°C). Ainsi, ils peuvent être naturels, émis par exemple au cours des éruptions volcaniques et des feux de forêts (Blumer, 1976; Wilson and Jones, 1993) ou d'origine anthropique lors de l'utilisation de matières fossiles (charbon, coke, goudron de houille) comme combustible (Richter and Howard, 2000).

2.4.2 Devenir des HAP dans les sols

Dans l'environnement, la part de HAP naturels étant très minoritaire, la très grande majorité des HAP retrouvés sont d'origine anthropique, générés par des processus pyrolytiques (Manzetti, 2013). On les retrouve ainsi à des teneurs allant de 42 à 11 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dans les sols naturels contaminés par des dépôts atmosphériques (Nam et al., 2008) et jusqu'à des concentrations dépassant 14 g kg^{-1} dans les sols les plus contaminés par l'activité humaine (Biache et al., 2017), tels que les friches industrielles (Cébron et al., 2013). Le devenir des HAP dans les sols est conditionné par leurs caractéristiques (forte hydrophobicité et faible solubilité dans l'eau) et par de nombreux processus biotiques et abiotiques (Semple et al., 2003) (**Figure 1.11**).

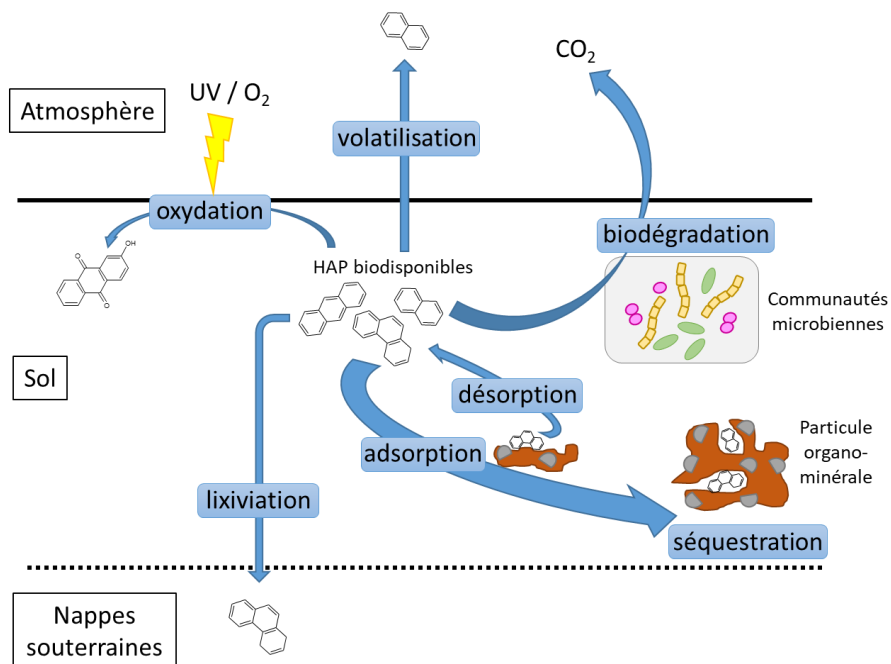


Figure 1.11. Principaux processus contrôlant le devenir des HAP dans les sols.

2.4.2.1 Les processus abiotiques

Les processus abiotiques regroupent l'oxydation, la volatilisation, la lixiviation et l'adsorption/désorption. L'**oxydation** correspond à la dégradation ou à la transformation des HAP sous l'action de l'oxygène ou des rayons UV (photo-oxydation). Ce processus a surtout lieu dans l'atmosphère et sur les premiers centimètres à la surface du sol. La photo-oxydation peut générer des métabolites (e.g. 2-hydroxy-anthraquinone à partir de l'anthracène) dont la toxicité est supérieure à la molécule mère (Mallakin et al., 1999). La **volatilisation**, plus importante pour les HAP dits « légers », est le passage des HAP en phase gazeuse. Dans le sol, la volatilisation dépend de l'humidité, du potentiel redox et du taux d'adsorption des HAP sur les constituants organo-minéraux (Ophoff et al., 1996; Wilcke, 2000). La **lixiviation**, qui dépend de la solubilité des HAP et de leur adsorption, engendre un transport des HAP présents dans les couches superficielles du sol vers les couches plus profondes. Toutefois ces trois processus sont minoritaires dans les sols. En revanche, les phénomènes d'**adsorption** des HAP sur les constituants du sol (matière organique et minérale), jouent un rôle prépondérant dans la persistance des HAP dans les sols (Semple et al., 2003). Cette adsorption dépend des propriétés du sol, les HAP s'adsorbant plus fortement sur la matière organique que sur les matières minérales (Appert-Collin et al., 1999), bien que la présence de particules d'argile facilite l'adsorption des HAP en comparaison d'une texture plus grossière (Carmichael and Pfaender, 2009). De plus, la teneur (Nam et al., 1998) et la nature de la matière organique (i.e. plus elle est oxydée, moins les HAP ont tendance à s'y adsorber ; Grathwohl, 1990) peuvent moduler le degré d'adsorption des HAP. Il a été montré qu'au cours du temps, la fraction disponible et bio-accessible des HAP diminue alors que la fraction récalcitrante et non-extractible augmente (Semple et al., 2003). Ce phénomène est le résultat de l'adsorption et de la diffusion progressive des HAP dans les micropores du sol (Hatzinger and Alexander, 1995), conduisant à leur **séquestration** et empêchant leur accessibilité aux microorganismes. Ce phénomène, qui correspond au vieillissement de la pollution, aussi appelé « *ageing* » (Alexander, 2000; Northcott and Jones, 2001) induit une forte diminution de la biodisponibilité et biodégradation des HAP avec le temps (Semple et al., 2003).

2.4.2.2 Les processus biotiques

Les processus biotiques constituent l'ensemble des réactions microbiennes conduisant à une dégradation des HAP et à la production de métabolites secondaires, voire à la minéralisation complète du HAP en carbone minéral (CO₂) (Cerniglia, 1992). Ces processus conditionnent majoritairement le devenir des HAP dans les sols. Cette dégradation peut être réalisée selon

2 types de métabolismes : i) Le métabolisme microbien (ou assimilation microbienne) qui utilise les HAP comme source de carbone ou d'énergie pour synthétiser de la biomasse. ii) Le co-métabolisme qui correspond à une dégradation des HAP sans bénéfice nutritionnel et énergétique pour les organismes impliqués, mais peut permettre une détoxification du milieu.

De nombreuses espèces de procaryotes (bactéries et archées) et d'eucaryotes (champignons et algues) sont connues pour leur implication dans la dégradation des HAP (Ghosal et al., 2016). Néanmoins, dans les sols, les principaux organismes dégradant des HAP (métabolisme) sont les bactéries. Ainsi, un grand nombre de bactéries ont été isolées pour leur capacité à dégrader les HAP et les utiliser comme seule source de carbone. Elles appartiennent notamment aux Alpha- (*Sphingomonas* sp., *Sphingobium* sp., *Agrobacterium* sp.), Beta- (*Burkholderia* sp., *Alcaligenes faecalis*, *Pusillimonas* sp. 21-11), Gamma-Protéobactéries (*Pseudomonas* sp., *Cycloclasticus* sp.; *Shewanella* sp. 13-24), aux Actinobactéries (*Mycobacterium* sp., *Arthrobacter* sp., *Rhodococcus* sp.), aux Firmicutes (*Bacillus cereus*, *Geobacillus* sp. G27, *Staphylococcus* sp.) et aux Bactéroidetes (*Flavobacterium* sp. PJ711) (Ghosal et al., 2016). Par ailleurs, depuis quelques années, des archées halophiles (*Haloferax* sp., *Halorubrum* sp., *Halococcus* sp.) dégradant les HAP commencent également à être mises en évidence (Al-Mailem et al., 2010; Erdoğan et al., 2013). Cependant, leurs voies de dégradation des HAP n'ont pas été clairement caractérisées et sont encore en cours d'exploration (Ghosal et al., 2016). Enfin, un certain nombre d'algues (e.g. *Selenastrum capricornutum*; *Chlorella vulgaris*) et de champignons (e.g. *Pleurotus ostreatus*; *Cunninghamella elegans*) ont également été mis en évidence pour leur implication dans la dégradation des HAP, généralement par co-métabolisme. Ces différents organismes utilisent des voies métaboliques de dégradation variées selon le HAP et les conditions environnementales que ce soit en condition aérobie ou anaérobie. Dans les 2 cas, la première étape réalise l'ouverture d'un des cycles benzéniques. En condition anaérobie, cette première étape est basée sur des réactions de réduction utilisant du Fer(III), des nitrates, des sulfates ou encore des chlorates comme accepteur terminal d'électrons (Foght, 2008). Néanmoins, à l'exception des zones humides et des tourbières, on ne trouve que très peu de zones anaérobies à la surface des sols continentaux. Ainsi, dans le cadre de cet état de l'art, nous nous concentrerons sur le métabolisme de la dégradation en condition aérobie.

2.4.2.3 Dégradation bactérienne

Afin d'illustrer la dégradation aérobie des HAP, la voie de dégradation (simplifiée) du phénanthrène est présentée dans la **Figure 1.12**. La première étape de dégradation nécessite

l'ouverture d'un des cycles benzéniques externes par l'action d'une dioxygénase spécifique aux HAP. Cette dernière fixe 2 atomes d'oxygène (provenant du dioxygène atmosphérique) sur les carbones en position 1 et 2 du cycle benzénique conduisant à la formation d'un cis-dihydrodiol. Après transformation en dihydroxy et ouverture du cycle benzénique, du pyruvate est généré. Le second cycle benzénique est ensuite dégradé, générant également du pyruvate, selon 2 voies possible : la voie du salicylate, menant au catéchol et la voie du phthalate menant au protocatéchuate. Le catéchol est alors dégradé *via* une méta- ou une ortho-fission. Finalement, l'ensemble des composés générés rejoint le métabolisme central des bactéries en entrant dans le cycle de Krebs.

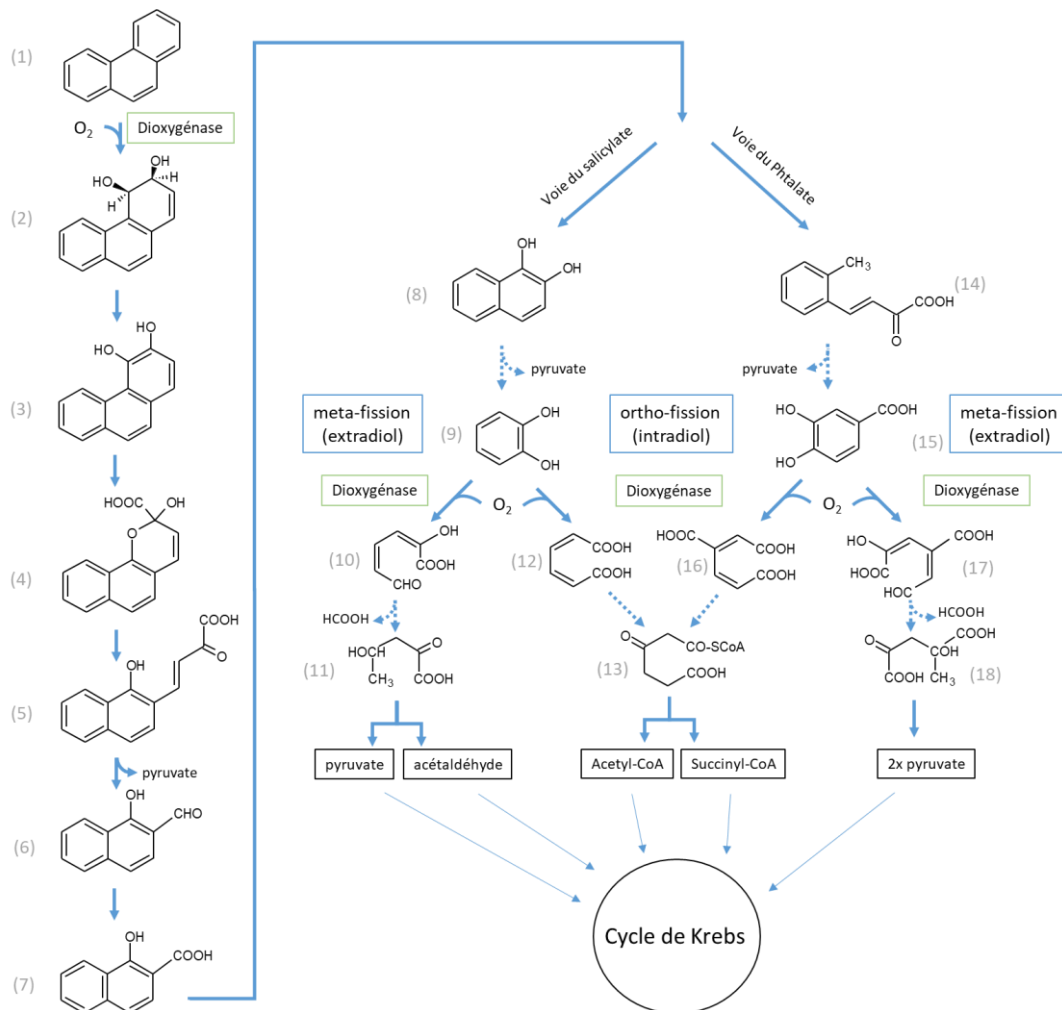


Figure 1.12. Voie métabolique bactérienne de la dégradation aérobie du phénanthrène par les bactéries du genre *Pseudomonas* (simplifiée). Adapté d'après Cerniglia, (1992), Fuchs et al. (2011) et Peng et al. (2008). Les flèches pleines indiquent une étape métabolique réalisée par une enzyme et les flèches en pointillés résumant une succession d'étapes enzymatiques. (1) phénanthrène ; (2) phénanthrène cis-3,4-dihydrodiol ; (3) 3,4-dihydroxyphénanthrène ; (4) Acide 2-hydroxybenzochromène carboxylique ; (5) Trans-4-(1'-hydroxynaphth-2-yl)-2-oxobut-3-énoate ; (6) 1-hydroxy-2-naphtalaldehyde ; (7) 1-hydroxy-2-naphtoate ; (8) 1,2-dihydroxy naphtalène ; (9) catéchol ; (10) 2-hydroxymuconique semialdéhyde ; (11) 4-hydroxy-2-oxovalérate ; (12) cis,cis-muconate ; (13) 3-oxoadipyl-CoA ; (14) 2-carboxybenzalpyruvate ; (15) protocatéchuate ; (16) 3-carboxy-cis,cis-muconate ; (17) 2-hydroxy-4-carboxymuconique semialdéhyde ; (18) 4-hydroxy-4carboxy-2-oxovalérate.

Il existe une grande variété de dioxygénases, elles-mêmes impliquées dans de multiples voies métaboliques. Parmi elles, les dioxygénases nécessaires à la première étape de dégradation aérobie des HAP sont spécifiques de ces molécules : on les appelle les dioxygénases PAH-RHD (*Ring Hydroxylating Dioxygenase*). Ces dioxygénases sont des systèmes enzymatiques multi-composants formés d'une ferrédoxine-réductase, d'une ferrédoxine et d'une protéine fer-souffre, elle-même constituée de 2 sous-unités alpha et beta (Habe and Omori, 2003). Par ailleurs, il a été montré que les séquences des gènes codant la sous-unité alpha présentaient une grande variabilité entre les bactéries à Gram négatif (Protéobactéries appartenant aux genres *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Commamonas*, *Polaromonas* et *Ralstonia*) et à Gram positif (Actinobactéries appartenant aux genres *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardioides* et *Terrabacter*) (Habe and Omori, 2003). Ainsi, ces gènes constituent un marqueur de choix pour quantifier les populations bactériennes impliquées dans la dégradation des HAP puisque cette première étape est essentielle pour initier la biodégradation (Cébron et al., 2008).

2.4.2.4 Dégradation fongique

Les champignons sont aussi connus pour contribuer à la dégradation des HAP, principalement par co-métabolisme. Ils peuvent être séparés en deux groupes : On distingue les champignons ligninolytiques (e.g. *Pleurotus ostreatus*) qui produisent et sécrètent des peroxydases (lignine- et manganèse-) ou des laccases. Ces enzymes impliquées dans la dégradation de la litière et du bois (cf. Chap. 1, § 1.2.2.3) sont également capables d'oxyder les HAP en HAP-quinones (Cerniglia and Sutherland, 2010). Contrairement aux enzymes bactériennes dégradant les HAP, la synthèse des enzymes ligninolytiques n'est pas induite en présence de HAP (Verdin et al., 2004). On distingue également les champignons non-ligninolytiques (e.g. *Cunninghamella elegans*), qui produisent des cytochromes P450 monooxygénases. Ces dernières oxydent les HAP en arene-oxides, qui sont ensuite soit transformés en trans-dihydrodiol par une époxyde hydrolase, soit réarrangés en dérivés phénoliques suivant des réactions non enzymatiques (Peng et al., 2008). Les premières étapes réalisées par les champignons peuvent permettre d'initier la dégradation. Les sous-produits formés peuvent ensuite être biodégradés par d'autres microorganismes pour leur métabolisme. Cette complémentarité métabolique a été montrée pour des consortia bactéries-champignons où la dégradation des HAP, en particulier ceux de haut poids moléculaires, était favorisée (Jacques et al., 2008; Li et al., 2008).

2.5 La pollution métallique dans les sols

2.5.1 Métaux et Eléments Traces Métalliques : définition

Le concept d'Eléments Traces (ET) diffère selon la discipline et la matrice étudiée, faisant varier la liste des éléments considérés comme traces ou comme majeurs. Dans cette thèse, nous considérerons la définition d'un point de vue géochimique qui décrit les ET comme un ensemble d'éléments chimiques retrouvés dans la croûte terrestre à des concentrations moyennes inférieures à 1000 mg kg^{-1} , en opposition avec les éléments majeurs, retrouvés à des concentrations supérieures à ce seuil (Sterckeman, 2004).

Parmi les ET, on distingue les ETM, souvent nommés à tort « métaux lourds », qui comprennent les métaux (hors lanthanides et actinides) et les métalloïdes présents à l'état de traces. Les plus retrouvés dans les sols sont le Co, Ni, Cu, Zn, As, Ag, Cd et Pb.

2.5.2 Origine et occurrence des ETM

Dans les sols, l'occurrence des ETM dépend de différents facteurs. En effet, dans le cadre d'un sol naturel, la présence et la teneur en ETM sera dépendante de la composition du matériau géologique parent (aussi appelé fond géochimique naturel) et des processus de pédogénèse qui ont mené à son altération et à la formation du sol. Au fond géochimique naturel, s'ajoutent les sources anthropiques : Celles-ci peuvent être agricoles (fumiers, amendements, fertilisants), urbaines (boues de station d'épuration) ou industrielles (par exemple *via* les déchets de l'industrie métallurgique ; Rachwał et al., 2015; Cf. Chap. 1, § 2.2). Par ailleurs, les dépôts atmosphériques sont également une importante source d'ETM naturelle (e.g. produit par le volcanisme ; Bradl, 2005) ou anthropique (e.g. les particules générées *via* des procédés à haute température). Bien que la teneur en ETM des sols soit dépendante de nombreuses caractéristiques pédologiques, Baize (2000) fournit une gamme de valeurs couramment observées dans les sols français (**Tableau 1.2**).

Tableau 1.2. Gammes de valeurs de Zn, Pb, Cd, Cr, Cu, Ni, Co et Tl rencontrées dans des sols français « ordinaires » ou présentant des anomalies naturelles modérées ou fortes. Adapté d'après Baize (2000).

	Valeurs couramment observées dans les sols "ordinaires" de toutes granulométries	valeurs observées dans le cas d'anomalies naturelles modérées	valeurs observées dans le cas de fortes anomalies naturelles
Zn	10 - 100	100 - 250	250 - 3800
Pb	9 - 50	60 - 90	100 - 3000
Cd	0,05 - 0,45	0,70 - 2,00	2,0 - 16,0
Cr	10 - 90	90 - 150	150 - 3180
Cu	2 - 20	20 - 62	65 - 102
Ni	2 - 60	60 - 130	130 - 2076
Co	2 - 23	23 - 90	105 - 148
Tl	0,10 - 1,70	2,5 - 4,4	7,0 - 55,0

Les teneurs sont exprimées en mg kg^{-1} de sol tamisé < 2 mm

On parle généralement de pollution par des ETM lorsqu'un sol présente des teneurs supérieures aux valeurs habituellement retrouvées. Néanmoins, de très fortes concentrations en ETM peuvent être d'origines naturelles (**Tableau 1.2**), comme c'est le cas dans les sols dérivés des roches ultramafiques, connues pour renfermer de fortes concentrations de Ni, Cr, Co et Mn. Par exemple, Pędziwiatr et al. (2018) ont observé que les 8 premiers centimètres du sol du massif de Szklary (Pologne) contenaient plus de 2 g kg^{-1} de Ni et $3,5 \text{ g kg}^{-1}$ de Cr dont l'origine est naturelle. Ce type de sol n'est toutefois pas étudié dans cette thèse, nous considérons donc les valeurs fournies par Baize (2000) (colonne 1 du **Tableau 1.2**) comme les valeurs à partir desquelles un sol est considéré comme pollué par des ETM.

2.5.3 La toxicité des ETM : Essentiel VS non essentiel

Les métaux et ETM, à forte concentration, sont toxiques pour les organismes vivants. Néanmoins, parmi les métaux et ETM, il faut différencier les métaux essentiels des métaux non essentiels. En effet, certains sont considérés comme des micronutriments essentiels (e.g. Zn, Cu, Cr (III), Co, Fe, Mn, Ni) car ils jouent des rôles importants dans le métabolisme des microorganismes (Madigan and Martinko, 2007). Le fer est, par exemple, nécessaire au bon fonctionnement des cytochromes P450, qui réalisent notamment des réactions de mono-oxygénation (Munro and Lindsay, 1996). De la même manière, le manganèse est nécessaires aux Mn-superoxyde dismutases, notamment impliquées dans la prévention des dommages oxydatifs sur l'ADN (Steinman et al., 1994). Ainsi ces métaux essentiels sont nécessaires aux organismes en faible concentration, mais deviennent toxiques à des concentrations plus

élevées (**Figure 1.13**). En effet, le Fe(II), le Cu(II) ou le Cr(III) présents en trop grandes quantités peuvent, *via* des réactions de Fenton, catalyser la production d'espèces réactives de l'oxygène (Lemire et al., 2013) qui provoquent de nombreux dommages cellulaires. À l'inverse, les métaux non essentiels (e.g. Pb, Hg, Cd, As) n'ont pas de rôle dans le métabolisme et peuvent donc induire des effets toxiques dès lors qu'ils sont présents dans la cellule, même à de très faibles concentrations. Par exemple, la forme trivalente de l'arsenic (As(III)) a une forte affinité pour les groupements thiols des protéines, entraînant la perturbation voire la dénaturation de ces dernières. De la même manière, la forme pentavalente de l'arsenic (As(V)) est un analogue structural du phosphate et peut donc entrer en compétition avec ce dernier et notamment inhiber les réactions de phosphorylation oxydative (Shen et al., 2013).

Néanmoins, dans les sols, une très forte concentration (totale) d'un métal n'entraîne pas forcément de toxicité vis-à-vis des organismes vivants. En effet, seule la part disponible des métaux dans les sols est réellement toxique. On considère généralement que la forme la plus biodisponible et toxique d'un métal correspond à sa forme libre, en solution (McLean and Bledsoe, 1992).

Par ailleurs, dans le cadre des communautés microbiennes et non d'un organisme unique, la réponse des organismes de la communauté ne suit probablement pas exactement la même tendance que la courbe typiquement obtenue sur des organismes uniques. De la même manière, la multi-contamination induit probablement également une réponse différente de celle observée dans le cas d'un contaminant métallique unique.

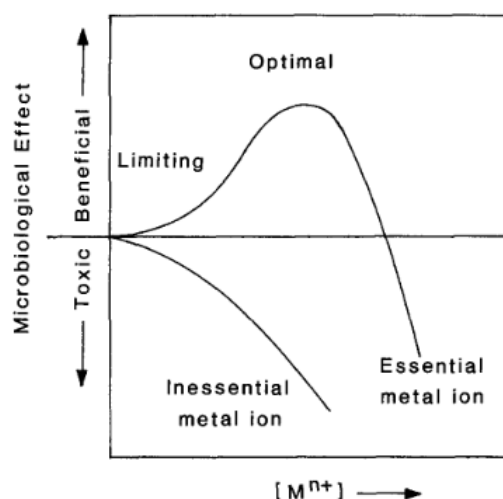


Figure 1.13. Relation entre la concentration et l'effet sur les microorganismes des ions métalliques essentiels et non essentiels. Figure extraite de Gadd (1992). La gamme de concentration du métal et le profil de réponse microbienne dépendent du métal concerné, de l'organisme et des facteurs environnementaux.

2.5.4 Devenir et disponibilité des ETM dans les sols

Contrairement aux composés organiques tels que les HAP, les ETM ne peuvent être dégradés, et peuvent donc persister longtemps dans les sols. En effet, dans les sols, les ETM peuvent être présents sous différentes formes chimiques (spéciation) et vont s'associer plus ou moins fortement aux constituants du sol. Dans cet état de l'art, la notion d'ETM disponibles fait référence à la fraction des ETM extractibles à l'aide d'extractant faible (e.g. H₂O, CaCl₂, NH₄NO₃). La mobilité et la disponibilité des ETM sont contrôlées par 3 grands processus (Rieuwerts et al., 1998) : i) Les **échanges cationiques**, facilement réversibles, qui correspondent à l'adsorption/désorption des ETM à la surface des constituants du sol. ii) Les phénomènes d'**adsorption/désorption spécifique**, qui impliquent l'échange de cations et forment des liaisons partiellement covalentes. iii) La **précipitation** ou **complexation** par des liaisons covalentes entre des ETM et des ligands.

Ces différents processus sont eux-mêmes contrôlés par les propriétés physico-chimiques du sol. Le pH est généralement reconnu comme le principal facteur gouvernant la disponibilité des ETM (Brallier et al., 1996), en influençant leur spéciation et les processus contrôlant leur mobilité. Ainsi, lorsque le pH diminue, la disponibilité des ETM sous forme cationique tend à augmenter et leur adsorption sur les particules de sol à diminuer. Par exemple, Kim et al. (2015) ont observé qu'à pH 3, jusqu'à 100% du Cd total était extractible au NH₄NO₃, alors que moins de 20% était extrait à un pH supérieur à 5. Par ailleurs, une diminution du pH induit la solubilisation des carbonates et la libération des ETM qui y étaient associés. Le potentiel redox agit sur la mobilité des ETM en modifiant leur degré d'oxydation, ce qui affecte les processus de solubilisation/précipitation et donc la formation des complexes. Ces phénomènes prédominent dans les milieux réducteurs, alors qu'en condition oxydante une partie des ETM sont non disponibles car associés à des oxydes de fer ou de manganèse insolubles (Chuan et al., 1996; Rieuwerts et al., 1998). Les ligands organiques et minéraux (phyllosilicates de type argiles et oxy-hydroxydes) présents dans le sol contrôlent également la mobilité des ETM en influençant les processus de sorption et de solubilisation des ETM sur les phases solides. Ainsi, pour une concentration totale donnée, Eriksson (1989) a observé que le Cd était 3 à 6 fois plus soluble dans l'eau, et 3 à 5 fois plus disponible pour les plantes, dans un sol sableux (83% sable, 7% argile) qu'un sol argileux (1% sable, 64% argile). Néanmoins, la matière organique serait un ligand plus fort des ETM que les argiles, en retenant les ETM *via* des processus de complexation et d'adsorption (Mclaren et al., 1981). Enfin, les ETM peuvent

jouer le rôle de liant entre les phases minérales et organiques pour former des complexes organo-minéraux (Gobat et al., 2010).

Les microorganismes et les plantes jouent également un rôle dans la mobilité et la disponibilité des ETM dans les sols. Par exemple, ils peuvent par la libération d'acides organiques, modifier très localement le pH, et donc la mobilité des ETM. Les microorganismes peuvent dégrader la matière organique en composés dont la réactivité sera différente vis-à-vis des ETM. De la même manière, ils peuvent libérer des ligands et agents complexant (sidérophores, acides organiques de faible poids moléculaire) dans le sol, ou constituer eux-mêmes des ligands en fixant les ETM sur leur paroi cellulaire (Haferburg and Kothe, 2007; Lemire et al., 2013) (**Figure 1.14**).

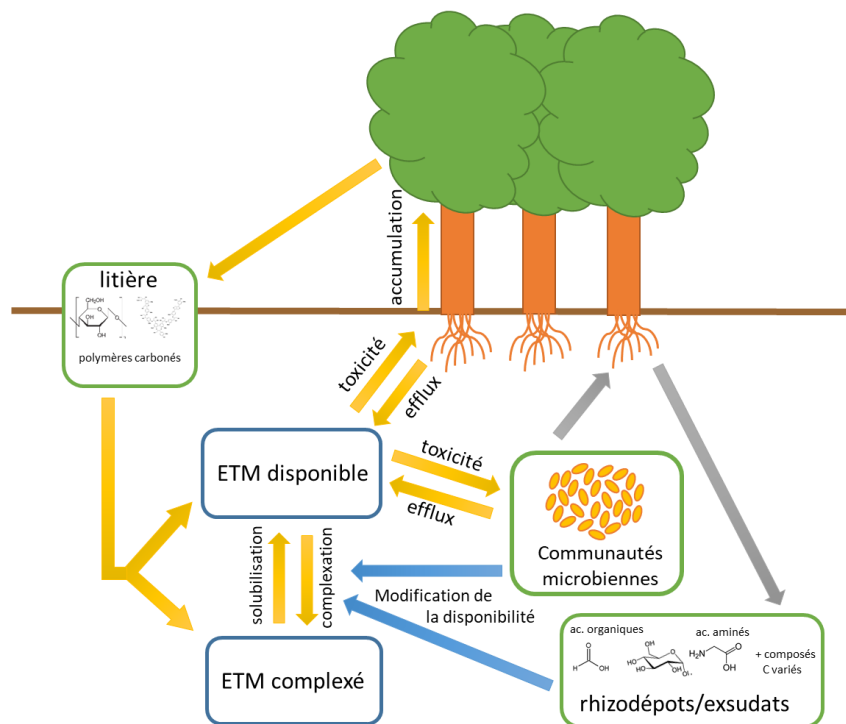


Figure 1.14. Action des plantes et des microorganismes contrôlant le devenir des ETM dans les sols.

Les communautés microbiennes mais également les propriétés des sols, sont donc des acteurs contrôlant la mobilité, et *in fine* la concentration en ETM biodisponibles dans les sols. Or, une forte concentration en ETM biodisponibles peut être toxique pour les communautés microbiennes et par conséquent pourrait entraver les processus du cycle du carbone dans lesquels elles sont impliquées.

2.6 Impact de la pollution sur la diversité et les fonctions des communautés microbiennes

2.6.1 Impact des HAP

De nombreuses études se sont intéressées à l'impact d'une pollution organique, notamment aux hydrocarbures aromatiques polycycliques, sur les communautés microbiennes. Pour ce faire, on retrouve deux approches principales : i) l'apport d'une pollution ponctuelle dans un sol non contaminé, qui permet d'étudier son effet toxique à court terme, et ii) l'étude d'une pollution chronique à long terme, qui permet d'étudier entre autres l'adaptation des communautés. Ces deux approches sont complémentaires et nécessaires, notamment pour mieux comprendre les effets d'une pollution au cours du temps et les mécanismes de réponse mis en œuvre par les microorganismes.

Ainsi, il a été montré qu'une pollution ponctuelle par des HAP, d'un sol non pollué auparavant (ou pollué à de très faibles teneurs), entraîne généralement une diminution de la diversité et de la richesse microbienne, associée à une modification plus ou moins importante de la structure des communautés et à l'enrichissement de certains taxons selon le niveau de pollution (Bell et al., 2014; Sawulski et al., 2014; Yang et al., 2014). En effet, bien que les taxons enrichis varient selon l'étude, on observe souvent une augmentation de l'abondance relative des Protéobactéries, notamment des Alpha- et du genre *Sphingomonadaceae* ou encore des Gamma- et du genre *Pseudomonas* (Niepceron et al., 2013). D'une manière globale, il apparaît que les Protéobactéries (toutes les classes, sauf Epsilon-) sont typiquement présentes dans les sols pollués par des HAP (Greer et al., 2010; Ren et al., 2016). Bien que les travaux étudiant l'effet d'une pollution par des HAP sur les fonctions microbiennes soient peu abondants, certains auteurs se sont intéressés à l'influence des HAP sur les activités enzymatiques. Ainsi, il a été observé qu'un amendement en HAP réduisait les activités déshydrogénase (Lipinska et al., 2014; Klamerus-Iwan et al., 2015) et uréase (Klamerus-Iwan et al., 2015). En outre, une étude de Ding et al. (2012) s'est intéressée à la diversité des gènes fonctionnels, détectés par GeoChip (puce ADN), après un amendement en phénanthrène. De manière intéressante, ils ont observé, dans les sols amendés, un fort enrichissement en gènes fonctionnels impliqués dans la dégradation des polluants, mais aussi dans le cycle du carbone et de l'azote ou encore dans la résistance aux métaux. Ils estiment que ceci est probablement dû à la sélection de certaines populations microbiennes bénéficiant notamment des métabolites intermédiaires issus de la dégradation du phénanthrène. Néanmoins, certains gènes, tels que les PAH-RHD α n'étaient détectés dans les sols qu'après la pollution aux HAP (Ding et al., 2010). Au niveau

fonctionnel, l'ajout de phénanthrène induit une diminution de l'activité de minéralisation et une réponse cellulaire au stress caractérisée par des changements du métabolisme central et de la synthèse des protéines membranaires (Cébron et al., 2014).

À plus long terme et si la pollution persiste, le stress exercé par la toxicité des polluants, induit une sélection des microorganismes les plus compétitifs, sur la base de leur capacité à tolérer les composés toxiques, ou à les dégrader. Dans une étude sur l'effet d'une pollution historique au diesel, Sutton et al., (2013) ont observé une diminution de la richesse et de la diversité microbienne, corrélée avec la contamination en hydrocarbures. De la même manière, en étudiant un gradient de sols historiquement pollués par des hydrocarbures, Andreoni et al. (2004) ont constaté que le sol le plus contaminé présentait la diversité taxonomique la plus faible. Toutefois, une grande diversité bactérienne et fongique a pu être observée, notamment dans un sol d'une ancienne cokerie présentant une forte contamination historique aux HAP (Cébron et al., 2009; Thion et al., 2012; Bourceret et al., 2016). Il est intéressant de noter que le niveau de diversité taxonomique était similaire à celui que l'on peut rencontrer dans les sols non pollués, suggérant une adaptation et une potentielle résilience des communautés. D'un point de vue fonctionnel, Liang et al. (2009) ont étudié l'impact d'un gradient de pollution à partir d'un sol pétrolifère et ont mis en évidence une diminution de l'abondance et de la diversité (en terme d'indice) des gènes impliqués dans le cycle du carbone et de l'azote le long du gradient de contamination. Dans une étude similaire sur d'autres sols historiquement pollués par du pétrole brut, Liang et al. (2011) confirment ces résultats et observent également une augmentation de l'abondance des gènes de mono- et di-oxygénase dans les sols pollués, en comparaison des sols témoins. De manière analogue, Cébron et al. (2008) ont constaté que les gènes de HAP di-oxygénase étaient beaucoup plus abondants dans les sols et sédiments contaminés aux HAP. Derry et al. (1998) ont également étudié la diversité fonctionnelle, mais au niveau de l'utilisation de substrats carbonés, en comparant les capacités de communautés de sols historiquement contaminés aux HAP avec celles de sols non contaminés. Toutefois, leurs résultats ne montrent pas de différences significatives entre les diversités fonctionnelles, indiquant une probable adaptation microbienne -dans les sols pollués- n'impactant pas la redondance fonctionnelle.

Globalement, il apparaît donc que la pollution aux HAP exerce un effet négatif sur la diversité taxonomique et fonctionnelle des communautés. Néanmoins, dans le cadre de contaminations sur le long-terme, certaines communautés microbiennes sont capables de résilience, à la fois en terme de diversité taxonomique et en terme de diversité fonctionnelle.

Toutefois, les travaux étudiant l'impact de la pollution aux HAP sur la diversité fonctionnelle sont encore relativement rares et méritent d'être élargis à l'étude de davantage de sols car les tendances semblent diverger, notamment quant à l'impact d'une pollution aux HAP sur le fonctionnement du cycle du carbone.

2.6.2 Impact de la pollution métallique

Comme pour les HAP, l'impact de la pollution métallique est étudié selon deux approches permettant de mesurer son effet aigu (court-terme) et son effet chronique (long-terme).

Ainsi, bien que les résultats soient contrastés, de nombreuses études en microcosmes ont montré que l'ajout d'une pollution métallique fraîche induisait généralement une réduction de la biomasse et de l'activité et/ou des changements dans la structure des communautés microbiennes (Bååth, 1989; Muhammad et al., 2005). De la même manière, en étudiant des sols artificiellement contaminés, Kandeler et al. (1996) ont observé une corrélation négative entre la biomasse et l'activité microbienne et le taux de polluant métallique. En revanche, les communautés microbiennes devenaient plus tolérantes à la pollution métallique après ajout de cette dernière (Diaz-Ravina and Baath, 1996).

Néanmoins, comme le soulignent Giller et al. (1998), l'étude de l'effet toxique aiguë d'une pollution métallique ne peut pas directement être transposée dans le cadre de contamination chronique à long terme, puisque des phénomènes d'adaptation/sélection des communautés et de changement de toxicité et de biodisponibilité de la pollution apparaissent au cours du temps. Ainsi, d'après une étude comparant un sol historiquement contaminé avec un sol non pollué, Moffett et al. (2003) ont montré que le stress causé par la toxicité du zinc dans le sol pollué avait réduit le nombre d'espèces rares, provoquant une diminution de la richesse et de l'équitabilité taxonomique. Cette diminution de la richesse spécifique (He et al., 2017) et/ou de la biomasse (Bérard et al., 2016; Wang et al., 2007) a été observée dans de nombreux sols historiquement pollués par des ETM. En revanche, des sols avec différents degrés de pollution métallique présentaient une plus grande diversité alpha taxonomique que les sols non pollués (Hong et al., 2015). De plus, en étudiant des sols forestiers le long de deux gradients de pollution métallique, Azarbad et al. (2015) ont trouvé que le potentiel fonctionnel, la diversité taxonomique et la composition des communautés étaient très similaires quel que soit le niveau de contamination métallique, suggérant une résilience des communautés. Ces résultats largement contrastés témoignent de mécanismes complexes d'adaptation des communautés. Par ailleurs, différentes études suggèrent que la pollution métallique serait

moins toxique pour les champignons que pour les bactéries (Frostegård et al., 1996; Wang et al., 2010) et induirait une augmentation du ratio champignon/bactéries (Dai et al., 2004) et de l'indice de Shannon fonctionnel fongique, et une diminution de cet indice chez les bactéries (Stefanowicz et al., 2008). Toutefois, d'autres études ont mis en évidence des tendances inverses (Pennanen, 2001; Bååth et al., 2005).

Une diminution de la biomasse et de diversité taxonomique s'accompagne souvent d'une réduction de la diversité fonctionnelle et des activités enzymatiques. Ainsi, bien que Lucisine et al. (2015) ne montrent pas d'effet d'une pollution par des ETM sur la dégradation de la litière par la macrofaune, il a également été montré qu'une pollution métallique affectait négativement la décomposition de la matière organique (litière), la respiration du sol, et l'activité de nombreuses enzymes du sol (Rühling and Tyler, 1973). Plus récemment, différents auteurs ont également constaté une diminution de la richesse et/ou de la diversité fonctionnelle (Boshoff et al., 2014) ou encore des activités enzymatiques (Wang et al., 2007) dans des sols chroniquement pollués par des ETM. En revanche, pour des sols forestiers historiquement contaminés par l'industrie métallurgique, Niklińska et al. (2004) ont trouvé des profils métaboliques similaires entre les sols, quel que soit le niveau pollution, suggérant une adaptation et une possible résilience fonctionnelle.

La variabilité des résultats concernant l'impact de la pollution métallique s'explique notamment par la variabilité des écosystèmes et des propriétés des différents ETM étudiés, mais également par une possible adaptation à la pollution des communautés microbiennes issues de sols contaminés. En effet, certaines études suggèrent une adaptation, voire une résilience des communautés microbiennes soumises à une pollution métallique à long terme. Davis et al. (2004) et Bérard et al. (2016) ont montré que les communautés étaient plus tolérantes au zinc et au plomb lorsque la concentration en ETM des sols augmentait, confirmant ainsi le concept de PICT (*pollution-induced community tolerance*).

2.6.3 Impact de la multi-pollution métallique et organique

Les nombreux travaux étudiant l'impact d'un type de pollution (organique ou métallique) sont très informatifs mais sont difficilement transposables à des sols multi-contaminés. Pourtant, la pollution aux hydrocarbures coexiste souvent avec une pollution métallique, particulièrement dans les zones industrielles et urbanisées. Ainsi, de plus en plus d'études concernant l'impact de la multi-contamination sont menées, mais sont encore loin d'apporter une compréhension satisfaisante de leur impact combiné sur les communautés microbiennes.

La majorité des études concernant l'effet de la multi-contamination a été réalisée en microcosmes et à court terme. Par exemple, Gogolev and Wilke (1997) ont étudié l'effet combiné du fluoranthène et de divers ETM sur la croissance bactérienne et concluent que les HAP rendaient les ETM plus toxiques en altérant la perméabilité des membranes cellulaires bactériennes. De plus, dans une étude utilisant des microcosmes amendés avec un mélange de plusieurs HAP et un polluant métallique, Smreczak et al. (1999) ont démontré que la présence d'ETM (à des niveaux similaires à ceux de zones fortement contaminées) diminuait l'activité microbienne et augmentait la persistance des HAP dans le temps. Une étude de Irha et al. (2003) montre également que l'ajout d'une multi-contamination entraîne une réduction des activités enzymatiques (i.e. déshydrogénase) et que, plus le sol contenait de matière organique, plus il était affecté. À l'inverse, Obuekwe et Semple (2013) ont montré que la présence d'une forte concentration en certains ETM (i.e. Cu, Al) pouvait accroître la minéralisation du phénanthrène en augmentant sa mobilité et son accessibilité (i.e. en réduisant l'adsorption du HAP à la matière organique). Il apparaît que l'interaction entre ETM et HAP peut avoir des effets positifs ou négatifs sur l'activité des enzymes et que cela semble dépendre de l'ETM, du HAP et de l'activité considérée (Shen et al., 2005). En outre, Jiang et al. (2010) ont comparé l'effet individuel et combiné du phénanthrène et du cadmium. Ils ont constaté que chaque type de pollution entraînait une diminution de la diversité fonctionnelle, mais que l'effet toxique combiné était supérieur à la somme des effets individuels, suggérant un effet synergique de la multi-contamination.

D'autres études se sont plutôt intéressées à des sites historiquement multi-pollués. Par exemple, Vivas et al. (2008) ont montré que la diversité et la richesse taxonomique étaient négativement corrélées au niveau de pollution globale. Ils ajoutent que les sols les plus pollués aux hydrocarbures montraient l'activité catéchol 2,3-dioxygénase la plus intense, tandis que l'activité déshydrogénase était d'avantage affectée par les ETM que les hydrocarbures. Thavamani et al. (2012) ont montré que, dans l'ensemble, la biomasse microbienne et les indices de Shannon et d'équitabilité taxonomique étaient réduits dans des sols multi-contaminés, en comparaison d'un sol contrôle. De plus, ils ont observé que la pollution par des hydrocarbures exerçait une plus forte toxicité que les contaminants métalliques, mais ce résultat semble en partie dû à la forte concentration en HAP (90% de la charge en contaminants) en comparaison de la concentration en ETM. De la même manière, Markowicz et al. (2016a) trouvent une relation négative entre les indices de biodiversité et de richesse taxonomique et la pollution par des HAP, mais pas avec la pollution métallique. En outre, ils trouvent que les ETM, plus que les HAP, étaient responsables de la réduction de l'activité

microbienne (Markowicz et al., 2016a, 2016b). À l'inverse, en étudiant des sédiments historiquement multi-contaminés, Misson et al. (2016) ne trouvent pas de réduction de la diversité taxonomique, mais au contraire, observent une plus forte richesse spécifique dans les sédiments les plus pollués. Pour expliquer ceci, ils indiquent que les microorganismes sont connus pour leur capacité à croître sur les substrats organiques, et en particulier les HAP. Une contamination organique plus ou moins dégradable pourrait donc augmenter la diversité des sources de carbone, créant de nouvelles niches écologiques pour les organismes hétérotrophes. Ainsi, une contamination organique pourrait partiellement expliquer une forte richesse en contrebalançant la réduction de la diversité microbienne due à la pollution métallique. Mais une fois encore ces tendances restent à confirmer, en étudiant une plus large gamme de sols historiquement contaminés et présentant des gradients de contamination organique et métallique.

3 OBJECTIFS DE LA THESE

Au cours de cet état de l'art, nous avons vu que nos connaissances concernant le fonctionnement du cycle du carbone dans les sols historiquement contaminés sont encore limitées. Des études ultérieures sont nécessaires pour approfondir notre compréhension de l'impact de la multi-pollution sur la diversité microbienne et le fonctionnement des processus microbiens. En effet, les polluants métalliques et organiques (i.e. HAP) ayant des impacts différents sur la diversité, la composition et les fonctions microbiennes, l'exposition à un mélange de ces deux types de pollution induit très probablement des effets inattendus, qu'il faut encore étudier. Pour cela, il est essentiel de déterminer si les fonctions de dégradation de différents composés carbonés (substrats simples tels que les carbohydrates, ou substrats plus complexes tels que les résidus végétaux, i.e. cellulose) sont toujours présentes dans les sols soumis à une forte contamination. A travers cet état de l'art, nous avons également vu la grande complexité inhérente aux sols. Dans ces écosystèmes, les processus, en plus d'être affectés par la pollution, sont aussi contrôlés par la physico-chimie du milieu (texture, disponibilité en nutriments...) et sa biologie (abondance, diversité et composition des communautés microbiennes). Ainsi, il reste un certain nombre de verrous à lever, concernant notamment l'impact combiné de la pollution, des propriétés des sols et de la diversité et de la composition taxonomique sur la diversité fonctionnelle des microorganismes. En particulier, le lien entre la diversité et la composition taxonomique et une fonction réalisée reste encore

difficile à établir et nécessite des techniques spécifiques, telle que le marquage par des isotopes stables.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse avaient pour objectifs i) d'étudier la diversité taxonomique et fonctionnelle des communautés microbiennes de sols anthropisés et délaissés depuis de nombreuses années, mais également ii) de mieux comprendre le lien qui unit ces deux diversités et enfin iii) d'identifier l'impact des caractéristiques des sols, en particulier de leur pollution, sur la diversité et l'intensité des processus microbiens.

Pour commencer, nous avons fait l'hypothèse que la communauté microbienne d'un sol est d'autant plus impactée que le sol est plus pollué et anthropisé. Ainsi, 10 sols ont été échantillonnés dans la région Grand Est, afin de constituer une collection présentant un gradient d'anthropisation représenté par un gradient de multi-pollution (HAP et ETM).

Notre hypothèse était que la diversité bactérienne pourrait être influencée par les propriétés des sols et par la concentration et la disponibilité des polluants, mais différemment selon qu'il s'agisse de la diversité taxonomique ou fonctionnelle. Afin de tester cette hypothèse, les communautés microbiennes des sols de la collection ont été caractérisées d'un point de vue taxonomique par séquençage du gène codant l'ARN ribosomique 16S. La diversité fonctionnelle a quant à elle été estimée vis-à-vis de l'activité d'utilisation de substrats carbonés simples à l'aide des outils Biolog® et MicroResp™. Ces outils permettent respectivement de mesurer l'utilisation de substrats par les communautés cultivables ou la communauté directement dans le sol, et cela dans un court laps de temps (Chapitre 3).

Le chapitre 3 ne traite que de la diversité bactérienne. Toutefois, au même titre que la diversité bactérienne, la diversité fongique a probablement aussi été impactée par l'anthropisation et la pollution des sols. Ainsi, la pression exercée par la pollution pourrait avoir conduit à la sélection de communautés fongiques comparables parmi les sols présentant un usage et une pollution similaire. Pour explorer cette voie, la diversité taxonomique des communautés fongiques a également été estimée par séquençage du gène codant l'ARN ribosomique 18S (Chapitre 4).

Après avoir étudié la diversité fonctionnelle en analysant la dégradation d'une large gamme de substrats carbonés simples, nous nous sommes intéressés aux fonctions de dégradations de substrats plus complexes. Nous sommes partis de l'hypothèse que : plus un sol a été fortement contaminé et anthropisé, plus la pression exercée par la pollution a dû conduire à la sélection des microorganismes. Cette sélection pourrait avoir favorisé des fonctions

permettant aux microorganismes de dégrader les polluants, mais à l'inverse, conduit à la perte d'autres fonctions essentielles à l'écosystème, telle que des fonctions impliquées dans la dégradation de la matière organique. Nous nous sommes donc focalisés sur l'étude de la dégradation d'un substrat d'origine anthropique, le phénanthrène (une molécule couramment retrouvée dans les sols pollués par des hydrocarbures), et d'un substrat d'origine naturelle, la cellulose (l'un des composants majeurs des débris végétaux). Ainsi, le chapitre 5 de cette thèse cherche à déterminer si les communautés microbiennes issues de sols historiquement contaminés par des hydrocarbures seraient plus aptes à dégrader une pollution fraîche par du phénanthrène que des communautés issues de sols non pollués. Nous avons supposé que plus un sol est fortement contaminé, plus sa communauté a été sélectionnée et montre un fort potentiel fonctionnel et une forte activité de dégradation face à l'ajout de phénanthrène frais. A l'inverse, dans le chapitre 6, nous nous sommes demandés si la pression exercée dans les sols pollués a négativement impacté la présence de la fonction (et l'activité) de dégradation de la cellulose. Nous supposions que les sols les moins anthropisés présenteraient la plus forte activité de dégradation de la cellulose et que celle-ci serait fortement diminuée, voir absente, dans les sols pollués. Par ailleurs, dans ces deux chapitres, nous souhaitons aborder le lien entre les fonctions étudiées et la diversité taxonomique, afin de regarder si les taux de dégradation du phénanthrène et de la cellulose dans les sols étaient liés à la présence de certains taxons. Et donc, déterminer si les diversités des microorganismes impliqués dans la dégradation du phénanthrène et de la cellulose seraient différentes entre sols pollués et non pollués. Pour tester ces différentes hypothèses, la dégradation du phénanthrène (Chapitre 5) et de la cellulose (Chapitre 6), entièrement marqués au carbone 13, ont été étudiées en microcosmes, et les acteurs microbiens impliqués dans leur dégradation ont été identifiés grâce à la technique de *Stable Isotope Probing*.

Les différents questionnements présentés ci-dessus sont schématisés dans la **Figure 1.15**.

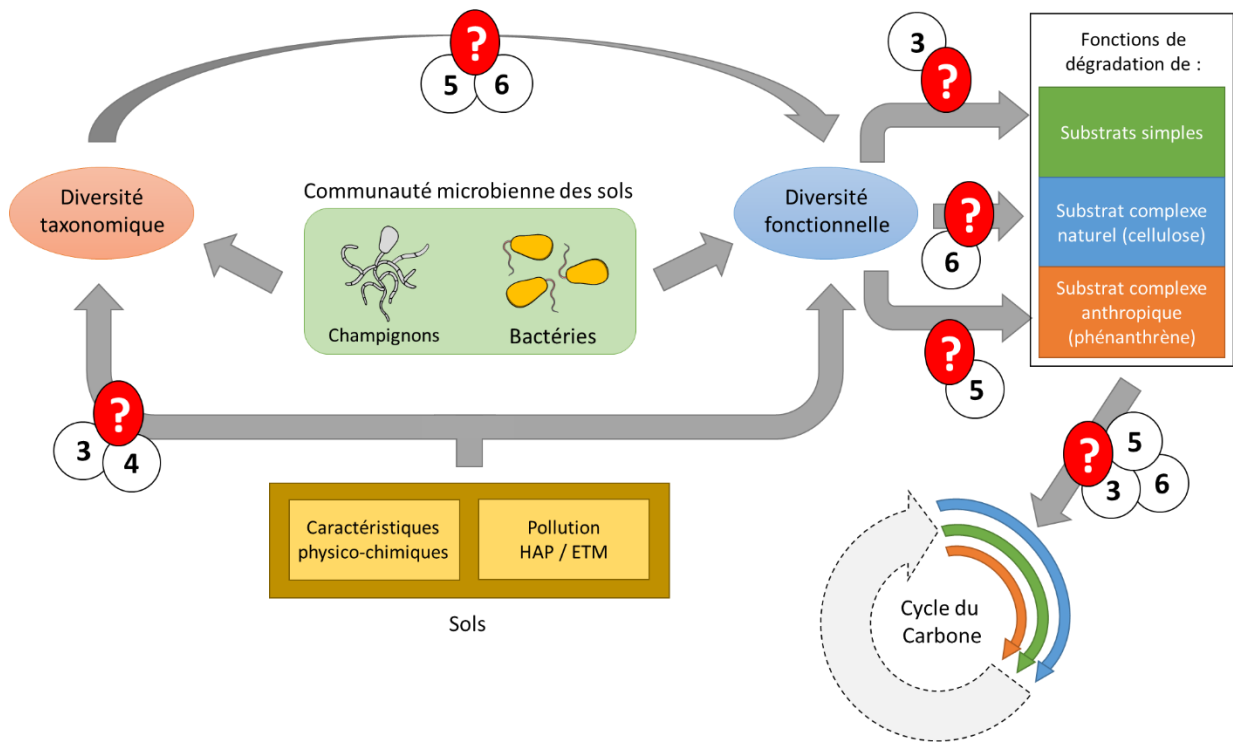


Figure 1.15. Schéma conceptuel des différentes questions de la thèse. Les points d'interrogations indiquent les questions posées et les numéros associés correspondent aux chapitres ayant contribué à apporter des réponses à ces questions.

Chapitre 2 :
Matériel et méthodes

1 LES SOLS

1.1 Sites étudiés

Dans ce travail de thèse, dix sols provenant de friches industrielles, de forêts ou d'une ancienne gravière, localisés en France dans la région Grand Est (**Figure 2.1**), ont été étudiés. Cette collection de sols a été choisie afin de couvrir une large gamme de situations d'anthropisation, allant de sols peu ou pas contaminés à des sols fortement contaminés, permettant d'avoir un gradient d'anthropisation. Nous avons considéré trois sols comme des « contrôles » (*ctrl*) : deux sols forestiers faiblement anthropisés, collectés à Hémilly (*He* ; Moselle) et Montiers-sur-Saulx (*Mo* ; Meuse) et un sol provenant d'une ancienne gravière anthropisée mais non polluée, collecté à Dieulouard (*Di* ; Meurthe-et-Moselle). Les sept autres sols, connus pour être pollués par des HAP et/ou des ETM (Huot, 2013; Lucisine et al., 2015; Ouvrard et al., 2011), ont été collectés sur des sites d'anciens :

- i) Crassiers sidérurgiques (*slag heap, sh*) à Homécourt (*Ho* ; Meurthe-et-Moselle), Neuves-Maisons (*NM* ; Meurthe-et-Moselle), Terville (*Te* ; Moselle) et Uckange (*Uc* ; Moselle)
- ii) Bassins à boues sidérurgiques (*settling pond ; sp*) à Pompey (*Po* ; Meurthe-et-Moselle, Mont-St-Martin (*MsM* ; Meurthe-et-Moselle) et Russange-Micheville (*RM* ; Moselle).

On peut toutefois noter que, bien que ces sols proviennent de sites de friches industrielles polluées, la plupart présentaient un couvert végétal relativement développé (**Figure 2.2**).

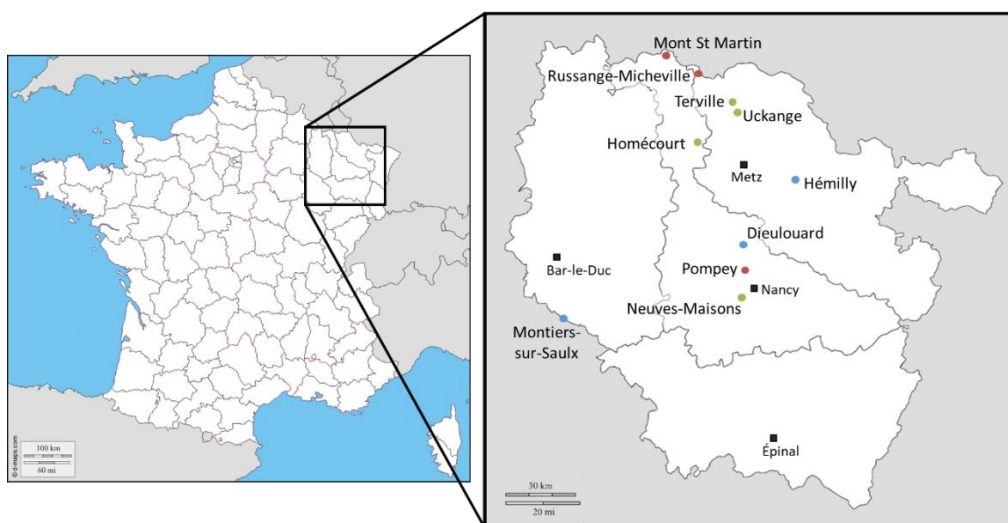


Figure 2.1. Carte de la répartition géographique des sols étudiés. Les sols « contrôles », de crassiers sidérurgiques et de bassins à boues sont représentés par des points bleus, verts et rouges, respectivement.



Figure 2.2. Photos des 10 sites étudiés dans cette thèse.

1.2 Échantillonnage des sols

L'échantillonnage des sols a été réalisé durant le mois de novembre 2015. Pour chacun des sites, trois échantillons de sols ont été prélevés à partir de trois points d'échantillonnage indépendants, séparés d'environ un mètre les uns des autres. À chaque point d'échantillonnage, un bloc de sol de 20 centimètres de côté a été prélevé sur les 30 premiers centimètres de sol, en ayant pris soin de retirer la litière lorsque celle-ci était présente. Les trois blocs de sols provenant des trois points d'échantillonnage ont ensuite été mélangés pour constituer un échantillon moyen, représentatif du site étudié.

1.3 Estimation de la couverture arborée

Afin d'estimer la couverture arborée des sites de prélèvement des sols, des photos hémisphériques ont été prises sur chacun d'eux et traitées *via* le logiciel ImageJ V1.52a par Florence Maunoury-Danger. Brièvement, sur chaque site 6 photos hémisphériques ont été prises (2 photos par sous-site, avec 3 sous-sites par site). Puis ces photos ont été binarisées et converties en noir et blanc, et le pourcentage de l'image occupée par des pixels noirs a été calculé. Ce pourcentage de pixel noir a été utilisé pour estimer la couverture arborée selon un indice allant de 1 à 5, avec 1 correspondant à 0-20% de pixels noirs et 5 correspondant à 81-

100% de pixels noirs. L'ensemble des sites de la collection présentait un indice de couverture arborée de 4, à l'exception de Neuves-Maisons et Uckange, qui présentaient respectivement un indice de 1 et 3.

1.4 Préparation pour les analyses

Une fois de retour au laboratoire, les échantillons de sol ont été séchés à l'air à température ambiante durant une semaine, puis tamisés à 2 mm (**Figure 2.3**). Les échantillons ont ensuite été stockés à l'obscurité à température ambiante pour les différentes analyses et expérimentations, tandis que des aliquotes ont été stockées à -80°C en prévision de l'analyse du contenu en HAP.



Figure 2.3. Aspect des 10 sols après séchage et tamisage à 2 mm.

2 ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES DES SOLS

Parmi les nombreux paramètres existant pour décrire les sols, nous avons choisi de caractériser leur teneur en carbone organique et en azote total, en matière organique, en carbone organique dissous, en carbonate, en phosphore disponible, en carbohydrates et en acides organiques. Le pH, la capacité de rétention en eau (WRC), la capacité d'échange cationique (CEC) et la texture ont également été mesurés. Enfin, pour estimer la pollution métallique et organique des sols, nous avons également caractérisé leur teneur en divers éléments totaux et traces (métalliques ou non) et en HAP.

Il faut préciser que certains paramètres ont été mesurés directement au laboratoire tandis que d'autres ont été effectués par le LAS (Laboratoire d'analyse des sols, INRA) à Arras (France). Les procédures utilisées pour les caractéristiques mesurées au LAS ne sont pas décrites dans ce manuscrit. Néanmoins, pour chacune d'entre elles, la norme et la méthode utilisée a été précisée.

2.1 Caractéristiques physico-chimiques

Le **pH** a été mesuré à partir d'une suspension de sol préparée dans de l'eau ultrapure (1:5 w:vol) en utilisant un pH-mètre (PHM210, Radiometer Analytical), équipé d'une sonde pH (Bioblock Scientific). Avant mesure du pH, la suspension de sol a été homogénéisée par agitation durant 15 min, puis mise à décanter 15 min.

Les concentrations en **carbone organique total** et en **azote total** ont été mesurées par la méthode de Dumas, respectivement selon les normes NF ISO 10694 et NF ISO 13878. La concentration en **matière organique** a été calculée à partir de la concentration du carbone organique total *via* un facteur correctif (environ 1,73). Le **ratio C:N** a été déterminé mathématiquement en divisant les valeurs de la concentration en carbone organique total par la concentration en azote total.

La concentration en **phosphore disponible** a été mesurée par la méthode Olsen, selon la norme NF ISO 11263.

Les concentrations en **carbohydrates**, **acides organiques** et **carbone organique dissous** (DOC) ont été mesurées à partir d'extraits aqueux des sols. Ces extraits ont été préparés à partir de 6 g de sol (lyophilisé et broyé) mélangés (agitation rotatoire ; 80 rpm) à 30 ml d'eau ultrapure (mélange 1:5) dans des tubes de centrifugation PTFE Oak Ridge (FEP, Nalgène, USA), durant 2 h à 20°C. Les extraits aqueux sont récupérés après centrifugation à 3000 g (10 min) et filtrés

à 0,45 μm (filtres en acétate de cellulose, Sartorius Stedim Biotech, Allemagne). Sept carbohydrates (inositol, trehalose, saccharose, glucose, xylose, mannose, and fructose) ont été quantifiés par chromatographie ionique (ICS 3000, équipé d'une colonne Dionex CarboPac SA10, Thermo Scientific). Onze acides organiques (acides gluconique, lactique, acétique, propanoïque, formique, pyruvique, succinique, maléique, oxalique, fumarique et citrique) ont été quantifiés par chromatographie ionique (ICS 2100, équipé d'une colonne Dionex IonPac AS11 HC, Thermo Scientific). Le DOC a été dosé à l'aide d'un analyseur TOC (TOC-V, CSH, Shimadzu).

Le contenu en **carbonates** a été estimé par mesure de la concentration de CO_2 (mesure de l'absorbance infrarouge, λ 2325,6 cm^{-1} , analyseur Binos 1004) produit après décarbonatation à l'acide (HCl 4 M) d'1 g de sol lyophilisé et broyé. La décarbonatation a été réalisée dans un flacon sérum en verre de 125 ml fermé et les mesures du CO_2 produit ont été effectuées 6 h après ajout de l'acide, pour laisser à ce dernier le temps d'agir sur la totalité du sol.

La **capacité d'échange cationique** (CEC) a été mesurée par la méthode de Metson, selon la norme NF X 31-310.

La **texture** du sol a été mesurée par granulométrie 3 fractions sans décarbonatation (fraction argileuse, 0-2 μm ; fraction limoneuse, 2-63 μm ; fraction sableuse 63-2,000 μm) selon la norme ISO 11277.

La **capacité de rétention en eau** (WRC, *water retention capacity*) a été estimée à partir de la différence de masse entre le sol sec et le sol saturé en eau (qui correspond à 100% de la WRC). Pour obtenir le sol saturé en eau, 50 g de sol ont été placés dans un gobelet en plastique dont le fond a été percé de 6 trous (diamètre 0,9 mm). Le fond du gobelet a ensuite été immergé dans l'eau, jusqu'à ce que cette dernière remonte par capillarité et effleure la surface du sol.

2.2 Analyse des teneurs en éléments totaux et traces

Les concentrations en **éléments totaux** (Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn et Na) ont été mesurées par ICP-AES après leur extraction à l'acide fluorhydrique (HF), selon les normes NF X 31-147 / NF ISO 22036.

Les concentrations en **éléments traces totaux** ont été mesurées, après leur extraction à l'HF, *via* 2 méthodes selon les éléments :

- Le **Cr, Cu, Ni, Zn** et **Co** ont été dosés par ICP-AES selon les normes NF X 31-147 / NF ISO 22036.
- Le **Pb, Cd, Tl** et **Mo** ont été dosés par ICP-MS selon les normes NF X 31-147 / NF EN ISO 17294-2.

Les concentrations en **éléments traces disponibles (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn)** ont été mesurées par ICP-MS, après leur extraction au CaCl_2 0.01 M, selon une méthode développée par l'INRA.

2.3 Analyse des teneurs en HAP

Des extractions et analyses du contenu en HAP ont été réalisées : i) pour caractériser la pollution en HAP de la collection de sols et ii) lors de l'expérience de *stable isotope probing* (SIP) avec le phénanthrène.

Avant extraction des HAP, les échantillons de sol sont préalablement stockés à -80°C , puis lyophilisés (lyophilisateur Christ Alpha 1-2 LD) et enfin broyés à $500\ \mu\text{m}$ à l'aide d'un broyeur à billes (MM 400, Restch) équipé de bols et de billes en acier (11 mm de diamètre).

2.3.1 Extraction des HAP totaux

Les HAP totaux ont été extraits à partir d'un mélange constitué d'1 g de terre de diatomée (SiO_2 , Sigma-Aldrich) et de 0,5 g (expérience de SIP) ou 1,0 g (caractérisation de la pollution) de sol lyophilisé et broyé. Ce mélange a été déposé dans des cellules SST en inox de 10 ml (dont l'espace non occupé est comblé par des billes en verre de 3 mm) pour en récupérer les HAP par extraction accélérée au dichlorométhane (DCM) en utilisant un extracteur (ASE350 Dionex®) à haute température et haute pression selon le programme suivant : 2 cycles à 130°C , avec pour chaque cycle, un préchauffage de la cellule durant 7 min, puis 5 min de chauffage après injection du DCM (avec relâchement de la pression à 115 bars) et rinçage à 60% du volume de la cellule. L'extrait était ensuite mis sous flux d'azote pour faire évaporer le DCM, qui est progressivement remplacé par de l'acétonitrile (ACN, solvant utilisé pour le dosage). Finalement, l'extrait a été filtré à $0,45\ \mu\text{m}$ (filtre PTFE, WVR) et stockée à 4°C dans un vial Supelco en verre jusqu'à l'analyse des HAP.

2.3.2 Extraction des HAP disponibles

Les HAP disponibles ont été extraits à partir d'1 g de sol mélangé à 20 ml de solution d'hydroxypropyl- β -cyclodextrine (Acros Organics) à 50 mM dans des tubes de centrifugation PTFE Oak Ridge (FEP, Nalgène, USA). Après 16 h d'agitation orbitale (100 rpm) à 20°C, les tubes ont été centrifugés deux fois durant 15 min à 3250 rpm. Le surnageant aqueux (15 ml) est ensuite récupéré et transféré dans une ampoule à décanter pour effectuer une extraction liquide : liquide. Trois extractions successives sont réalisées : 8 ml de DCM sont ajoutés au surnageant aqueux, après agitation et décantation, la phase DCM est récupérée. L'extrait est ensuite mis sous flux d'azote pour faire évaporer le DCM, qui est progressivement remplacé par de l'ACN. L'extrait est ensuite filtré à 0,45 μm (filtre PTFE, WVR) et stocké à 4°C dans un vial Supelco en verre jusqu'à l'analyse des HAP.

2.3.3 Analyse des HAP

Les HAP ont été quantifiés à l'aide d'une chaîne de chromatographie UHPLC DIONEX® Ultimate 3000 équipée d'une colonne Zorbax Eclipse PAH (2.1 x 100 mm, 1,8 μm , Agilent) et d'un détecteur à barrette de diodes (DAD, *Diode Array Detector*) à une longueur d'onde de 254 nm. Brièvement, les HAP sont élués par un mélange ACN-H₂O à un débit de 0,4 ml min⁻¹ afin d'être séparés lors de leur passage sur la colonne, en fonction de leur nombre de cycles benzéniques. Puis, ils sont détectés et quantifiés *via* le détecteur DAD.

3 ANALYSES BIOLOGIQUES DES SOLS

3.1 Quantification des bactéries cultivables

La méthode du NPP (Nombre le Plus Probable, ou *MPN, Most Probable Number*) a été utilisée pour quantifier les bactéries cultivables du sol. Pour cela, 1 g de sol sec a été réhumidifié à 80% WRC avec de l'eau déminéralisée stérile et mis à incuber 2 jours à 24°C pour réactiver les communautés microbiennes. Puis, 10 ml de solution de NaCl (0,9%) ont été ajoutés au sol réhumidifié et l'ensemble a été mis à agiter à 100 rpm durant 1 h sur un agitateur rotatif. À partir de cette suspension de sol, des dilutions 1/10^{ème} en cascade ont été réalisées dans une solution de NaCl (0,9%) et utilisées pour inoculer des microplaques 96 puits (à raison de 16 puits par dilution) contenant un milieu riche (nutrient Broth No 1, Fluka Analytical). Après 3 jours d'incubation à 24°C, l'absorbance à 600 nm a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre (Safas MP 96, Safas Monaco). Les puits étaient considérés positifs (croissance microbienne) lorsque leur absorbance (corrigée par soustraction de puits négatifs non inoculés) était supérieure à une DO de 0,2. Le NPP a ensuite été déterminé *via* les tables de Mac Grady et exprimé en bactéries cultivables par gramme de sol.

3.2 Analyse des capacités métaboliques des communautés microbiennes

Afin d'estimer la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes cultivables, leurs capacités métaboliques ont été mesurées à l'aide des microplaques Biolog®.

3.2.1 Principe des plaques Biolog®

L'utilisation des microplaques Biolog® permet d'estimer la diversité métabolique fonctionnelle des communautés microbiennes de sols à travers la mesure de l'utilisation de substrats carbonés. Brièvement, les microplaques Biolog® sont constituées de 96 puits qui contiennent un milieu de culture (avec ou sans substrat carboné) renfermant un indicateur colorimétrique, le tétrazolium violet. Lors de l'utilisation du substrat carboné par les microorganismes, la réduction de l'indicateur colorimétrique provoque l'apparition proportionnelle d'une coloration violette, qui est quantifiée par mesure de la densité optique à 595 nm (**Figure 2.4**).

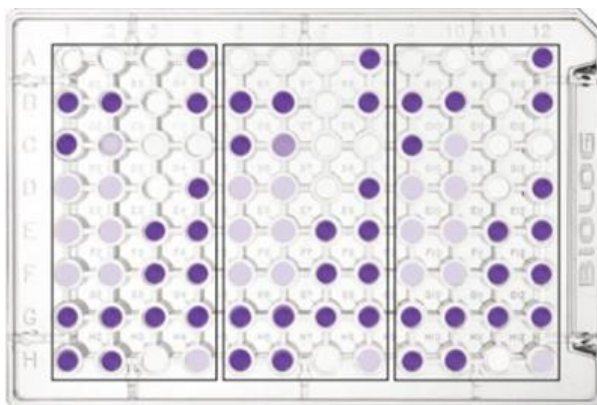


Figure 2.4. Exemple de l'apparition de la coloration violette dans les puits où le substrat fourni a été consommé.

3.2.2 Substrats analysés

Dans le cadre de cette thèse, nous avons analysé la consommation de 62 substrats carbonés à l'aide de deux types de microplaques Biolog® : les plaques EcoPlates™ qui contiennent 31 substrats d'intérêt écologique choisis par le fabricant, et les plaques MT2™ qui nous ont permis de choisir 31 autres substrats à tester. L'ensemble des substrats testés est reporté dans le **Tableau S3.1** (voir annexes). Globalement nous avons ainsi pu tester la consommation de 4 HAP, 6 acides aromatiques, 17 acides carboxyliques, 14 carbohydrates, 9 acides aminés, 7 polymères et 5 composés « divers ».

3.2.3 Préparation des microplaques

Les microplaques MT2 ont été préparées suivant les instructions du fabricant (0,3 mg de carbone par puits), excepté pour certains substrats qui ont été dilués au dixième (soit 0,03 mg de carbone) car ils étaient toxiques à la concentration recommandée (acides carboxyliques) ou formaient des particules insolubles dans l'eau (cellulose et lignine). Les substrats de type HAP et acides phénoliques ont été dissouts dans du n-hexane avant d'être déposés dans les puits, et le solvant a été évaporé en laissant les plaques une nuit sous un PSM (poste de sécurité microbiologique) équipé d'un filtre chimique (charbon actif). Les substrats solubles dans l'eau ont finalement été ajoutés juste avant inoculation, à raison de 20 µl par puit. Pour obtenir le même volume final dans chacun des puits, 20 µl d'eau déminéralisée stérile ont été ajoutés aux puits contenant les HAP et les acides phénoliques (plaque MT2) et aux puits de la microplaque EcoPlate.

3.2.4 Inoculation et incubation des microplaques

Les inocula microbiens ont été préparés à partir d'1 g de sol (réhumidifié à 60% WRC et réactivés 2 jours à 24°C) dilués dans 10 ml de solution de NaCl (0,9%), puis mélangés avec des billes en verre (\varnothing 1,5 mm) *via* un agitateur rotatif à 100 rpm durant 1 h. Après agitation, les suspensions de sols ont été mises à décanter pendant 15 min et le surnageant a été prélevé pour être dilué dans une solution de NaCl (0,9%). En se basant sur les valeurs de NPP, les surnageants ont été dilués différemment pour obtenir une abondance bactérienne cultivable du même ordre de grandeur dans les inocula des différents sols (de 10^2 à 10^3 microorganismes cultivables par ml). Finalement, les plaques ont été inoculées avec 100 μ l de la dilution appropriée et mises à incuber à 24°C dans un sac en plastique contenant du coton humide pour maintenir une atmosphère saturée en eau et éviter la dessiccation.

Les microplaques Biolog[®] ont également été utilisées pour étudier la tolérance des communautés bactériennes à la présence d'un polluant métallique, en comparant l'utilisation des substrats en présence et en absence de zinc. Pour cela, lors de la préparation des inocula, du zinc a été ajouté sous forme de $ZnCl_2$ (Merck) pour obtenir 10 mg l⁻¹ de zinc (Zn^{2+}) dans les puits des plaques Biolog[®]. Cette concentration de zinc a été choisie (**Figure 2.5**) pour avoir un effet toxique sans inhibition totale, en se basant sur des expériences préliminaires où l'effet de différentes concentrations de zinc (0 ; 1 ; 10 ; 50 ; 100 mg.l⁻¹) a été testé vis-à-vis des communautés de 3 sols (Hémilly, Terville, Pompey) représentatifs des 3 groupes de sols définis précédemment.

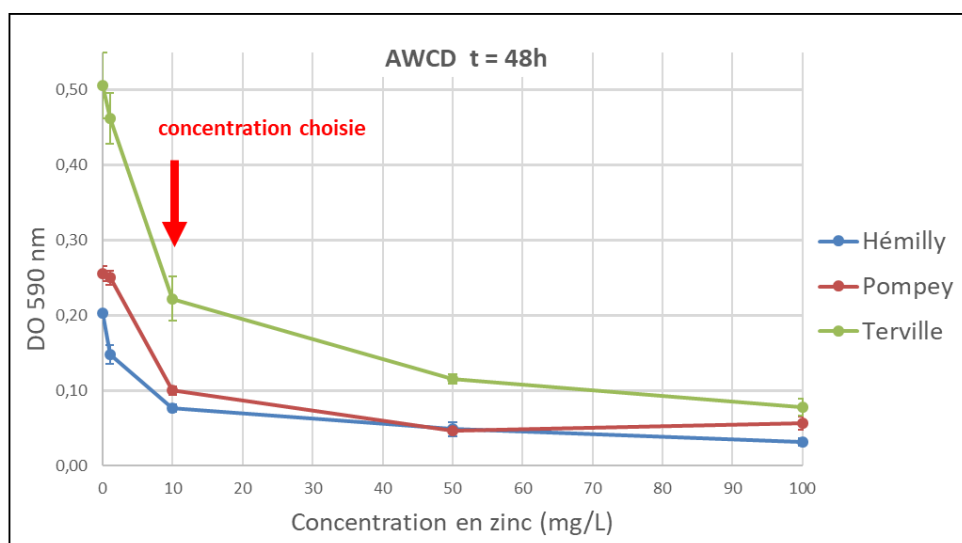


Figure 2.5. Effet de différentes concentrations de zinc sur l'utilisation moyenne des substrats par 3 sols représentant les 3 groupes de sols de la collection, après 48 h d'incubation. Les barres d'erreurs représentent l'erreur standard à la moyenne.

3.2.5 Mesure de l'utilisation des substrats

L'utilisation des substrats est mesurée de manière indirecte par mesure du changement de couleur produit par la réduction du tétrazolium. Ainsi, l'absorbance à 595 nm a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre MP96 (Safas, Monaco) durant 7 jours, à $t = 0, 24, 48, 72$ et 96 h. Puis, cette absorbance a été corrigée à chaque temps pour chaque substrat, en y soustrayant la valeur du puits témoin (sans substrat). L'absorbance corrigée (Abs_{cor}) associée à chacun des 62 substrats a été utilisée pour calculer l'utilisation moyenne des substrats à chaque temps, classiquement dénommée « coloration moyenne des puits » (AWCD, *average well color development*), selon la formule (1) :

$$AWCD = \sum (Abs_{cor}) / 62 \quad (1)$$

La tolérance des communautés a été estimée en calculant un pourcentage d'inhibition due au zinc. Ce dernier a été obtenu par comparaison des aires sous les courbes d'AWCD en fonction du temps, entre les conditions avec ou sans zinc.

3.3 Analyse des capacités métaboliques des communautés dans les sols

Afin d'estimer la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes directement dans le sol, leurs capacités métaboliques ont été mesurées à l'aide des microplaques MicroResp™.

3.3.1 Principe du MicroResp™

La technique MicroResp™ est une méthode colorimétrique permettant de mesurer simultanément la production de CO_2 par plusieurs échantillons de sols, en réponse à l'ajout (SIR, *Substrate-Induced Respiration*) ou non (respiration basale) de substrats (Campbell et al., 2003). Brièvement, le dispositif MicroResp™ se compose de 3 éléments : i) une microplaque 96 puits (*Deepwell plate*) dans laquelle sont déposés les échantillons de sols ; ii) une plaque de détection 96 puits contenant un gel d'agar avec un indicateur colorimétrique ; iii) un joint en silicone qui permet de faire l'étanchéité entre la plaque *Deepwell* et la plaque de détection. Le dosage du CO_2 est ainsi réalisé par mesure de la densité optique (DO) à 570 nm de la plaque de détection. En effet, le CO_2 produit par l'activité des microorganismes provoque une acidification et un changement de couleur de l'indicateur colorimétrique du rouge vers le jaune, proportionnel à la quantité de CO_2 dégagée (**Figure 2.6**).

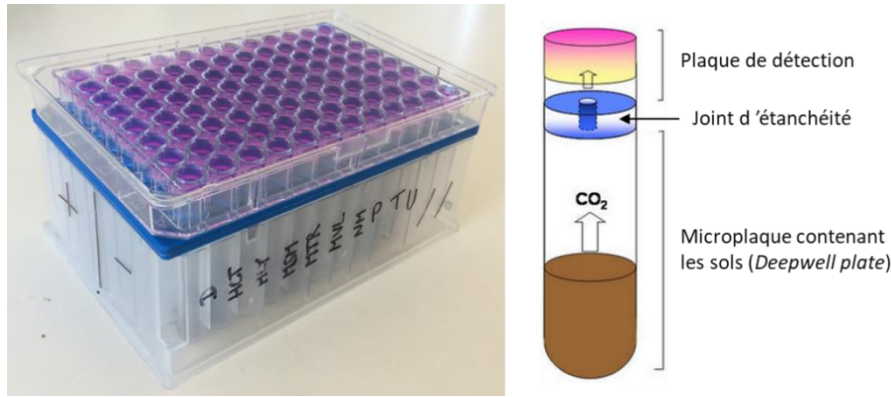


Figure 2.6. Principe du dispositif MicroResp™ (modifié d'après <http://www.microresp.com/>)

3.3.2 Expérimentation

Les échantillons de sol sec ont été introduits dans la plaque *Deepwell* à l'aide du distributeur volumétrique fourni par le fabricant, puis réhumidifiés à 45% WRC avec de l'eau déminéralisée stérile et mis à réactiver durant 3 jours à 24°C dans des sacs en plastique contenant du coton humide pour maintenir une atmosphère saturée en eau et éviter la dessiccation. Après cette étape, six sources de carbone (pyruvate, succinate, citrate, L-asparagine, D-ribose et D-mannitol) ont été ajoutées sous forme de solutions aqueuses, dont le volume a été calculé pour atteindre 80% de la WRC des sols. Pour chaque échantillon de sol, quatre répliqués de chaque source de carbone ont été préparés. En accord avec les instructions du fabricant, les substrats ont été ajoutés à raison de 20 mg de carbone par puit, excepté pour la L-asparagine (3 mg) et le citrate (5 mg), très peu solubles dans l'eau. Dans d'autres puits de l'eau a été ajoutée à la place des substrats pour mesurer la minéralisation basale et servir de témoin sans ajout de substrat carboné. La minéralisation basale a été mesurée à raison de 8 répliqués par échantillons de sol. Finalement, la plaque *Deepwell* a été scellée à la plaque de détection *via* le joint d'étanchéité et l'ensemble mis à incuber à l'obscurité à 24°C durant 4 à 9 h selon le substrat et 8 h pour la minéralisation basale (voir **tableau S3.1** en annexe).

3.3.3 Mesure de l'utilisation des substrats ajoutés

L'absorbance de la plaque de détection a été mesurée à 570 nm, avant (blanc) et après incubation, à l'aide d'un spectrophotomètre MP96 (Safas, Monaco). La valeur de densité optique correspondant à la quantité de CO₂ produit (ΔDO) est obtenue par soustraction de l'absorbance mesurée après incubation à l'absorbance initiale (formule 2). Pour n'obtenir que la DO correspondant au CO₂ produit après l'ajout du substrat carboné (DO_{corr}), on retranche également la valeur de ΔDO mesurée pour la minéralisation basale (formule 3). Puis cette

valeur est transformée en concentration de CO₂ (ppm ou mg.kg⁻¹) à l'aide de la formule (4), obtenue *via* l'équation d'une courbe de calibration (non montrée). Cette valeur est normalisée (DO_{norm}) par la quantité de sol et le temps d'incubation (formule 5). Enfin, le résultat de la formule (5) est exprimé en µg de C de CO₂ par gramme et par heure, selon la formule (6). Cette dernière a été obtenue en adaptant la formule fournie dans le manuel d'utilisation du kit MicroResp™.

$$\Delta DO = DO_{initiale} - DO_{incubation} \quad (2)$$

$$DO_{corr} = \Delta DO(\text{substrat}) - \Delta DO(\text{min basale}) \quad (3)$$

$$ppm \text{ CO}_2 = 138,72 \times e^{(6,7974 \times DO_{corr})} \quad (4)$$

$$ppm \text{ CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1} = \text{CO}_2(\text{ppm}) \div \text{masse}_{sol} \div \text{temps}_{incubation} \quad (5)$$

$$\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1} = \frac{ppm \text{ CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}}{100000} \times 945 \times \frac{12}{22,4} \times \frac{273}{273 + T(^{\circ}\text{C})} \quad (6)$$

3.4 Mesures de minéralisation

La mesure de minéralisation de substrats complexes, tels que la cellulose ou le phénanthrène, nécessite une incubation trop longue pour être réalisée avec la technique de MicroResp™. La faible solubilité de ces substrats dans l'eau rend également la technique de Biolog® difficilement utilisable pour suivre leur minéralisation. Ainsi, pour étudier la dégradation du phénanthrène et de la cellulose, des mesures de leurs cinétiques de minéralisation ont été réalisées par quantification du CO₂ produit au cours du temps, dans l'atmosphère d'un flacon fermé (**Figure 2.7**). En parallèle la minéralisation basale des sols a été suivie au cours du temps sans ajout de substrat pour servir de témoin. Pour cela, la concentration en CO₂ a été obtenue par mesure du rayonnement infrarouge à l'aide d'un automate d'analyse de CO₂. Des mesures de la production de CO₂ ont ainsi été réalisés directement à partir d'échantillons de sol réhumidifiés (minéralisation basale) ou en réponse à l'ajout des deux substrats testés (SIR). Ces deux substrats ont été utilisés sous forme non marquée (i.e. ¹²C) ou marquée au ¹³C (*stable isotope probing* ; cf. Chap. 2, § 3.5).



Figure 2.7. Illustration du dispositif utilisé pour les mesures de minéralisation.

3.4.1 Préparation des échantillons de sols

La minéralisation basale a été mesurée à partir d'échantillons de 2,0 g de sol, sans ajout de substrat.

La minéralisation du phénanthrène a été mesurée à partir d'échantillons de 2,0 g de sol amendé par du phénanthrène à raison de 200 mg kg⁻¹ de sol sec. Pour cela, une solution de phénanthrène à 2,5 mg ml⁻¹ a d'abord été préparée par dissolution de phénanthrène (Fluka) dans du n-hexane (Prolabo) et stockée à 4°C dans un vial Supelco en verre. Pour chaque échantillon, 200 mg de sol ont été pesés dans une coupelle en aluminium, puis amendés par dépôt au goutte à goutte de 160 µl de la solution de phénanthrène, directement sur le sol. Après avoir laissé le solvant s'évaporer durant une nuit sous une hotte chimique, le sol contient alors du phénanthrène à hauteur de 2 mg g⁻¹ et correspond à l'échantillon 10X. Ce dernier a ensuite été dilué au 1/10 par ajout de 1800 mg de sol non amendé (et non traité au n-hexane) et mélangé pour constituer l'échantillon 1X (200 mg phénanthrène kg⁻¹ de sol sec).

La minéralisation de la cellulose a été mesurée à partir d'échantillons de 2,0 g de sol amendé à raison de 750 mg de cellulose par kg de sol sec. Pour cela, chaque échantillon a été préparé à partir de 2 g de sol sec, mélangé à 1,5 mg de poudre de cellulose de bois d'épicéa (Fluka).

3.4.2 Incubation

Chacun des échantillons de sols (amendé ou non) a été déposé dans un flacon Plasma 125 ml en verre préalablement stérilisé, puis humidifié à 80% (H₂O déminéralisé stérile) de sa capacité de rétention en eau (WRC) avant d'être fermé hermétiquement par un bouchon en caoutchouc-butyl et mis à incuber à 24°C à l'obscurité. Une fois fermé, chaque flacon a été pesé pour connaître sa masse avant incubation.

Des mesures du taux de CO₂ dans l'atmosphère des flacons ont été réalisées tous les jours pendant 3 jours, puis tous les 2 ou 3 jours. À chaque temps, une partie de l'atmosphère des flacons (4 ml) a été prélevée à l'aide d'une seringue équipée d'une aiguille pour mesurer la concentration de CO₂ (cf. Chap. 2, § 3.4.3). Après mesure, les flacons ont été ouverts sous un PSM (poste de sécurité microbiologique) et mis à « aérer » durant 15 min pour renouveler leur atmosphère.

Afin de maintenir le taux d'humidité des échantillons après aération, la masse des flacons (avec leur bouchon) a été mesurée à chaque temps et comparée à leur masse initiale avant incubation. Lorsqu'une perte de masse était détectée, celle-ci était compensée par l'ajout d'eau déminéralisée stérile.

3.4.3 Mesure du CO₂ par détection du rayonnement infrarouge

La concentration du dioxyde de carbone dans l'atmosphère des flacons fermés a été mesurée à l'aide d'un automate d'analyse CO₂. Ce dernier est constitué d'un coffret d'injection couplé à un analyseur infrarouge (Binos 1004[®], Rosemont Analytical). Il permet ainsi de déterminer la concentration en CO₂ dans un mélange gazeux par mesure photométrique de l'absorption de ce gaz, à une longueur d'onde de 2325,6 nm (infrarouge). L'appareil fournit une mesure de la concentration de CO₂ en ppm (partie par million) à partir de l'injection d'une aliquote (4 ml) de l'atmosphère des flacons. Les valeurs mesurées ont ainsi été transformées en quantité de carbone par masse d'échantillon, en utilisant la formule (7) :

$$CO_2 (\mu\text{g C g échantillon}^{-1}) = \frac{CO_2(\text{ppm}) \times MW(C) \times Vol_{\text{flacon}} \times Dil_{\text{Boucle}}}{m_{\text{échantillon}} \times VM(CO_2)} \quad (7)$$

Avec : CO_2 (ppm), la valeur indiquée par l'analyseur de gaz ; $MW(C)$, la masse molaire du carbone, soit 12 g mol⁻¹ ; Vol_{flacon} , exprimé en ml, qui correspond au volume d'atmosphère présent dans le flacon ; Dil_{Boucle} , le facteur de dilution du gaz, qui est dépendant de la boucle de dilution utilisée. Les mesures ont été réalisées avec une boucle de 2 ml, correspondant à un facteur de 42,86 ; $m_{\text{échantillon}}$, la masse de l'échantillon de sol, exprimée en g ; $VM(CO_2)$, le volume molaire du CO₂, exprimé en mol ml⁻¹ et calculé en fonction de la température selon la formule (8) :

$$VM(CO_2) = (20,74 + 0,088 \times \text{temp}) \times 10^3 \quad (8)$$

Avec : temp , la température exprimée en degré Celsius (°C).

3.5 Lien entre diversité taxonomique et fonctions de dégradation du phénanthrène et de la cellulose

Afin de pouvoir lier une diversité taxonomique aux fonctions de dégradation du phénanthrène et de la cellulose, nous avons utilisé la technique de *stable isotope probing* (SIP). En effet, celle-ci permet d'étudier les microorganismes possédant la ou les fonction(s) de dégradation d'un substrat marqué par un isotope lourd. Brièvement, la technique se base sur l'incorporation de l'isotope lourd (provenant de la dégradation du substrat marqué) dans l'ADN, puis sur l'identification taxonomique de l'ADN marqué par l'isotope. Dans le cadre de cette thèse, les expériences de SIP ont permis d'étudier les microorganismes possédant les fonctions de dégradation du phénanthrène ou de la cellulose. Les suivis de la production de CO₂ après ajout de phénanthrène ou de cellulose ont permis de déterminer leur cinétique de minéralisation. Puis, ces cinétiques de minéralisation ont permis de déduire le temps d'incubation optimal pour les deux expériences de *stable isotope probing*.

3.5.1 Préparation et incubation

Dans le cadre des expériences de SIP, pour chaque composé testé (phénanthrène ou cellulose), un lot d'échantillon a été préparé avec le composé non marqué (¹²C) et un lot a été préparé avec le composé marqué au ¹³C. De plus, dans chacun des lots d'échantillons préparés avec les composés ¹²C ou ¹³C, deux sous-lots d'échantillons ont été préparés : l'un pour être immédiatement arrêté avant incubation (t = 0) et l'autre pour être arrêté après incubation (t = final). Au final, pour chaque composé, 4 lots ont été préparés : ¹²C_t = 0 ; ¹²C_t = final ; ¹³C_t = 0 ; ¹³C_t = final. La préparation des échantillons de sols par ajout du composé ¹²C (¹²C-phénanthrène, Fluka ; ¹²C-Cellulose, IsoLife bv) ou uniformément marqué au carbone 13 sur tous les carbones (¹³C-phénanthrène, Sigma-Aldrich ; ¹³C-cellulose, IsoLife bv) a été réalisée suivant le même protocole que décrit pour les mesures de minéralisation (cf. Chap. 2, § 3.4.1).

Après amendement, les échantillons ont été transférés dans des flacons Plasma et réhumidifiés à 80% de leur WRC (cf. Chap. 2, § 3.4.2). Dans le cadre de la SIP-phénanthrène, un tube ouvert contenant 2 ml de NaOH 1M a été ajouté dans les flacons au début de l'incubation, afin de piéger le CO₂ dans l'atmosphère du flacon. Les lots d'échantillons « t = final » ont été incubés à 24°C à l'obscurité durant un total de 12 jours. Au bout de 6 jours d'incubation, les flacons ont été ouverts sous PSM pour être remis en équilibre avec l'atmosphère. Dans le cadre de la SIP-cellulose, aucun piège à CO₂ n'a été ajouté, mais une partie de l'atmosphère des flacons a été prélevée pour mesurer le δ¹³C-CO₂. Les lots

d'échantillons « t = final » ont ainsi été incubés à 24°C à l'obscurité durant un total de 17,2 jours avec prélèvement d'une partie de leur atmosphère pour mesure du $\delta^{13}\text{C}$ du CO_2 après 77, 245 et 413 h d'incubation. Après chaque prélèvement de leur atmosphère, les flacons ont été ouverts sous PSM pour renouveler l'atmosphère. À l'arrêt des incubations, les échantillons de sols ont été stockés à -80°C pour être utilisés ultérieurement. Ces échantillons congelés ont ainsi été utilisés pour doser le $\delta^{13}\text{C}$ des sols (cf. Chap. 2, § 3.5.2) et les concentrations en phénanthrène (cf. Chap. 2, § 2.3), et pour en extraire les ADN génomiques (cf. Chap. 2, § 3.6.1).

3.5.2 Mesure du $\delta^{13}\text{C}$

Les mesures du $\delta^{13}\text{C}$ des sols et du $\delta^{13}\text{C}\text{-CO}_2$ ont été réalisées par la plateforme PTEF (plateforme technique d'écologie fonctionnelle) du centre INRA de Champenoux.

Le $\delta^{13}\text{C}$ des sols a été obtenu à partir de l'analyse d'échantillons de sol à l'aide d'un analyseur élémentaire (vario ISOTOPE cube, Elementar, Hanau, Allemagne) relié à un spectromètre de masse à rapport isotopique (IsoPrime 100, Isoprime Ltd, Cheadle, Angleterre). Pour cela, 5 mg de sol (lyophilisé et broyé) ont été pesés et déposés dans une capsule en étain (8 x 5 mm, Elemental Microanalysis), puis la capsule a été repliée sur elle-même pour l'analyse de son contenu.

Pour le $\delta^{13}\text{C}\text{-CO}_2$, la plateforme a fourni des flacons de 12 ml équipés d'un bouchon à septum (Exetainers® Labco) remplis d'azote gazeux (N_2). À chaque temps de mesure, 100 μl de l'atmosphère des flacons de SIP ont été prélevés à l'aide d'une seringue étanche au gaz (SGE™) et injectés dans un flacon Exetainer® dont le contenu a été analysé *via* un module d'analyse de gaz couplé à une IRMS (*isotope ratio mass spectrometry*). Brièvement, les flacons ont été placés dans un bac Multiflow® (Isoprime / Elementar) pour l'analyse des gaz. L'injection en boucle était équipée d'une boucle de 50 μl qui envoie le gaz à une colonne de chromatographie en phase gazeuse (HayeSep Q 60-80 mesh, 2,5 m, DI: 2,0 mm, T = 80°C) sur laquelle le gaz CO_2 est élué. Après son élution, le CO_2 passe sur une colonne Nafion® pour éliminer l'eau résiduelle, et les composés indésirables sont évacués avec un système automatique de valves. Les flux d'hélium étaient fixés à 30 ml min^{-1} . Ce Multiflow® était lié *via* un système de « split » ouvert au spectromètre de masse isotopique (Isoprime / Elementar). Le « *current trap* » de l'IRMS était réglé à 400 μA . La durée totale de la mesure était de 300 s.

Les mesures fournissent une valeur de $\delta^{13}\text{C}$ qui est transformé en ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ selon la formule (9) :

$$R \frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}} = R_{vPDB} \times \left(1 + \frac{\delta^{13}\text{C}}{1000}\right) \quad (9)$$

Avec R_{vPDB} étant la valeur de ratio $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ du standard de référence (Vienna *Pee Dee Belemnite*), soit 0,0112375.

3.6 Analyse des communautés microbiennes

3.6.1 Extractions des ADN génomiques

L'ADN génomique (ADNg) a été extrait directement à partir de sols congelés (pour les analyses sur la collection de 10 sols) ou de sols congelés, lyophilisés et broyés (pour les expériences de *stable isotope probing*) à l'aide d'un kit *Fast DNA Spin kit for Soil* (MP Biomedicals, France) en suivant les instructions du fabricant. Après son extraction, à partir d'environ 0,5 g de sol, l'ADN a été repris dans 100 µl d'eau sans DNase et apyrogène, et sa concentration et sa pureté (ratio A_{260}/A_{280}) ont été mesurées à l'aide d'un spectrophotomètre (UV1800, Shimadzu) équipé d'un adaptateur TrayCell™ (Hellma®).

3.6.2 Séparation des ADN sur gradient de CsCl et précipitation

Après arrêt des incubations dans les expériences de SIP, les ADN génomiques des échantillons de sol ont été extraits et quantifiés. Dans ces ADNg se trouvait de l'ADN marqué au ^{13}C (fraction lourde, appartenant aux microorganismes ayant utilisé le composé marqué comme source de carbone), que l'on sépare de l'ADN ^{12}C (fraction légère) *via* la formation d'un gradient de densité de chlorure de césium (CsCl) par ultracentrifugation, puis un fractionnement et une précipitation. En parallèle, les mêmes étapes de séparation ont été réalisées sur les ADNg extraits des échantillons incubés avec les composés non marqués dans les expériences de SIP. Ces étapes ont été réalisées en se basant sur le protocole de Neufeld et al. (2007). Au total, pour chacun des substrats utilisés (i.e. phénanthrène et cellulose) dans les expériences de SIP, 60 échantillons d'ADNg (10 sols en triplicats, incubés avec le composé ^{12}C ou marqué au ^{13}C) ont ainsi été fractionnés.

3.6.2.1 Préparation de la solution pour ultracentrifugation

La formation du gradient de densité par ultracentrifugation se fait dans une solution de CsCl contenant l'ADNg dans du tampon GB. Cette solution est préparée à partir du mélange d'une solution de CsCl et d'une solution d'ADNg-GB, elle-même préparée en mélangeant du tampon GB avec la solution d'ADN.

Ainsi, du tampon GB (0,1 M Tris-HCl ; 0,1 M KCl ; 1 mM EDTA) a été préparée, puis stérilisée par filtration à 0,2 µm (filtre seringue Acrosdisc) et autoclavage. L'ADNg extrait des sols a été ajouté à cette solution à raison de 3 µg pour tous les sols, sauf Neuves-Maisons et Uckange. Pour ces derniers, une faible quantité d'ADN a été obtenue après extraction. Pour ces sols, nous avons donc choisi d'utiliser 650 ng et 900 ng d'ADN dans les expériences de SIP-Phénanthrène et SIP-cellulose, respectivement. Les volumes de tampon GB à ajouter à la solution d'ADN ont été calculés *via* la formule (11) qui dépend du résultat des formules (9) et (10) (voir ci-dessous).

Une solution de CsCl (Fischer Scientific) à 7,163 M a également été préparée. Pour aider à dissoudre le chlorure de césium dans l'eau, il était nécessaire de chauffer celle-ci à 30°C et de maintenir une agitation constante. À une concentration de 7,163 M, la solution de CsCl a théoriquement une densité entre 1,88 et 1,89 g ml⁻¹ à 20°C. Pour connaître la densité exacte de notre solution, 10 ml ont été prélevés et pesés à 3 reprises.

La solution de CsCl + ADNg-GB pour ultracentrifugation doit avoir une densité finale de 1,725 g ml⁻¹. Nous avons choisi de préparer 6 ml de cette solution, à l'aide des formules (10) et (11) qui permettent de déterminer le volume des solutions de CsCl et d'ADNg-GB à utiliser en fonction de la densité de la solution de CsCl préparée. En ayant calculé le volume de solution d'ADNg-GB à utiliser, il était possible de déterminer le volume de tampon GB à utiliser, selon la formule (12).

$$Vol_{CsCl} = \frac{(D_{finale} - 1) \times Vol_{finale}}{D_{CsCl} - 1} \quad (10)$$

$$Vol_{ADNg-GB} = Vol_{finale} - Vol_{CsCl} \quad (11)$$

$$Vol_{GB} = Vol_{ADNg-GB} - Vol_{ADNg} \quad (12)$$

Avec D_{CsCl} et Vol_{CsCl} correspondant à la densité et au volume de solution de CsCl à utiliser ; V_{finale} et D_{finale} correspondant au volume et à la densité de la solution de CsCl + ADNg-GB, soit 6 ml avec une densité de 1,725 g ml⁻¹ ; $Vol_{ADNg-GB}$, le volume de la solution d'ADNg-GB à utiliser ; Vol_{GB} , le volume de la solution de tampon GB à utiliser ; et Vol_{ADNg} , le volume de solution d'ADNg correspondant aux quantités d'ADNg choisies (i.e. 3000, 900 ou 650 ng).

3.6.2.2 Ultracentrifugation, fractionnement et précipitation

Une fois les solutions de CsCl + ADN_g-GB préparées, celles-ci ont été transférées dans des tubes (Quick-Seal® PA 5,1 ml ; Beckman) pour ultracentrifugation. Pour chaque réplicat d'un sol (e.g. réplicat 1 sol 1), un couple de tubes a été préparé : l'un correspondant à l'ADN_g de l'échantillon incubé avec le substrat ¹³C (e.g. réplicat 1 sol 1 – ¹³C-phénanthrène), et l'autre à l'ADN_g de l'échantillon incubé avec le substrat ¹²C (e.g. réplicat 1 sol 1 – ¹²C-phénanthrène). Dans chaque couple, les tubes ont été pesés et leur masse ajustée pour être identique au centième de gramme près. Puis les couples de tubes ont été scellés à chaud à l'aide d'un appareil dédié (Quick-Seal Cordless Tube Topper, Beckman) et positionnés en face l'un de l'autre dans le rotor de l'ultracentrifugeuse. Les ultracentrifugations ont été réalisées au centre INRA de Champenoux à l'aide d'une ultracentrifugeuse Optima™ L-80 XP équipée d'un rotor VTI 65.2 (Beckman) possédant 16 emplacements pour tubes (soit 8 couples). Les ultracentrifugations ont été réalisées à 42 400 rpm (= 176 985 g), à 20°C durant 40 h. L'arrêt s'est fait sans freinage, pour ne pas compromettre l'intégrité du gradient.

Une fois le gradient de densité formé par ultracentrifugation, les tubes ont été collectés très délicatement pour fractionner leur contenu à l'aide d'un équipement dédié (i.e. *fraction recovery system*, Beckman). Cet équipement se compose d'un support avec une aiguille percée traversant sa base, qui permet de récupérer les fractions au goutte-à-goutte en ayant percé le fond du tube. Pour chaque tube, 13 fractions d'environ 400 µl (soit 20 à 25 gouttes) ont ainsi été récupérées dans des tubes Eppendorf 2 ml. À noter qu'il était également nécessaire de faire un petit trou sur le haut du tube à fractionner, afin de permettre une entrée d'air et l'écoulement de son contenu à travers l'aiguille du système de fractionnement. Une fois les fractions d'un échantillon obtenues, la formation du gradient de densité a été vérifiée en pesant très précisément 200 µl de chaque fraction. En effet, les premières fractions (récoltées en bas du tube) doivent avoir la densité la plus élevée (deuxième fraction ≈ 1,750 g ml⁻¹) et celle-ci doit diminuer au fur et à mesure des fractions suivantes (douzième fraction ≈ 1,700 g ml⁻¹). À noter que la 1^{ère} et la 13^{ème} fraction n'ont pas été utilisées pour la suite.

Une fois les tubes fractionnés et la formation du gradient vérifiée, l'ADN des fractions a été récupéré en suivant les instructions de Neufeld et al. (2007). Brièvement, l'ADN a été précipité et séparé de la solution de chlorure de césium à l'aide d'une solution de PEG (polyéthylène glycol) + glycogène. Puis, le culot d'ADN a été lavé à l'éthanol, séché et repris dans 30 µl de tampon TE durant 1 nuit à 4°C avant d'être congelé en attente d'être utilisé (i.e. qPCR, PCR).

À noter que, contrairement aux recommandations de Neufeld et al. (2007), la solution de PEG + glycérol ne peut être filtrée et a été uniquement stérilisée par autoclavage.

3.6.3 Quantification des microorganismes et de gènes fonctionnels par qPCR

3.6.3.1 Amorces qPCR

L'abondance des bactéries, des champignons et des archées a été évaluée par PCR quantitative en temps réel (qPCR) en utilisant les couples d'amorces : 968F / 1401R (Felske et al., 1998), Fung5F / FF390R (Lueders et al., 2004), 571F / 910R (Baker et al., 2003), ciblant respectivement l'ADNr 16S bactérien, l'ADNr 18S fongique et l'ADNr 16S des archées. De la même manière, l'abondance des bactéries capables de dégrader les HAP a été évaluée *via* les couples d'amorces : PAH-RHD α GN3 F/R et PAH-RHD α GP1 F/R (Cébron et al., 2008), qui ciblent les gènes codant la sous-unité α des HAP-dioxygénase hydrolysant les noyaux aromatiques des HAP, respectivement chez les bactéries à Gram négatif (GN, Protéobactéries) et à Gram positif (GP, Actinobactéries). Les séquences de ces amorces sont rapportées dans le **Tableau 2.1**.

Tableau 2.1. Noms et séquences des amorces utilisées pour les amplifications par qPCR et pour le séquençage haut débit.

Amorce	Sequence (5' - 3')	Références
Fung5F	GTA AAA GTC CTG GTT CCC C	Lueders et al., 2004 ; Smit et al., 1999
FF390R	CGA TAA CGA ACG AGA CCT	Lueders et al., 2004 ; Vainio and Hantula, 2000
968F	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA	Felske et al., 1998 ; Nübel et al., 1996
1401R	CGG TGT GTA CAA GAC CC	Felske et al., 1998 ; Nübel et al., 1996
571F	GCY TAA AGS RIC CGT AGC	Baker et al., 2003
910R	GCT CCC CCG CCA ATT C	Baker et al., 2003
PAH-RHD α GN F	GAG ATG CAT ACC ACG TKG GTT GGA	Cébron et al., 2008
PAH-RHD α GN R	AGC TGT TGT TCG GGA AGA YWG TGC MGT T	Cébron et al., 2008
PAH-RHD α GP F	CGG CGC CGA CAA YTT YGT NGG	Cébron et al., 2008
PAH-RHD α GP R	GGG GAA CAC GGT GCC RTG DAT RAA	Cébron et al., 2008
S-D-Bact-0341-a-S-17	CCTACGGGAGGCAGCAG	Thomas and Cébron, 2016 ; Muyzer et al., 1993
S-D-Bact-0787-b-A-20	GGA CTA CNV GGG TWT CTA AT	Thomas and Cébron, 2016 ; Caporaso et al., 2011
FR1	ANCCATTCAATCGGTAN	Tardy et al., 2015 ; Grangeteau et al., 2016 ; Prévost-Bouré et al., 2011

Code IUPAC pour les bases des amorces dégénérées : Y = C ou T ; S = G ou C ; R = A ou G ; K = G ou T ; W = A ou T ; M = A ou C ; D = A ou G ou T ; N = A ou C ou G ou T ; I = Inosine.

3.6.3.2 Mix réactionnel qPCR

Le mix réactionnel d'un volume final de 20 μl , était composé de 10 μl d'IQ SYBR green SuperMix (Bio-rad), 0,8 μl de chacune des amorces F et R (10 μM), 0,4 μl de solution de BSA 3% (*bovin serum albumin*), 0,2 μl de DMSO (*dimethyl sulfoxyde*), 0,08 μl de T4gp32 (protéine 32 du bactériophage T4 ; MP Biomedicals, France) et 1 μl d'ADN matriciel. Ce dernier correspondait aux échantillons d'ADN génomique dilués à 5 ng μl^{-1} , aux échantillons d'ADN après fractionnement (SIP), ou à l'ADN du plasmide standard (Cébron et al., 2008), dilué en série de manière à avoir de 10^8 à 10^1 copies μl^{-1} , permettant d'obtenir une droite de calibration pour quantifier nos échantillons environnementaux.

3.6.3.3 Programmes d'amplification qPCR

La quantification a été réalisée *via* un système de détection CFX-96 Real-Time PCR (Bio-Rad). Différents programmes d'amplifications ont été utilisés, selon les amorces et les gènes à quantifier. La courbe de dénaturation a été réalisée de 50-54°C à 95°C selon le couple d'amorces, avec une augmentation progressive de 0,5°C et une lecture de la fluorescence durant 5 s à chaque température. Ces programmes sont décrits dans le **Tableau 2.2**.

Tableau 2.2. Programmes qPCR utilisés pour amplifier et quantifier les ADNr 16S des bactéries, les ADNr 18S des champignons et les ADNr 16S des archées, et les gènes PAH-RHD α des bactéries à GN et GP.

		ADNr 16S Bactéries	ADNr 18S Champignons	ADNr 16S Archées	PAH-RHD α GN	PAH-RHD α GP
couple d'amorces		968F 1401R	Fung5F FF390R	arch_571F Arch_910R	PAH-RHD α GN3 F PAH-RHD α GN3 R	PAH-RHD α GP1 F PAH-RHD α GP1 R
Programme	pré-dénaturation	95°C 5 min	95°C 5 min	95°C 5 min	95°C 5 min	94°C 3 min
	dénaturation	95°C 20 s	95°C 20 s	95°C 20 s	95°C 20 s	95°C 20 s
	hybridation	56°C 20 s X 39	52°C 20 s X 44	60°C 20 s X 49	57°C 20 s X 44	54°C 20 s X 44
	élongation	72°C 30 s cycles	72°C 30 s cycles	72°C 20 s cycles	72°C 20 s cycles	72°C 20 s cycles
	lecture fluorescence	82°C 5 s	80°C 5 s	82°C 5 s	82°C 5 s	82°C 5 s
Courbe de dénaturation	température de départ (+0,5/cycle)	51°C	50°C	50°C	54°C	54°C
	température finale	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C
	lecture fluorescence	5 s	5 s	5 s	5 s	5 s

3.6.4 Diversité taxonomique : PCR et séquençage

La diversité taxonomique des bactéries et champignons a été déterminée par séquençage des gènes codant, respectivement, les ARNr 16S bactériens et les ARNr 18S fongiques à partir de l'ADNg des sols de notre collection, ou de l'ADN des fractions lourdes (après séparation sur gradient de CsCl) des échantillons des expériences de SIP.

3.6.4.1 Amorces PCR

La région V3-V4 du gène codant l'ARNr 16S (environ 550 pb) a été amplifiée à l'aide du couple d'amorces S-D-Bact-0341-a-S-17 et S-D-Bact-0787-b-A-20 (Muyzer et al., 1993; Caporaso et al., 2011) en suivant la stratégie d'indexation double (*Dual indexing strategy*, **Figure 2.8**) décrite par Kozich et al. (2013). De la même manière, le couple d'amorces FR1 et FF390 (Vainio and Hantula, 2000) a été utilisé pour amplifier la région V7-V8 du gène codant l'ARNr 18S (environ 390 pb), également selon la stratégie d'indexation double.

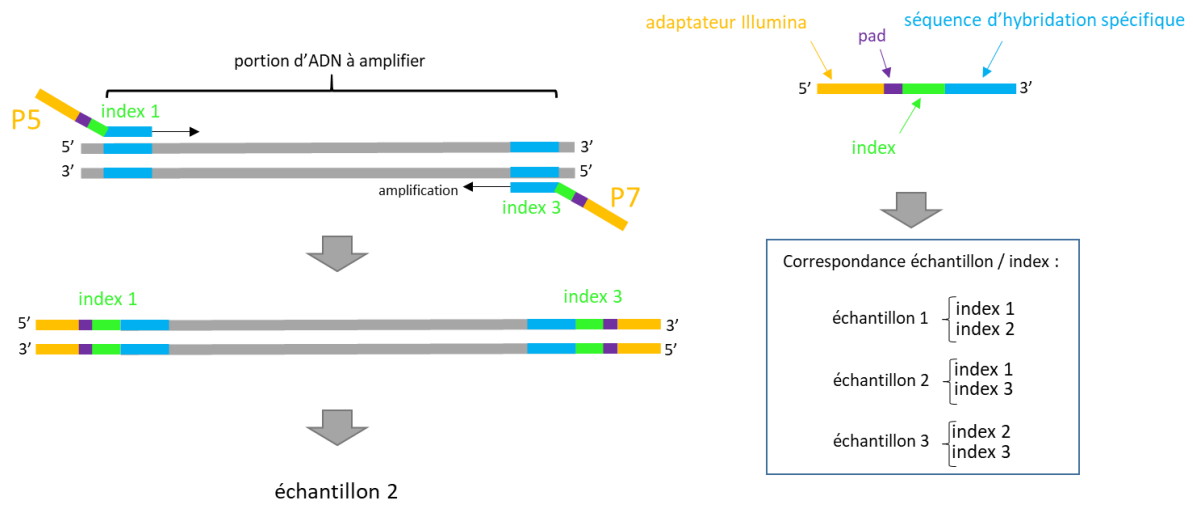


Figure 2.8. Principe de la stratégie d'indexation double.

Les amorces ciblant les bactéries et les champignons étaient respectivement constituées de 66 et 62 bases pour les amorces *forward* et, 64 et 67 bases pour les amorces *reverse*. Chacune de ces amorces était composée de 4 séquences particulières (de 5' en 3') : i) une séquence adaptateur P5 (amorces *forward*) de 29 bases ou P7 (amorces *reverse*) de 24 bases permettant la fixation des fragments d'ADN sur la cellule de séquençage Illumina ; ii) une séquence dite « index » de 8 bases qui permet, grâce à la stratégie de double indexage, d'identifier l'échantillon d'où provient le fragment d'ADN séquencé ; iii) une séquence « pad » riche en GC qui permet d'augmenter la température d'hybridation (T_m), nécessaire pour le séquençage Illumina ; iv) la séquence ciblant spécifiquement les gènes codant l'ARNr 16S ou l'ARNr 18S. Les séquences de ces amorces sont indiquées dans le **Tableau 2.3**. Ici, il n'y a qu'une seule PCR permettant de générer la librairie pour l'envoi au séquençage à la société Genewiz.

Cette stratégie a été utilisée pour le séquençage des ARNr 16S et ARNr 18S à partir de l'ADNg des sols et à partir de l'ADN des fractions lourdes des expériences de SIP. Toutefois, cette

stratégie ayant échoué pour le séquençage des ADNr 18S des fractions lourdes de l'expérience de SIP-cellulose, nous avons changé d'approche. Dans la seconde approche, les amorces ciblant les champignons étaient constituées de 51 bases pour l'amorce *forward* et 52 bases pour l'amorce *reverse*. Chacune de ces amorces était composée de 2 séquences particulières (de 5' en 3') : i) un adaptateur permettant la fixation des amorces pour la seconde PCR ; ii) la séquence ciblant spécifiquement les gènes codant l'ARNr 18S (correspondant aux amorces citées ci-dessus). Les séquences de ces amorces sont indiquées dans le **Tableau 2.3**. Ici nous avons réalisé une première PCR, puis les amplicons ont été fournis à la société Microsynth AG (Balgach, Suisse) pour qu'ils réalisent une seconde PCR permettant d'ajouter les index et les adaptateur d'Illumina, avant séquençage.

Tableau 2.3. Noms et séquences des amorces utilisées pour les amplifications par PCR.

Cible	Amorce	Séquence (5' - 3')	Références
région V3-4 ADNr 16S	S-D-Bact-0341-a-S-17	CCTACGGGAGGCAGCAG	Thomas and Cébron, 2016 ; Muyzer et al., 1993
	S-D-Bact-0787-b-A-20	GGA CTA CNV GGG TWT CTA AT	Thomas and Cébron, 2016 ; Caporaso et al., 2011
région V7-8 ADNr 18S	FR1	ANCCATTCAATCGGTAN	Tardy et al., 2015; Vainio and Hantula, 2000
	FF390R	CGA TAA CGA ACG AGA CCT	Lueders et al., 2004 ; Vainio and Hantula, 2000

Code IUPAC pour les bases des amorces dégénérées : W = A ou T ; V = A ou C ou G ; N = A ou C ou G ou T.

3.6.4.2 Mélanges réactionnels PCR

Les mélanges réactionnels PCR ont été réalisés dans un volume final de 50 µl, contenant 1 ou 2 µl (bactéries et champignons) d'ADN matrice, 10 µl de tampon 5X HF Phusion, 1,5 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,25 µl de DMSO, 0,1 µl de T4pg32 (MP Biomedicals, France), 0,1 µl de la polymérase haute-fidélité Phusion (Thermo Scientific) et d'1 µl de chacune des amorces à 10 µM (Eurofins). Dans le cadre du séquençage de la communauté totale (bactérienne ou fongique), 2 µL d'ADNg matriciel dilué à 5 ng µl⁻¹ ont été utilisés. A l'inverse, l'ADN n'a pas été dilué pour le séquençage des ADN des fractions lourdes issues des expériences de SIP, et seul 1 µl d'ADN matriciel a été utilisé.

3.6.4.3 Programmes d'amplification PCR

Pour séquençage par la société Genewiz, les gènes codant les ARNr bactériens et fongiques ont été amplifiés selon des programmes PCR différents, décrits dans le **Tableau 2.4**. Brièvement, chacun des programmes était composé de 4 étapes : i) une pré-dénaturation ; ii) une amplification avec réduction de la température d'hybridation à chaque cycle

(*touchdown*), pour diminuer le risque d'hybridation aspécifique ; iii) une amplification avec température d'hybridation constante ; iv) une élongation finale.

Concernant le séquençage par la société Microsynth, les gènes codant les ARNr fongiques ont été amplifiés avec des nombre de cycles différents selon le sol et la condition (i.e. ^{12}C ou ^{13}C) afin d'obtenir, après l'amplification PCR, une quantité d'ADN similaire entre les sols. Les programmes utilisés ne contenaient pas d'étape de *touchdown* et l'hybridation des amorces s'est faite à une température constante de 54°C (**Tableau 2.4**).

Tableau 2.4. Programmes PCR utilisés pour amplifier les ADNr 16S des bactéries et les ADNr 18S des champignons.

		ADNr 16S bactéries (Genewiz)			ADNr 18S champignons (Genewiz)			ADNr 18S champignons (Microsynth)		
couple d'amorces		S-D-Bact-0341-a-S-17 S-D-Bact-0787-b-A-20			FF390 FR1			FF390 FR1		
Programme PCR	pré-dénaturation	94°C	5 min		94°C	5 min		94°C	5 min	
	dénaturation	94°C	30 s	X 18 cycles	94°C	30 s	X 20 cycles			
	hybridation	63°C (-0,5°C/cycle)	30 s		63°C (-0,5°C/cycle)	30 s				
	élongation	72°C	30 s		72°C	30 s				
	dénaturation	94°C	30 s	X 15 cycles	94°C	30 s	X 14 cycles	94°C	30 s	X 23-32 cycles (*)
hybridation	54°C	30 s	53°C		30 s	54°C		30 s		
élongation	72°C	30 s	72°C		30 s	72°C		30 s		
élongation finale	72°C	7 min		72°C	7 min		72°C	7 min		

(*) Dans le cadre de la PCR réalisée pour le séquençage des ARNr 18S par la société Microsynth, les échantillons d'ADN des fractions lourdes de l'expérience de SIP-cellulose ont été amplifiés avec des nombre de cycles différents selon le sol et la condition (i.e. ^{12}C ou ^{13}C) afin d'obtenir, après l'amplification PCR, une quantité d'ADN similaire entre les sols.

3.6.4.4 Préparation de la librairie d'amplicons

Après amplification, les produits PCR ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1%.

Pour le séquençage des ADNr 16S et 18S par la plateforme Genewiz, les produit ont été purifiés à l'aide d'un kit UltraClean-htp-96 well PCR Clean-up (MoBio) en suivant les instructions du fabricant. Les produits PCR purifiés ont ensuite été quantifiés *via* un kit Quant-iT Picogreen ds-DNA (Invitrogene). Puis une librairie d'amplicons a été préparée sur la base des concentrations d'ADN dans chaque échantillon afin d'obtenir un mélange équimolaire à 50 nM. Le volume final de la librairie obtenue après mélange des produits PCR était supérieur à celui préconisé pour le séquençage. Ainsi, la librairie a été re-purifiée *via* un kit QIAquick PCR (Quiagen) pour être reconcentrée et atteindre le volume et la concentration requise pour séquençage (> 20 μl à > 15 nM). Finalement, la librairie a été envoyée à la plateforme Genewiz

(South Plainfield, USA) pour être séquencée selon la technique de séquençage Illumina MiSeq V2 2x 250 pb.

Dans le cadre du séquençage des ARNr 18S issus de l'expérience de SIP-Cellulose par la société Microsynth, les amplicons PCR n'ont pas été purifiés et ont directement été envoyés au prestataire. La librairie d'amplicons a été réalisée par celui-ci.

3.6.4.5 Traitement des données de séquençage

Le séquençage Illumina fournit une très grande quantité de séquences brutes qu'il faut analyser *via* une succession d'étapes pour en tirer l'information. Cette analyse a été réalisée en suivant la procédure MiSeq SOP disponible en mars 2017 et décrite par Kozich et al. (2013) en utilisant le logiciel Mothur V1.38.0. Ci-dessous sont présentées les paramètres utilisés pour réaliser le traitement des données issues du séquençage des ARNr 16S et 18S dans les sols initiaux. Concernant le traitement des données de séquençage issues des expériences de SIP, les paramètres utilisés étaient légèrement différents et sont décrits dans les chapitres correspondants (chapitres 5 et 6). Brièvement, durant la première étape (*trimming*), les séquences brutes (séquences d'environ 250 bases en *reverse* et en *forward*) ont d'abord été triées selon les critères suivants : i) leur score de qualité (QScore) était au minimum de 20 (16S bactéries et 18S champignons). ii) l'assemblage des séquences brutes *reverse* et *forward* formait une séquence d'une longueur comprise entre 404 pb et 454 pb (16S bactéries) ou entre 312 pb et 320 pb (18S champignons). iii) les séquences ne présentaient aucune bases ambiguës (16S bactéries et 18S champignons). Puis, l'alignement des séquences uniques a été réalisé vis-à-vis de la base de données Silva V132 (Décembre 2017). Les séquences chimériques ont été détectées à l'aide du logiciel Uchime (Edgar et al., 2011) et retirées des données. La taxonomie a été assignée en utilisant la base de données Silva bactéries ou champignons, avec un *cutoff* de 80 (16S bactéries et 18S champignons). Les séquences non affiliées, ou affiliés aux mitochondries, aux chloroplastes, aux archées, et aux eucaryotes et/ou aux bactéries ont été retirées, selon que l'on cherchait à ne garder que les séquences issues des bactéries ou des champignons. Par ailleurs, les séquences uniques (singletons) ont également été retirées. Puis, les séquences ont été regroupées en OTUs (*Operational Taxonomic Units*) lorsqu'elles présentaient au moins 97% de similarité. Enfin, les jeux de données obtenus ont été réduits au plus petit nombre de séquences retrouvé pour un échantillon, afin de pouvoir comparer l'ensemble des échantillons entre eux.

3.7 Analyse des données

3.7.1 Indices de diversité taxonomique

La diversité taxonomique globale peut se diviser en 3 composantes : i) la diversité alpha, qui correspond à la richesse et à la proportion des taxons au sein d'une même communauté ; ii) la diversité bêta, qui reflète la dissemblance entre 2 communautés distinctes, le long d'un gradient ou dans une région donnée ; iii) la diversité gamma, qui exprime la différence entre 2 communautés provenant de zones géographiques distinctes. Dans le cadre de cette thèse, des indices décrivant la diversité taxonomique alpha et bêta ont été utilisés. Parmi les indices de diversité alpha, le plus couramment utilisé est l'indice de Shannon (H') qui se base sur la richesse en taxon (ou OTU) et l'abondance relative des taxa (ou OTUs) dans la communauté (Bertrand et al., 2011). L'indice de diversité de Shannon se calcule selon la formule (13) :

$$H' = - \sum_{i=1}^S \left(\frac{N_i}{N} \log_2 \frac{N_i}{N} \right) \quad (13)$$

Avec N_i , le nombre d'individu (= le nombre de séquences) d'un taxon (= OTU) donné et N , le nombre total d'individus (= le nombre total de séquences) tous taxons confondus. Brièvement, la valeur de H' est minimale lorsque tous les individus de la communauté appartiennent à une seule et même OTU, sa valeur augmente lorsque les individus sont équitablement répartis entre les OTUs et/ou que le nombre d'OTUs augmente, jusqu'à atteindre une valeur maximale lorsque chaque individu de la communauté représente une OTU. À l'indice de Shannon est souvent associé l'indice d'équitabilité de Pielou (J ; formule 14), qui représente l'équité de la répartition des individus parmi les OTUs (Blondel, 1979).

$$J = \frac{H'}{\log_2(S)} \quad (14)$$

Avec H' , la valeur de l'indice de Shannon et S , le nombre taxa/OTUs. Cet indice varie de 0 à 1, avec 0 lorsque qu'une seule OTU domine la communauté et 1 lorsque chacune des OTUs a une abondance identique dans la communauté.

Le séquençage haut débit ne permet pas d'obtenir 100% des séquences d'un échantillon, et donc ne permet pas de connaître la totalité des OTUs dans la communauté. Ainsi, pour estimer la richesse en OTU, on utilise notamment les estimateurs Chao1 et ACE, qui vont extrapoler le nombre théorique d'OTUs dans la communauté à partir du nombre d'OTUs obtenus dans l'échantillon et de la couverture de séquençage.

Différents indices décrivant la diversité taxonomique alpha et beta ont été calculés *via* Mothur. Ainsi, la diversité alpha a été exprimée à travers l'indice de richesse extrapolée Chao1, l'indice d'équitabilité de Pielou J' et l'indice de diversité de Shannon H' (Hill et al., 2003), tandis que la diversité beta a été estimée *via* l'indice de Bray-Curtis.

3.7.2 Indices de diversité fonctionnelle

De la même manière que pour la diversité taxonomique, la diversité fonctionnelle peut être exprimée sous forme d'indices. Un indice de Shannon fonctionnel et son indice d'équitabilité ont ainsi été calculés selon les formules (13) et (14), pour analyser les données de capacité métaboliques obtenues avec les expériences en microplaques Biolog®, et en microplaques MicroResp™.

Dans le cas des microplaques Biolog®, S correspondait au nombre de substrats consommés, c'est-à-dire présentant une densité optique (DO) corrigée supérieure à 0,2 après 96 h d'incubation ; N_i correspondait à la valeur de DO (corrigée) mesurée pour les substrats consommés ; et N était la somme des DO corrigées des substrats consommés parmi les 62 substrats testés.

Pour les microplaques MicroResp™, S correspondait au nombre de substrats consommés, c'est-à-dire les substrats ayant induit une production de CO₂ (par gramme et par heure) supérieure à celle de la minéralisation basale. N_i correspondait à la valeur de CO₂ (par gramme et par heure) produit pour les substrats consommés (voir formule 6) ; et N était la somme des valeurs de CO₂ (par gramme par heure) produit pour les substrats consommés parmi les 6 substrats testés.

3.7.3 Analyses statistiques uni-variées

L'ensemble des analyses statistiques uni-variées ont été réalisées à l'aide du logiciel RStudio v1.0.136.

3.7.3.1 Comparaisons multiples : test de Kruskal-Wallis

Afin d'identifier les différences significatives entre les sols et les groupes de sols, des tests de Kruskal-Wallis ont été réalisés à l'aide de la fonction « `kruskal.test` » qui fournit une p-value, et de la fonction « `kruskal` » du package *agricolae* (Mendiburu, 2017) qui permet d'effectuer des comparaisons 2 à 2 et d'indiquer quels sols ou groupes de sols sont différents *via* une classification par lettrage (A, B, C ...).

3.7.3.2 Comparaison de 2 échantillons : test T

Afin de comparer deux échantillons pour voir s'ils étaient statistiquement différents, des tests T de Student ont été réalisés *via* la fonction « t.test ».

3.7.3.3 Corrélations de Pearson

L'ensemble des variables décrivant physico-chimiquement ou biologiquement les sols ont été comparées, afin d'identifier les variables qui étaient corrélées (positivement ou négativement) entre elles. Pour cela, la fonction « rcor » du package Hmisc (Harell, Dupont, et al., 2018) a été utilisée. Cette dernière permet d'obtenir une p-value et un coefficient de corrélation R pour chaque comparaison de 2 variables entre elles. Les variables montrant une corrélation ont été représentées graphiquement afin de vérifier qu'il n'y avait pas de « points leviers » pouvant induire une corrélation fortuite.

3.7.4 Analyses statistiques multi-variées

Une part des analyses statistiques multi-variées (PCA, RDA et PLSr) a été réalisée à l'aide du logiciel RStudio v1.0.136, tandis que la seconde part (PCoA et CCA) a été effectuée *via* le logiciel XLStat 2015 (Addinsoft).

3.7.4.1 Analyse en composante principale (PCA)

Des analyses en composantes principales ont été utilisées pour visualiser la répartition des sols entre eux en utilisant plusieurs variables descriptives. Afin de réaliser des analyses les plus pertinentes possibles, 9 variables ont été sélectionnées. Le choix du nombre de variables (n-1) était conditionné par le nombre d'échantillons à comparer (n), à savoir 10 sols. Ainsi, 9 variables ont été choisies pour décrire les sols sur base de leurs caractéristiques physico-chimiques (i.e. pH, contenu en C, N, pH, K), de leur texture (i.e. proportion des fractions argileuses et sableuses) et de leur pollution (i.e. somme des 16 HAP réglementaires et indice de pollution métallique). Les ACP ont été réalisées en utilisant des jeux de données normalisées (centrées-réduites) grâce à la fonction « dudi.pca » du package R ade4 (Dray and Dufour, 2007). Afin de vérifier que la répartition des sols n'était pas le résultat d'un processus aléatoire, un test de Monte-Carlo a également été utilisé. Ce test a été réalisé à l'aide de la fonction « randtest » du package ade4, en utilisant 1000 itérations.

3.7.4.2 Analyse en coordonnées principales (PCoA)

Une analyse en coordonnées principales a été utilisée pour représenter graphiquement la répartition des sols en se basant sur la dissimilarité de leurs communautés fongiques. Pour cela, une matrice contenant les indices de dissimilarité de Bray-Curtis a été calculée à partir de l'abondance des OTUs fongiques dans les réplicats des sols, en utilisant la fonction « *vegdist* » incluse dans le package R *vegan* (Oksanen et al., 2017). Puis cette matrice de dissimilarité a été utilisée pour réaliser une analyse en coordonnées principales *via* XLStat 2015.

3.7.4.3 Analyse canonique de redondance (RDA)

Des analyses canoniques de redondance ont été utilisées pour étudier les relations entre les caractéristiques des sols (variables explicatives) et les indices de diversité fonctionnelle et taxonomique (variables réponses). Ces analyses ont été effectuées *via* la fonction « *rda* » du package R *vegan*. Par ailleurs, pour chaque analyse des redondances, les variables (explicatives) expliquant le mieux la variation des indices de diversité ont préalablement été choisies par sélection rétrograde à l'aide de la fonction « *ordistep* ». Finalement, pour déterminer la significativité et le poids des variables et des axes, des tests de permutation (10 000 itérations) ont été réalisés à l'aide de la fonction « *anova.cca* » du package R *vegan*.

3.7.4.4 Analyse canonique des correspondances (CCA)

Des analyses canoniques des correspondances ont été utilisées pour explorer la relation entre l'abondance relative des groupes d'OTUs enrichis dans les expériences de *stable isotope probing*. Cela afin d'identifier les groupes d'OTUs majoritairement impliqués dans la dégradation des composés testés. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel XLStat 2015.

3.7.4.5 Régression des moindres carrés partiels (PLSr)

L'algorithme de régression partielle des moindres carrés (Wold et al., 1984, 2001) a été utilisé dans le but d'identifier les relations possibles entre les caractéristiques physico-chimiques des sols et la présence et l'abondance des OTUs basées sur la taxonomie. Cette partie a été réalisée grâce à une collaboration avec le Dr Andrea Fanesi durant son post-doctorat au LIEC.

Chapitre 3 :

Les propriétés et la multi-pollution
du sol affectent la diversité
taxonomique et fonctionnelle dans
une gamme de sols présentant un
gradient d'anthropisation

Les activités industrielles intensives du siècle dernier ont laissé derrière elles des sols de friches, généralement multi-contaminés par des hydrocarbures (i.e. HAP) et des éléments métalliques. La pression exercée par cette multi-pollution depuis des décennies a dû conduire à une adaptation des communautés microbiennes du sol, modifiant potentiellement leur diversité taxonomique, mais aussi fonctionnelle. Or, les microorganismes étant des acteurs clés des cycles biogéochimiques, la modification de leurs diversités pourrait avoir un impact sur le fonctionnement de l'écosystème et notamment sur le cycle du carbone. Dans la littérature, il existe encore peu d'études ayant exploré l'impact d'une multi-pollution sur les communautés microbiennes, particulièrement dans le cadre d'une contamination à long-terme. En outre, l'exposition à un mélange de polluants pourrait induire des effets différents et plus prononcés qu'une contamination par un polluant unique.

Ainsi, l'objectif de ce chapitre était d'évaluer l'impact de la multi-contamination à long-terme et des propriétés physico-chimiques des sols sur la diversité taxonomique bactérienne, mais aussi sur la diversité fonctionnelle, notamment en lien avec le cycle du carbone.

Pour répondre à cet objectif, nous avons échantillonné et analysé les propriétés de 10 sols, sélectionnés sur la base de précédents travaux réalisés dans le cadre du Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles (GISFI), afin de constituer une collection de sols présentant un gradient de multi-contamination. La diversité taxonomique des communautés bactériennes a été obtenue par séquençage Illumina MiSeq. La diversité métabolique fonctionnelle a, quant à elle, été estimée à l'aide de microplaques Biolog® et MicroResp™.

Les sols de la collection pouvaient être répartis en 3 groupes sur la base de leurs teneurs en polluants et de leurs propriétés physico-chimiques. Le premier groupe réunit les sols contrôles et les deux autres groupes correspondent aux anciens usages industriels des sols : crassiers et bassins à boues de hauts fourneaux. Dans ce premier chapitre de résultats, nous avons montré qu'à l'échelle des phyla, la diversité taxonomique bactérienne n'était pas différente entre les groupes de sols. Toutefois, l'abondance relative de plusieurs OTUs était influencée soit par la pollution soit par certaines caractéristiques des sols. La diversité fonctionnelle était quant à elle négativement influencée par la pollution en éléments métalliques, tandis que la pollution par des HAP ne semblait pas avoir d'impact. En parallèle de cette réduction de la diversité fonctionnelle, les communautés microbiennes ont également montré une tolérance accrue au zinc dans les sols les plus contaminés en métaux. Par ailleurs, l'activité métabolique était négativement liée au contenu en azote total des sols. Partant de ces différentes constatations, nous avons émis l'hypothèse que la réduction de la diversité fonctionnelle par la pollution

métallique pourrait avoir induit un dysfonctionnement du cycle du carbone et une accumulation d'azote et de carbone dans les sols les plus contaminés.

Ces travaux font l'objet d'une publication dans la revue *Microbial Ecology*, référencée dans la suite du manuscrit par Lemmel et al. (in press).

Soil properties and multi-pollution affect taxonomic and functional bacterial diversity in a range of French soils displaying an anthropisation gradient

Florian Lemmel¹, Florence Maunoury-Danger², Andrea Fanesi¹, Corinne Leyval¹, Aurélie Cébron^{1†}

¹ Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-54000 Nancy, FRANCE

² Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, FRANCE

† Corresponding author: aurelie.cebron@univ-lorraine.fr

ABSTRACT

The intensive industrial activities of the 20th century have left behind highly contaminated wasteland soils. It is well known that soil parameters and the presence of pollutants shape microbial communities. But in such industrial waste sites, the soil multi-contamination with organic (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH) and metallic (Zn, Pb, Cd) pollutants and long-term exposure may induce a selection pressure on microbial communities that may modify soil functioning. The aim of our study was to evaluate the impact of long-term multi-contamination and soil characteristics on bacterial taxonomic and functional diversity as related to the carbon cycle.

We worked on 10 soils from northeast of France distributed into 3 groups (low anthropised controls, slag heaps, and settling ponds) based on their physico-chemical properties (texture, C, N) and pollution level. We assessed bacterial taxonomic diversity by 16S rDNA Illumina sequencing, and functional diversity using Biolog[®] and MicroResp[™] microtiter plate tools.

Although taxonomic diversity at the phylum level was not different among the soil groups, many OTUs were influenced by metal or PAH pollution, and by soil texture and total nitrogen content. Functional diversity was not influenced by PAH contamination while metal pollution selected microbial communities with reduced metabolic functional diversity but more tolerant to zinc. Limited microbial utilisation of carbon substrates in metal-polluted soils was mainly due to the nitrogen content. Based on these two observations, we hypothesised that reduced microbial activity and lower carbon-cycle-related functional diversity may have contributed to the accumulation of organic matter in the soils that exhibited the highest levels of metal pollution.

1 INTRODUCTION

The decline of the steel industry in the north east of France at the end of the 20th century left behind more than 6,000 ha of polluted wastelands ("BASOL", 2016). On these sites, the soils are multi-contaminated with hydrocarbons and metallic trace elements (MTE) (Joimel et al., 2016; Rachwał et al., 2015). On sites of former coking plants or slag heaps, polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollution results from the use of coal tar during coke manufacturing. PAH are ubiquitous contaminants produced from the incomplete combustion of organic matter (Wilcke, 2000), especially during industrial activities. In settling ponds resulting from the sewage sludge storage of blast furnace gases (Dhelft, 1994), high concentrations of MTE (Cd, Cu, Zn, Pb, Ni) are also often encountered.

In soils, the fate of PAH and MTE depends on various abiotic and biotic processes. Over time PAH adsorb onto organic matter and spread into the micropores of soil components. This is referred to as the pollutant ageing, and leads to a decrease of pollutant availability (Johnsen et al., 2005). MTE availability depends mostly on soil properties (pH, organic matter, redox potential...) (Janssen et al., 2003; Kim et al., 2015). PAH compounds can be degraded over time mainly through microbial processes (Cerniglia, 1992) that can be limited by low PAH availability (Hatzinger and Alexander, 1995; Cébron et al., 2013). MTE cannot be biodegraded, but microorganisms can modify their speciation through direct use or modifications of soil properties (Abdu et al., 2017).

Numerous studies have focused on the short-term influence of PAH or MTE on microbial communities. The selective pressure exerted by PAH toxicity (Andreoni et al., 2004; Grant et al., 2007) could modify microbial community composition (Grant et al., 2007; Sawulski et al., 2014), reduce microbial taxonomic diversity (Sutton et al., 2013), or inhibit microbial activity and the global activity of enzymes such as arylsulphatase, phosphatase, urease, dehydrogenase (Andreoni et al., 2004). Similarly, various studies have highlighted the negative effects of MTE pollution. For example the effect of zinc addition has been studied on enzymatic activity and microbial community composition (Kelly et al., 1999), as well as on the taxonomic diversity of bacterial communities (Moffett et al., 2003).

In aged polluted soils, various adaptation processes enable the microbial community to cope with and even benefit from pollution. The selection of PAH degraders (Cébron et al., 2008; Sawulski et al., 2014) and MTE-resistant microbes (Diaz-Ravina and Baath, 1996; Kelly et al., 1999) in aged polluted soils has been shown using acquired tolerance tests (Blanck, 2002).

However, the long-term impact of chronic exposure to PAH and MTE on microbial community composition has been less addressed (Bourceret et al., 2016; Lindgren et al., 2017). The impact of pollutants has been mainly studied separately, although multi-contamination can have a synergistic effect (Lu et al., 2013; Thavamani et al., 2012). Studies considering aged pollution and the impact of multi-contamination on microbial taxonomic diversity (richness and evenness) are scarce (Markowicz et al., 2016a) and therefore needed.

The carbon cycle is pivotal in soil functioning because it contributes to all biological processes, such as biomass production or respiration by organisms. It also affects other nutrient cycles through organic matter recycling and mineralisation. In a context of soil pollution, one can thus wonder how the different functions of the carbon cycle are affected, and study the microbial functions involved in key C-cycle processes. Metabolic functional diversity can be defined as the number (richness) and the evenness of the metabolic functions of the microbial community. One approach to estimating functional diversity is by comparing the degradation capacities of carbon substrates using Biolog® (Zak et al., 1994) and MicroResp™ (Campbell et al., 2003) microtiter plate methods in the presence or absence of pollutants, as done with metals that decrease bacterial functional diversity (Boshoff et al., 2014).

Apart from this impact of pollutants, it is well known that soil parameters, such as the pH, texture, the C content or the C:N ratio, highly contribute to shape microbial community composition (Fierer and Jackson, 2006; Nacke et al., 2011) and functional diversity (Bissett et al., 2011) in soils of various origins (forest, grassland, agricultural...). In polluted soils, such as urban, industrial, traffic, mining and military areas (Joimel et al., 2016), physico-chemical parameters have also been found to largely influence the composition of the bacterial and fungal communities (Bourceret et al., 2016).

We therefore hypothesised that microbial diversity in multi-contaminated soils may be influenced by both soil properties and pollutant concentrations and availability, but differently at the taxonomic and functional levels. In this context, the present study aimed to: i) assess taxonomic diversity and metabolic functional diversity of microbial communities in a context of aged multi-pollution, and ii) to determine which soil factors (physico-chemical parameters, pollutants...) affected these diversities. We studied microbial communities from a collection of 10 soils presenting gradients of PAH and metal pollution, and under different land uses, ranging from weakly to highly anthropised, i.e. from forest soil to industrial soil. We assessed bacterial taxonomic diversity through 16S rRNA gene tag-amplicon sequencing (Illumina MiSeq). We estimated metabolic functional diversity using the degradation functions of

ecologically relevant carbon substrates through Biolog[®] and MicroResp[™] microtiter plate methods.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Study sites and soil sampling

Ten soils originating from industrial wastelands and waste sites, natural forests or ancient gravel pit, located in the “Grand Est” region (north-east of France), were sampled in November 2015. This soil collection was chosen to cover a wide range of anthropisation situations, i.e. from no or low contamination to high contamination, and represented an anthropisation gradient. All sampling sites are within 100km. Three soils were considered as the control soils (*ctrl*), i.e. two low-anthropised forest soils collected at Hémilly (*He*; 49°2'1"N/6°30'51"E; Moselle; Stagnic Luvisol) and Montiers-sur-Saulx (*Mo*; 48°31'55"N/5°16'8"E; Meuse; Calcaric Cambisol), and one anthropised but unpolluted former gravel pit soil collected at Dieulouard (*Di*; 48°49'44"N/6°5'2"E, Meurthe-et-Moselle; Fluvisol). Seven anthropised soils (Technosol) known to be polluted by MTE and/or PAH, where industrial activities stopped during 1980s, were collected from: i) former slag heaps (*sh*) at Homécourt (*Ho*; 49°12'79"N/5°59'72"E, Meurthe-et-Moselle), Terville (*Te*; 49°20'25"N/6°08'33"E; Moselle), Uckange (*Uc*; 49°18'58"N/6°9'55"E; Moselle), and Neuves-Maisons (*NM*; 49°12'52"N/5°59'45"E; Meurthe-et-Moselle), and ii) former settling ponds (*sp*), dried since at least 30 years, at Pompey (*Po*; 48°46'8"N/6°8'8"E; Meurthe-et-Moselle), Mont-St-Martin (*MsM*; 49°32'9"N/5°46'46"E; Meurthe-et-Moselle), and Russange-Micheville (*RM*; 49°28'58"N/5°55'51"E; Moselle).

All sites were colonized by trees (mainly birch and/or beech) and herbaceous plants, with a very heterogeneous colonization density from one site to another, except for the NM soil which was colonized only by some herbs. None of the soil samples were rhizosphere soils or directly under plant influence (sampling at least 2 m from a tree). As plant colonization was sparse by location, we collected samples on bare soils. At each of the ten sites, samples were collected from three independent sub-sites 1 m apart. After removing the litter layer, if present, one soil block per sub-site (block of 20 cm on the side and 30 cm deep) was removed using shovel. The three sub-site soil blocks were mixed to get one composite sample per site. Back to the laboratory, the soil samples were air-dried at room temperature for one week, and then sieved at 2 mm. The dried and sieved soils were then stored at room temperature in the dark before chemical and microbiological analyses, and aliquots were stored at -80°C before freeze-drying and PAH analyses.

2.2 Soil physico-chemical characteristics

The soil physico-chemical characteristics were determined from the dried sieved soils. The pH was measured (PHM210 Radiometer Analytical, equipped with a pH probe, Bioblock Scientific) in a soil suspension prepared in distilled water (1:5 w:v). The CaCO₃ content was estimated from measurements of CO₂ concentrations released after acid (4 M HCl) decarbonation of 1 g of dw soil, using an infrared absorbance (Binos 1004 analyser), with λ 2325.6 cm⁻¹. The water retention capacity was estimated from the difference in weight between dry and water-saturated soil, which corresponded to 100%. Measurements of the soil texture (clay fraction, 0-2 μ m; silt fraction, 2-63 μ m; sand fraction 63-2,000 μ m; ISO 11277), the cation exchange capacity (CEC; determined by Metson method, NF X 31-130), organic carbon, organic matter, nitrogen concentrations (C, OM, and N, respectively; Dumas method, ISO 10694), the available phosphorus concentration (P; Olsen method, NF ISO 11263), total (fluoridric acid extraction) and available (calcium chloride extraction) concentrations of metals (Cr, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn for total and available concentrations, plus Tl, Mo, Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, and Na for total concentrations) were performed at the "Laboratoire d'Analyse des Sols" (INRA, Arras, France). We calculated a metal pollution index (Mi) in order to compare metallic pollution of soils using only one variable. Mi was the sum of the relative proportions (RP_{metal}) of nine metal concentrations (Zn, Pb, Cd, Fe, Cr, Cu, Ni, Co, Tl). RP_{metal} in soils were calculated using the following formula:

$$RP_{metal} = \frac{MC_{soil} \times 100}{MC_{max}}$$

where MC_{soil} is the total metal concentration in the soil, and MC_{max} is the maximum total metal concentration found among all the soils of the collection. Total instead of available metal concentrations were used because some of the available metal values were lower than the detection limit. The nine metals were chosen because they commonly resulted from the steel industry, and when for at least one soil, the metal concentration was higher than the mud compost norm (NF 44 095) or the natural geochemical background of French soils (Baize, 2000).

2.3 PAH extraction and analysis

Soil samples stored at -80°C were freeze-dried and ground to 500 μ m (Mixed Mill MM 400, Retsch). Total PAH were extracted from 1 g dw soil in triplicate with dichloromethane, at 130°C and 100 bars, using accelerated solvent extraction (DIONEX® 200 ASE), as described in

Cennerazzo et al. (2017). Available PAH were extracted from 1 g dw soil in triplicate with 20 ml of hydroxypropyl- β -cyclodextrin (50 mM) in Teflon™ FEP Oak Ridge centrifuge tubes (Nalgene, USA) (Reid et al., 2000). After mixing (16 h) at 24°C and centrifugation, PAH were extracted from the aqueous solution through liquid:liquid extraction using dichloromethane. Both solvent extracts of total and available PAH were evaporated (nitrogen flow) and dissolved in acetonitrile for PAH analysis using a reverse-phase chromatography (UHPLC DIONEX® Ultimate 3000 system) equipped with a Diode Array Detector (UV detection, 254 nm) and a Zorbax Eclipse PAH column (2.1 x 100 mm, 1.8 μ m, Agilent).

2.4 Carbohydrate, organic acid, and dissolved organic carbon measurements

Carbohydrates, organic acids, and dissolved organic carbon (DOC) were measured on triplicate soil aqueous extracts (1:5 w:v) using 6 g dw soil mixed with 30 ml of distilled water in Teflon™ FEP Oak Ridge centrifuge tubes (Nalgene, USA) for 2 h at 20°C (Jones and Willett, 2006; Thomas and Cébron, 2016). After centrifugation and filtration, aqueous extracts were recovered. Seven carbohydrates (inositol, trehalose, sucrose, glucose, xylose, mannose, and fructose) were quantified by an ICS 3000 ion-exchange chromatograph equipped with a Dionex CarboPac SA10 column (Thermo Scientific). Eleven organic acids (gluconic, lactic, acetic, propionic, formic, pyruvic, succinic, maleic, oxalic, fumaric, and citric acids) were quantified using an ICS 2100 ion chromatographer equipped with a Dionex IonPac AS11 HC column (Thermo Scientific). DOC was measured on a TOC-V analyser (Shimadzu).

2.5 Quantification of culturable bacteria

The most probable number (MPN) was measured on 1 g dw soil (in triplicate) moistened (to 60% of their water retention capacity) and pre-incubated for 2 days (24°C) for reactivation of microbial community. After soil aliquots were resuspended in 10 ml of NaCl (0.9%) and mixed for 1 h, ten-fold dilution series were prepared in NaCl (0.9%) and used to inoculate 96-well microtiter plates (16 wells *per* dilution) filled with nutrient Broth No 1 (Fluka analytical). After incubation for 3 days (24°C), absorbance at 600 nm was measured using spectrophotometer (Safas, Monaco) and MPN counts were calculated using Mac Grady's tables, and expressed as MPN *per* gram of soil.

2.6 DNA extraction, real-time quantitative PCR, and sequencing

Genomic DNA (gDNA) was extracted in triplicate from *ca.* 0.5 g of moistened soil (as described above) stored at -20°C, using Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, France), following the manufacturer's instructions. Concentration and purity (A_{260}/A_{280} ratio) were measured using a spectrophotometer (UV1800, Shimadzu) equipped with a TrayCell™ adapter (Hellma®). gDNA was diluted to 5 ng μl^{-1} for real-time quantitative PCR (qPCR) and sequencing library preparation. The abundance of fungi and bacteria was estimated by qPCR using the primer sets Fung5F/FF390R (Lueders et al., 2004), 968F/1401R (Felske et al., 1998), targeting 18S and 16S rRNA genes, respectively. The qPCR assays were performed as previously described (Thion et al., 2012; Cébron et al., 2015). Briefly, the reaction mixture (20 μl) was composed of 10 μl iQ SYBR green SuperMix (Bio-Rad), 0.8 μl primers (10 μM), 0.4 μl bovine serum albumin solution (3%), 0.2 μl dimethyl sulfoxide, 0.08 μl T4gp32 (MP Biomedicals, France), and 1 μl DNA (diluted gDNA or 10-fold dilution series from 10^8 to 10^1 copies μl^{-1} of the standard plasmids). Quantification was performed using a CFX96 Real-Time PCR detection system (Bio-Rad), using 56°C and 50°C as annealing temperature for 16S and 18S rDNA quantification, respectively.

The V3/V4 region of bacterial 16S rRNA genes (*ca.* 550 bp) was amplified using primers S-D-Bact-0341-a-S-17 and S-D-Bact-0787-b-A-20 (Muyzer et al., 1993; Caporaso et al., 2011) and following a previously described dual-index strategy (Kozich et al., 2013) using PCR primers with Illumina adaptor, pad and index sequences (Thomas and Cébron, 2016). PCR reactions were performed on 2 μl of diluted gDNA using Phusion high-fidelity polymerase (Thermo Scientific). PCR reactions consisted of 31 cycles with touchdown annealing temperature for 18 cycles (63°C to 54°C with a decrease of 0.5°C/cycle) and 13 cycles at 54°C. Amplification products were checked on 1% agarose gel electrophoresis, and purified using the UltraClean-htp 96 Well PCR Clean-Up kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. After Quant-iT Picogreen ds-DNA assay Kit (Invitrogen) quantification, an amplicon library was prepared (equimolar pool at 10 nM), purified on a QIAquick PCR purification kit column (Qiagen), and sent for sequencing to Genewiz platform (South Plainfield, NJ, USA) using an Illumina MiSeq V2 Kit for 2 x 250 bp paired-end sequencing. Illumina MiSeq paired-end reads have been deposited in the SRA database under Bioproject accession number PRJNA450766. Sequence data were analysed following the MiSeq SOP procedure available in March 2017 and described in Kozich et al. (2013), using Mothur v.1.38.0

(Schloss et al., 2009). Paired-end reads were trimmed using the following criteria: $QS > 20$, $404 \text{ bp} < \text{length} < 454 \text{ bp}$, and no ambiguous bases. Chimeras detected using Uchime (Edgar et al., 2011) and singletons (sequences appearing only once among all samples) were removed. Alignment of unique sequences and taxonomy was assigned using the Silva bacteria database (cutoff = 80). Sequences affiliated to archaea, eukaryota, unknown, mitochondria, and chloroplasts were removed. Sequences were clustered in Operational Taxonomic Units (OTUs) at 97% similarity. Finally, datasets were rarefied to the lowest number of sequences *per* sample (34 191 reads/sample). Alpha diversity was expressed by calculating Chao1, Pielou's evenness J' , and Shannon H' indices (Hill et al., 2003) and Beta-diversity was calculated with Bray-Curtis index, using Mothur.

2.7 Carbon substrate utilisation using Biolog® plates and metal tolerance test

Two types of Biolog® microtiter plates were used to assess the metabolic functional diversity of bacterial communities through utilisation patterns of 62 carbon substrates (**Table S3.1**): i) EcoPlates™ containing 31 substrates of ecological relevance (5 guilds: 9 carboxylic acids, 6 amino acids, 8 carbohydrates, 4 polymers, and 4 miscellaneous), and ii) MT2 microplates™ allowing to test 31 chosen substrates (4 PAH, 6 aromatic acids, 8 carboxylic acids, 3 amino acids, 6 carbohydrates, 3 polymers, and 1 miscellaneous). MT2 microplates™ were prepared following the manufacturer's instructions (0.3 mg of carbon in each well) except for organic acids, cellulose, and lignin which were 10-fold diluted because the recommended concentrations were toxic or the presence of solid particles flawed absorbance measurements (data not shown). PAH and phenolic acids were dissolved in n-hexane and added to empty plates, and the solvent was eliminated by drying for 12 h in a sterile hood (Thomas and Cébron, 2016). The water-soluble substrates (20 μl) were added just before inoculation and 20 μl of sterile water were added in the wells containing PAH and phenolic acids and in the EcoPlate™ wells.

Microbial inocula were prepared by diluting soil aliquots (1 g of moistened soil prepared as described above) in 10 ml of NaCl (0.9%) and stirring with glass beads (1.5 mm diameter) for 1 h. Supernatant was decanted for 15 min and diluted in NaCl (0.9%) differently for each soil, based on MPN data to obtain a similar microbial abundance (from 10^2 to 10^3 cultivable bacteria ml^{-1}) for all soil. Biolog® plates were inoculated with 100 μl of the appropriate dilution, and incubated at 24°C in a plastic bag containing wet cotton to avoid desiccation.

Zinc was used to test bacterial community tolerance to metals. Biolog® substrate utilisation was measured in the presence of zinc, added as ZnCl₂ (10 mg l⁻¹ of Zn) directly in the inoculum. This zinc concentration was chosen to obtain a zinc effect without total inhibition of bacteria (preliminary experiments not shown).

To summarise, our experimental design tested 62 carbon substrates on 10 soils in triplicate, with or without zinc addition. The absorbance at 595 nm was monitored in an spectrophotometer (SAFAS, Monaco) over 7 days at t = 0, 24, 48, 72 and 96 h. Absorbance values were corrected (Abs_{corr}) after subtraction of the absorbance of mean blank wells at the corresponding times. Substrate utilisation was considered positive when the corrected absorbance was > 0.2. For each soil, Abs_{corr} at 96 h was used to calculate functional alpha diversity estimators, i.e. metabolic richness (number of carbon substrates significantly utilised), Pielou's evenness (J' ; based on the relative proportions of utilisation intensity for each substrate) and Shannon (H' ; based on the two previous indices) diversity indices using the vegan package in R (Oksanen et al., 2017). For each soil, the average well color development (AWCD) was calculated over time using the formula:

$$AWCD = \frac{\sum Abs_{corr}}{62}$$

where Abs_{corr} was the corrected absorbance of the substrate. Zinc tolerance was assessed for each soil by calculating a percentage of inhibition based on a comparison of areas below the AWCD curves between conditions with or without zinc. Percentages of inhibition were compared to soil total and available zinc concentrations (transformed to 1 when below the detection limit, i.e. 10 µg kg⁻¹) through linear regressions.

2.8 Soil metabolic profiling using the MicroResp™ method

The MicroResp™ technique was used to measure basal respiration and substrate-induced respiration (SIR) (Campbell et al., 2003). Soils were loaded (four replicates) into the 96-deep-well plates, and the mean mass of each soil was measured.

Soils were moistened to 45% water retention capacity using sterile distilled water, and plates were pre-incubated 3 days at 24°C in a plastic bag containing wet cotton to avoid desiccation. After this step, six carbon sources (pyruvate, succinate, citrate, L-asparagine, D-ribose, and D-mannitol), selected according to the contrasting levels of substrate utilisation in Biolog® plates among soils, were added to reach 80% of soil water retention capacities. Substrates were added at 20 mg of C per well except for L-asparagine (3 mg) and citrate (5 mg) having

lower solubility. Water was added to plates for basal respiration. Finally, deep-well plates were sealed to the CO₂-trap microtiter plates and incubated in the dark at 24°C for 4 to 9 h depending on the carbon source (**Table S3.1**) and for 8 h for basal respiration. Absorbance was measured at 570 nm using a spectrophotometer (SAFAS, Monaco) just before sealing to measure blank values to subtract to the final absorbance. Mean basal respiration (n = 8) was measured on two independent series and 6 SIR were measured on 4 replicates for the 10 soils. Absorbance values for SIR were corrected by subtracting the absorbance mean (n = 4) of the corresponding soil basal respiration series, and transformed into a CO₂ concentration using the following formula:

$$ppm\ of\ CO_2 = 138.72 \times \exp^{(6.7974 \times ODC)}$$

where *ODc* is the corrected absorbance. Then the CO₂ concentration was standardised by dividing it by the soil quantity and the incubation time. Based on MicroResp™ instruction manual, ppm values of CO₂ were then expressed as quantity of carbon released as CO₂ per gram of soil per hour. For each soil, these corrected and standardised absorbance values were used to calculate the same functional diversity estimators (richness, evenness, and Shannon diversity indices) as the ones described above for Biolog® data.

2.9 Statistical analyses

All statistical analyses were performed using RStudio v1.0.136. Significant differences among soils or among soil groups were assessed using Kruskal-Wallis rank sum test followed by a multiple comparison test included in the Vegan R package (Oksanen et al., 2017). For principal component analysis (PCA) nine soil variables among soil physico-chemical, pollution, and texture characteristics, were used, and soil groups were made with Monte Carlo test using 1 000 iterations. For redundancy analysis (RDA), explanatory variables were chosen by using the ordistep R function. Permutation tests on the RDA axes and variables were performed. Multivariate analyses were carried out on standardised data using the ade4 (Dray and Dufour, 2007) and vegan R packages. Linear regression was assessed by fitting to a linear model using “lm” function. The partial least square regression (PLSr) algorithm (Wold et al., 1984, 2001) in regression mode was used to identify possible relationships between the soil physico-chemical characteristics and 96 bacterial OTUs (each representing at least 1% of the total). The two matrices were z-normalised. The PLSr was implemented using the mixOmics package (Cao et al., 2017; Rohart et al., 2017). Once calibrated, the PLSr model was validated using the leave-one-out cross-validation method. The R² and the mean squared error of prediction were

then used (data not shown) to select the appropriate number of principal components used to implement the model. The correlation between bacterial OTUs and soil physico-chemical parameters was displayed in a heatmap (“cim” function) resulting from the similarity matrix obtained from the PLSr model.

3 RESULTS

3.1 Grouping of soils according to their physico-chemical characteristics

The physico-chemical and microbial characteristics of the ten soils are summarised in **Table 3.1** and **Table 3.2**. Many characteristics differed among soils and soil groups (settling pond, slag heap, control). Although one of the control forest soils (ctrl-He) had a pH of 5.4 while all other soils had a slightly basic pH (from 7.0 to 8.0), no statistical pH difference was observed among the soil groups. The slag heap soils differed by a high available PAH concentration and intermediate values of the metal pollution index, whereas the settling pond soils had a high metal pollution index with especially high Zn, Pb, Cd, and Tl concentrations and intermediate values of available PAH concentrations. These two groups also presented high total PAH concentrations and high Fe concentrations as compared to the control soils. The control soils were mainly characterised by the highest dissolved organic carbon concentration and the lowest total PAH concentration and metal pollution index. The control soils also contained higher total potassium and aluminium concentrations than the other soils, probably in part due to their proportion of clay. No difference among soil groups was observed for the C:N ratio or for concentrations of total organic carbon, organic matter, nitrogen, organic acids, carbohydrates, and available phosphorus. Our collection of soils also presented highly variable iron concentrations, ranging from 18 g kg⁻¹ in ctrl-Di to a particularly high concentration of 452 g kg⁻¹ in sh-Uc. Concerning microbial parameters such as MPN counts and 16S rRNA gene abundance, soil groups were not statistically different. Interestingly, the ratios of fungal to bacterial abundance (18S/16S rDNA ratios) were similar between the control and slag heap soils, and the lowest for settling pond soils, probably because the three soil groups had similar 18S rRNA gene copy numbers while the settling pond soils tended to have higher 16S rRNA gene copy numbers ($p = 0.053$).

Table 3.1. Physico-chemical characteristics of the ten soils. Parameters were measured one time on one mean sample. For soil groups, values are means ($n = 3$ for ctrl and sp soils, and $n = 4$ for sh soil) \pm standard error of the mean. Significant results of Kruskal-Wallis tests ($p < 0.05$), testing differences among the 3 soil groups, are indicated by different letters, and no letter appears when non-significant differences were found. For statistical analyses, values lower than the detection limits of the method were replaced by 1, except for available phosphorus for which the value was replaced by 0.05. The metals used for calculating the metal pollution index (Mi) are indicated by a star. Abbreviations: Ctrl: control; sh: slag heap; sp: settling pond; CEC: cation exchange capacity; PAH: polycyclic aromatic hydrocarbons.

Soil group	Mo	He	Di	Uc	Te	NM	Ho	Po	MsM	RM	Means per group Kruskall-Wallis multiple comparison test (95% confidence)				
	ctrl	ctrl	ctrl	sh	sh	sh	sh	sp	sp	sp	ctrl	sh	sp		
Total organic carbon (g kg ⁻¹)	81.5	72.1	24.3	29.9	88.2	75.2	159.0	109.0	119.0	149.0	59.3 ± 17.7	88.1 ± 26.7	125.7 ± 12.0		
Dissolved organic carbon (g kg ⁻¹)	1.34	1.69	1.18	0.12	0.99	0.23	0.33	0.76	0.66	0.24	1.4 ± 0.2 ^a	0.4 ± 0.2 ^b	0.6 ± 0.2 ^b		
Organic matter (g kg ⁻¹)	141	125	42	52	153	130	276	189	206	257	102.7 ± 30.7	152.7 ± 46.5	217.3 ± 20.4		
Nitrogen (g kg ⁻¹)	4.56	2.85	1.74	0.56	4.35	2.35	2.92	7.19	4.18	3.83	3.1 ± 0.8	2.5 ± 0.8	5.1 ± 1.1		
C/N	17.9	25.3	14.0	53.6	20.3	32.0	54.6	15.2	28.5	38.8	19.1 ± 3.3	40.1 ± 8.4	27.5 ± 6.8		
Available phosphorus (g kg ⁻¹)	0.04	0.02	0.04	< 0.01	0.21	0.08	0.02	0.12	0.21	0.07	0.03 ± 0.01	0.08 ± 0.05	0.13 ± 0.04		
CEC (cmol kg ⁻¹)	35.0	15.5	9.9	3.6	20.0	17.5	9.8	51.2	16.2	10.8	20.1 ± 7.6	12.7 ± 3.7	26.1 ± 12.7		
Carbonates (g kg ⁻¹)	5.5	0.8	14.3	8.4	181.8	14.2	114.0	89.6	152.0	219.3	6.9 ± 3.9	79.6 ± 41.8	153.7 ± 37.4		
pH (H ₂ O)	7.0	5.4	7.3	8.0	7.7	7.4	7.5	7.8	7.2	7.6	6.6 ± 0.6	7.6 ± 0.1	7.6 ± 0.2		
Organic acids (mg kg ⁻¹)	222.9	140.0	120.7	43.2	179.0	11.5	238.1	279.3	154.0	114.2	161.2 ± 31.4	118.0 ± 54.1	182.5 ± 49.7		
Carbohydrates (mg kg ⁻¹)	0.28	0.29	0.10	0.04	0.20	0.02	0.05	0.08	0.05	0.07	0.22 ± 0.06	0.08 ± 0.04	0.07 ± 0.01		
Soil texture (%)	Clay	48.9	25.5	11.5	5.5	10.0	13.3	7.0	17.5	10.9	10.9	28.6 ± 10.9	9.0 ± 1.7	13.1 ± 2.2	
	Silt	46.0	69.0	14.3	17.6	20.7	27.9	12.0	53.3	72.7	74.6	43.1 ± 15.9	19.6 ± 3.3	66.9 ± 6.8	
	Sand	5.1	5.5	74.2	76.9	69.3	58.8	81.0	29.2	16.4	14.5	28.3 ± 23.0	71.5 ± 4.9	20.0 ± 4.6	
Total concentration (hydrofluoric acid extraction)	Major elements (g kg ⁻¹)	Al	67.2	51.9	45.0	19.9	25.5	39.9	40.0	39.6	21.0	22.0	5.5 ± 0.7 ^a	3.1 ± 0.5 ^b	2.8 ± 0.6 ^b
		Ca	16.2	3.8	11.6	46.7	125.0	99.2	151.0	71.9	88.1	129.0	1.1 ± 0.4	10.5 ± 2.2	9.6 ± 1.7
		K	14.6	18.6	28.6	0.6	5.4	9.2	5.8	5.4	1.5	3.4	2.1 ± 0.4 ^a	0.5 ± 0.2 ^b	0.3 ± 0.1 ^b
		Mg	5.8	4.8	3.2	5.9	23.5	7.4	9.9	11.3	4.3	3.9	0.5 ± 0.1	1.2 ± 0.4	0.6 ± 0.2
		Na	2.52	5.87	8.87	0.40	1.61	2.73	1.49	0.76	0.40	0.28	0.58 ± 0.18	0.16 ± 0.05	0.05 ± 0.01
		Fe *	44.1	27.3	18.0	452.0	108.0	193.0	65.8	93.0	304.0	53.6	3.0 ± 0.8 ^b	20.5 ± 8.7 ^a	15.0 ± 7.8 ^a
	Metallic trace elements (mg kg ⁻¹)	Zn *	144	248	60.5	74	1 650	2 540	314	29 600	55 400	119 000	151 ± 54 ^b	1 144 ± 580 ^b	68 000 ± 26 565 ^a
		Pb *	44	93	31	23	475	653	303	34 700	14 400	39 500	56 ± 19 ^b	363 ± 134 ^b	29 533 ± 7 692 ^a
		Cd *	0.7	0.3	0.1	0.1	4.5	3.3	1.1	152.0	17.6	22.0	0.4 ± 0.2 ^b	2.2 ± 1.0 ^b	63.9 ± 44.1 ^a
		Cr *	75.1	82.1	18.7	22.5	345.0	1 220.0	177.0	150.0	166.0	61.9	58.6 ± 20.1	441.1 ± 267.8	126.0 ± 32.4
		Cu *	16.4	12.9	10.2	9.4	146.0	144.0	93.6	148.0	186.0	42.3	13.2 ± 1.8	98.3 ± 32.0	125.4 ± 43.0
		Ni *	42.5	21.7	13.2	7.3	55.3	113.0	29.9	73.1	246.0	34.3	25.8 ± 8.7	51.4 ± 22.8	117.8 ± 65.1
		Co *	14.2	19.0	4.8	17.4	20.2	28.8	11.3	10.6	51.4	11.3	12.7 ± 4.2	19.4 ± 3.6	24.4 ± 13.5
		Ti *	0.77	0.59	1.13	0.09	0.52	0.83	0.26	88.30	4.79	8.63	0.83 ± 0.16 ^b	0.43 ± 0.16 ^b	33.91 ± 27.22 ^a
		Mo	1.5	0.9	0.5	0.6	4.6	12.3	10.0	7.9	21.0	1.5	1.0 ± 0.3	6.9 ± 2.6	10.1 ± 5.7
Mn	932	1 570	285	740	3 480	9 890	2 520	68 100	3 830	771	929 ± 371	4 158 ± 1 993	24 234 ± 21 951		
Available concentration (calcium chloride extraction; µg kg ⁻¹)	Zn	< 10	38 100	11	< 10	36	128	38	2 310	49 200	64 000	12 704 ± 12 698	51 ± 27	38 503 ± 18 594	
	Pb	< 3	94	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	32	397	1 440	32 ± 31 ^b	1 ± 0 ^b	623 ± 422 ^a	
	Cd	2.3	82.8	1.3	< 1.0	1.6	2.4	1.7	48.7	111.0	25.3	28.8 ± 27.0	1.7 ± 0.3	61.7 ± 25.6	
	Cr	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	20	< 10	29	< 10	< 10	1 ± 0	5.7 ± 4.7	10.5 ± 9.5	
	Cu	41	30	27	24	129	84	237	98	187	29	33 ± 4	118 ± 45	105 ± 46	
	Ni	< 15	390	< 15	< 15	< 15	90	< 15	< 15	126	59	131 ± 130	23 ± 22	62 ± 36	
Metal pollution index		71.2	66.8	27.2	144.0	198.6	329.0	115.6	475.5	480.9	299.8	55.1 ± 14.0 ^c	196.8 ± 47.3 ^b	418.7 ± 59.5 ^a	
Sum of 16 regulatory PAH (n = 3; mg kg ⁻¹)	Total	3.5	0.1	0.9	0.9	114.7	1 095.9	937.7	21.2	49.6	6.6	1.5 ± 0.6 ^b	537.3 ± 146.2 ^a	25.8 ± 6.4 ^a	
	Available	0.0	0.0	0.0	0.0	6.3	83.0	54.1	0.2	4.6	0.0	0.0 ± 0.0 ^c	35.8 ± 10.7 ^a	1.6 ± 0.8 ^b	

We performed a PCA on the basis of soil physico-chemical, pollution, and texture characteristics (**Figure 3.1**), which confirmed the distribution of the 10 soils in 3 groups based on their use. The first three components of the PCA explained 76.75% of total variance, with

the first (PC1), the second (PC2) and the third (PC3) components of the PCA accounting for 35.3%, 28.5%, and 12.8%, respectively. The main contributing variables were the metal pollution index Mi (24.8% of total variance on the considered axis) and the total potassium concentration (18.9%) on the first axis, soil texture (sand: 33.1%; clay: 24.9%) and the pH (13.8%) on the second axis, and PAH (46.9%) and organic carbon (30.9%) concentrations on the third axis. On PC1, control soils were mainly separated from slag heap and settling pond soils by the potassium and clay fraction parameters. Interestingly, settling pond soils were separated from the control and slag heap soils by the metal pollution, organic carbon, and nitrogen parameters. On PC2, slag heap soils were separated from the control and settling pond soils by the sand fraction and pH parameters. PAH pollution was not a discriminative parameter (10.6% of the weight on PC2) and did not separate the soil groups according to their use on the PC3 axis (46.86% of the weight on PC3). To test if the soil groups were robust, we performed a Monte-Carlo test, and confirmed that our grouping was statistically significant (1 000 iterations, $p = 1.998 \times 10^{-3}$). We also performed a second PCA without the pollution characteristics (data not shown) and confirmed the separation of the soils in three groups corresponding to their use (Monte Carlo test, 1 000 iterations, $p = 0.016$).

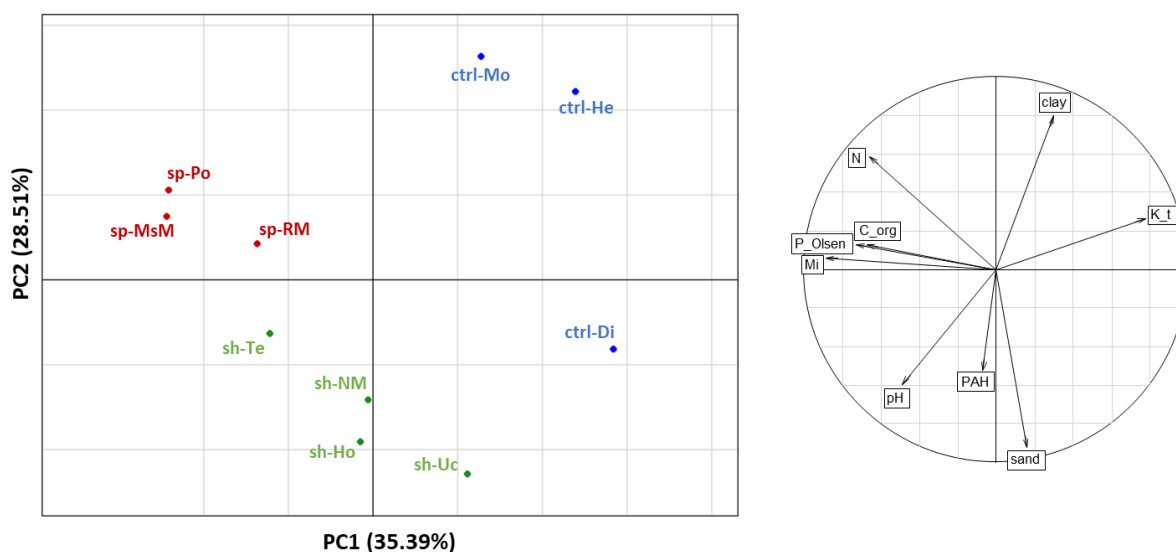


Figure 3.1. Principal Component Analysis (PCA) and correlation circle based on the physico-chemical, pollution, and texture characteristics of the ten soils. On the PCA: Soils (Di: Dieulouard, Ho: Homécourt, He: Hémilly, MsM: Mont St Martin, Mo: Montiers, RM: Russange-Micheville, NM: Neuves Maisons, Po: Pompey, Te: Terville, Uc: Uckange) were grouped in three types according to their industrial history (sp: settling pond; sh: slag heap; ctrl: control). On the correlation circle: N: total nitrogen; C_org: total organic carbon; P_Olsen: available phosphorus; Mi: metal pollution index; PAH: sum of 16 regulatory PAH; K_t: total potassium; sand and clay: proportions of the sand and clay fractions, respectively.

3.2 Bacterial taxonomic diversity

We determined bacterial taxonomic diversity by sequencing 16S rRNA genes. After read treatment and rarefaction to 34 191 reads *per* sample, we classified OTUs with 97% similarity taxonomically. The taxonomic alpha diversity estimators based on OTU data are shown in **Table 3.2**. Interestingly, slag heap soils harboured more diversified bacterial communities with higher Shannon's diversity (mean value of 6.203) and Pielou's evenness (mean value of 0.791) indices than settling pond soils. Compared to the other two soil groups, control soils had similar bacterial taxonomic diversity indices due to the low and high bacterial taxonomic diversity indices of ctrl-Mo and ctrl-Di, respectively.

Table 3.2. Microbial, taxonomic and functional characteristics of the ten soils. Values are means ($n = 3$ or 4) \pm standard error of the mean. For soil groups, values are means ($n = 3$ for ctrl and sp soils, and $n = 4$ for sh soil) \pm standard error of the mean. Significant results of Kruskal-Wallis tests ($p < 0.05$), testing differences among the 3 soil groups, are indicated by different letters, and no letter appears when non-significant differences were found.

	Soil group	Mo	He	Di	Uc	Te	NM	Ho	Po	MsM	RM	Means per group Kruskal-Wallis multiple comparison test (95% confidence)		
		ctrl	ctrl	ctrl	sh	sh	sh	sh	sp	sp	sp	ctrl	sh	sp
Microbial characteristics ($n = 3$)	MPN ($\times 10^3 \text{ g}^{-1}$)	1434.5 ± 327.7	40.2 ± 8.1	488.6 ± 126.1	161.2 ± 53.9	586.1 ± 170.0	496.9 ± 214.8	2 071.4 ± 952.1	80.2 ± 19.1	38.5 ± 4.1	0.1 ± 0.1	654.5 ± 410.9	828.9 ± 424.1	39.6 ± 23.1
	16S rRNA gene copy number ($\times 10^{10} \text{ g}^{-1}$)	17.8 ± 2.4	25.0 ± 2.2	30.1 ± 1.1	6.9 ± 0.5	41.5 ± 1.2	4.4 ± 0.3	14.8 ± 0.7	41.5 ± 0.4	26.4 ± 1.2	17.8 ± 0.4	24.3 ± 2.1	16.9 ± 4.5	28.6 ± 3.5
	18S/16S rRNA gene copy ratio	0.03 ± 0.00	0.18 ± 0.01	0.07 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.05 ± 0.00	0.09 ^a ± 0.02	0.08 ^a ± 0.00	0.04 ^b ± 0.00
Bacterial taxonomic diversity ($n = 3$)	Chao1 index	2 621 ± 205	3,161 ± 254	4 966 ± 32	4 293 ± 291	4 380 ± 38	2 541 ± 100	4 966 ± 100	3 422 ± 223	3 151 ± 2	2 478 ± 15	3,583 ± 367	4 045 ± 282	3 017 ± 154
	Shannon's index (H')	5.40 ± 0.03	6.38 ± 0.05	7.12 ± 0.02	6.68 ± 0.03	6.97 ± 0.01	6.37 ± 0.01	7.06 ± 0.04	6.65 ± 0.02	6.06 ± 0.02	5.99 ± 0.02	6.30 ^{ab} ± 0.25	6.77 ^a ± 0.08	6.23 ^b ± 0.11
	Pielou's evenness index (J')	0.70 ± 0.01	0.80 ± 0.01	0.85 ± 0.01	0.81 ± 0.00	0.84 ± 0.00	0.82 ± 0.00	0.84 ± 0.00	0.83 ± 0.00	0.77 ± 0.00	0.78 ± 0.00	0.78 ^{ab} ± 0.02	0.83 ^a ± 0.00	0.79 ^b ± 0.01
MicroResp catabolic diversity ($n = 4$)	Catabolic richness ($n = 6$)	5.0 ± 0.0	5.8 ± 0.3	5.0 ± 0.0	5.8 ± 0.3	4.5 ± 0.3	5.0 ± 0.4	4.5 ± 0.3	5.8 ± 0.3	5.0 ± 0.4	4.5 ± 0.3	5.3 ± 0.2	4.9 ± 0.2	5.1 ± 0.3
	Shannon's index (H')	1.53 ± 0.03	1.62 ± 0.06	1.57 ± 0.01	1.72 ± 0.05	1.41 ± 0.07	1.57 ± 0.08	1.49 ± 0.07	1.13 ± 0.02	1.41 ± 0.09	1.39 ± 0.07	1.57 ^a ± 0.03	1.55 ^a ± 0.05	1.31 ^b ± 0.06
	Pielou's evenness index (J')	0.95 ± 0.02	0.93 ± 0.02	0.97 ± 0.01	0.98 ± 0.00	0.94 ± 0.02	0.98 ± 0.01	0.99 ± 0.00	0.65 ± 0.02	0.88 ± 0.03	0.93 ± 0.01	0.95 ^b ± 0.01	0.97 ^a ± 0.01	0.82 ^c ± 0.04
Biolog catabolic diversity ($n = 3$)	Catabolic richness ($n = 62$)	30.7 ± 1.3	17.7 ± 2.2	21.3 ± 1.45	25.7 ± 2.6	22.0 ± 9.5	12.7 ± 3.5	15.7 ± 5.8	15.0 ± 1.5	12.0 ± 4.4	5.0 ± 1.15	23.2 ^a ± 2.1	19.0 ^a ± 3.0	10.7 ^b ± 2.0
	Shannon index (H')	3.27 ± 0.04	2.77 ± 0.13	2.97 ± 0.07	3.15 ± 0.10	2.78 ± 0.38	2.35 ± 0.36	2.43 ± 0.41	2.47 ± 0.09	2.22 ± 0.39	1.52 ± 0.25	3.00 ^a ± 0.08	2.68 ^a ± 0.17	2.07 ^b ± 0.20
	Pielou's evenness index (J')	0.96 ± 0.00	0.97 ± 0.01	0.97 ± 0.00	0.97 ± 0.01	0.95 ± 0.01	0.96 ± 0.02	0.94 ± 0.01	0.92 ± 0.02	0.95 ± 0.01	0.98 ± 0.01	0.97 ± 0.00	0.95 ± 0.01	0.95 ± 0.01

We investigated bacterial taxonomic diversity at the phylum level (Alpha, Beta, Gamma, and Delta classes were found for Proteobacteria). Their relative proportions in each soil are presented in **Figure 3.2**. Based on the dissimilarity distance matrix, the soils were all highly different: the minimum Bray-Curtis dissimilarity index between two different soils was 0.814, while it ranged from only 0.254 to 0.519 for replicates of a same soil (data not shown). Phylum proportions varied among soils, with a majority of Acidobacteria, Actinobacteria, and Proteobacteria. Acidobacteria were dominant (10.8% to 31.4%), except in ctrl-Mo (7.1%) and sh-NM (4.3%) communities. Within the soil collection, Actinobacteria represented 10.1% to 25.9% of bacterial communities. Proteobacteria represented 16.2% to 35.1% of soil bacterial communities and were mainly represented by Alpha-Proteobacteria (up to 18.5% in sh-Te), except in ctrl-Mo where Beta-Proteobacteria were the dominant proteobacterial class and represented 13.2%. We can note that ctrl-He, sp-MsM, and sp-RM bacterial soil communities harboured the lowest proportions of Proteobacteria but high proportions of Verrucomicrobia (22.1% in ctrl-He) and of unclassified OTUs (16.5% and 17.8% in sp-MsM and sp-RM, respectively). Bacterial communities from soils sharing the same use had very different compositions. For example, Firmicutes represented 13.8% of the sp-MsM soil community, while they represented a maximum of 0.4% of the other settling pond soil bacterial communities. By comparing soil groups, we noted that Verrucomicrobia were present in a significantly higher proportion in control soils than in polluted soils ($p = 9.415 \times 10^{-5}$). On the contrary, polluted soils harboured a significantly higher proportion of Candidate division TM7 phyla than control soils ($p = 0.001$). We investigated the relationship between physico-chemical soil parameters and bacterial phylum proportions by searching significant linear correlations. The proportion of Actinobacteria was positively correlated to the total nitrogen concentration (Pearson, $p = 6.74 \times 10^{-4}$, $r = 0.88$) and the soil cation-exchange capacity (Pearson, $p = 2.04 \times 10^{-3}$, $r = 0.85$). The proportion of Proteobacteria was positively correlated to total and available PAH concentrations (Pearson, $p = 1.59 \times 10^{-3}$, $r = 0.86$ and $p = 9.99 \times 10^{-4}$, $r = 0.87$, respectively), mostly due to a correlation with gamma-Proteobacteria (Pearson, $p = 0.05$, $r = 0.63$ and $p = 0.02$, $r = 0.71$, respectively). Positive correlations between the proportion of Chloroflexi and total zinc and lead concentrations (Pearson, $p = 2.43 \times 10^{-3}$, $r = 0.84$ and $p = 0.03$, $r = 0.70$, respectively) were also found. The proportion of unclassified OTUs was correlated with the total zinc concentration (Pearson, $p = 5.42 \times 10^{-3}$, $r = 0.80$) and the metal pollution index (Pearson, $p = 1.93 \times 10^{-2}$, $r = 0.72$). Similarly, the proportion of Gemmatimonadetes was positively correlated with the metal pollution index (Pearson,

$p = 1.44 \times 10^{-2}$, $r = 0.74$) and with various metals such as total nickel and cobalt concentrations (Pearson, $p = 1.66 \times 10^{-2}$, $r = 0.73$ and $p = 1.52 \times 10^{-2}$, $r = 0.74$, respectively).

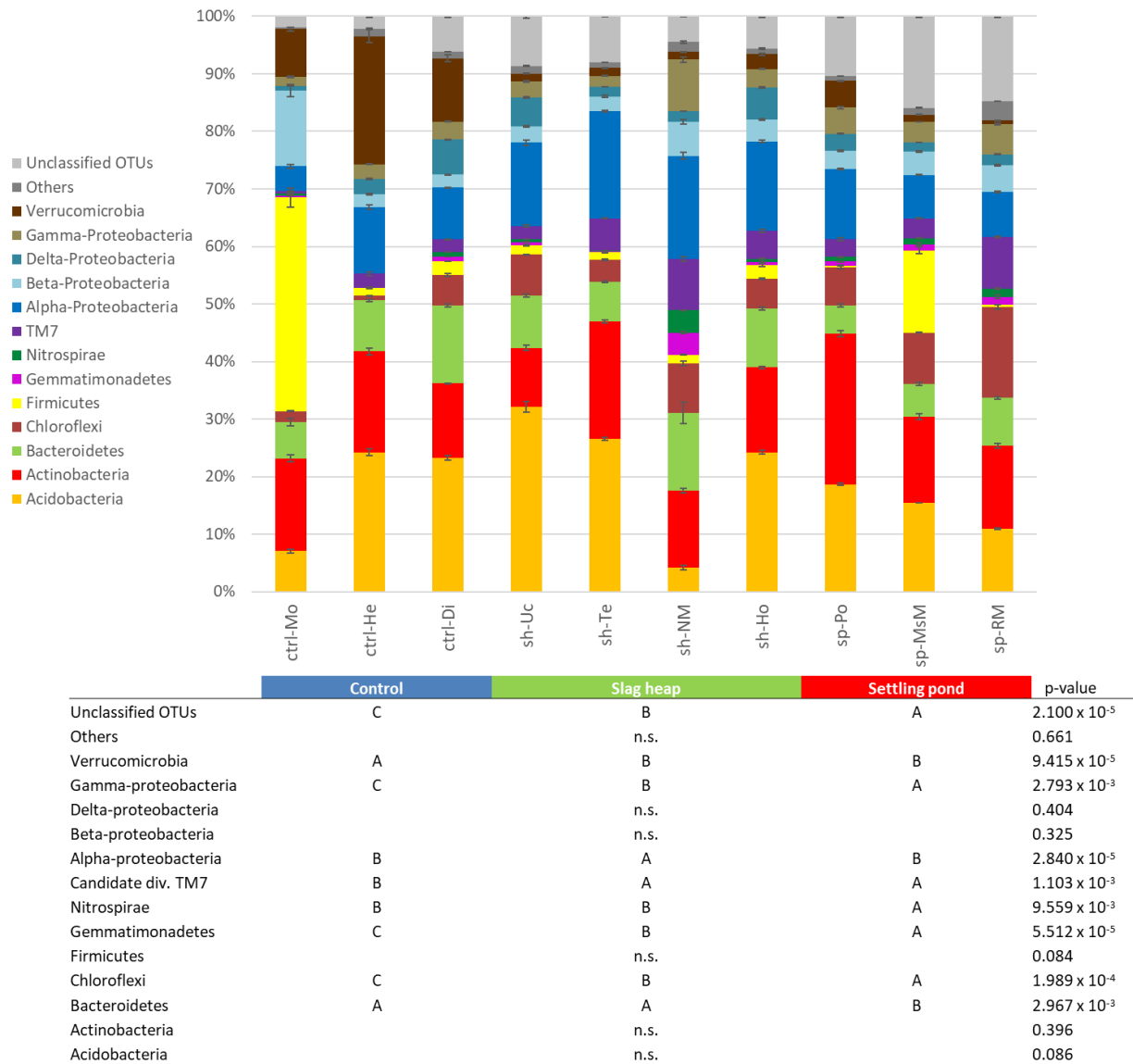


Figure 3.2. Taxonomic composition of the bacterial communities of the ten soil samples. Values are means ($n = 3$), and error-bars represent standard errors of the mean for each soil. The group named Others included OTUs affiliated to the following phyla: BD1-5, Chlamydiae, Chlorobi, Cyanobacteria, Deinococcus-Thermus, Fusobacteria, Spirochaetes, WCHB1-60, Synergistetes, and Candidate divisions BRC1, OD1, OP10, SR1, TG-1, TM6, WS3, and WS6. Statistical differences among phylum proportions in the soil groups are indicated by different letters (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$).

The analysis at the OTU level generated 32 920 OTUs, which ranged from 2 159 (sp-RM) to 4 434 (ctrl-Di) mean OTUs *per* sample. The PLSr was computed to gain insights into the soil physico-chemical parameters that drove bacterial taxonomic diversity. The heatmap in

Figure S3.1 shows that the distribution of correlations between bacterial diversity and soil characteristics was rather scattered, reflecting a great heterogeneity of the relationships linking bacterial diversity to soil properties. Each soil factor selectively correlated only to a small number of OTUs (10-17). In particular, as identified by the high correlation coefficients (> 0.9), the strongest correlations between soil properties and OTUs concerned the pH, the clay content, and the PAH content. Whereas the pH and clay seemed to correlate mostly to OTUs affiliated to the Verrucomicrobia (negatively) and Firmicutes (positively), respectively, the PAH content appeared to affect a more diverse range of OTUs. The soil PAH content was indeed positively and strongly correlated to the abundance of 5 OTUs affiliated to Bacteroidetes (*Flexibacter* and *Flavobacterium* members) but also to that of 3 OTUs affiliated to Chloroflexi, and 4 affiliated to Alpha-Proteobacteria (2 OTUs belonging to *Sphingomonadaceae*), Nitrospirae, and Actinobacteria (one OTU affiliated to *Arthrobacter*). Interestingly, these groups were mostly unaffected by all other soil parameters and were the only taxa affected by PAH. Moreover, no OTU was negatively affected by PAH. With respect to the other soil characteristics such as total N, available P, and the metal concentration index, we observed weaker correlations with bacterial diversity. These factors were positively correlated to one group of OTUs dominated by members of Actinobacteria. The total organic carbon and sand contents were slightly correlated to 2 other groups of OTUs, but with opposite effects. Organic C was positively correlated to a highly diversified taxonomic group, while the sand content was positively correlated with a group of 8 Acidobacteria.

3.3 Metabolic functional diversity

The soil basal respiration and the substrate-induced respiration (SIR) measured for six different carbon sources (L-asparagine, citrate, succinate, pyruvate, D-mannitol, D-ribose) using MicroResp™ microtiter plates are shown in **Figure 3.3**. The functional alpha diversity estimators based on MicroResp™ data are shown in **Table 3.2**. No statistical difference among soil groups emerged for substrate richness, probably due to the low number of carbon substrates we tested. The control and slag heap soils had similar functional Shannon indices and higher ones than the settling pond soils. Pielou's functional evenness index was statistically different among the 3 soil groups, with the highest for slag heap soils and the lowest for settling pond soils. The sum of SIRs for the 6 different carbon sources was used as a proxy of the soil metabolic activity (**Figure 3.3**). Most of the carbon sources were utilised by every soil, i.e. the SIR level was higher than basal respiration, except with D-mannitol that was not utilised by sh-Te, and citrate that was not utilised by ctrl-Mo, ctrl-Di, sh-Ho, and sp-Mi.

The highest measured SIR was with pyruvate and the lowest with citrate. sp-Po showed the highest metabolic activity, while sh-Ho showed the lowest, mostly due to the great differences in SIR levels with the pyruvate substrate (data not shown). Kruskal-Wallis tests showed that all SIR values except with D-ribose significantly differed among the soils. Based on soil groups, Kruskal-Wallis tests revealed that the settling pond soils had a significantly higher soil metabolic activity than the slag heap and control soils ($p = 1.93 \times 10^{-3}$), mostly due to the high metabolic activity of sp-Po. Basal respiration and SIR with pyruvate were also the highest in the settling pond soils and the lowest in the slag heap soils ($p = 1.73 \times 10^{-7}$ and $p = 9.54 \times 10^{-5}$, respectively). Finally, a positive linear correlation (Pearson, $p = 6.99 \times 10^{-5}$, $r = 0.94$) was found between soil metabolic activity and soil basal respiration. Additionally, these last two parameters were positively correlated with the total nitrogen concentration (Pearson, $p = 8.42 \times 10^{-3}$; $r = 0.77$ and $p = 1.53 \times 10^{-2}$; $r = 0.74$, respectively).

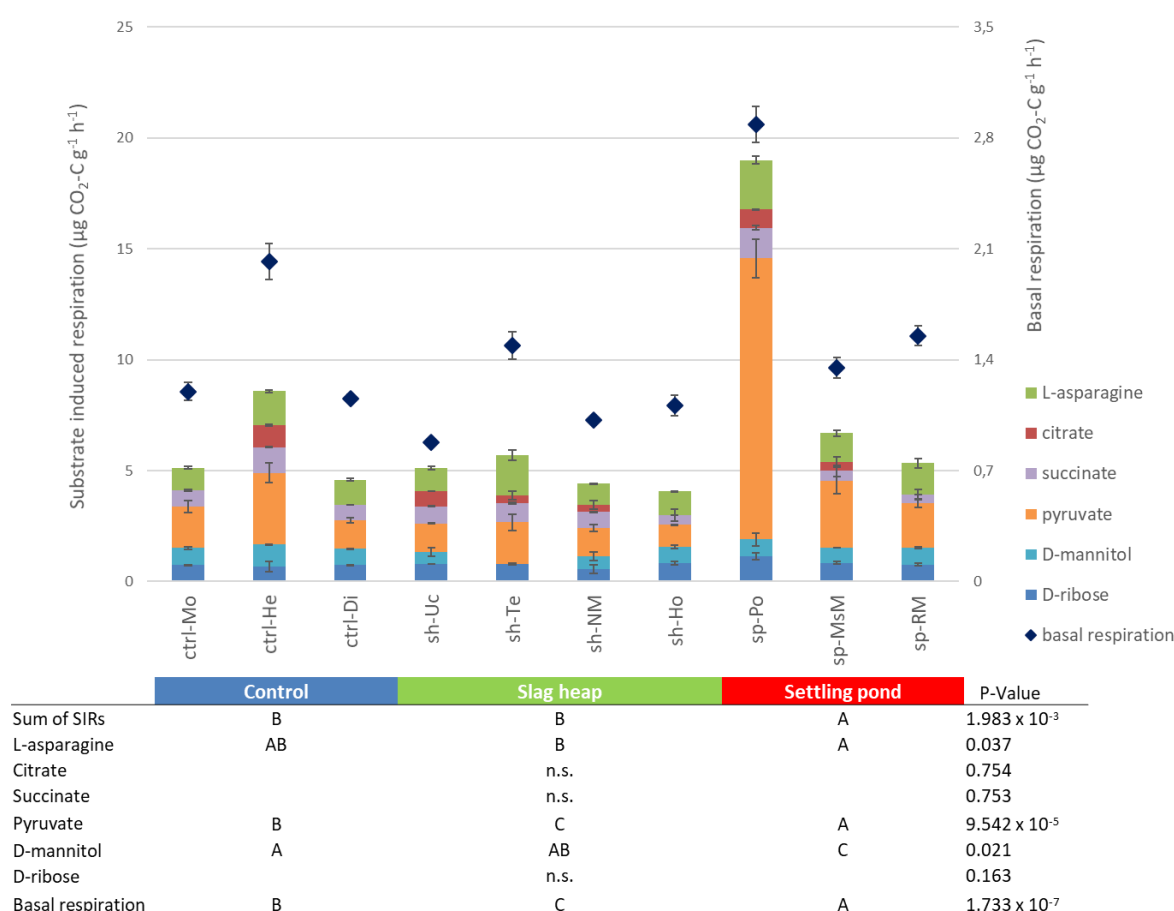


Figure 3.3. Cumulated substrate-induced respiration (SIR) in the presence of six carbon sources, and basal soil respiration measured using the MicroResp™ method. Values are means ($n = 4$ for SIR and $n = 8$ for basal respiration), and error bars represent standard errors of the mean for each soil. Statistical differences among the soil groups are indicated by different letters (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$).

We assessed carbon substrate utilisation using Biolog® microtiter plates to calculate soil metabolic richness and average well colour development (AWCD) (**Figure 3.4**). The functional alpha diversity estimators based on Biolog® data are shown in **Table 3.2**. Kruskal-Wallis test showed that bacterial communities from the settling pond soils had a significantly lower metabolic richness and Shannon's diversity indices than bacterial communities from the slag heap and control soils, while no difference among the three soil groups was observed for Pielou's evenness index. The metabolic richness of the ten soils ranged from 5 (sp-RM) to 31 (ctrl-Mo) utilised carbon sources, out of a total of 62 carbon sources. None of the 10 soils significantly catabolised PAH in the conditions of the experiment, probably due to a too short incubation time. Thus, except PAH for all soils, and polymers and miscellaneous substrates for sp-RM, at least one substrate from each substrate guild was utilised by each soil. Among the 62 carbon substrates, protocatechuic acid, L-asparagine, Tween 40, D-mannitol, succinic acid, and putrescine were the best utilised carbon substrates in the aromatic acid, amino acid, polymer, carbohydrate, carboxylic acid, and miscellaneous guilds, respectively. On the contrary, for these same carbon guilds, the less utilised substrates were syringic acid, glycine, alpha-cyclodextrin, D-sucrose, propionic acid, and pyrocatechol, respectively. Kruskal-Wallis tests showed significant differences in metabolic richness among soils, especially between ctrl-Mo and sp-RM. ctrl-Mo indeed exhibited higher total metabolic richness and a wider range of utilised carboxylic acids, carbohydrates, and polymers than sp-RM. No significant difference was observed among soils for miscellaneous, amino acid, and aromatic acid metabolic richness. Besides, as regards the soil groups, the settling pond soils showed significantly lower total metabolic richness ($p = 0.007$), carboxylic acid ($p = 0.017$) and carbohydrate ($p = 0.004$) utilisation richness than the slag heap and control soils. Regarding utilisation of substrates from the polymer guild, the settling pond soils showed the lowest metabolic richness, and the control soils the highest ($p = 0.03$), respectively. Finally, a positive linear correlation (Pearson correlation, $p = 1.182 \times 10^{-5}$, $r = 0.959$) was found between total metabolic richness and AWCD.

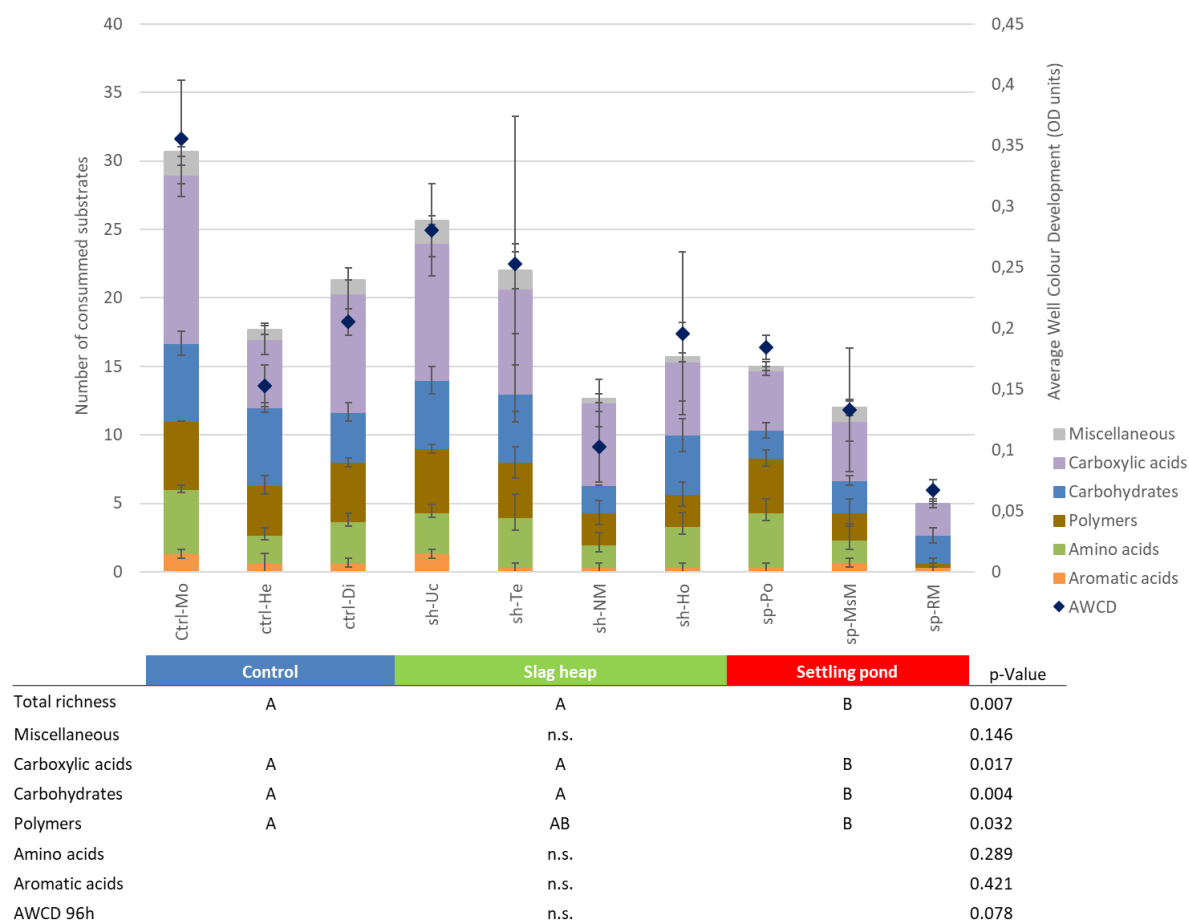


Figure 3.4. Catabolic richness and average well color development (AWCD) measured after 96 h of incubation using Biolog® microtiter plates. Values are means ($n = 3$), and error bars represent standard errors of the mean for each soil. Sixty-two carbon sources were tested: 4 PAH, 6 aromatic acids, 9 amino acids, 7 polymers, 14 carbohydrates, 17 carboxylic acids, and 5 miscellaneous (for details see Supplemental Table S3.1). Statistical differences among the soil groups are indicated by different letters (Kruskal-Wallis test, $p > 0.05$). As none of the PAH compounds was significantly degraded, they were excluded from the statistical analysis.

3.4 Zinc tolerance

Soil microbial zinc tolerance was assessed using Biolog® microtiter plates by adding $ZnCl_2$ solution, and then percentages of inhibition due to zinc addition were calculated. **Figure 3.5** shows the linear regression between the soil available zinc concentration and the percentage of inhibition of carbon substrate utilisation. A similar linear regression was found with the total zinc concentration ($p = 3.975 \times 10^{-5}$, $R^2 = 0.45$). The settling pond soils had the highest available zinc concentration, and their metabolic activity was the least inhibited by zinc addition. The ctrl-He soil also had a high available zinc concentration (38.1 mg kg^{-1}), due to its low pH (5.4, **Table 3.1**) leading to a higher MTE availability and a lower zinc inhibition of metabolic activity (46.2%). In comparison, ctrl-Mo and ctrl-Di had neutral pH values (7.0 and

7.3, respectively), a low available zinc concentration (< 10 and $11 \mu\text{g kg}^{-1}$, respectively) and a higher zinc inhibition of metabolic activity (49.3 and 54.7%, respectively).

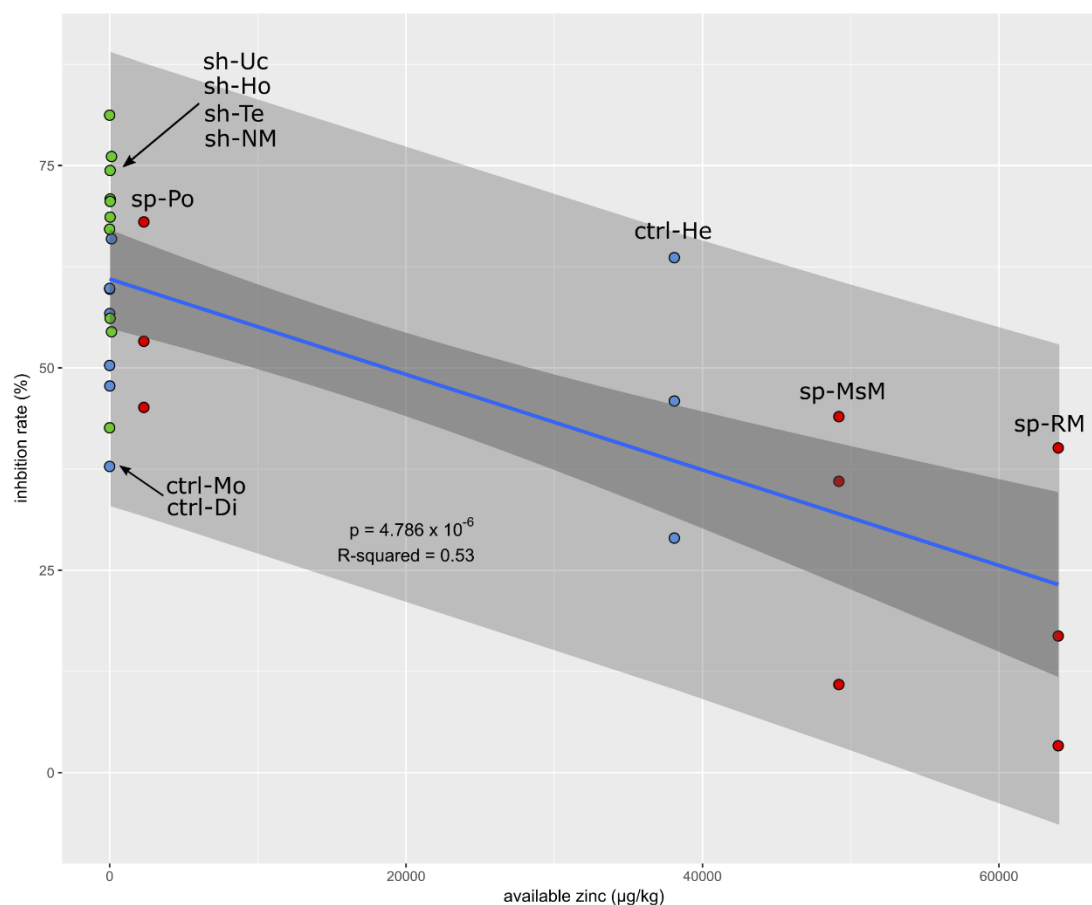


Figure 3.5. Linear regression between the inhibition rate of carbon substrate utilisation measured using Biolog[®] microtiter plates ($n = 3$) with and without zinc addition, and available zinc concentrations in the ten soils. The blue line represents the linear model of regression ($y = -0.0006x + 60.98$; where y is the inhibition rate and x is the available zinc content of the soil). The dark grey area represents the confidence interval, and the light grey area represents the prediction interval (95%). Settling pond, slag heap, and control soils are represented by red, green and blue dots, respectively.

3.5 Effects of the soil characteristics on taxonomic and metabolic functional diversity

We investigated the effects of soil environmental characteristics on bacterial taxonomic diversity (Figure 3.6A), and MicroResp[™] (Figure 3.6B) and Biolog[®] (Figure 3.6C) metabolic functional diversity through redundancy analyses. We performed three RDAs using soil environmental characteristics as explanatory variables, and the taxonomic and functional diversity indices of the soil microbial communities (Table 3.1 and Table 3.2) as response variables. The explanatory variables that best explained the variation of diversity indices were

selected by backward selection to maximise the percentage of explained variability leading to at least 99.3% of total variation. The supplemental **Table S3.2** provides p values and coefficients for axes and soil properties significance. Only the first axis ($p < 0.005$) in **Figure 3.6A** and **Figure 3.6B** was significant, and so were the first two axes ($p < 0.005$ and $p < 0.02$) in **Figure 3.6C**. Among the explanatory variables (metal pollution index, PAH concentration, pH, and sand fraction), only the sand fraction had a significant effect (first axis; **Figure 3.6A**) on bacterial taxonomic diversity ($p < 0.01$, $F = 16.30$). This relationship was confirmed by significant positive linear correlations between the proportions of soil sand fractions and Chao1 ($p = 5.97 \times 10^{-3}$, $r = 0.80$), Shannon diversity ($p = 3.50 \times 10^{-3}$, $r = 0.82$) and Pielou's evenness ($p = 0.01$, $r = 0.76$) indices. Total organic carbon and nitrogen concentrations were the two significantly explanatory variables ($p < 0.005$, $F = 8.71$ and $p < 0.01$, $F = 4.46$, respectively) accounting for the variation of MicroResp™ soil metabolic diversity (**Figure 3.6B**). The total nitrogen concentration showed negative relationships with Shannon diversity (H') and Pielou's evenness (J) indices, confirmed by significant Pearson linear correlations ($p = 1.50 \times 10^{-4}$, $r = -0.92$ and $p = 3.08 \times 10^{-3}$, $r = 0.83$, respectively). The metal pollution index and the total nitrogen concentration were the strongest determinants of both axes (**Figure 3.6C**) and had a significant effect on Biolog® metabolic diversity indices ($p < 0.01$, $F = 7.77$, and $p < 0.05$, $F = 4.71$, respectively). The metal pollution index showed a negative relationship with metabolic richness and Shannon diversity index (H') confirmed by slightly significant negative linear correlations ($p = 0.06$, $r = -0.61$ for both of them). Total nitrogen exhibited a negative relationship with Pielou's evenness index (J), confirmed by a significant linear correlation ($p = 0.02$, $r = -0.73$).

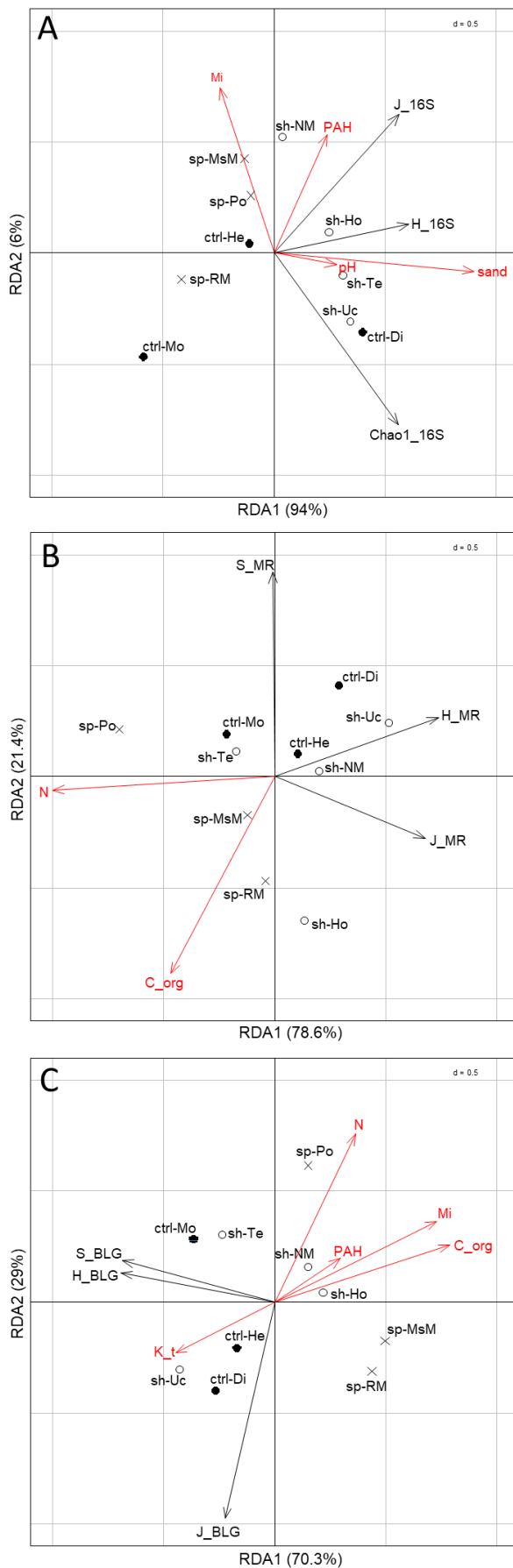


Figure 3.6. Redundancy analysis (RDA) of soil bacterial community diversity (A), MicroResp™ soil catabolic diversity (B), and Biolog® catabolic diversity (C), each of them constrained by soil environmental characteristics. For each RDA, the explanatory variables that best explained the variation of diversity indices (response variables) were selected by backward selection. Explanatory and response variables are in red and black, respectively. Abbreviations of explanatory variables: N: total nitrogen; C_{org}: total organic carbon; Mi: metal pollution index; PAH: sum of 16 regulatory PAH; K_t: total potassium; sand: proportion of the sandy fraction. Abbreviations of response variables: S: richness; Chao1: extrapolated richness; H: Shannon's diversity index; J: Pielou's evenness index; 16S: index for bacterial taxonomic diversity. MR: index for MicroResp™ soil catabolic diversity. BLG: index for Biolog® catabolic diversity. Abbreviations for soils: Di: Dieulouard, Ho: Homécourt, He: Hémilly, MsM: Mont St Martin, Mo: Montiers, RM: Russange-Micheville, NM: Neuves Maisons, Po: Pompey, Te: Terville, Uc: Uckange). Soils were grouped in three types according to their history (sp: settling pond; sh: slag heap; ctrl: control). The p values and F coefficients, for axes and soil properties, are provided in the supplemental Table S3.2.

4 DISCUSSION

We studied ten different soils presenting metal and/or PAH pollution gradients and exhibiting a wide range of anthropisation levels. Although the ten soils came from various sites with different types and levels of plant colonization, they mostly clustered in three groups based on their physico-chemical properties and pollution levels. These three groups reflected their use, whether industrial or low anthropised. Settling pond soils were highly polluted with MTE, with higher contents of total organic carbon and nitrogen and a siltier texture than the soils from the other groups. Slag heap soils were the sandiest and the most PAH-polluted soils, and also exhibited middle-high metal pollution: mostly MTE for sh-Te, sh-NM, and sh-Ho, while sh-Uc contained a very high iron concentration. The control soils were the least metal- and PAH-polluted ones; they were also the most clayey soils, and had the highest dissolved organic carbon and potassium contents. Apart from the identification of well-known edaphic factors impacting the microbial diversity, we also aimed at identifying the impact of pollutants on the microbial community composition. The taxonomic and metabolic functional diversity of the microbial communities inhabiting the ten soils was characterized. We studied bacterial taxonomic diversity based on 16S rRNA gene sequencing, and functional diversity based on measurements of the utilisation of various carbon substrates involved in different functions to estimate the impact of land use on microbial community diversity and functions. We focused on functions related to the carbon cycle, one of the most important biogeochemical cycles for soil functioning (Nielsen et al., 2011; Schimel and Schaeffer, 2012). Although the taxonomic and functional diversity of soil microorganisms is extensively studied to better understand ecosystem functioning, the real link between taxon occurrence and functional richness remains poorly understood in most ecosystems (Nannipieri et al., 2003), particularly for microbial communities. Various authors suggest that the functions related to carbon mineralisation are redundant (Rousk et al., 2009; Yin et al., 2000). Besides, the loss of species or the modification of microbial community composition does not necessarily induce a loss of functions. In order to better understand the effect of pollution on microbial communities, it is thus important to study both taxonomic and functional diversity, using a combination of tools. One of the objectives of this study was to identify soil parameters mostly shaping microbial community diversity in the ten soils. Although, some of the measured diversity indicators seemed constant in all soils, our data revealed that both pollutant and physico-chemical parameters strongly affected part of the taxonomic and functional structures.

4.1 Non-impacted microbial parameters

We noted few variations in bacterial community composition among our soils, with all the major phyla present in each soil, and no phylum significantly dominant or under-represented in highly anthropised soils. The taxonomic diversity indices of the polluted soils were not significantly different from those of the control soils. Previous studies reported similar trends with no difference among the bacterial taxonomic diversity indices of historically mining-impacted vs. unpolluted sediments (Reis et al., 2013). Indeed, long-term adaptation and resilience (Gillan et al., 2005) of the bacterial communities, being as diverse as in control soil (Bourceret et al., 2016) or over a metal polluted gradient (Azarbad et al., 2015), was previously observed. Additionally, except for sp-RM that exhibited a very strong decrease of metabolic richness, at least one substrate from each carbon substrate guild from Biolog® plates was utilised by each soil. In some cases, metabolic potentials were not affected by metal pollution as shown in three forest soils gradually polluted by Zn and Cd (Niklińska et al., 2004). The differences of substrate-induced respiration observed among soils were less pronounced using the MicroResp™ than the Biolog® method, and were essentially linked to the soil basal respiration rates as previously observed (Nordgren et al., 1988). Contrarily to many studies (Bérard et al., 2016; Nordgren et al., 1988; Stazi et al., 2017), basal respiration rates and substrate-induced respiration were mostly not affected by pollution (metals and PAH) level. Additionally, to the bacterial activity, MicroResp™ can also integrate fungal respiration. Although, fungi are major actors of the carbon cycle (Bardgett et al., 2008), their relative abundances (ratio between 18S and 16S rDNA copy numbers) were not correlated with the respiration rates because the three soil groups had similar fungal density (18S rDNA copies g⁻¹ dw soil). Moreover, even if fungi harbor high metal tolerance (Rajapaksha et al., 2004) no link between fungal abundances, respiration rates and soil pollution was highlighted.

4.2 Impact of metals on microbial diversity

The relative toxicity of a pollutant depends more on its available content than on its total content. The bioavailability of MTE in these soils was relatively low since most of them had a pH value above 7. Only soil He with a pH of 5.4 had a relatively higher MTE availability than the other soils of the same group, although it was not contaminated. Except for this soil, using the relative metal pollution index or the available fraction of MTE such as Zn showed the same tendency, that is why we mainly used the former to compare the soils.

The metal pollution index and/or the total zinc content were positively correlated with the relative proportion of unclassified OTUs and Gemmatimonadetes and Chloroflexi phyla (correlation with available Zinc content have p value of 0.077, 0.088 and 0.120, respectively). Unclassified OTUs may represent extensive unexplored bacterial diversity that may have original properties allowing them to survive and grow in strongly metal-contaminated environments. Gemmatimonadetes are commonly found in heavy-metal contaminated soils (Sullivan et al., 2013). A positive relationship between the relative proportion of Gemmatimonadetes or Chloroflexi and metal pollution was shown in lake sediment historically polluted with zinc and lead (Ni et al., 2016) and in the soil of an abandoned Pb-Zn mine (Epelde et al., 2015). The Chloroflexi group is known to have a high stress tolerance ability (Fierer, 2017), which could explain its development in our metal-polluted soils. At the OTU level, a few OTUs were positively correlated to the metal pollution index, and these OTUs were also positively correlated to the P and N contents. These OTUs were affiliated to Actinobacteria members, closely related to the AKIW543 clone, the *Acidimicrobinae* and *Aeromicrobium* genera, and to Firmicutes affiliated to the *Bacillus* genus. Very little information is available about the two former but few strains belonging to *Aeromicrobium* and *Bacillus* genera have already been isolated from former mining sites (Sprocati et al., 2014) and from heavy-metal contaminated soil (Ellis et al., 2003).

The metal pollution index and/or the total and available zinc contents were negatively correlated to the richness and diversity of the substrates utilised in Biolog® plates, suggesting that functional diversity (number of metabolic functions) was reduced in metal-polluted soils (Giller et al., 1998). Similarly, when comparing soils sampled at different distances from a site historically metal-polluted with As, Cu, and Pb, Boshoff et al. (2014) found lower functional diversity in the soils closest to the contamination source. It may result from the replacement of sensitive species by more resistant ones having different and less versatile metabolic properties (Hemme et al., 2010) maybe due to an energy cost balance between metal stress survival mechanisms and substrate utilisation efficiency (Chander and Joergensen, 2001). Functional diversity may indicate the capacity of the community to adapt its metabolism, relative composition, and size to various changes in environmental conditions (Preston-Mafham et al., 2002). In our study, the low metabolic richness of the bacterial community in the metal-polluted soils may have disturbed carbon recycling and soil functioning.

Additionally, using Biolog® for tolerance tests, lower zinc sensitivity (or higher tolerance) of the bacterial community inhabiting high metal-contaminated soils was shown as compared to

low-polluted or unpolluted soils, suggesting an adaptation of communities to metal stress, as previously observed (Lock and Janssen, 2005). It is well accepted that microorganisms coming from highly polluted environments are more tolerant to pollution than those coming from less polluted environments (Blanck, 2002).

Among our soil collection, sh-Uc had the highest iron concentration and relatively low concentrations of other metals, resulting in a middle-high metal pollution index. This soil had similar taxonomic but slightly higher functional diversity indices as compared to other soils presenting a middle-high metal pollution index. Unlike other metals such as Cd or Pb, Fe is an essential element for almost all living organisms and is involved in numerous metabolic processes. Moreover, due to its extremely high total concentration in sh-Uc, iron was probably mostly present as insoluble oxides and unavailable forms. This finding suggests that although iron was present in a very high total concentration in sh-Uc, it had a lower effect on microbial diversity than other metals such as Zn, Cd, or Pb.

4.3 Impact of PAH on microbial diversity

We highlighted various correlations between PAH pollution and the proportions of some phyla or OTU abundance, but found no relationship with functional metabolic diversity, suggesting a limited impact of PAH on microbial community carbon-cycle related functions in our soils. Total and available PAH contents were both positively correlated to the proportions of Proteobacteria (mostly Gamma-Proteobacteria) and Nitrospirae phyla, even if in the literature the Nitrospirae phylum seemed to be negatively impacted by PAH content and bioavailability (Ni et al., 2017). Proteobacteria and Gamma-Proteobacteria were previously found in greater proportions in pyrene-amended soil (Ren et al., 2016) and can be involved in PAH degradation (Padmanabhan et al., 2003). The abundance of some OTUs was also positively correlated to the total PAH pollution level, but was not affected by all other soil parameters, suggesting an advantage conferred in the presence of PAH. Most of them were found predominant in PAH-polluted environments, i.e. bacteria belonging to *Flavobacterium* (Trzesicka-Mlynarz and Ward, 1995), *Flexibacter* (Viñas et al., 2005), *Sphingomonadaceae* (Martirani-Von Abercron et al., 2017) and Chloroflexi (Cébron et al., 2009) were detected or isolated from PAH-contaminated soils. Firstly, PAH pollution could have contributed to shape bacterial communities by favouring species able to metabolise PAH. Secondly, in our soils, due to ageing, available PAH concentrations were low as compared to total concentrations and did

not negatively affect taxonomic or functional diversity at the community level, indicating no major toxicity impact of PAH on bacterial diversity.

4.4 Impact of physico-chemical parameters on microbial diversity

Apart from the soil pollutants, microbial communities can be affected by physico-chemical parameters. It is well known that the pH is one of the major parameters that shapes microbial community composition (Fierer and Jackson, 2006; Rousk et al., 2010). Except one control soil (ctrl-He), our soils were chosen with a similar slightly alkaline pH to avoid a too high influence of this parameter that could have hidden the structuring impact of other parameters. Thus, the pH has little impact on taxonomic and functional diversity, although the proportions of few OTUs mostly affiliated to Verrucomicrobial DA101 members and commonly found as dominant bacteria in soils (Brewer et al., 2017) increased when the pH decreased.

The soil texture, and especially the sand fraction proportion, was the strongest determinant of bacterial taxonomic diversity in our soils, but no link with metabolic functional diversity was highlighted. The relative proportion of the soil sandy fraction was indeed positively correlated with taxonomic richness, evenness, and Shannon diversity indices, and the relative proportion of Alpha-Proteobacteria (Sessitsch et al., 2001), whereas the relative proportions of silt and clay negatively influenced the richness and evenness indices. Fine-textured soil can protect microbes from predation by protozoans, reduce variations in water availability, and maintain higher microbial abundance (Franzuebbers et al., 1996). Conversely, coarse-textured soils allow for a better aeration and water circulation providing various microhabitats and supporting growth of diverse microorganisms adapted to limited nutrient conditions or able to use a wider range of substrates (Sessitsch et al., 2001). Similarly to our results, Chau et al. (2011) found a positive linear relationship between sand content and taxonomic richness, while Kandeler et al. (1996) found that the small-size fraction promoted bacterial diversity. These contradictory results could be related to soil fractionation techniques (Chau et al., 2011), as we based textures on particle granulometry, not on mineralogy (i.e. the sandy fraction could contain sand but also other particles). Finally, the texture may affect pollutant availability, which could indirectly affect microbial diversity.

While the soil total organic carbon content was not the main parameter explaining taxonomic diversity, it was negatively correlated to the functional diversity indices, calculated from MicroResp™ and Biolog® data, to the utilisation level of 6 substrates (phthalic, ferulic, succinic,

and aconitic acids, Tween 40, and phenylethylamine), and to the number of polymer, carboxylic acid and miscellaneous substrates utilised in Biolog® microtiter plates. We noticed that in the redundancy analysis, the total organic carbon content co-varied with the metal pollution index, as previously shown by Valsecchi et al. (1995) on a collection of 16 soils. As explained above, metal pollution may have reduced the functional capacities of the microbial community. The resulting lower microbial functional diversity and activity may have reduced organic carbon recycling in the soils, resulting in an accumulation of total organic carbon and organic matter. Similarly, rates of organic matter (i.e. litter or plant polymer such as cellulose) degradation were lower in metal-contaminated than unpolluted soils (Chew et al., 2001; McEnroe and Helmisaari, 2001). This finding could be explained by a decrease of enzymatic activities involved in the C cycle in metal-polluted soils (Kandeler et al., 1996). Moreover, Lucisne et al. (2015) also explained that accumulation of organic matter at the surface of brownfield soil could be partly due to the lack of endogenous metal-sensitive earthworm species limiting organic matter incorporation in the deeper soil layers.

We observed that the total nitrogen content was positively correlated with soil basal respiration, with ribose-, pyruvate-, and asparagine-induced respiration, and with 16S rRNA gene copy numbers. These relationships suggest that in some of our soils, nitrogen present in very low concentrations was one of the limiting factors of microbial growth and activity. N limitation can indeed occur in some cases depending on the quality of the available carbon substrate (Johnson et al., 1998; Wardle, 1992). Additionally, the relative proportions of the Actinobacteria phylum and of a few OTUs affiliated to Actinobacteria and Firmicutes were positively correlated to the total nitrogen content. As discussed above, these OTUs were also positively correlated to the metal pollution index indicating a simultaneous influence of various soil parameters on microbial community composition. As explained for total organic carbon, metal pollution partly inhibits soil enzyme activities and organic matter decomposition (Kuperman and Carreiro, 1997), so that the total nitrogen content potentially increases in the most polluted soils. Moreover, several strains of Bacilli isolated from soils are known as nitrogen-fixing bacteria (Moore and Becking, 1963) and could contribute to increase the nitrogen content. On the contrary, Bacteroidetes phyla and a few OTUs affiliated to Acidobacteria were negatively correlated with the total nitrogen content. Acidobacteria are often classified as oligotrophes (Fierer et al., 2012), which are favoured in nutrient-poor environments. Moreover, a negative relationship between the total nitrogen content and the functional evenness index was mostly explained by a higher mineralising activity in a few

substrates. Nitrogen may have impacted bacterial community composition, favouring the development of certain species with higher metabolic activity for certain specific substrates.

5 CONCLUSION

We studied a collection of 10 soils presenting different anthropisation levels. Based on their physico-chemical characteristics and on metal and PAH pollution levels, these soils were gathered in 3 groups corresponding to their use, i.e. either industrial (slag heap and settling pond) or low anthropised (control soil). Although taxonomic diversity largely varied among soils, the occurrence of a few bacterial phyla and OTUs was influenced by metal and PAH pollution as well as by the pH, texture, and the total N content. Furthermore, metal pollution, particularly zinc concentrations, seems to have selected more metal-tolerant communities but with reduced metabolic functional diversity and activity. Apart from metal pollution, the N content appeared to be one of the main factors limiting microbial activity in our soils. These reduced activity and metabolic functional diversity may have contributed to an accumulation of organic matter in the most metal-polluted soils. Considering all abiotic and biotic soil characteristics, especially metabolic functional diversity, we are now able to rank our soils based on their impact on microbial communities (i.e. control soils have the lowest effect, while settling pond soils have the highest). Although it would be very interesting to study a wider range of soil to draw more generalizable conclusions, the study of 10 soils already allowed us to identify the drivers of microbial diversity at both the taxonomic and functional level.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Arcelor Mittal, EPFL, GISFI, ONF, and LTO of Montiers (ANDRA/INRA, M.P. Turpault and S. Uroz) for giving us access to the different sampling sites. We would like to thank G. Kitzinger and D. Billet (LIEC, Nancy, France) as well as J. Marchand (PTEF, INRA Champenoux, France) for technical assistance and A. Meyer (LIEC, Metz, France) for statistical analysis support. Fundings: This study was supported by the Agence Nationale de la Recherche (RhizOrg project ANR-13-JSV7-000701), the French national program EC2CO (EcobioS project) and the OSU-OteLo (TraitMic project).

Chapitre 4 :
Etudes des communautés fongiques
dans des sols français présentant un
gradient d'anthropisation

Le règne des champignons, au même titre que celui des bactéries, est connu pour être très diversifié, avec plus de 100 000 espèces décrites à l'heure actuelle. Une étude à l'échelle globale de la planète a montré que les communautés fongiques des sols non pollués sont principalement représentées par des espèces affiliées aux Basidiomycota, aux Ascomycota, aux Mortierellomycotina et aux Mucoromycotina. En comparaison, la diversité des communautés fongiques dans les sols pollués par des HAP ou des métaux est peu connue, et bien moins encore dans les sols multi-contaminés.

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la pollution des sols par des métaux et par des HAP pouvait impacter l'abondance relative de plusieurs OTUs bactériennes, sans toutefois induire de changement majeur dans la structuration et le niveau de diversité taxonomique des communautés bactériennes. Il était donc intéressant de voir si une réponse similaire pouvait être observée pour les communautés fongiques.

Ainsi, l'objectif de ce 4^{ème} chapitre était d'étudier la diversité taxonomique des communautés fongiques de la collection de sols et de tenter d'établir des liens avec le niveau de pollution de chaque sol.

Nous avons mis en évidence que les communautés fongiques des 10 sols étudiés étaient majoritairement constituées d'Ascomycota, de Basidiomycota et de Cryptomycota, bien que leurs proportions relatives variaient beaucoup entre certains sols. De plus, le regroupement des sols obtenu en utilisant la composition des OTUs majoritaires était différent de celui réalisé sur la base de leurs propriétés physico-chimiques et de leur pollution (voir Chapitre 3). Différents taxa étaient impactés négativement ou positivement par la pollution. En effet, les classes Saccharomycetes, Leotiomycetes et Agaricomycetes étaient significativement moins abondantes dans les sols pollués que dans les sols contrôles, tandis que l'abondance des Dothideomycetes était positivement corrélée à la teneur en HAP dans les sols. Globalement, les résultats de ce chapitre suggèrent donc une adaptation des communautés fongiques et tendent à identifier différents taxa favorisés, ou au contraire, négativement impactés par la pollution.

Study of fungal communities in French soils displaying an anthropisation gradient

Florian Lemmel¹, Florence Maunoury-Danger², Corinne Leyval¹, Aurélie Cébron¹

¹ Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-54000 Nancy, FRANCE

² Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, FRANCE

ABSTRACT

Although numerous studies have investigated fungal taxonomic diversity in various soils and identified the soil driving properties, only few studies focused in a wide range of long-term polluted soils with various contamination levels and type. Long-term exposure to pollutant, either organic (i.e. polycyclic aromatic hydrocarbons) or metallic, may induce a selecting pressure on fungal community that could modify their structure and diversity. In this context, the aim of our study was to characterize fungal community structure and diversity in a soil collection presenting a multi-contamination gradient, in order to evaluate whether soils sharing similar use and pollution type harboured similar adapted fungal community or not.

Taxonomic diversity and structure of fungal community was assessed using 18S rDNA Illumina sequencing in a collection of ten soils previously characterised and gathered in three groups (control, slag heap and settling pond) based on their physico-chemical properties and pollution level. Possible relationships, between fungal community characteristics and soil properties, pollution content or use, were explored.

Fungi belonged mostly to Ascomycota, Basidiomycota and Cryptomycota phylum, and their proportion varied among soils and soil uses. Based on major OTU composition, the soils were grouped differently compared to the groups based on their physico-chemical properties and pollution level. However, Saccharomycetes and Leotiomycetes (Ascomycota), as well as Agaricomycetes (Basidiomycota) classes were significantly more abundant in control than in polluted soils, while it was the opposite for Cryptomycota phylum. Dothideomycetes abundance was found positively related to soil PAH contamination level. This study provides a report about the adaptation of fungal community structure to multi-contamination, and tends to identify fungal taxa affected or favoured in contaminated soils.

1 INTRODUCTION

Among microorganisms living on earth, the kingdom of Fungi represents one of the most diverse group. Actually, more than 100 000 fungal species were described, but the global fungal diversity is estimated to about 5.1 million species (Blackwell, 2011). Fungi are known to play fundamental role in terrestrial ecosystems, as they contribute to carbon cycling, mediate mineral nutrition of plant, and alleviate carbon limitation of other soil microorganisms (Tedersoo et al., 2014). For example, the majority of fungal species are saprotrophs that take part in organic matter mineralisation (Setälä and McLean, 2004) and are capable of decomposing complex polymers, such as cellulose or lignin (Cragg et al., 2015). Fungi are also commonly found inside living plants, either as endophytes or pathogens. Moreover, fungi are predominant plant mutualists, with the majority of terrestrial plants forming symbioses known as mycorrhizae, which improve plant mineral nutrition and tolerance to stress (Leyval et al., 1997; Smith and Read, 2008). Based on the study of a large range of soils, it was shown that fungal communities are mainly composed of Basidiomycota, Ascomycota, Motierellomycotina and Mucoromycotina (Tedersoo et al., 2014). On the contrary only few studies assessed fungal taxonomic diversity on wide range of long-term polluted soils with various contamination levels. Pollutions by metals and organic compounds such as polycyclic aromatics hydrocarbons (PAH) are known to impact fungal community structure and diversity. For example, it was shown that PAH pollution can reduce fungal Shannon diversity (Bell et al., 2014), or Chao1 richness (Zhou et al., 2017) indices. Some fungal genera such as *Fusarium*, *Cladosporium*, *Mucor* (Salvo et al., 2005), Sordariales or Pleosporales (Zhou et al., 2017) were found more abundant in PAH-polluted soils or sediments. In metal polluted soil, Ascomycota were more prevalent, while Basidiomycota dominated the reference areas (Narendrula and Nkongolo, 2017). More specifically, De Beeck et al. (2015) found that zinc and cadmium pollution of soil modified fungal community composition, with a dominance of *Sistotrema sp.*, *Suillus luteus* and *Wilcoxina mikolae*, but did not affect fungal diversity indices. This dominance of various species or genera in polluted soils suggests a fungal selection and adaptation to contamination. Although the bacterial taxonomic diversity of a wide range of soils presenting gradient of anthropisation and contamination did not show major structuration based on the soil use and their contamination level (Lemmel et al., in press; chap. 3), we wonder whether fungal community response is similar or not. In a context of long-term soil contamination, one wonders whether the pollution leading to selection of microorganisms has conducted to similar fungal community composition among soils sharing

similar use and pollution type. Additionally, a better understanding of fungal community diversities living in historically multi-contaminated soils could provide some information to better understand fungal ecology as well as soil functioning, and potentially be useful in bioremediation strategies.

In this context, the aim of this study was to determine the taxonomic diversity and composition of fungal community originating from a wide range of long-term anthropised soils presenting both PAH and metal contamination gradients. The taxonomic diversity was assessed through 18S rRNA gene tag-amplicon sequencing (Illumina MiSeq) and correlations with soil physico-chemical parameters, such as pollution, were searched.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Study sites and their physico-chemical characteristics

The ten studied soils and their physico-chemical characteristics were previously described in Lemmel et al. (in press; cf. chap. 3). Briefly, three were considered as the control soils (*ctrl*), i.e. two low-anthropised forest soils collected at Hémilly (*He*) and Montiers-sur-Saulx (*Mo*), and one anthropised but unpolluted ancient gravel pit soil collected at Dieulouard (*Di*). Seven anthropised soils known to be polluted by MTE and/or PAH were collected from: i) former slag heaps (*sh*) at Homécourt (*Ho*), Terville (*Te*), Uckange (*Uc*), and Neuves-Maisons (*NM*), and ii) former settling ponds (*sp*), at Pompey (*Po*), Mont-St-Martin (*MsM*), and Russange-Micheville (*RM*). All sites presented a similar good tree cover, except for *Uc* that presented a very low tree cover and *NM* that was not colonized by tree.

As described in Lemmel et al. (in press; chap. 3), the soil collection presented a gradient of PAH-pollution, ranging from 0.03 to 1095.90 mg kg⁻¹ dw soil (based on the 16 US-EPA PAH) and a gradient of metallic contamination mainly represented by Zn (60 to 119 000 mg kg⁻¹), Pb (23 to 39 500 mg kg⁻¹) and Cd (0.09 to 152 mg kg⁻¹) contaminations. The soil pH was similar (from 7.2 to 8.0) among soils except for *He* soil (pH = 5.4). Other soils characteristics, namely total organic carbon (24 to 159 g kg⁻¹), total nitrogen (0.56 to 7.19 g kg⁻¹), and texture (from silty to sandy) varied among soils. So, slag heap soils were mainly characterised by a high PAH pollution and intermediate level of metallic pollution while settling pond were mainly characterised by a high PAH metallic pollution and intermediate level of PAH pollution. Control soils showed the lowest PAH and metallic contamination.

2.2 DNA extraction, real-time quantitative PCR, and sequencing

Genomic DNA was extracted from soils in triplicate using Fast DNA spin kit for Soil (MP Biomedicals), then diluted to 5 ng μl^{-1} to be used as template for further PCR. Abundance of fungi was estimated through real-time PCR quantification (Thion et al., 2012), using the primer sets Fung5F/FF390R (Lueders et al., 2004), as explained in Lemmel et al. (in press; chap. 3). The V7-V8 region of fungal 18S rRNA genes was amplified (*ca.* 390 bp) using primers FR1 and FF390 (Vainio and Hantula, 2000) and following a previously described dual-index strategy Kozich et al. (2013) using PCR primers with Illumina adaptor, pad and index sequences (Thomas and Cébron, 2016). PCR reactions were performed on 2 μl of diluted gDNA using Phusion high-fidelity polymerase (Thermo Scientific). PCR reactions consisted of 34 cycles with touchdown annealing temperature for 20 cycles (63°C to 53°C with a decrease of 0.5°C/cycle) and 14 cycles at 53°C. Amplification products were checked on 1% agarose gel electrophoresis, and purified using the UltraClean-htp 96 Well PCR Clean-Up kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. After Quant-iT Picogreen ds-DNA assay Kit (Invitrogen) quantification, an amplicon library was prepared (10 nM equimolar pool), purified on a QIAquick PCR purification kit column (Qiagen), and sent for sequencing to Genewiz platform (South Plainfield, NJ, USA) using an Illumina MiSeq V2 Kit for 2 x 250 bp paired-end sequencing. Sequence data were analysed following the MiSeq SOP procedure available in March 2017 and described in Kozich et al. (2013), using Mothur v.1.36.0 (Schloss et al., 2009). Paired-end reads were trimmed using the following criteria: $QS > 20$, $312 \text{ bp} < \text{length} < 320 \text{ bp}$, and no more than 3 ambiguous bases and 8 homopolymers. Chimeras detected using Uchime (Edgar et al., 2011) and singletons (sequences appearing only once among all samples) were removed. Alignment of unique sequences and taxonomy was assigned using the Silva V132 database (cutoff = 80). Sequences not affiliated to fungi were removed. Sequences were clustered in Operational Taxonomic Units (OTUs) at 97% similarity. Finally, datasets were rarefied to the lowest number of sequences *per* sample (6 181 reads/sample). Alpha diversity was expressed by calculating Chao1, Pielou's evenness J' , and Shannon H' indices (Hill et al., 2003) using Mothur.

2.3 Statistical analysis

The first part of statistical analysis was performed using RStudio v1.0.136. Significant differences among soil groups were assessed using Kruskal-Wallis rank sum test followed by a

multiple comparison test included in the Vegan R package (Oksanen et al., 2017). Bray-Curtis dissimilarity index matrix was generated using the “vegdist” function included in the Vegan R package. The second part of statistical analysis was made using XLSTAT 2015 in order to perform both a Principal Coordinate Analysis (PCoA) based on Bray-Curtis dissimilarity index matrix and a heatmap based on more abundant OTUs in the soil collection.

3 RESULTS

We determined fungal taxonomic diversity by sequencing 18S rRNA genes. After read treatment and rarefaction to 6 181 reads *per* sample, we classified OTUs at 97% similarity. The taxonomic alpha diversity estimators based on OTU data are shown in **Table 4.1**. Interestingly, slag heap soils harboured less diversified fungal communities with lower Shannon’s diversity (mean value of 2.25) and Pielou’s evenness (mean value of 0.455) indices than control (mean value of 3.08 and 0.605, for Shannon and Pielou’s indices) and settling pond soils (mean value of 2.57 and 0.510, for Shannon and Pielou’s indices). Compared to the control soils, slag heap and settling pond soils had similar fungal richness indices mostly explained by the high heterogeneity of richness index values, with sh-Ho and sp-Po having high Chao1 indices.

Table 4.1. Fungal abundance and taxonomic diversity indices of the ten soils. Values are means ($n = 3$ or 4) \pm standard error of the mean. For soil groups, values are means ($n = 3$ for ctrl and sp soils, and $n = 4$ for sh soil) \pm standard error of the mean. Significant results of Kruskal-Wallis tests ($p < 0.05$), testing differences among the 3 soil groups, are indicated by different letters, and no letter appears when non-significant differences were found.

	Soil group	18S rRNA gene copy number ($\times 10^9 \text{ g}^{-1}$)	Observed number of OTUs	Chao1 index	Shannon's diversity index	Pielou's evenness index	
	Mo	ctrl	4.8 \pm 0.6	162 \pm 15	215 \pm 31	3.40 \pm 0.02	0.669 \pm 0.009
	He	ctrl	45.0 \pm 1.8	176 \pm 10	281 \pm 48	3.08 \pm 0.04	0.596 \pm 0.018
	Di	ctrl	21.8 \pm 1.2	155 \pm 7	203 \pm 15	2.77 \pm 0.09	0.549 \pm 0.014
	Uc	sh	5.1 \pm 0.3	103 \pm 4	175 \pm 7	1.25 \pm 0.05	0.271 \pm 0.011
	Te	sh	34.2 \pm 3.0	113 \pm 2	147 \pm 15	2.08 \pm 0.06	0.440 \pm 0.011
	NM	sh	3.1 \pm 0.3	150 \pm 7	179 \pm 20	2.92 \pm 0.03	0.581 \pm 0.002
	Ho	sh	11.8 \pm 0.2	190 \pm 9	257 \pm 6	2.75 \pm 0.01	0.529 \pm 0.005
	Po	sp	18.1 \pm 1.6	196 \pm 8	317 \pm 22	3.14 \pm 0.02	0.593 \pm 0.006
	MsM	sp	10.3 \pm 0.9	148 \pm 7	186 \pm 9	3.11 \pm 0.02	0.623 \pm 0.002
	RM	sp	8.5 \pm 0.7	101 \pm 5	158 \pm 15	1.46 \pm 0.05	0.313 \pm 0.007
	Means per group	p-value	0.252	0.331	0.317	0.011	0.011
Kruskal-Wallis multiple comparison test	ctrl	23.8 \pm 5.9	164 \pm 6	233 \pm 21	3.08 \pm 0.10 ^a	0.605 \pm 0.019 ^a	
	sh	13.5 \pm 3.8	139 \pm 11	190 \pm 14	2.25 \pm 0.20 ^b	0.455 \pm 0.036 ^b	
	sp	12.3 \pm 1.6	148 \pm 14	220 \pm 26	2.57 \pm 0.28 ^a	0.510 \pm 0.049 ^a	

We investigated fungal diversity at the phylum and class level for Basidiomycota and Ascomycota and explored their relative proportions in each soil (**Figure 4.1**). Phylum proportions varied among soils, with a majority of Ascomycota, Basidiomycota and Cryptomycota, depending on the soil. Ascomycota were the more abundant phylum (40.4% to 90.2%), except in ctrl-He (27.6%) and sp-RM (19.3%), in which Basidiomycota (61.4%) and Cryptomycota (72.5%) were dominant, respectively. Concerning Ascomycota phylum, Eurotiomycetes and Leotiomyces represented, respectively, the major class in sh-Uc (77.0%) and sh-Te (62.1%), and the major class in ctrl-Mo (21.9%) and ctrl-He (15.8%), while Sordariomycetes were dominant in other soils (6.2% to 30.6%). Additionally, although Dothideomycetes were not dominant, they represented an important part in sh-NM (22.8%) and sh-Ho (21.6%). Basidiomycota were predominantly composed of Agaricomycetes, which represented 76.6% (sh-NM) to 99.5% (sh-Uc) of the phylum, except for sp-RM (38.0%). We noted also that environmental clade LKM11 represented 98 to 100% of the Cryptomycota phylum, excepted in Te soil where LKM11 represented 78%, while the rest was unclassified Cryptomycota.

Fungal communities from soils sharing the same use had different compositions. For example, relative abundance of Eurotiomycetes was at least ten-fold higher sh-Te and sh-Uc than in two other slag heap soils. Similarly, Cryptomycota and Ascomycota represented, respectively, large and weak part in sh-RM, while it was the opposite for the other settling pond soils. By comparing soil groups, we noted that Basidiomycota were present in a significantly higher proportion in control soils than in polluted soils ($p = 6.528 \times 10^{-4}$), mainly due to significantly higher proportion of Agaricomycetes ($p = 7.698 \times 10^{-4}$). Additionally, Ascomycota represented a significantly higher proportion in slag heap soils ($p = 4.301 \times 10^{-4}$) than in the two other soil groups. However, Saccharomycetes and Leotiomyces (belonging to Ascomycota) were significantly more abundant in control soils than in polluted ones ($p = 1.930 \times 10^{-5}$ and $p = 8.621 \times 10^{-4}$, respectively). Cryptomycota were significantly more abundant in slag heap and settling pond soils than in controls ($p = 1.160 \times 10^{-3}$). Chytridiomycota were statistically more abundant in control than in settling pond soils ($p = 0.038$). Finally, the unclassified fungi were more abundant in settling pond soils than in the two other groups ($p = 8.697 \times 10^{-3}$).

We investigated the relationship between physico-chemical soil parameters and fungal phylum and class proportions by searching significant linear correlations. The relative proportion of Dothideomycetes (Ascomycota) was positively correlated to total and available PAH concentrations (Pearson, $p = 7.823 \times 10^{-8}$, $r = 0.99$, and $p = 3.686 \times 10^{-4}$, $r = 0.97$,

respectively). Additionally, relative proportion of Ascomycota was positively and negatively correlated to proportion of sand ($p = 0.014$, $r = 0.74$) and silt ($p = 0.008$, $r = -0.78$) fractions of soil, respectively.

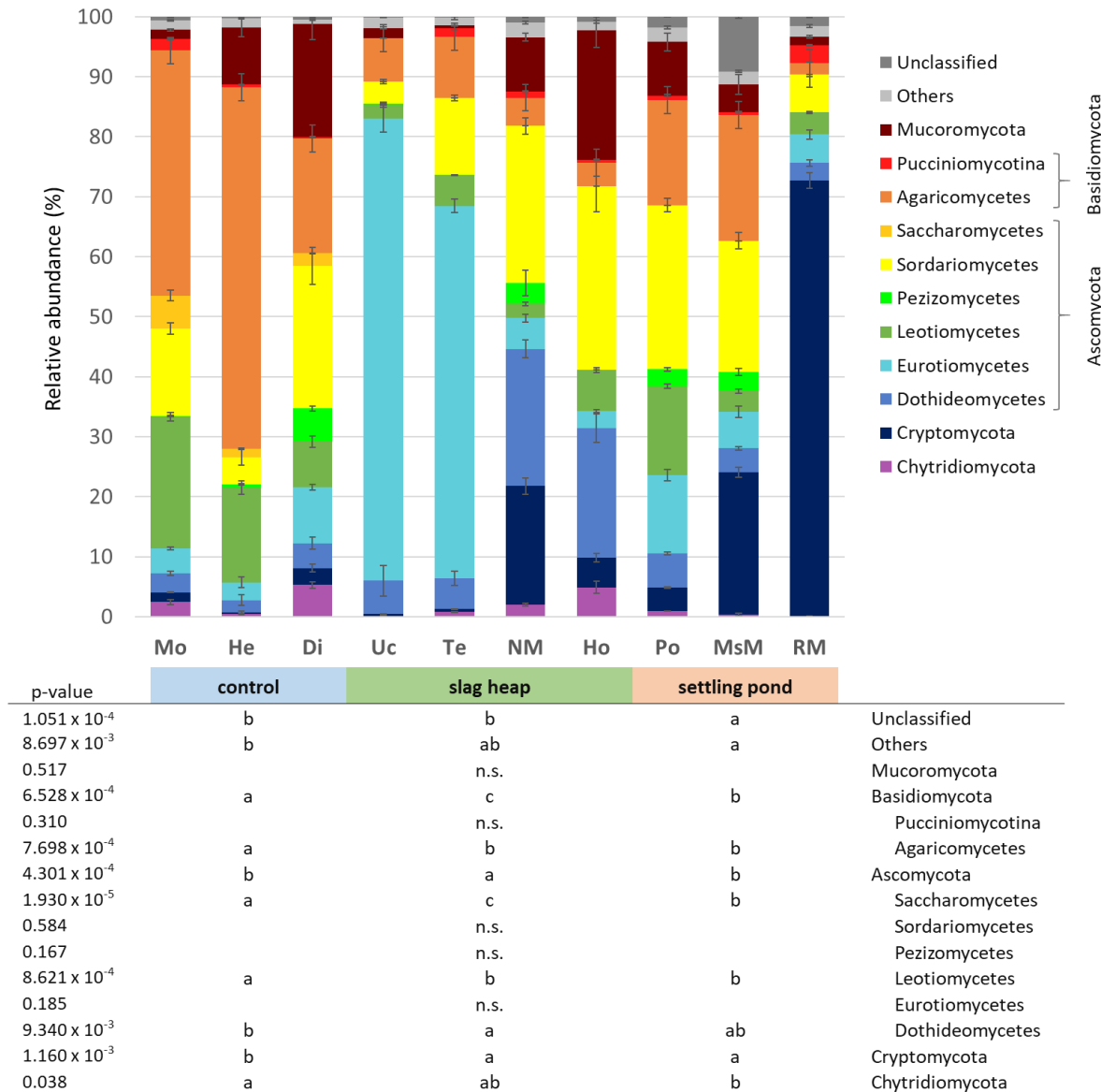


Figure 4.1. Taxonomic composition of the fungal communities of the ten soil samples. Values are means ($n = 3$), and error-bars represent standard errors of the mean for each soil. The group named "Others" corresponds to Blastocladiomycota, LKM15, Neocallimastigomycota, Zoopagomycota, Entorrhizomycota, and taxa affiliated to Basidiomycota and Ascomycota but not shown on the graph due to their minor relative abundances. Statistical differences among taxa proportions in the soil groups are indicated by different letters (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$).

In order to visualise differences between soils based on their fungal communities, we performed a Principal Coordinate Analysis (PCoA, **Figure 4.2**) using Bray-Curtis dissimilarity distance matrix. The two first components of the PCoA explained 43.05% of the total variation, with the first (PCo1) and the second (PCo2) components of the PCoA accounting for 24.26% and 18.79%, respectively. We observed that replicates of the same soil were close to each other, indicating that fungal communities were similar among the soil replicates. Additionally, we noted that based on their fungal communities, soils were separated in four different groups which did not correspond to the three groups of soil use and generated based on soil physico-chemical properties. The three control soils are close and grouped with one slag heap (i.e. sh-Ho) and two settling pond (i.e. sp-Po and sp-MsM) soils. The three remaining slag heap soils were separated in two groups, sh-Uc and sh-Te were grouped together while sh-NM was separated. The last settling pond soil (sp-RM) was totally separated from all the other soils.

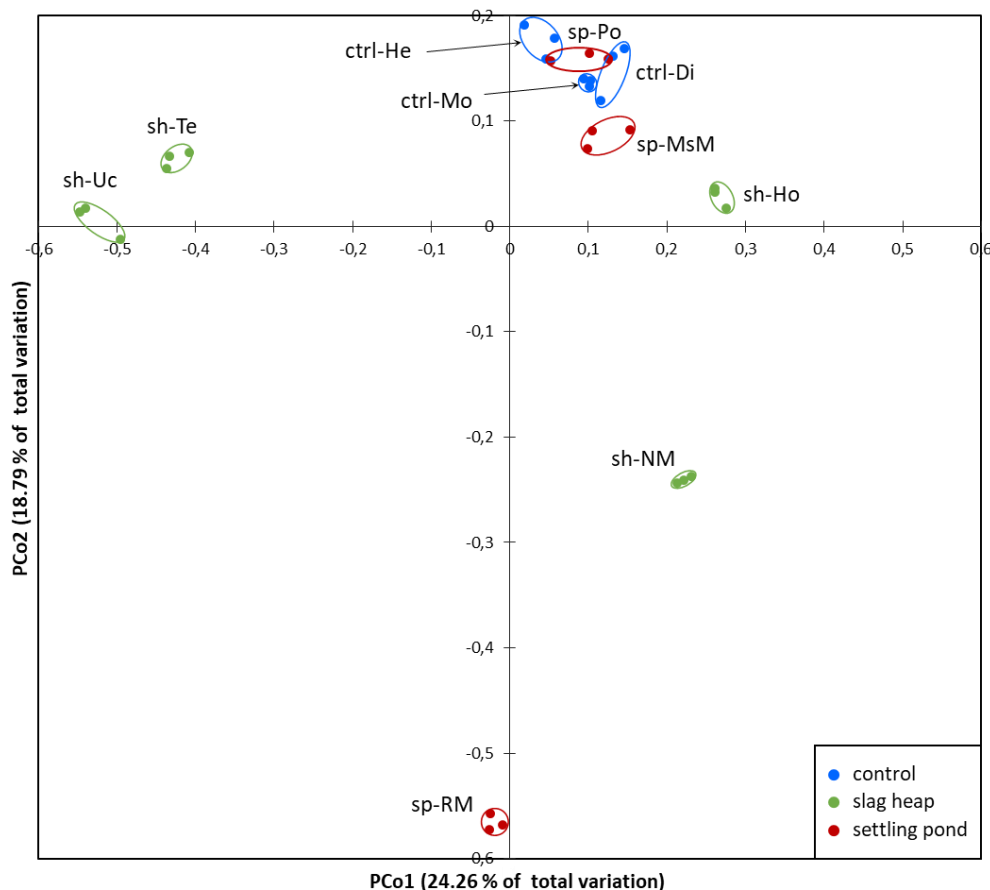


Figure 4.2. PCoA plots illustrating distances between fungal communities of the ten soils. Soils (*Di*: Dieulouard, *Ho*: Homécourt, *He*: Hémilly, *MsM*: Mont St Martin, *Mo*: Montiers, *RM*: Russange-Micheville, *NM*: Neuves Maisons, *Po*: Pompey, *Te*: Terville, *Uc*: Uckange) were coloured according to their industrial history (*sp*: settling pond; *sh*: slag heap; *ctrl*: control). Replicates of the same soil were circled.

The analysis at the OTU level generated 1 614 OTUs, which ranged from 101 (sp-RM) to 191 (sp-Po) mean OTUs per sample. Among all the soils, 68 OTUs represented at least 1% in one soil replicate and were used to classify soils and OTUs based on hierarchical ascending classification. Soils and OTUs classifications were represented by dendrograms and the corresponding heatmap represented the relative abundance of OTUs (**Figure 4.3**). The distribution of major fungal OTUs among soils was relatively scattered, indicating heterogeneity among soils. Nevertheless, OTU002 affiliated to Hypocreales presented a relatively high abundance in the most of soils. Similarly, OTU006 (Pleosporales), OTU004 (*Mortierella*), OTU009 (Leotiomyces) and OTU005 (Agaricales) were present in all soil replicates, but they presented a variable abundance depending of the soils. We note that replicates of a same soil harboured similar major OTU composition and abundance, and were close of each other, excepted for ctrl-Di_1 which was separated to other ctrl-Di replicates mainly due to the high abundance of OTU029 (Agaricales) in this replicate. On the contrary, soils sharing same use did not harbour the same major fungal OTUs. For example, ctrl-He showed a high abundance of OTU008 (Russulaceae) and OTU013 (Uncultured *Trechispora*) and no or very low abundance of OTU021 (Boletales) and OTU024 (*Geminibasidium donsium*), while it was the opposite for ctrl-Mo replicates. Additionally, a high abundance of OTU022 and OTU030, both affiliated to LKM11, were respectively found in sp-MsM and in sh-NM, while they were absent in other settling pond and slag heap soils. Finally, the distribution of soils based on major fungal OTUs was not totally in accordance with the repartition in four groups found in **Figure 4.2** (excepted for sh-TE and sh-Uc and sp-RM), indicating that minor OTUs contributed substantially to dissimilarity between soils observed in **Figure 4.2**.

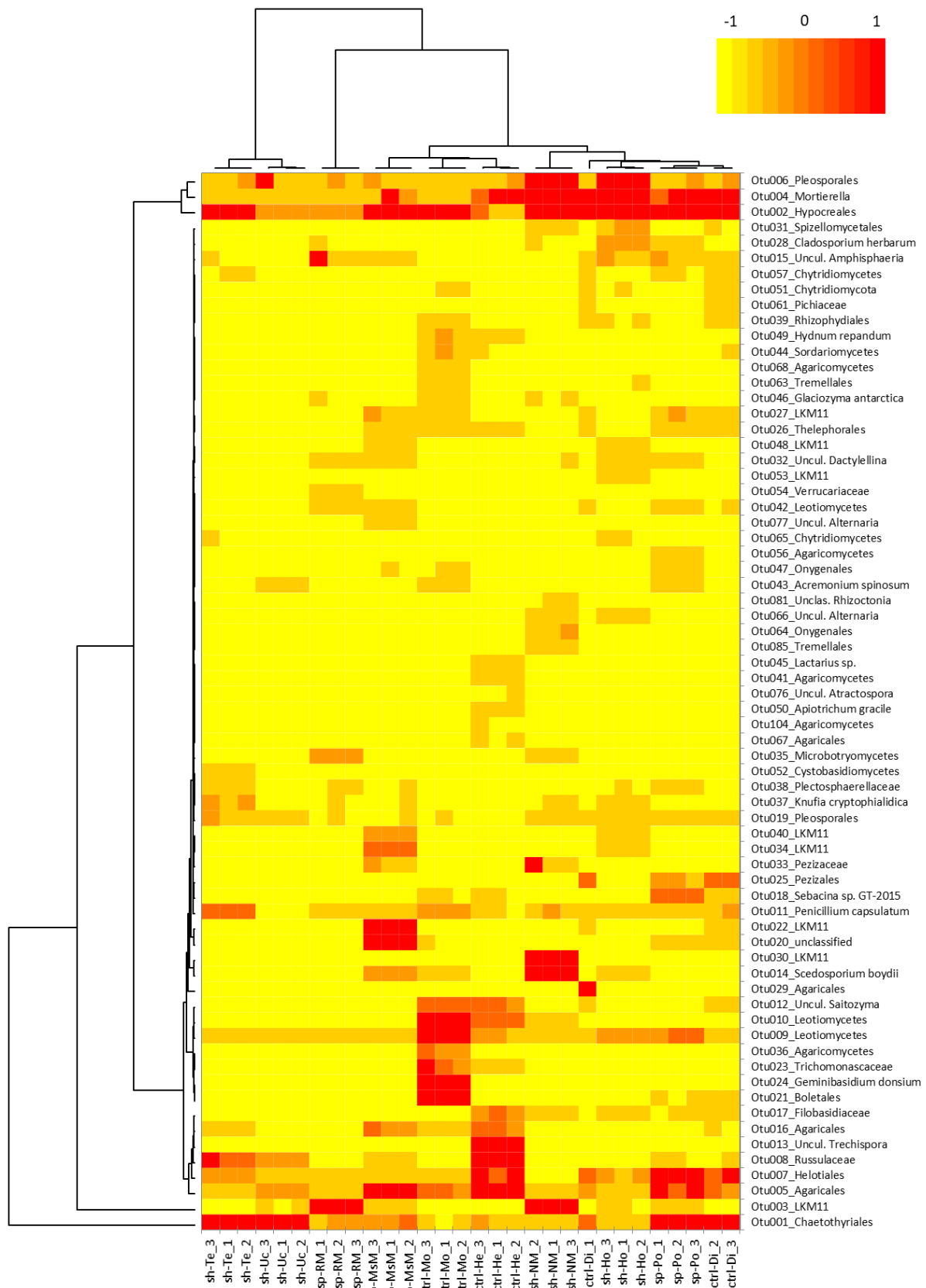


Figure 4.3. Heatmap based on the 96 predominant OTUs in the soil collection. OTU best affiliation was indicated next to the OTU number. If the best affiliation was at genera level, unclassified or uncultured were specified with "Unclas." and "Uncul.", respectively.

4 DISCUSSION

We hypothesised that in a context of long-term soil contamination, the pollution led to selection of microorganisms and conducted to similar fungal community composition among soil sharing similar use and pollution. To test this hypothesis, we analysed fungal communities in a collection of ten soils classified in three groups according to their physico-chemical, texture and pollution characteristics. As explained in Lemmel et al. (in press; chap. 3), slag heap soils presented a high PAH concentration and intermediate level of metal pollution, and settling pond soils presented a high level of metal pollution (especially high Zn, Pb, Cd and TI total concentration) and intermediate PAH concentration. The control soils were characterised by the lowest level of both PAH and metal contamination. Our data partly confirmed this hypothesis, even though soils sharing same use and similar pollution showed variables fungal community structures. Some significant differences were highlighted among soil use groups. Agaricomycetes (belonging to Basidiomycota), Saccharomycetes and Leotiomycetes (belonging to Ascomycota) and Chytridiomycota were in higher proportion in control soils than in the two other groups. On the other hand, Cryptomycota and Dothideomycetes were more represented in polluted and slag heap soils, respectively, and Eurotiomycetes dominated in two slag heap soils (Uc and Te).

It is actually difficult to compare our data with the literature because only few studies focused on the fungal diversity of metal or PAH polluted soils. Indeed when authors study the tolerance to metals they mostly focus on plant endophytic and mycorrhizal populations (Val et al., 1999; Zarei et al., 2010) in phytoremediation assays (Meier et al., 2012).

Although Agaricomycetes was the predominant class of Basidiomycota in the whole soil collection, it dominated the fungal communities of control soils and was more abundant in control soils than in polluted ones. At world scale, Agaricomycetes was also found as major fungal class belonging to Basidiomycota phylum in numerous terrestrial ecosystems such as grasslands, temperate and boreal forests or tropical savannahs and forests (Tedersoo et al., 2014) and were more abundant in forest soils (Lauber et al., 2008). Agaricales (Agaricomycetes) fill a wide range of ecological niches, but a very large number of species are wood-decay fungi, which play a vital role in carbon cycling (de Mattos-Shiple et al., 2016). Decrease of Agaricomycetes in our polluted soils could indicate a disruption of the carbon cycle and may to slow the organic matter mineralization due to metal (Clemente et al., 2006). More globally, Basidiomycota have been shown to be affected by metal pollution as it was in

higher proportion in reference soil in comparison to metal polluted ones (Narendrula and Nkongolo, 2017).

Saccharomycetes and Leotiomyces were statistically more abundant in control soils than in polluted soils. At global world scale, these classes represented in mean 0.4% and 7.1% of the fungal communities (Tedersoo et al., 2014), respectively, and were present at 1.4 to 5.5% and 7.6 to 21.9%, respectively, in our control soils. The low abundance of Saccharomycetes and Leotiomyces in polluted soils could suggest a negative impact of soil pollution on these classes but no information about such toxic effect and about the ecology of these two classes was found in the literature. However, a seemingly contradictory result was shown by Ferrari et al. (2011), who found that in highly petroleum contaminated soils, the diversity of cultured fungi decreased and was limited to the Eurotiomycetes and Leotiomyces classes only.

Chytridiomycota were more abundant in our control un-contaminated soils than in settling pond soils, which presented the highest metal contamination. The members of this phylum produce unwallied, asexual spores that swim by means of a single, posteriorly directed flagellum, and are important cellulose, keratin and chitin degraders (Longcore and Simmons, 2012). At world scale, they represented 0.9% of fungal soil communities (Tedersoo et al., 2014) but represented 0.4 to 5.3% in our control soils.

Cryptomycota phylum was found more abundant in polluted soils than in control soils. This newly proposed phylum is composed of singular fungi mostly detected in freshwater ecosystems. They are single-cell fungi capable to form flagella and epibionte associations (Jones et al., 2011), that lack of rigid chitin/cellulose-rich wall and they are possibly capable of phagotrophy, as it was described for *Rozella* genus (Pöggeler and Wöstemeyer, 2011). At world scale, they represented only a slight part (in mean 0.9%) of fungal soil communities (Tedersoo et al., 2014), but represented 0.3 to 72.7% in our polluted soils. Cryptomycota were mostly represented here by sequences related to the LKM11 clade, forming a deep branch of true fungi but, as no cultivated representative exist, the ecology and physiology of this group is still unclear (Lara et al., 2010). However, based on our data we can suppose that this LKM11 clade is well adapted to metal as well as PAH pollution in soil ecosystem, even if it was recently detected as dominant in pristine limnetic ecosystems (Rojas-Jimenez et al., 2017).

We found that abundance of Dothideomycetes was significantly higher in slag heap soils than in control soils and was positively correlated to soil PAH contamination. At world scale, this class represented in mean 4.5% of the fungal communities (Tedersoo et al., 2014), but represented 21.6 and 22.8% in the two most PAH-contaminated soils (NM and Ho). It was

previously found an increased abundance of cultured Dothideomycetes at high hydrocarbon concentrations (Ferrari et al., 2011). This class could have been selected in PAH-polluted soils due to its PAH-tolerance or its capacity to degrade PAH. Interestingly, several genera of Dothideomycetes, including *Phoma* and *Preussia* have been shown to harbor endohyphal bacteria from groups that are capable of hydrocarbon biodegradation (Hoffman and Arnold, 2010). In our soils, Dothideomycetes class was mostly represented by an OTU affiliated to Pleosporales, that was also one dominant order found in hydrocarbon-contaminated soils (Bell et al., 2014).

Finally, two slag heap soils (Uc and Te) harboured a really high abundance of Eurotiomycetes (77.0 and 62.1%, respectively). This class of Ascomycota represented a high proportion of isolated fungal strains from heavy metal contaminated sediments (Abdel-Azeem et al., 2015). Moreover, Eurotiales were previously described in multi-contaminated industrial wasteland soil, and the authors found that their proportion decreased over time with the decrease of PAH content of soil (Bourceret et al., 2015). In our soils, Eurotiomycetes were mostly represented by an OTU belonging to Chaetothyriales. However, this order has members that have been detected in a wide range of habitats (Gueidan et al., 2014), preventing to conclude on its ecology.

In conclusion, to our knowledge our study brings the first report about the adaptation of fungal community structure to multi-contamination in wide range of soils, and tends to identify fungal taxa affected or favoured in contaminated soils. Additionally, we found a large fungal diversity in control soils as well as in contaminated soils. Fungal communities of these polluted soils could potentially contain useful fungi for improving bioremediation strategies. With this in mind, it will necessary to further investigate functional properties and ecology of these fungi to better understand their role in contaminated soils.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Arcelor Mittal, EPFL, GISFI, ONF, and LTO of Montiers (ANDRA/INRA, M.P. Turpault and S. Uroz) for giving us access to the different sampling sites. This study was supported by the French national program EC2CO (EcobioS project) and the OSU-OteLo (TraitMic project).

Chapitre 5 :

Mise en évidence d'une activité et
d'une identité contrastées de
bactéries dégradant le phénanthrène
dans un gradient de sols anthropisés
par la technique de *DNA-stable*
isotope probing

Comme nous l'avons vu dans l'état de l'art, les HAP sont des substances toxiques persistantes dans les sols, résultant très souvent d'activités anthropogéniques, telle que la production et l'utilisation de coke dans l'industrie sidérurgique. On retrouve ainsi une pollution par des HAP dans de nombreux sols de friches industrielles. Ce type de pollution est connu pour exercer un effet toxique sur les communautés microbiennes et pour induire une sélection de microorganismes plus tolérants ou capables d'en tirer parti en la dégradant et en l'utilisant comme source de C.

Dans le chapitre 3, nous avons montré que la pollution par des éléments métalliques avait réduit la diversité métabolique fonctionnelle des communautés, tandis que la pollution par des HAP ne semblait pas avoir d'impact sur ces fonctions. De plus, l'analyse de l'activité de dégradation de différents HAP à l'aide de microplaques Biolog® suggérait que cette fonction n'était pas présente dans les sols. Toutefois, les microplaques Biolog® sont davantage optimisées pour l'étude de la dégradation de substrats carbonés simples (temps d'incubation courts) que pour des composés complexes tels que les HAP et ne permettent de cibler l'activité que d'une partie de la communauté. La dégradation des HAP peut impliquer des consortia microbiens, qu'il est intéressant d'identifier dans le cadre de l'étude du lien entre diversité taxonomique et fonction. De plus, dans le chapitre 4 nous avons vu que certains taxa fongiques semblaient avoir été positivement sélectionnés par la pollution par des HAP. Ainsi, pour approfondir l'étude des fonctions de dégradation des substrats carbonés et aborder le lien entre ces fonctions et la diversité taxonomique, il était pertinent de s'intéresser à la fonction de dégradation des HAP, puisque celle-ci pourrait avoir été favorisée dans les sols contaminés par ces polluants. L'un des objectifs de ce chapitre était de voir si la sélection des communautés microbiennes avait pu conduire à une meilleure capacité/efficacité de dégradation des HAP dans les sols les plus contaminés, et ce grâce à une population dégradante différente, en comparaison de sols moins pollués.

Pour cela, nous avons choisi d'utiliser la technique de *Stable Isotope Probing*, afin d'étudier la dégradation d'un HAP modèle entièrement marqué au ^{13}C et d'identifier les microorganismes impliqués dans sa dégradation, permettant de lier diversité taxonomique et fonction. Le phénanthrène, largement retrouvé dans les sols contaminés par des hydrocarbures, fût choisi comme HAP modèle.

Dans ce chapitre, nous avons montré que le potentiel de dégradation des HAP, basé sur l'abondance des gènes codant des HAP-dioxygénases, était positivement corrélé à la teneur en HAP des sols. Pour autant, le phénanthrène était dégradé dans tous les sols, mais à des

taux variables qui n'étaient pas liés au niveau de contamination, mais plutôt à certains paramètres biotiques. En effet, le taux de dégradation était d'autant plus élevé que le sol hébergeait une communauté bactérienne abondante et diversifiée, suggérant notamment une possible complémentarité métabolique entre espèces. En outre, un grand nombre d'OTUs a été mis en évidence pour leur implication dans la dégradation du phénanthrène. Bien que la diversité de ces dégradeurs de phénanthrène variait entre les sols, les OTUs affiliées aux genres *Mycobacterium* et *Massilia* étaient dominantes dans les sols qui présentaient un taux de dégradation élevés. De plus, les proportions relatives cumulées de ces deux OTUs étaient corrélées au taux de dégradation, indiquant que les genres *Mycobacterium* et *Massilia* étaient les acteurs essentiels de la dégradation du phénanthrène dans nos sols.

DNA stable isotope probing revealed contrasted activity and phenanthrene degrading bacteria identity in a gradient of anthropised soils

Florian Lemmel¹, Florence Maunoury-Danger², Corinne Leyval¹, Aurélie Cébron¹

¹ Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-54000 Nancy, FRANCE

² Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, FRANCE

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are ubiquitous organic contaminants produced during industrial iron and steel activities and representing one of the major pollution of soils. Although PAH-degrading bacteria are present in almost all environments, in historically PAH-contaminated soils, an adaptation and selection of microorganisms able to tolerate PAH or degrade them was shown. We can wonder if the effectiveness of PAH biodegradation differs in low and highly-contaminated soils and in historically PAH-contaminated soils and whether PAH-degrading bacterial diversity is the same. To answer this question, the stable isotope probing (SIP) technique, allowing to link microbial identity with functions in complex systems such as soils, was used. The aim of our study was to i) compare a range of ten soils harbouring a gradient of anthropisation, ii) determine their PAH-degradation efficiency and iii) identify the active PAH-degraders. Phenanthrene, widely distributed in PAH-contaminated soils, was used as a model PAH during SIP experiments. Phenanthrene-degrading bacteria were identified using high throughput 16S rDNA amplicon sequencing from ¹³C-labelled DNA. Results showed that phenanthrene degradation rate was not directly correlated to the initial level of PAH in the ten soils. The rate of phenanthrene degradation was mostly explained by biotic parameters as the abundance and diversity of bacteria present initially in the soils. A large diversity of PAH-degrading bacteria was identified, with differences among soils. *Mycobacterium* and *Massilia* sp. were the main active PHE-degraders in the soils harbouring high PHE degradation activity.

1 INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are organic contaminants representing one of the major pollution in the environment, especially in soils. Anthropogenic activities are the main source of these contaminants due to the incomplete combustion of organic materials, such as coke and petroleum products, during industrial processes. In industrial brownfields, although pollution has stopped for several decades, soil contamination can still reach very high levels (Biache et al., 2017). PAH can accumulate in soils and constitute serious threats for human health and ecosystem functioning with regard to their carcinogenicity and toxicity (Abdel-Shafy and Mansour, 2016; Eom et al., 2007). However, stress applied by the high PAH concentration lead to adaptation and selection of soil microbial communities (Bourceret et al., 2016). In these soils a selection of microorganisms able to tolerate PAH or degrade them was shown (Cébron et al., 2008; Sawulski et al., 2014), and involves detoxification (Sutherland, 1992) or catabolic (PAH used as carbon source; Ghosal et al., 2016) mechanisms. So, high level of PAH contamination could impair soil functioning and lead to function loss (i.e. functions involved in C and N cycling ; Liang et al., 2009). But, it also leads to function gain (i.e. functions involved in PAH biodegradation; Cébron et al., 2008). Nevertheless, it was shown that communities coming from weakly PAH-contaminated soils (soil background level) can also harboured PAH degradation function (Crampon et al., 2017). Then, we can wonder if the effectiveness (i.e. the rate) of PAH biodegradation is similar between un- or low-contaminated soils and soils with a high and historical PAH contamination. This aspect needs to be further explored to better understand the factors controlling the soil PAH biodegradation efficiency, sometime limiting soil bioremediation (Chauhan et al., 2008; Ghosal et al., 2016).

In order to study PAH biodegradation function, most studies only seek to detect the presence of certain functional genes. PAH-RHD α genes, encoding PAH-dioxygenase enzyme involved in the first step of bacterial biodegradation pathway, are targets of choice indicating the functional potential of the microbial community (Cébron et al., 2008; Sawulski et al., 2014), but this approach does not allow identifying the actors of biodegradation. Stable isotope probing (SIP) is one culture-independent technique, which allow linking microbial identity with functions in complex systems, such as soils (Dumont and Murrell, 2005). This technique, using ^{13}C -labelled compounds, allows the monitoring of the ^{13}C during biodegradation and the labelling of cell components (e.g. DNA) of microbes using the ^{13}C labelled substrate as carbon source for their growth. To date, SIP has been extensively used to study the degradation of C1 compounds (Lueders et al., 2004), but it has been applied also on organic pollutants such as

PAH (i.e. naphthalene, phenanthrene, pyrene; Guo et al., 2017; Song et al., 2016; Wald et al., 2015) in order to identify microbial degraders. However, only few research has been done on PAH degraders in weakly contaminated soils (Chen et al., 2018; Song et al., 2016), and we ignore whether the PAH-degrading bacterial diversity is similar to historically and highly PAH-contaminated soils. Most studies used SIP to compare PAH degradation yield and degraders identity in one soil under various conditions. For example, authors seek to understand the impact of surfactants (Crampon et al., 2017; Guo et al., 2017), root exudates (Cébron et al., 2011; Lv et al., 2018), or temperature (Wald et al., 2015). On the other hand, the SIP technique was never used to study a wide range of soils and compare their communities of PAH-degraders, with the objective to see: i) whether some taxa are more efficient than others to degrade PAH, and ii) whether the historically contaminated soils have a diversity of active microorganisms different from that of the weakly contaminated soils.

In this context, the aim of this study was to compare a range of ten soils harbouring a gradient of anthropisation, determine their PAH-degradation efficiency and identify the active PAH-degraders. Our hypothesis was to test whether: i) the intensity of the PAH degradation was correlated to the level of PAH contamination of soils, ii) the microbial communities coming from historically and highly PAH-contaminated soils are more efficient than weakly polluted soils, and iii) the identity of PAH-degraders could explain the differences in PAH degradation rates, involving more or less efficient taxa. Phenanthrene (PHE), widely distributed in nature and contaminated soils, was used as model PAH during SIP experiments. PHE-degrading bacteria were identified using high throughput 16S rDNA amplicon sequencing from ¹³C-labelled DNA.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Soil sampling and characteristics

Soils used in this study were collected in November 2015 from various woodland ecosystems located on industrial wastelands, natural forest or ancient gravel pits, located in the “Grand Est” region (north-east of France), all sites localized within a 50 km radius. Three soils were considered as control soils: two natural forest soils collected at Hémilly (He; Moselle) and Montiers-sur-Saulx (Mo; Meuse), and one anthropised but unpolluted ancient gravel pit soil collected at Dieulouard (Di; Meurthe-et-Moselle). Seven anthropised soils known to be polluted by metals and/or PAH were collected from: i) former slag heaps at Homécourt (Ho; Meurthe et-Moselle), Terville (Ter; Moselle), Uckange (Uc; Moselle), and Neuves-Maisons (NM; Meurthe-et-Moselle) and ii) former settling ponds at Pompey (Po; Meurthe-et-Moselle), Mont-St-Martin (MsM; Meurthe-et-Moselle) and Russange-Micheville (RM; Moselle). This soil collection was chosen to cover a wide range of anthropisation situations described previously in Lemmel et al. (in press; chap. 3). Briefly, a gradient of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination was shown with the concentration of the 16 US-EPA PAH ranging from 0.03 to 1 095.90 mg kg⁻¹ dw soil (**Table 5.1**). Soils presented a variable 16S rRNA gene abundance ranging from 4.4 to 41.5 x 10¹⁰ copy g⁻¹. The lowest and highest 16S rDNA abundances were found respectively for Uc and NM, and Po and Te soils, while other soils presented intermediate abundance values. The soil bacterial communities were characterised by Illumina MiSeq sequencing, and indices describing alpha-diversity such as Chao1 richness index was calculated (**Table S5.1**; Lemmel et al., in press; chap. 3). Soils presented a variable Chao1 richness index ranging from 2 541 to 4 966, and lowest and highest values were found for RM and NM, and Di and Ho, respectively. A gradient of metal contamination, mainly represented by Zn (60 to 119 000 mg kg⁻¹), Pb (23 to 39 500 mg kg⁻¹) and Cd (0.09 to 152 mg kg⁻¹) contaminations, was also shown. The pH, a characteristic known to be one of the main drivers of microbial communities, was similar (from 7.2 to 8.0) among soils except for He soil (pH = 5.4). Other soil characteristics (LAS, INRA, Arras, France), namely total organic carbon (24 to 159 g kg⁻¹), total nitrogen (0.56 to 7.19 g kg⁻¹), C:N ratio (14 to 54) and texture (from silty to sandy) varied among soils (**Table S5.1**).

2.2 Soil respiration

Basal respiration (BR) and substrate-induced respiration after PHE addition (PHE-SIR) were performed, using two sets (i.e. unspiked and PHE-spiked) of soil samples. The two sets were prepared in triplicates, using 2.0 g dw of unspiked soil and of PHE-spiked soil, respectively. The PHE-spiked soil was prepared by mixing 1.8 g of soil with 0.2 g (1:9 w:w) of spiked soil with PHE (Fluka, purity > 97.0%) dissolved in n-hexane left under a fume hood until complete solvent evaporation. The final PHE concentration was 200 mg kg⁻¹. Our experimental design accounted 60 samples (10 soils in triplicates, unspiked and PHE spiked).

The two grams of soils were placed in 125 ml Plasma glass flasks and rewetted using sterilized water to reach 80% water retention capacity (WRC) before being hermetically sealed with rubber-butyl corks and incubated in the dark at 24°C for 17 days (for Di, MsM, Mo, NM, Te and Uc soil samples) and 23 days (for Ho, He, RM and Po soil samples) depending on the sample behaviour. Respirations were monitored by measuring CO₂ content through infrared spectrophotometer (Binos, absorption at 2325.6 cm⁻¹) on a 4 ml fraction of the flask atmosphere sampled after 1, 2, 4, 7, 10, 14, 17 and 23 days of incubation. The produced CO₂ was expressed as carbon mass produced by one gram of dw soil per hour (mg of C g⁻¹ h⁻¹). After each measurement sampling, the flasks were open under fume hood for 15 min to renew the atmosphere.

2.3 Stable isotope probing incubations

For stable isotope probing (SIP) experiments, two sets of soil samples were prepared in triplicates by spiking all samples with PHE as describe above. The first set was spiked with non-labelled PHE (i.e. ¹²C; Fluka, purity > 97.0%) and the second set was spiked with ¹³C uniformly labelled PHE (Sigma Aldrich, 99 atom % ¹³C). Both sets were prepared twice, one harvested at the beginning (T0) and the other incubated and harvested after 12 days (Tf). SIP incubation experimental design accounted 120 samples (10 soils in triplicates, spiked with ¹²C- or ¹³C-PHE and analysed 2 times at T0 and Tf).

Each soil sample was placed in 125 ml Plasma glass flasks and rewetted using sterilized water to reach 80% WRC. Then, the T0 samples were directly harvested by freezing at -80°C. A CO₂ trap (2 ml of 1 M NaOH; in 5 ml vial) was added in the Tf flasks, before being hermetically sealed and incubated for 12 days in the dark at 24°C. The atmosphere of the flasks was

renewed one time after 6 days, as described above. Tf incubations were harvested by freezing at -80°C.

2.4 Phenanthrene and ¹³C measurements

Soil samples (T0 and Tf) from SIP incubation stored at -80°C were freeze-dried and ground to 500 µm with a grinder (Mixed Mill MM 400, Retsch) before PAH extraction and ¹³C measurements.

Total PHE was extracted from one aliquots of *ca.* 500 mg dw of each soil with dichloromethane (DCM) at a high temperature (130°C) and a high pressure (100 bars) using accelerated solvent extraction (DIONEX® 200 ASE), as described in Cennerazzo et al. (2017). Solvent extracts were evaporated under a nitrogen flow and dissolved in acetonitrile for PHE analysis. PHE was analysed by UV detection (254 nm) using a reverse-phase chromatography UHPLC DIONEX® Ultimate 3000 system equipped with a DAD (Diode Array Detector) and a Zorbax Eclipse PAH column (2.1 x 100 mm, 1.8 µm, Agilent).

¹³C measurements were performed at the PTEF platform (INRA, Champenoux, France). Briefly, δ¹³C was measured from one aliquot of *ca.* 5 mg dw of soil using an elemental analyzer (vario ISOTOPE cube, Elementar, Hanau, Germany) interfaced in line with a gas isotope ratio mass spectrometer (IsoPrime 100, Isoprime Ltd, Cheadle, UK; sensibility of 0.2 ‰). δ¹³C values were then transform into R¹³C/¹²C using the following formula: $R^{13}C/^{12}C = R_{VPDB} \times (1 + \delta^{13}C/1000)$; with R_{VPDB} corresponding to 0.0112375, which is the R¹³C/¹²C value of reference standard (*Vienna Pee Dee Belemnite*).

2.5 DNA extraction, isopycnic ultracentrifugation and gradient fractionation

Total genomic DNA was extracted from *ca.* 300 mg dw soil (Tf samples of both ¹²C and ¹³C-PHE sets) using a Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, France), following the manufacturer's instructions. Then DNA was resuspended in 100 µl of DNase and pyrogen-free water. Concentration and purity (A₂₆₀/A₂₈₀ ratio) were measured using a spectrophotometer (UV1800, Shimadzu) equipped with a TrayCell™ adapter (Hellma®). For each sample, heavy (¹³C labelled) and light DNA (¹²C) were separated according to the protocol described by Neufeld et al. (2007). Briefly, approximately 3 000 ng DNA (excepted NM and Uc, for which 650 ng DNA were used because lower genomic DNA quantity could be recovered from these soils) was added to Quick-Seal polyallomer tubes (13 x 51 mm, 5.1 ml, Beckman Coulter),

along with gradient buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA) mixed with CsCl solution, to a final buoyant density (BD) of $\approx 1.725 \text{ g ml}^{-1}$. Tubes were centrifuged at 42 400 rpm (i.e. $176\,985 \times g$; VTI 65.2 rotor, Beckman) at 20°C for 40 h. Following centrifugation, 13 fractions of *ca.* 400 μl were collected from each tube using a fraction recovery system (Beckman). Fractions were annotated from 1 (the first collected; highest density) to 13 (the last; lowest density). The BD value of each fraction was then measured and CsCl was removed by glycogen-assisted polyethelene glycol precipitation. DNA fractions were finally resuspended in 30 μl of TE buffer (pH 8.0).

2.6 Real-time quantitative PCR

In order to determine the distribution of heavy and light DNA and compare samples from ^{12}C and ^{13}C incubations, the abundance of 16S rRNA genes in each recovered fraction was quantified using real-time quantitative PCR. The qPCR assay was performed as described in Cébron et al. (2008) by using the primers sets 968F/1401R (Felske et al., 1998). Briefly, the reaction mixture (20 μl) was composed of 10 μl of iQ SYBR green SuperMix (Bio-Rad), 0.8 μl of each primer (10 μM), 0.4 μl of BSA (3%), 0.2 μl of DMSO, 0.08 μl of T4gp32 (MP Biomedicals, France) and 1 μl of DNA as a template (fraction DNA samples or 10-fold dilution series from 10^8 to 10^1 copies μl^{-1} of the standard plasmid). Quantification were performed using a CFX96 Real-Time PCR detection system (Bio-Rad), under the following conditions: an initial denaturation step at 95°C for 5 min and then 39 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 56°C for 20 s, extension at 72°C for 30 s and measurement of SYBR Green signal intensities at 82°C for 5 s. Similarly, the abundance of 18S rRNA genes was quantify by using the primers sets Fung5F/FF390R (Lueders et al., 2004) as previously described in Thion et al. (2012).

Additionally, PAH-RHD α genes were also quantified in genomic DNA from unspiked soils (before incubation) and in each DNA fractions (from SIP assay) using the primer pairs PAH-RHD α GP-F/R for Gram-positive bacteria (Actinobacteria) and PAH-RHD α GN-F/R for Gram-negative bacteria (Proteobacteria) (Cébron et al., 2008). The reaction mixtures and quantification conditions were as described above except annealing temperatures that were 57°C and 54°C for PAH-RHD α GN, and GP, respectively.

Based on qPCR quantifications, relative abundances of PAH-RHD α GP and GN genes (related to 16S rRNA gene) were calculated in unspiked soils. Similarly, abundances of PAH-RHD α GP and GN genes in soils after incubation and in sequenced DNA fractions were calculated based

on their average relative abundance in ^{12}C light DNA fraction and in ^{13}C heavy DNA fraction (i.e. respectively light and dark grey bar in **Figure S5.2**), respectively. All these gene relative abundance values were reported in **Table 5.1**.

2.7 Identification of phenanthrene-degrading bacteria

Based on results of the distribution of heavy and light DNA in recovered fraction, we observed an enrichment of 16S rRNA gene in heavy fraction (number 4-5-6; i.e. BD from 1.725 to 1.717 g ml⁻¹; **Figure S5.2**) of the incubation with ^{13}C -PHE (compared to incubation with ^{12}C -PHE), indicating a significant use of ^{13}C for bacterial growth. In order to identify these phenanthrene-degrading bacteria, 5 μl of the three heavy fractions (number 4-5-6) were pooled from samples of both ^{12}C and ^{13}C incubations. These pooled fractions were used as template to perform 16S rRNA gene amplicon libraries for Illumina MiSeq sequencing. To do so, the V3/V4 region of bacterial 16S rRNA genes (ca. 550 bp) was amplified using primers S-D-Bact-0341-a-S-17 and S-D-Bact-0787-b-A-20 (Muyzer et al., 1993; Caporaso et al., 2011) and following a previously described dual-index strategy (Kozich et al., 2013).

PCR reactions were performed on 1 μl of the DNA-pooled fractions in a final volume of 50 μl , containing 10 μl of 5X Phusion HF buffer, 1.5 μl of 50 mM MgCl₂, 0.25 μl of DMSO, 0.1 μl of T4gp32 (MPBiomedicals, France), 0.1 μl of Phusion high fidelity polymerase (Thermo Scientific) and 1 μl of each primer at 10 μM . PCR reactions were heated at 94°C for 5 min, followed by 33 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at the annealing temperature (18 cycles starting at 63°C, with a subsequent decrease of 0.5°C at each cycle, and 15 cycles at 54°C), 30 s at 72°C, and a final extension step of 7 min at 72°C. Amplification products were checked on 1% agarose gel electrophoresis and purified using the UltraClean-htp 96 Well PCR Clean-Up kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. After quantification using a Quant-iT Picogreen ds-DNA assay Kit (Invitrogen), an amplicon library was prepared as an equimolar pool of amplicons (10 nM), purified on a QIAquick PCR purification kit column (Qiagen) and sent for sequencing to Genewiz platform (South Plainfield, NJ, USA) using an Illumina MiSeq V2 Kit for 2 x 250 bp paired-end sequencing.

Sequence data were analysed following the MiSeq SOP procedure available in March 2017 and described in Kozich et al. (2013), using Mothur v.1.36.0 (Schloss et al., 2009). Due to the altered sequence quality from Uc soil compared to the 9 other soils, two separate analyses were performed, with Uc read treated separately from all the others. Paired-end reads were trimmed to a minimum QScore of 20 and joined using the following criteria:

404 bp < length < 480 bp and maximum 6 ambiguous bases or no ambiguous bases for paired-end reads from Uc soil or the 9 other soils, respectively. Alignment of unique sequences was performed against the Silva database. Chimeras were detected using Uchime (Edgar et al., 2011) and removed. Taxonomy was assigned using the Silva 132 bacteria database (release in Dec. 2017) using a cutoff = 80. Sequences affiliated to archaea, eukaryota, unknown, mitochondria and chloroplasts were removed for further analysis. Singletons (sequences appearing only once among all samples) were removed. Sequences were clustered in Operational Taxonomic Units (OTUs) at 97% similarity. Finally, datasets were rarefied to the lowest number of sequences per sample (1 096 or 20 764 reads/sample for sequences from Uc soil or the other 9 soils, respectively).

In order to identify organisms having incorporated ^{13}C in their DNA, we firstly grouped OTUs which had exactly the same taxonomic affiliation and summed their abundance. Then, we compared the abundance of these OTU groups (based on number of sequences) between ^{12}C and ^{13}C conditions. OTU groups presenting both an abundance of at least 1% (in at least one ^{13}C replicate) and a 3-fold increase in ^{13}C microcosms than in ^{12}C microcosms DNAs were reported in **Figure 5.2** and corresponded to major active ^{13}C -PHE-degraders. Using the abundance of major PHE-degrader (related to the whole of PHE-degraders), we performed a canonical correspondence analysis (CCA) to identify major PHE-degraders explaining the best the percentage of PHE and ^{13}C dissipations (**Figure S5.3**).

2.8 Statistical analyses

All statistical analyses were performed using RStudio v1.1.442. Significant differences of PHE dissipation, ^{13}C dissipation, and 16S rRNA gene copy number among soils were assessed by using Kruskal-Wallis rank sum test and multiple comparison test included in the agricolae R package (Mendiburu, 2017). Significant difference between dissipation of PHE and dissipation of ^{13}C in the same soil was assessed using Student's t-Test. Linear correlations between all data were explored using *rcorr* function included in the Hmisc R package (Harell et al., 2018). Linear multiple regression and factor interactions were explored using *lm* function. Diversity index were calculated using *specnumber* and *diversity* functions included in the vegan R package (Oksanen et al., 2017). The canonical correspondence analysis was performed using XLStat 2015 (Addinsoft).

3 RESULTS

3.1 PAH contamination and PAH-dioxygenase genes of soils

The PAH and phenanthrene content, together with PAH-RHD α gene relative abundances (related to 16S rRNA gene copy number) in the ten soils (before and after incubation with ¹³C-PHE) are presented in **Table 5.1**. Percentages of PAH-RHD α genes in ¹³C-heavy DNA fractions were also presented and corresponded to their average relative abundances in fractions number 4-5-6. Soil collection showed a gradient of total PAH content ranging from 0.03 (He) to 1 095.90 mg kg⁻¹ (NM) with c.a. 1 to 10% of available PAH. Initial PHE content of soil (without spiking) follows similar trend and range from 0 (He) to 199.24 mg kg⁻¹ (Ho). Based on PAH content, we considered each soil as low (< 20 mg kg⁻¹), middle (20 - 200 mg kg⁻¹) or high (> 200 mg kg⁻¹) PAH contaminated. Interestingly, relative abundance of PAH-RHD α genes in unspiked soils showed linear relationships with total ($p = 2.62 \times 10^{-4}$, $r = 0.91$ and $p = 3.38 \times 10^{-8}$, $r = 0.99$ for PAH-RHD α -GN and -GP genes, respectively) and available ($p = 5.77 \times 10^{-5}$, $r = 0.96$ and $p = 3.70 \times 10^{-6}$, $r = 0.98$ for PAH-RHD α -GN and -GP genes, respectively) PAH contents of soils.

Table 5.1. PAH content and PAH-degradation gene copy number and abundance in the soils. *Values are means (n = 3) \pm standard error of the mean (SEM). For values indicated by +, SEM were not calculated because only one replicate showed results for gene quantification. < dl means lower than detection limit.*

	Sum of 16 regulatory PAH (mg kg ⁻¹)		Phenanthrene (mg kg ⁻¹)		Percentage of functional gene copy relative to 16S rRNA genes						Gene enrichment during SIP incubation	
					In soils (before SIP incubation)		In soils (after SIP incubation)		In sequenced ¹³ C-heavy DNA			
	Total	Available	Total	Available	PAH-RHD α GP (x 10 ³)	PAH-RHD α GN (x 10 ⁵)	PAH-RHD α GP (x 10 ²)	PAH-RHD α GN (x 10 ³)	PAH-RHD α GP (x 10 ⁰)	PAH-RHD α GN (x 10 ³)	PAH-RHD α GP	PAH-RHD α GN
He	0.03 ± 0.01	<dl	0.00 ± 0.00	<dl	7.0 ± 0.3	15.7 ± 1.0	5.7 ± 1.6	5.1 ± 2.6	0.3 ± 0.2	73.7 ± 10.5	8 ± 2	32 ± 16
Di	0.87 ± 0.06	<dl	0.11 ± 0.01	<dl	8.3 ± 0.4	11.5 ± 1.4	182.6 ± 23.0	N/A	39.4 ± 9.8	22.8 ⁺	221 ± 28	N/A
Uc	0.90 ± 0.09	<dl	0.26 ± 0.04	<dl	26.9 ± 3.6	14.0 ± 1.4	446.2 ± 27.6	1.0 ± 0.1	113.4 ± 28.9	18.3 ± 7.7	166 ± 10	7 ± 1
Mo	3.47 ± 1.35	<dl	1.34 ± 1.34	<dl	2.2 ± 0.2	4.9 ± 0.5	4.3 ± 0.6	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1	18.7 ⁺	19 ± 3	11 ± 4
RM	6.59 ± 0.31	<dl	1.33 ± 0.03	N/A	11.2 ± 0.3	109.0 ± 9.3	26.6 ± 2.4	10.1 ± 1.4	1.9 ± 0.9	33.1 ± 16.7	24 ± 2	9 ± 1
Po	21.17 ± 2.33	0.18 ± 0.01	5.27 ± 2.79	<dl	22.1 ± 1.4	12.4 ± 0.8	462.7 ± 20.4	1.1 ± 0.4	81.1 ± 5.9	2.7 ± 0.8	209 ± 9	9 ± 3
MsM	49.65 ± 1.01	4.65 ± 0.62	4.40 ± 0.07	0.83 ± 0.06	31.4 ± 4.3	16.4 ± 4.7	505.1 ± 39.2	9.0 ± 0.8	24.5 ± 2.3	66.0 ⁺	161 ± 12	55 ± 5
Te	114.74 ± 0.50	6.31 ± 1.00	15.51 ± 0.09	0.88 ± 0.13	28.3 ± 3.0	6.1 ± 0.5	197.2 ± 22.4	7.7 ± 3.5	29.0 ± 6.4	2.2 ± 0.6	70 ± 8	126 ± 57
Ho	937.69 ± 14.31	54.14 ± 9.17	199.24 ± 3.25	18.10 ± 1.43	143.7 ± 12.2	329.0 ± 77.5	317.3 ± 29.3	159.2 ± 22.4	12.1 ± 3.1	274.9 ± 39.9	22 ± 2	48 ± 7
NM	1,095.90 ± 32.44	82.98 ± 8.47	104.08 ± 2.74	15.77 ± 0.56	160.5 ± 25.1	888.5 ± 475.6	69.9 ± 18.5	24.7 ± 8.0	0.9 ± 0.2	376.0 ± 197.6	4 ± 1	3 ± 1

3.2 Soil respirations of unspiked soils

Depending on the soil activity, the basal respiration (BR) and the respiration induced after phenanthrene addition (PHE-SIR) were monitored during 17 or 23 days (**Figure S5.1**). Mo, Te and Po soil have the highest basal respiration activity. A globally higher CO₂ production was observed in PHE-SIR than in BR flasks, except for He soil. Te, Di and Mo soils have the higher PHE-SIR level compared to their BR, followed by Uc and MSM soils. Difference of CO₂ production between BR and PHE-SIR at each time was also presented (**Figure S5.1**). Globally, we found that after 10-12 days of incubation, most of the soils showed a high difference in CO₂ production between the two conditions indicating that most of the spiked-phenanthrene has been degraded. Based on this we choose to stop SIP incubation after 12 days.

3.3 ¹³C-Phenanthrene dissipation in soils

We measure the PHE concentration and the $\delta^{13}\text{C}$ level to estimate the ¹³C-PHE dissipations in soils at the end of SIP incubation (**Figure 5.1**). Soils presented a variable percentage of PHE dissipation, ranging from 17.9% (RM) to 91.2% (Di) of the initial spiked-PHE quantity. Di and Po soils presented the highest PHE dissipation, while RM and NM soils presented the lowest PHE dissipation (Kruskal Wallis tests, $p = 0.002$). Interestingly, we thus noted that there was no correlation (Pearson) between the level of PHE dissipation and soil characteristics (including initial content of PAH). Additionally, no soil characteristics interaction explaining PHE degradation was found (**Table S5.2**). Besides, we showed that middle PAH polluted soils (i.e. Po, MsM, Te) presented a higher PHE dissipation than low contaminated soils (i.e. He, Uc, Mo, RM except for Di soil) (Kruskal Wallis test, $p = 0.002$). Based on soil $\delta^{13}\text{C}$ level, we calculated the ¹³C dissipation in soils that ranged from 18.8% (NM) to 59.5% (Di) of the initial ¹³C quantity, with significant differences (Kruskal Wallis test, $p = 0.002$). No correlation was found between ¹³C dissipation and soil characteristics. However, the percentage of degraded PHE showed positive linear correlation with both the initial bacterial abundance (i.e. 16S gene copy number; $P = 0.0001$, $R = 0.65$) and initial bacterial richness (i.e. Chao1 index; $p = 0.0002$, $R = 0.62$) in soils (**Figure 5.3**). A strong linear relationship ($p = 0.0004$; $R = 0.90$) was also found between the percentage of ¹³C and the PHE dissipated. The difference between the percentage of ¹³C and of PHE dissipated (**Figure 5.1**) indicates the ¹³C still present in soil but not attributed to the remaining PHE (i.e. ¹³C-labelled microorganisms, PHE derivative ¹³C-labelled metabolites or possibly un-extractable ¹³C-PHE) at the end of the incubations. Five soils (i.e. Di, Po, MsM, Te and Ho) presented a significantly higher PHE dissipation than ¹³C

dissipation (Student test, $p < 0.05$). We noted that this difference was positively correlated to initial 16S rRNA gene copy number in soils (Pearson; $p = 0.01$; $R = 0.76$).

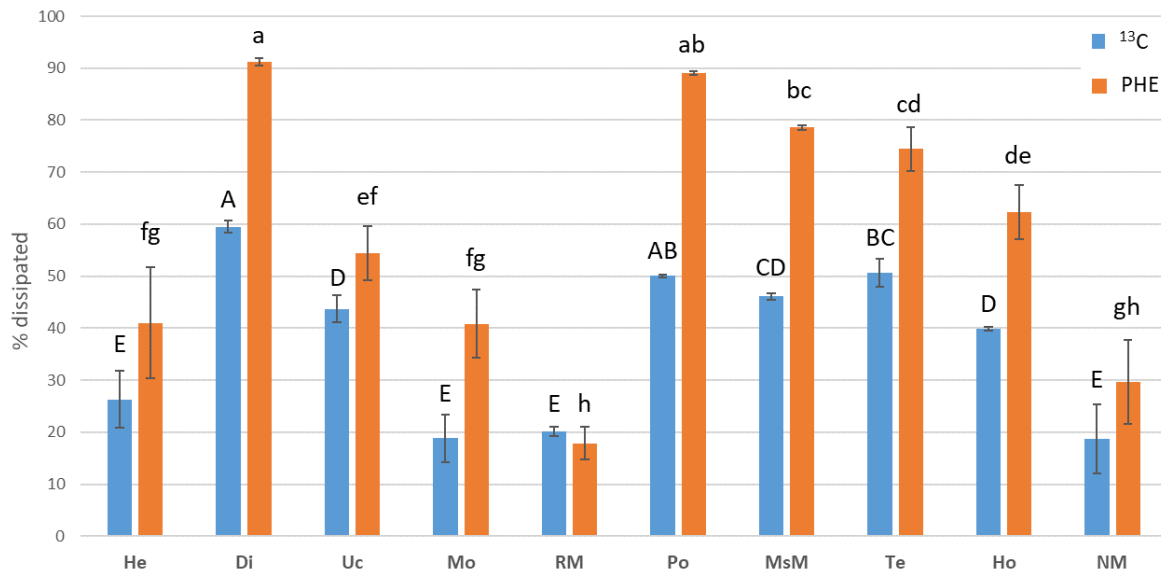


Figure 5.1. Percentage of dissipated ^{13}C and phenanthrene (PHE) at the end of SIP incubations (after 12 days). Error bars represent standard error to the mean ($n = 3$). Statistical differences of PHE and ^{13}C dissipated among the soils are indicated by small and capital letters, respectively (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). On the figure, soils were ordered from left to right according to their total-PAH concentration.

3.4 Evidence for ^{13}C -labelled DNA

Bacterial 16S rRNA gene abundance was quantified on the DNA fractions obtained after ultracentrifugation of gDNA from ^{12}C -PHE (control) and ^{13}C -PHE microcosms (**Figure S5.1**). The “heavy” DNA was in the fractions with a buoyant density ranging from 1.717 to 1.725 g ml^{-1} , while most of the “light” DNA corresponded to the fractions with buoyant density ranging from 1.699 to 1.704 g ml^{-1} . Higher number of 16S rRNA gene copies in the heavy DNA fractions collected from ^{13}C microcosms than in the same fractions in the ^{12}C controls highlighted the presence of ^{13}C -labelled DNA belonging to the active ^{13}C -PHE-degrading bacteria. This ^{13}C -DNA enrichment was observed for all soils except for Mo and only a weak signal was observed for RM soil. 18S rRNA gene copies were also quantified in all fractions (data not shown) but no fungal ^{13}C -DNA enrichment was detected, signifying that fungi were not significantly involved in PHE degradation or did not use the carbon from PHE for their growth, as they did not incorporate ^{13}C into their DNA.

In addition, PAH-RHD α -GN and -GP genes were also quantified in DNA recovered from the CsCl gradient fractions, allowing to calculate their relative abundance in soils after incubation

and in sequenced ^{13}C -heavy DNA fractions (**Table 5.1**). By comparing PAH-RHD α -GP and -GN abundance in soils before and after SIP incubation, we calculated a value of enrichment during incubation (**Table 5.1**), ranging from 4 (NM) to 221 (Di) and from 3 (NM) to 126 (Te) for PAH-RHD α -GP and -GN, respectively. Interestingly, PAH-RHD α -GP gene abundance and PAH-RHD α -GP gene enrichment in soil after SIP incubation were positively correlated to both the percentage of PHE and ^{13}C dissipated during SIP incubation (Pearson; $p = 0.03$, $R = 0.68$ and $p = 0.01$, $R = 0.75$, respectively for abundance; $p = 0.005$, $R = 0.81$ and $p = 0.0006$, $R = 0.89$, respectively for enrichment). Additionally, PAH-RHD α -GP gene abundance in ^{13}C -heavy DNA fractions was positively correlated to percentage of ^{13}C dissipated during SIP incubation (Pearson; $p = 0.02$, $R = 0.72$). We noted that no correlation was found neither for PAH-RHD α -GN gene abundance in soil after SIP incubation or in ^{13}C -heavy DNA fractions, nor for PAH-RHD α -GN gene enrichment.

3.5 Identity of PHE-degraders

Based on results of the quantification of bacterial 16S rRNA genes, pooled heavy DNA fractions were used as template for 16S rDNA amplicon library preparation for Illumina sequencing. Due to altered sequence quality from Uc soil compared to the 9 other soils, two separate analyses were performed, with Uc reads treated separately from all the other soils. A total of 7 150 234 and 405 380 reads were obtained after sequencing and 4 174 084 and 62 522 reads were kept after the trimming steps, for the 9 soils and Uc soil, respectively. Finally, data were rarefied to 20 764 and 1 096 reads/sample for the 9 soils and Uc soil, respectively. OTUs with the same taxonomic affiliation were gathered and OTU groups presenting a 3-fold increase in ^{13}C microcosms than in ^{12}C microcosms heavy DNAs were considered as PHE-degraders. Among them, OTU groups corresponding to major active ^{13}C -PHE-degraders ($> 1\%$) were reported with their relative abundance (related to the whole of PHE-degraders) in **Figure 5.2**. A total of 50 (Uc) to 351 (Mo) OTU groups (representing 56 to 857 OTUs) were highlighted as PHE-degraders, while among them only 1 (Mo) to 9 (Te) groups (representing 33 to 773 OTUs) were considered as major PHE-degraders (**Figure 5.2**). Compared to the total number of 16S rDNA reads sequenced from ^{13}C heavy DNA fractions, reads corresponding to the active PHE-degraders represented in mean 13% (RM) to 91% (MsM). Among the sequences corresponding to active PHE-degraders, in mean 66% (Mo) to 99% (MsM) belonged to the major active PHE-degraders (data not shown).

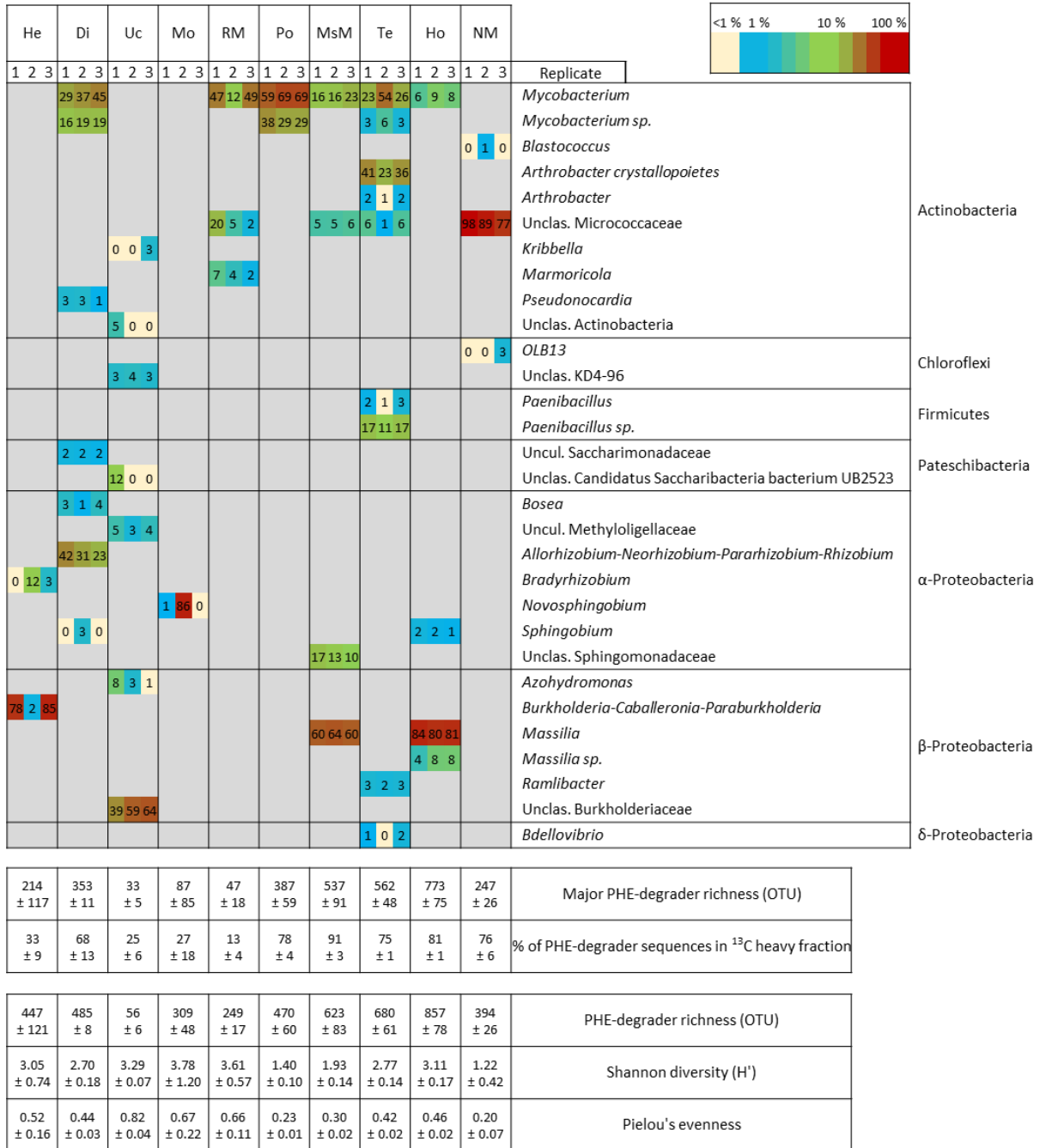


Figure 5.2. Abundance of OTU groups representing the major active ¹³C-labelled PHE degraders. OTU groups with an abundance at least 3-fold higher in ¹³C microcosms than in ¹²C microcosms (controls) were considered as PHE-degraders. PHE-degraders representing an abundance of at least 1% in one replicate in ¹³C microcosms were considered as major active PHE-degraders and are shown on the figure with their best taxonomic affiliation. Colour gradient represent abundance of OTU groups, related to the whole of PHE-degraders. OTU groups originally classified as betaproteobacteriales order in the γ -Proteobacteria class (in Silva V132 database) were indicated as β -Proteobacteria. On the figure, soils were ordered from left to right according to their total-PAH concentration. Values on table below correspond to means ($n = 3$) \pm standard error of the mean.

Major PHE-degraders were relatively diverse and belonged to the Actinobacteria, Proteobacteria (α , β and δ), Firmicutes, Chloroflexi and Patescibacteria phyla; the 2 last and δ -Proteobacteria being in minority (< 5% in mean) and only detected in 1 or 2 soils. We noted also that Firmicutes, only represented by *Paenibacillus* genus in Te soil, constituted a weak part of PHE-degraders (11-17%). In the soil collection, major PHE-degraders were mainly affiliated to the *Arthrobacter*, *Massilia*, *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (BCP), *Mycobacterium*, *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* (ANPR) and *Novosphingobium* genera, and to unclassified genera of Burkholderiaceae and of Micrococcaceae families. All together those 8 taxonomic groups (at genus level) represented in mean 29% (Mo) to 98% (Po) of the whole active PHE-degraders. In Actinobacteria, OTUs affiliated to *Mycobacterium* were the major PHE-degraders in soil of Di (45-63%), RM (12-49%), Po (98%) and Te (25-60%), while *Arthrobacter* constituted the second most abundant PHE-degraders in Te soil (24-43%) and unclassified Micrococcaceae the major PHE-degraders in NM soil (77-98%). Concerning the α -Proteobacteria, ANPR genus represented the second major PHE-degraders in Di soil (23-42%) and *Novosphingobium* genus the major PHE-degraders in the second replicate of Mo soil (86%). Finally, Burkholderiaceae constituted the major PHE-degraders in the remaining soils, and more specifically *Massilia* genus for MsM and Ho soils (60-64% and 88-89%, respectively), BCP genus for the first and third replicates of He soil (78 and 85%) and unclassified Burkholderiaceae for Uc soil (39-64%). We noted that percentage of degraded PHE was positively correlated to the sum of relative abundance of the globally two more abundant PHE-degraders, namely *Mycobacterium* and *Massilia* ($p = 0.0003$; $R = 0.62$). For each soil replicate, we calculated diversity indices (i.e. species richness, Shannon diversity and Pielou's evenness) describing PHE-degrader community (**Figure 5.2**). Each index showed significant linear correlation with the percentage of PHE degraded. Species richness was positively correlated ($p = 0.02$, $R = 0.43$), while Shannon diversity and Pielou's evenness were both negatively correlated ($p = 0.04$, $R = -0.39$ and $p = 0.02$, $R = -0.42$) to the percentage of degraded PHE, respectively (**Figure 5.3**).

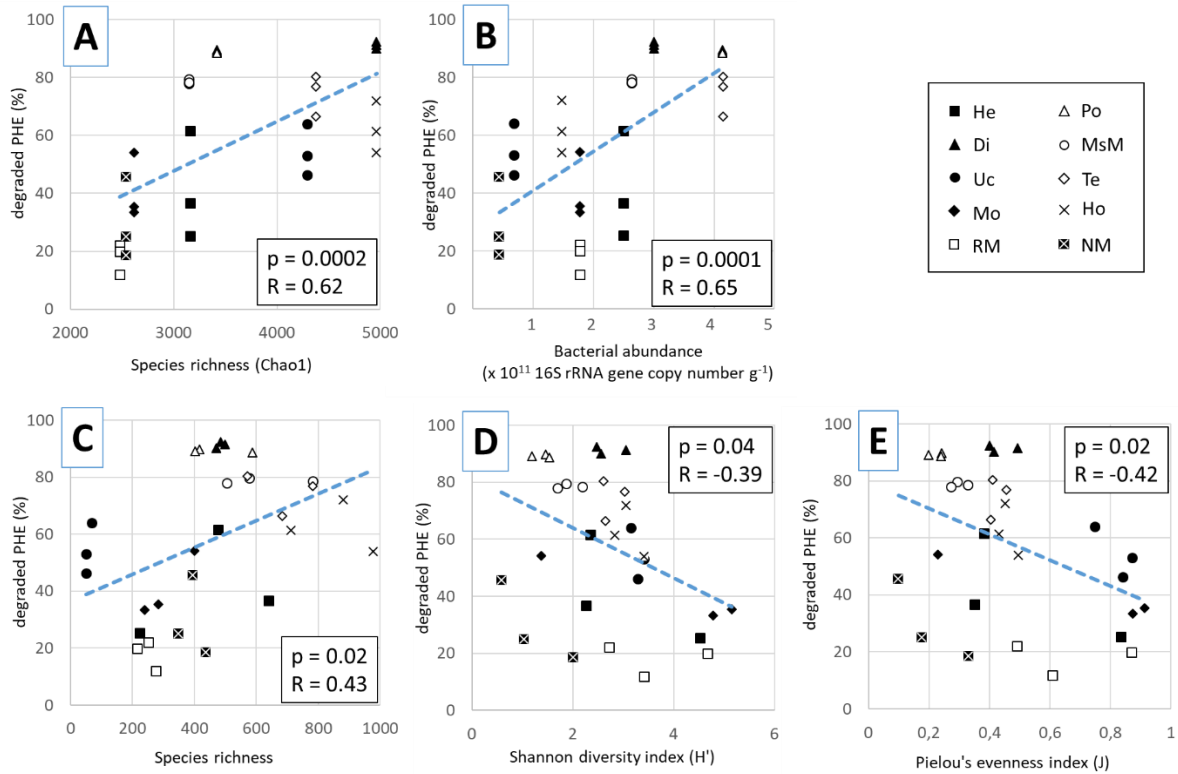


Figure 5.3. Correlations between the percentage of degraded PHE and biotic factors from unspiked soils (A and B) and from PHE-degrader communities found using SIP experiment (C, D and E). Correlation with total bacterial community Chao1 index (A) and bacterial abundance (B), and PHE-degrader's richness (C), Shannon diversity (D) and Pielou's (E) indices.

In order to identify PHE-degraders explaining the best the percentage of PHE and ^{13}C dissipations, we performed a CCA using the abundance of major PHE-degraders (**Figure S5.3**). The first and the second axis of the CCA explained 62.1% and 37.9% of the variance, respectively. The most important PHE-degraders linked with the level of PHE and ^{13}C dissipation were on the top left block and corresponded to *Mycobacterium*, *Massilia*, *Bosea*, *Sphingobium* and *ANPR* genera, and unclassified genera belonging to Sphingomonadaceae.

4 DISCUSSION

In ten soils presenting a PAH pollution gradient, we evaluated the level of phenanthrene degradation and identified the phenanthrene-degraders. We hypothesised that microbial community of soils with a high and historical PAH contamination will be better adapted to the PAH degradation than the ones from low- or no-contaminated soils. And in consequence, the phenanthrene degradation rate would be positively correlated to the level of soil PAH-contamination. Indeed, previous works showed that a greater PHE or PAH mineralization

appeared in soils pre-exposed to PAH or with the higher PAH contamination level, compared to low- or un-contaminated soils (Johnsen and Karlson, 2005; Carmichael and Pfaender, 2009).

In the present study, this hypothesis was partly confirmed by the linear positive correlation between PAH-dioxygenase gene (both PAH-RHD α -GP and -GN) abundance and the total PAH contamination level of the 10 soils. Our finding suggests that the selective pressure exerted by PAH pollution led to an enrichment of bacteria capable of PAH-degradation. Indeed PAH-RHD α gene abundance is a good indicator of PAH contamination level in environmental samples (Cébron et al., 2008). However, highly contrasted PHE degradation rates were observed among soils and were not correlated neither with the PAH concentration nor PAH-dioxygenase gene abundance of the unspiked soils. Yet, although the moderately contaminated soil (Di) had a higher PHE-degradation than un-contaminated ones, the highly PAH-contaminated soil (NM) did not have the highest PHE-degradation. These results showed that the detection of the potential function (i.e. PAH-RHD α gene abundance) is not the unique predictor of the realized function (i.e. PHE degradation) in our ten studied soils.

These differences in the PAH-biodegradation among soils could be explained by a myriad of abiotic and biotic factors, such as soil properties (e.g. texture, nutrient content, pH), multi-contamination (i.e. metal pollution) and microbial diversity.

No correlation was found between the percentage of PHE degraded and any abiotic factors including soil characteristics and pollution content. No impact of the nitrogen and phosphorus content nor C:N ratio on PHE degradation level was highlighted, even if it is well established that low nutrient levels limit microbial growth and activity (Wardle, 1992) and hydrocarbon degradation (Leahy and Colwell, 1990). Indeed, C:N:P ratios could drive the PHE degradation (Smith et al., 1998) and the selection of active microorganisms in SIP experiments (Cébron et al., 2007); and the addition of N or P can increase the soil respiration (Breedveld and Sparrevik, 2000) and improve biodegradation of crude oil or gasoline (Leahy and Colwell, 1990) and of PAH (Joner et al., 2002; Jones et al., 2008) in soils. Moreover, one of the main parameter driving PAH degradation level in soil is the PAH availability, mostly impacted by soil texture (Carmichael and Pfaender, 2009), organic matter type and content (Dictor et al., 2003) and the presence of aged-pollution (Biache et al., 2008). Dictor et al. (2003) showed that even after a short period (i.e. few hours), a significant part of the spiked PHE become unavailable for microorganisms in soil, resulting in a reduction of degradation. We can thus not exclude that the PHE availability was different depending on the soils.

We also hypothesised that difference in PHE degradation rate between soils may be explained by the diversity of PHE-degraders and/or by the presence of specific taxa having a higher PHE-degrading activity. In addition to the analyse of the diversity of the whole bacteria community in unspiked soils (Lemmel et al., in press; chap. 3), the use of stable isotope probing allowed us to directly link the ^{13}C -PHE degradation function with the diversity of ^{13}C -labelled PHE degraders.

We found that the percentage of degraded PHE was positively correlated to both the bacterial abundance and bacterial richness in unspiked soils. This relationship could be explained either i) by the fact that soils harbouring a more abundant and diversified microbial community may be likely to have more bacteria able to degrade PHE (i.e. the sampling effect hypothesis, see for example Hector et al., 2002) resulting in higher PHE degradation rate, or ii) by facilitation between species improving PHE degradation. As broadly described in plant community ecology (Hooper and Vitousek, 1998; Caldeira et al., 2001), facilitation between species allows enhancement of an ecosystem function and may be the mechanism responsible for the positive relationship between taxonomic diversity and ecosystem processes. Here, we can consider that some bacterial species indirectly contribute to increase PHE degradation by facilitating (for example by increasing their access to essential elements or by reducing the toxicity due to a high metal soil content) the PHE degrader activity in the soil.

We also found that the PHE degradation activity was positively correlated with the active PHE-degrader's richness found using SIP. Complementarity between species for the use of PHE should be considered here. When the number of species increases, the use of PHE as a carbon substrate is optimized and a greater amount of PHE is degraded. For example, the degradation of the PHE is the result of a sum of reactions (Ghosal et al., 2016) and, when the diversity of PHE degraders increases, the joint functioning of the different species ensures a greater number of its reactions and thus maximize the degradation of the PHE. Similarly, a positive relationship between species richness and soil respiration (Bell et al., 2005) or biodegradation efficiency of hydrocarbons in marine sediments (Dell'Anno et al., 2012) were observed.

Finally, negative correlation of both PHE-degrader's Shannon diversity and Pielou's evenness indices with PHE degradation rate suggests that the presence of dominant taxa maximises the PHE degradation rate. When looking at the 10 soils, large number of bacterial OTUs was identified as PHE-degraders. Among them, *Mycobacterium*, *Massilia*, *Bosea*, *Sphingobium* and *ANPR* genera, and unclassified genera belonging to Sphingomonadaceae seems to be the main PHE-degraders explaining the best the PHE degradation rates in the ten soils. *Sphingobium*

and more widely Sphingomonadaceae family is well known as PAH-degraders because many isolate belonging to Sphingomonadaceae were frequently isolated from PAH-contaminated environment (Johnsen et al., 2005). Similarly, PAH-degrading *Bosea* were isolated from hydrocarbon-contaminated soil (Ruggeri et al., 2009) and detected on nodule surface of plant growing on PAH contaminated soil (Sun et al., 2015). *ANPR* genera, which relate to N fixing bacteria through symbiosis with legumes, contained various *Rhizobium* species described for their capacity to tolerate and degrade PAH (Poonthrigpun et al., 2006; González-Paredes et al., 2013) and were used to enhance PAH phytoremediation (Johnson et al., 2005; Teng et al., 2011).

OTUs affiliated to *Mycobacterium* (Actinobacteria) or *Massilia* (β -Proteobacteria belonging to Oxalobacteraceae) genera were the dominant PHE-degraders in soils having high PHE degradation rates (except for RM soil). Based on Biolog[®] microplate assay, we previously found that RM soil had the lowest metabolic functional diversity among the soil collection, mainly explained by the toxic effect of the high metal content (Lemmel et al., in press; chap. 3) that would explain the lower PHE degradation rate. The high metal content of RM soil may have also negatively impacted the PHE degradation rate observed in the present study even if *Mycobacterium* PHE-degraders were present. Additionally, PHE degradation rate was positively correlated to the sum of both *Mycobacterium* and *Massilia* relative abundances. This relationship confirmed that *Mycobacterium* and *Massilia* were essential drivers of PHE degradation activity in our soils.

Due to their prevalence in many PAH-contaminated soils, *Mycobacterium* species were suggested to potentially play a major role in the natural attenuation of PAH (Cheung and Kinkle, 2001; Chen et al., 2016, 2018). Indeed, numerous *Mycobacterium* species were described for their ability to degrade various low and high molecular weight PAH, in both weakly and highly PAH-contaminated soils (Chen et al., 2018; Li et al., 2018). However, it was found that fast growing *Mycobacterium* (not only PAH-degraders) were more abundant in soil containing mainly high molecular weight PAH, than in soils containing high concentration of low molecular weight PAH (Leys et al., 2005b). Previous studies suggested that PAH-degrading *Mycobacterium* are well adapted to oligotrophic and low PAH availability conditions, usually found in PAH-contaminated soils. Indeed, it was shown that *Mycobacterium* was able to degrade PAH in optimal condition (C:N:P ratio of 100:10:1) as well as in excess or deficiency of N and P (Leys et al., 2005a). Additionally, Miyata et al. (2004) suggested that both passive diffusion and high affinity transport systems contribute to the PHE uptake by *Mycobacterium*

strain RJGII-135, and enable the bacteria to use aqueous-phase PHE in high and low concentrations. Moreover, *Mycobacterium* strains can fasten on the PAH source and form biofilm, thus increasing PAH bioavailability (Bastiaens et al., 2000; Wick et al., 2002).

Contrary to *Mycobacterium*, there are few examples of PAH-degrading *Massilia* species. PHE-degrading *Massilia* were isolated from soils after PHE exposition (Bodour et al., 2003; Zhang et al., 2010), and from PAH-polluted soils (Baquiran et al., 2012; Wang et al., 2016) or were detected by metagenomics in oilfield (Zhou et al., 2017). Although no detailed information about the role and potential of *Massilia sp.* in degradation of PAH in environmental sample is available, one study showed that *Massilia sp.* strain WF1 has a high degradation ability and tolerance to high concentration of PHE (Gu et al., 2016). Additionally, *Massilia* seems to be well tolerating various type of contaminants as Zhang et al. (2016) showed an enrichment of *Massilia* in BDE209 and Pb contaminated soils.

Interestingly, we noted that when *Mycobacterium* was predominant, *Massilia* was absent or represented a weak part of PHE-degraders, while it was the opposite when *Massilia* dominated. We hypothesize that *Massilia* and *Mycobacterium* shared similar ecological niche, but present different physiological properties making the one or the other more competitive, depending on the soil properties. For example, Gu et al. (2017) showed that *Massilia sp.* WF1, but not *Mycobacterium sp.* strain WY10, was able to migrate through *Phanerochaete chrysosporium* mycelia, conducting to an increase of PHE degradation in soil. Although abundance of fungi was similar in the ten soils, we can also hypothesis that predominance of *Mycobacterium* or *Massilia* would also depend of the presence of, and possible association/interaction with, other microorganisms. So, it would be relevant to further investigated the properties of and relation between *Massilia* and *Mycobacterium*, in order to better understand parameters driving their putative competition and allowing one or the other to become more competitive for PHE degradation.

5 CONCLUSION

We studied degradation of spike phenanthrene and identify major phenanthrene-degraders in a collection of 10 anthropised soils presenting a PAH pollution gradient. PAH-RHD α gene abundance was related to soil PAH content, reinforcing thoughts that it is a good indicator of PAH contamination level in environmental samples. However, PHE degradation rate was not correlated neither to soil PAH contamination level nor to PAH-degradation functional potential (occurrence of genes). Phenanthrene degradation rate seemed best explained by initial soil bacterial community characteristics as we found a higher PHE degradation when community harboured higher bacterial richness and diversity. Stable isotope probing identified various bacterial taxa that were involved in degradation of phenanthrene, with a dominance of *Mycobacterium* and *Massilia* genera in soil showing a high phenanthrene degradation. This two genera, previously found in PAH contaminated environments, were suggested as drivers of phenanthrene degradation in our soils, because we found that phenanthrene degradation rate was positively correlated to their cumulated relative abundance and negatively correlated to phenanthrene-degraders Shannon diversity and Pielou's evenness indices. However, a positive relationship between phenanthrene degradation rate and phenanthrene-degraders richness suggests that species complementarity would also be important for phenanthrene-degradation. To conclude, our study showed that microbial community characteristics and presence of specific degrading species, but also species complementarity is more important for degradation of PAH than initial level of soil PAH-contamination and PAH-degradation potential.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Arcelor Mittal, EPFL, GISFI, ONF, and LTO of Montiers (ANDRA/INRA, M.P. Turpault and S. Uroz) for giving us access to the different sampling sites. We are grateful to S. Uroz for the access to ultracentrifuge and methodological advises. This study was financially supported by the French national program EC2CO (EcobioS project) and the OSU-OteLo (TraitMic project).

Chapitre 6 :

Mise en évidence des communautés bactériennes et fongiques répondant à la cellulose dans un gradient de sols anthropisés par la technique de *DNA-stable isotope probing*

Les végétaux sont d'importants acteurs du cycle du carbone grâce à leur capacité à produire de la biomasse via la photosynthèse. Ainsi, on estime qu'en forêt tempérée, chaque année 2 à 4 tonnes de litière par hectare tombent au sol, auxquelles on peut ajouter la biomasse racinaire. Les microorganismes contribuent au recyclage de cette matière organique grâce aux fonctions cruciales qu'ils réalisent, telle que la décomposition des polymères végétaux. Or, tel que précisé dans la partie « état de l'art » de cette thèse, nous avons vu que la dégradation de la matière organique peut être réduite sous l'action de polluants, notamment métalliques. Dans les chapitres précédents, nous avons montré que la pollution métallique a réduit la diversité métabolique fonctionnelle, tandis que la pollution organique a induit une sélection de microorganismes avec un potentiel de dégradation des HAP d'autant plus élevé que le sol était pollué. Toutefois, le phénanthrène a été dégradé dans tous les sols mais à des niveaux variables, principalement expliqués par la structure des communautés et sans lien avec la pollution du sol. Ainsi, après avoir étudié le lien diversité-fonction en nous focalisant sur un composé d'origine anthropique, dont la fonction était supposée favorisée dans les sols pollués, nous avons voulu nous intéresser à un composé d'origine naturelle. Nous sommes partis d'un raisonnement inverse et avons fait l'hypothèse que la fonction de dégradation d'un substrat complexe naturel serait d'autant plus affectée que les sols seraient pollués, au même titre que la pollution métallique avait pu réduire la diversité métabolique fonctionnelle, basée sur l'utilisation de substrats simples (chapitre 3). L'un des objectifs était donc d'observer si la pollution par des ETM ou des HAP pouvait avoir induit une réduction de la capacité de dégradation de composés végétaux complexes. En outre, nous avons cherché à déterminer si le taux de dégradation pouvait être relié à une population dégradante particulière, qui aurait été défavorisée dans les sols pollués par rapport aux sols contrôles.

Ainsi, dans ce 6ème chapitre, nous avons également eu recours à la technique de Stable Isotope Probing, afin d'étudier la dégradation de la cellulose (marquée au ^{13}C) et d'identifier les populations impliquées dans sa dégradation. La cellulose a été choisie comme composé modèle d'origine naturelle car elle constitue l'un des composants structurels majeurs des végétaux et une part importante de la matière organique dégradée dans les sols. Dans ce dernier chapitre de résultats, nous avons montré que le taux de minéralisation de la cellulose était variable, voire nul, selon les sols, et sans lien avec leur niveau de contamination par des ETM ou des HAP. Néanmoins, différents taxa bactériens et fongiques impliqués dans la dégradation de la cellulose ont été identifiés dans chacun des sols, indiquant la présence de la fonction même dans les sols les plus contaminés. Bien qu'aucun taxa bactérien n'était fortement dominant dans les populations dégradant la cellulose, les genres fongiques

Coniochaeta et *Thielavia* ont systématiquement été trouvés ensemble et dominaient les populations fongiques dégradant la cellulose dans la plupart des sols.

Cellulose-responsive bacterial and fungal populations revealed by DNA stable isotope probing in a gradient of anthropised soils

Florian Lemmel¹, Florence Maunoury-Danger², Corinne Leyval¹, Aurélie Cébron¹

¹ Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-54000 Nancy, FRANCE

² Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-57000 Metz, FRANCE

ABSTRACT

Soil microbes are important contributors of C-cycle by performing numerous key functions such as decomposition of plant litter and turnover of organic matter. In long-term multi-contaminated soils, the toxicity exerted by pollution could, through selection of microbes, induce the loss of numerous functions. Thus, one can wonder whether essential functions for ecosystem functioning such as those involved in organic matter degradation are still present and effective, and what are the microbes involved, in long-term multi-contaminated soils. We choose to use cellulose, as a model compound to study organic matter/plant litter degradation. We resorted to stable isotope probing technique in order to identify microbes involved in the cellulose degradation. Our study aimed to: i) assess cellulose mineralisation in soils with a gradient of multi-contamination, and ii) identify microbes actively involved in cellulose degradation. This was assessed through measurement of the $\delta^{13}\text{C}$ of soils, and identification of microorganisms involved in cellulose degradation was achieved by using high throughput bacterial 16S and fungal 18S rDNA amplicon sequencing from ^{13}C -labelled DNA. The cellulose mineralisation level was different among soils and depended mainly on the microbial community richness and abundance. Various cellulose-responsive bacterial and fungal taxa were identified, suggesting that needed functions for cellulose degradation were present in all soils. Although no taxa were strongly dominant among cellulose-responsive bacteria, *Coniochaeta* and *Thielavia* genera were always found together and dominated active cellulose-responsive fungal populations in almost all soils.

1 INTRODUCTION

Plants are the primary producers of continental ecosystems and important actors of C cycle through photosynthesis. In temperate forest, annual plant deposits (i.e. plant litter) are estimated to 2-4 Mg of dry matter per hectare (Magneot 1980). Microbes mediate 80-90% of the soil C cycle (Nannipieri et al., 2003) by performing numerous crucial functions for carbon recycling, such as the decomposition of plant litter and turnover of organic matter (Gobat et al., 2010; Schmidt et al., 2011). It was shown that these functions could be disturbed in anthropised ecosystems, since for example metals inhibit organic matter decomposition (McEnroe and Helmisaari, 2001; Rühling and Tyler, 1973).

Most of anthropised soils are usually multi-polluted by metal and organic (e.g. polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH) contaminants. The toxicity exerted by these pollutants can modify the microbial community composition (Kelly et al., 1999; Sawulski et al., 2014), reduce the microbial taxonomic diversity (Moffett et al., 2003; Sutton et al., 2013) and also inhibit microbial activity (Irha et al., 2003) such as organic matter decomposition (Rühling and Tyler, 1973). In addition, through the selection of microbes, pollution could cause the loss of some functions, such as the ones involved in the N and C cycling (Liang et al., 2009), which could impair the ecosystem functioning. For example, metallic pollution was found to reduce the metabolic diversity (capacity to use carbon substrates) of soil bacterial communities (Lemmel et al., in press; chap. 3). However, microbial community composition and function can also be resilient to pollution (Azarbad et al., 2015). Additionally, the effect of pollutants (i.e. stress) on functions depend mostly on the function of interest and on its redundancy in the community (Allison and Martiny, 2008). Given the central role of microorganisms in ecosystem processes, one wonders whether essential functions for ecosystem functioning, such as functions involved in organic matter degradation are still present and effective, and what are the microbes involved, in soils subjected to anthropic pressure. In a previous study, we found a reduction of the degradation potential and rate for simple carbon substrates along a gradient of anthropised soils (Lemmel et al., in press; chap. 3), but the degradation of complex substrates could be impacted in a different manner. One way to study specific functions involved into complex substrate decomposition is to assess the degradation of cellulose as a model compound, because it is the major biopolymer of plant biomass and constitutes 35-50% of the plant dry weight (Lynd et al., 2002). In natural soils, the capability to degrade cellulose is widespread among bacteria and fungi and involves the biosynthesis of various cellulase systems (Lynd et al., 2002). Most of the studies focused on microorganisms growing on

different media supplemented with cellulose (Gupta et al., 2012), but the major fraction of microbes cannot yet be cultivated. Among cultivation-independent techniques, stable isotope probing (SIP) approach allows to identify active functional groups of microbes directly in their environment (Dumont and Murrell, 2005). SIP approach was already used to study cellulolytic or cellulose-responsive microorganisms (bacteria, fungi or both) in various environments such as forest (Bastias et al., 2009; Eichorst and Kuske, 2012) and managed or agricultural soils (El Zahar Haichar et al., 2007; Schellenberger et al., 2010; Wilhelm et al., 2017). In this way, Štursová et al. (2012) showed that populations involved in cellulose degradation differed substantially between the litter and soil. In another study, Eichorst and Kuske (2012) found that the composition of cellulose-responsive bacteria and fungi was generally unique to a certain soil type and suggested a strong potential influence of multiple edaphic factor in shaping the community. Nevertheless, SIP approach was never used to study cellulose-responsive microbial populations in a wide range of soils with a gradient of anthropisation (i.e. gradient of metal and PAH pollutions).

In this context, our study aimed to determine the cellulose mineralisation rates and to identify the composition of the microbial populations actively involved in the cellulose degradation process in soils with a gradient of anthropisation. We wanted to see: i) whether needed functions for the cellulose degradation processes were preserved and ii) whether the cellulose-responsive microbes were different depending on the pollutant level of soils.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Soil sampling

Soils used in this study were collected in November 2015 from various woodland ecosystems located on industrial wastelands, natural forests or ancient gravel pits, located in the “Grand Est” region (north-east of France), all sites localized within a 50 km radius. Three soils were considered as controls (ctrl): two forest soils collected at Hémilly (He; Moselle; Luvisol stagnic) and Montiers-sur-Saulx (Mo; Meuse; Cambisol calcaric), and one low-anthropised but unpolluted ancient gravel pit soil collected at Dieulouard (Di; Meurthe-et-Moselle; Fluvisol). Seven anthropised soils known to be polluted by metals and/or PAH were collected from: i) former slag heaps (sh) at Homécourt (Ho; Meurthe et-Moselle), Terville (Te; Moselle), Uckange (Uc; Moselle), and Neuves-Maisons (NM; Meurthe-et-Moselle) and ii) former settling ponds (sp) at Pompey (Po; Meurthe-et-Moselle), Mont-St-Martin (MsM; Meurthe-et-Moselle) and Russange-Micheville (RM; Moselle). All sites were colonized by trees (mainly birch and/or poplar trees) and herbaceous plants, and presented similar and high tree cover (more than 60% of the soil surface), except for sh-Uc which presented a very sparse tree cover and sh-NM which was colonized only by some herbs. None of the soil samples were rhizospheric soils or directly under plant influence (sampling at least 2 m from a tree). As plant colonization was sparse by location, we collected samples on bare soils. At each of the ten sites, samples were collected from three independent sub-sites 1 m apart. After removing the litter layer, if present, one soil block per sub-site (block of 20 cm on the side and 30 cm deep) was removed using shovel. The three sub-site soil blocks were mixed to get one composite sample per site. Back to the laboratory, the soil samples were air-dried at room temperature for one week, and then sieved at 2 mm.

This soil collection was chosen to cover a wide range of anthropisation situations described previously in Lemmel et al. (in press; chap. 3). Briefly, a gradient of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination was shown with the concentration of the 16 US-EPA PAH ranging from 0.03 to 1 095.90 mg kg⁻¹ dw soil. Additionally, the soils presented a gradient of metallic contamination mainly represented by Zn (60 to 119 000 mg kg⁻¹), Pb (23 to 39 500 mg kg⁻¹) and Cd (0.09 to 152 mg kg⁻¹) contaminations (**Table 6.1**; Lemmel et al., in press; chap. 3).

Table 6.1. Physico-chemical and pollution characteristics of initial soils. Extracted from Lemmel et al. (in press; chap. 3). Zn, Pb and Cd values corresponded to total concentrations.

	soil group	pH (H ₂ O)	Total organic C (g kg ⁻¹)	Total N (g kg ⁻¹)	Organic matter (g kg ⁻¹)	DOC (g kg ⁻¹)	Organic acids (mg kg ⁻¹)	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	Total PAH (mg kg ⁻¹)	Zn (mg kg ⁻¹)	Pb (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)
Mo	ctrl	7.0	81.5	4.56	141	1.34	222.9	48.9	46.0	5.1	3.47	144	44	0.71
He	ctrl	5.4	72.1	2.85	125	1.69	140.0	25.5	69.0	5.5	0.03	248	93	0.27
Di	ctrl	7.3	24.3	1.74	42	1.18	120.7	11.5	14.3	74.2	0.87	60.5	31	0.15
Uc	sh	8.0	29.9	0.56	52	0.12	43.2	5.5	17.6	76.9	0.90	74	23	0.09
Te	sh	7.7	88.2	4.35	153	0.99	179.0	10.0	20.7	69.3	114.74	1 650	475	4.55
NM	sh	7.4	75.2	2.35	130	0.23	11.5	13.3	27.9	58.8	1,095.90	2 540	653	3.27
Ho	sh	7.5	159.0	2.92	276	0.33	238.1	7.0	12.0	81.0	937.69	314	303	1.10
Po	sp	7.8	109.0	7.19	189	0.76	279.3	17.5	53.3	29.2	21.17	29 600	34 700	152.00
MsM	sp	7.2	119.0	4.18	206	0.66	154.0	10.9	72.7	16.4	49.65	55 400	14 400	17.60
RM	sp	7.6	149.0	3.83	257	0.24	114.2	10.9	74.6	14.5	6.59	119 000	39,500	22.00

The pH, a characteristic known to be one of the main drivers of microbial communities, was rather high (from 7.2 to 8.0) except for ctrl-He soil (pH = 5.4). Other soil characteristics, namely total organic carbon (24 to 159 g kg⁻¹), total nitrogen (0.56 to 7.19 g kg⁻¹), dissolved organic carbon (DOC; 0.23 to 1.69 g kg⁻¹), organic acids (11.5 to 279.3 mg kg⁻¹) and texture (from silty to sandy) varied among soils (**Table 6.1**; Lemmel et al., in press; chap. 3).

Soils presented a variable 16S rRNA gene abundance ranging from 4.4 to 41.5 x 10¹⁰ copy g⁻¹. The lowest and highest 16S rDNA gene abundances were found respectively for sh-Uc and sh-NM, and sp-Po and sh-Te soils. Abundance of 18S rRNA gene varied also among soils, ranging from 3.1 to 45.0 x 10⁹ copy g⁻¹. Sh-NM and ctrl-Mo soils presented the lowest 18S rRNA gene abundance while sh-Te and ctrl-He presented the highest one (**Table 6.2**). Data on bacterial and fungal communities, characterised by Illumina MiSeq sequencing, are summarized in **Table 6.2** (Lemmel et al., in press; chap. 3, chap. 4). It shows variable Chao1 richness indices (2 478 to 4 966, and 146 to 317 for bacteria and fungi, respectively), Shannon diversity indices (5.40 to 7.12, and 1.25 to 3.40 for bacteria and fungi, respectively) and Pielou's evenness indices (0.767 to 0.848, and 0.271 to 0.669 for bacteria and fungi, respectively) among soils.

Table 6.2. Bacterial and fungal community characteristics in initial soils. Values are means ($n = 3$) \pm standard error of the mean. Data based on Lemmel et al. (in press; Chap. 3 of the thesis) and (in preparation; Chap. 4 of the thesis).

	soil group	Gene copy number		Bacterial community			Fungal community		
		16S rRNA ($\times 10^{10} \text{ g}^{-1}$)	18S rRNA ($\times 10^9 \text{ g}^{-1}$)	Chao1 index	Shannon's index (H')	Pielou's evenness index (J')	Chao1 index	Shannon's index (H')	Pielou's evenness index (J')
Mo	ctrl	17.8 ± 2.4	4.8 ± 0.6	2 621 ± 205	5.40 ± 0.03	0.698 ± 0.001	215 ± 31	3.40 ± 0.02	0.669 ± 0.009
He	ctrl	25.0 ± 2.2	45.0 ± 1.8	3,161 ± 254	6.38 ± 0.05	0.803 ± 0.002	281 ± 48	3.08 ± 0.04	0.596 ± 0.018
Di	ctrl	30.1 ± 1.1	21.8 ± 1.2	4 966 ± 32	7.12 ± 0.02	0.848 ± 0.002	203 ± 15	2.77 ± 0.09	0.549 ± 0.014
Uc	sh	6.9 ± 0.5	5.1 ± 0.3	4 293 ± 291	6.68 ± 0.03	0.815 ± 0.004	175 ± 7	1.25 ± 0.05	0.271 ± 0.011
Te	sh	41.5 ± 1.2	34.2 ± 3.0	4 380 ± 38	6.97 ± 0.01	0.841 ± 0.001	147 ± 15	2.08 ± 0.06	0.440 ± 0.011
NM	sh	4.4 ± 0.3	3.1 ± 0.3	2 541 ± 100	6.37 ± 0.01	0.823 ± 0.003	179 ± 20	2.92 ± 0.03	0.581 ± 0.002
Ho	sh	14.8 ± 0.7	11.8 ± 0.2	4 966 ± 100	7.06 ± 0.04	0.844 ± 0.003	257 ± 6	2.75 ± 0.01	0.529 ± 0.005
Po	sp	41.5 ± 0.4	18.1 ± 1.6	3 422 ± 223	6.65 ± 0.02	0.826 ± 0.002	317 ± 22	3.14 ± 0.02	0.593 ± 0.006
MsM	sp	26.4 ± 1.2	10.3 ± 0.9	3 151 ± 2	6.06 ± 0.02	0.767 ± 0.002	186 ± 9	3.11 ± 0.02	0.623 ± 0.002
RM	sp	17.8 ± 0.4	8.5 ± 0.7	2 478 ± 15	5.99 ± 0.02	0.780 ± 0.002	158 ± 15	1.46 ± 0.05	0.313 ± 0.007

2.2 Soil respiration

Basal respiration (BR) and substrate-induced respiration after cellulose addition (cellulose-SIR) were measured, using two sets (i.e. unspiked and cellulose-spiked) of soil samples. The two sets were prepared in triplicates, using 2.0 g dw of unspiked soil and of cellulose-spiked soil, respectively. The cellulose-spiked soil was prepared by mixing 1.5 mg of cellulose powder (from spruce, Fluka) with 2.0 g dw soils. The final cellulose concentration was 750 mg kg⁻¹. Our experimental design accounted 60 samples (10 soils in triplicates, unspiked and cellulose-spiked).

The two grams of soils were placed in 125 ml Plasma glass flasks and rewetted using sterilized water to reach 80% water retention capacity (WRC) before to be hermetically sealed with rubber-butyl corks and incubated in the dark at 24°C for 22 days. Respirations were monitored by measuring CO₂ content through infrared spectrophotometer (Binos, absorption at

2325.6 cm⁻¹) on a 4 ml fraction of the flask atmosphere sampled after 1, 4, 7, 10, 14, 17 and 22 days of incubation. The produced CO₂ was expressed as carbon mass produced per gram of dw soil per hour (mg of C g⁻¹ h⁻¹). After each measurement sampling, the flasks were opened under fume hood for 15 min to renew the atmosphere.

2.3 Stable isotope probing incubations

For stable isotope probing (SIP) experiments, two sets of soil samples were prepared in triplicates by spiking all samples with cellulose as described above. The first set was spiked with non-labelled cellulose (i.e. ¹²C-cellulose high DP from Zea mays, < 1.2 atom % ¹³C, IsoLife bv) and the second set was spiked with ¹³C uniformly labelled cellulose (¹³C-cellulose high DP from Zea mays, 97 atom % ¹³C, IsoLife bv). Both sets were prepared twice, one harvested at the beginning (T0) and the other incubated and harvested after 17 days (Tf). SIP incubation experimental design accounted 120 samples (10 soils in triplicates, spiked with ¹²C or ¹³C-cellulose and analysed at 2 times, T0 and Tf).

Each soil sample was placed in 125 ml Plasma glass flasks and rewetted using sterilized water to reach 80% WRC. Then, the T0 samples were directly harvested by freezing at -80°C. The Tf flasks were hermetically sealed and incubated for 17 days in darkness at 24°C, and the atmosphere flasks was renewing at 3 and 10 days. At 3, 10 and 17 days, CO₂ content in atmosphere flasks was measured as described above for soil respiration, and an aliquot (100 µl) of the flask atmosphere was sampled using gas syringe and injected into 10 ml vial (Exetainers® Labco) preliminary flushed with N₂, for δ¹³C-CO₂ measurement. Tf incubations were harvested by freezing at -80°C.

2.4 δ¹³C measurements

The measurements of ¹³C in soil (δ¹³C-soil) and in atmosphere flask (δ¹³C-CO₂) coming from SIP incubation were made by the PTEF platform (INRA, Champenoux, France). Before δ¹³C-soil measurements, soil samples (T0 and Tf) from SIP incubation stored at -80°C were freeze-dried and ground to 500 µm with a grinder (Mixed Mill MM 400, Retsch). δ¹³C-soil was measured from one aliquot of ca. 5 mg dw of each soil using an elemental analyser (vario ISOTOPE cube, Elementar, Hanau, Germany) interfaced in line with a gas isotope ratio mass spectrometer (IsoPrime 100, IsoPrime Ltd, Cheadle, UK; sensibility of 0.2‰). δ¹³C-CO₂ was measured from one aliquot of atmosphere flasks using a gas source stable isotope ratio mass spectrometer equipped with a Multi-flow automated preparation system (Multi-Flow®, IsoPrime, Cheadle,

Hulme, UK). $\delta^{13}\text{C}$ values were then transformed into $R^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ using the following formula: $R^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = R_{\text{VPDB}} \times (1 + \delta^{13}\text{C}/1000)$; with R_{VPDB} corresponding to 0.0112375, which is the $R^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ value of reference standard (Vienna Pee Dee Belemnite). Values of $\delta^{13}\text{C}\text{-CO}_2$ were transformed in percentage of mineralized ^{13}C -cellulose using CO_2 content values and C content of cellulose powder from *Zea mays* (42.3% of C in cellulose; measured using elemental analyser ThermosQuest CE Instruments FlashEA 1112).

2.5 DNA extraction, isopycnic ultracentrifugation and gradient fractionation

Total genomic DNA was extracted from *ca.* 300 mg dw soil (Tf samples) using a Fast DNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals, France), following the manufacturer's instructions. Then DNA was resuspended in 100 μl of DNase and pyrogen-free water. Concentration and purity (A_{260}/A_{280} ratio) were measured using a spectrophotometer (UV1800, Shimadzu) equipped with a TrayCell™ adapter (Hellma®). Heavy (^{13}C labelled) and light DNA (^{12}C) were separated according to the protocol described by Neufeld et al. (2007). Briefly, approximately 3 000 ng DNA (except sh-NM and sh-Uc, for which 900 ng DNA were used because lower genomic DNA quantity could be recovered from these soils) was added to Quick-Seal polyallomer tubes (13 x 51 mm, 5.1 ml, Beckman Coulter), along with gradient buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M KCl, 1 mM EDTA) mixed with CsCl solution, to a final buoyant density (BD) of $\approx 1.725 \text{ g ml}^{-1}$. Tubes were centrifuged at 42 400 rpm (*i.e.* 176 985 $\times g$; VTI 65.2 rotor, Beckman) at 20°C for 40 h. Following centrifugation, 13 fractions of *ca.* 400 μl were collected from each tube using a fraction recovery system (Beckman). The BD value of each fraction was then measured (by fraction weighting) and CsCl was removed by glycogen-assisted polyethelene glycol precipitation. DNA fractions were finally resuspended in 30 μl of TE buffer (pH 8.0).

2.6 ^{13}C labelled DNA isolation

In order to determine the distribution of heavy and light DNA, the abundance of 16S and 18S rRNA genes in each recovered fraction was quantified using real-time quantitative PCR. The qPCR assay were performed as described in Cébron et al. (2015) and Thion et al. (2012) by using the primers sets 968F/1401R (Felske et al., 1998) and Fung5F/FF390R (Lueders et al., 2004), for 16S and 18S rRNA genes, respectively. Briefly, the reaction mixture (20 μl) was composed of 10 μl of iQ SYBR green SuperMix (Bio-Rad), 0.8 μl of each primer (10 μM), 0.4 μl

of BSA (3%), 0.2 μl of DMSO, 0.08 μl of T4gp32 (MP Biomedicals, France), and 1 μl of DNA as a template (fraction DNA samples or 10-fold dilution series from 10^8 to 10^1 copies μl^{-1} of the standard plasmid). Quantification were performed using a CFX96 Real-Time PCR detection system (Bio-Rad), under the following conditions: an initial denaturation step at 95°C for 5 min, and then 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing at 56°C (for 16S rDNA) or 50°C (for 18S rDNA) for 20 s, extension at 72°C for 30 s, and measurement of SYBR Green signal intensities at 82°C for 5 s.

2.7 Identification of cellulose-responsive bacteria and fungi

Based on results of the distribution of heavy and light DNA in recovered fraction, we observed an enrichment of 16S and 18S rRNA genes in heavy fractions (number 6-7-8; i.e. BD from 1.742 to 1.733 g ml^{-1} ; **Figures S6.2 and S6.3**) of the incubation with ^{13}C -cellulose, indicating a significant use of ^{13}C from cellulose for bacterial and fungal growth. Given that cellulose degradation involves multiple enzymatic steps likely to be conducted by many microorganisms, we may have detected species unable to cleave cellulose but using secondary products of initial cellulose cleavage, in addition to species able to perform the first cellulose depolymerisation step. In order to identify these bacterial and fungal functional populations (i.e. cellulose-responsive microorganisms), we pooled 5 μl of the three fractions for each sample from ^{12}C and ^{13}C incubations. These pooled fractions were used as template to perform 16S rRNA gene amplicon libraries for Illumina MiSeq sequencing by Genewiz (South Plainfield, NJ, USA). To do so, the V3/V4 region of bacterial 16S rRNA genes (ca. 550 bp) was amplified using primers S-D-Bact-0341-a-S-17 and S-D-Bact-0787-b-A-20 (Muyzer et al., 1993; Caporaso et al., 2011) and following a previously described dual-index strategy (Kozich et al., 2013). Concerning 18S rRNA gene, the amplicon library preparation and Illumina sequencing were both performed by the Microsynth AG (Balgach, Switzerland) from 18S rRNA gene amplicons (V7/V8 region of ca. 390 bp) generated using the primer set FR1 and FF390 (Vainio and Hantula, 2000) fused with a partial sequencing adapter. Illumina MiSeq V2 Kit for 2 x 250 bp paired-end sequencing were performed for both 16S and 18S rDNA sequencing.

Both 16S and 18S rDNA PCR reactions were performed on 1 μl of the DNA-pooled fractions in a final volume of 50 μl , containing 10 μl of 5X Phusion HF buffer, 1.5 μl of 50 mM MgCl_2 , 0.25 μl of DMSO, 0.1 μl of T4gp32 (MPBiomedicals, France), 0.1 μl of Phusion high fidelity polymerase (Thermo Scientific), and 1 μl of each primer at 10 μM . For 16S rRNA gene, PCR reactions were heated at 94°C for 5 min, followed by 33 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at the

annealing temperature (18 cycles starting at 63°C, with a subsequent decrease of 0.5°C at each cycle, and 15 cycles at 54°C), 30 s at 72°C, and a final extension step of 7 min at 72°C. For 18S rRNA gene, PCR reactions consisted of heating at 94°C for 5 min, followed by 23 to 32 cycles (depending of the DNA sample) of 30 s at 94°C, 30 s at 54°C and 30 s at 72°C, and a final extension step of 7 min at 72°C. Amplification products were checked on 1% agarose gel electrophoresis. 16S rDNA amplicons were purified using the UltraClean-htp 96 Well PCR Clean-Up kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. After quantification using a Quant-iT Picogreen ds-DNA assay Kit (Invitrogen), a 16S rDNA amplicon library was prepared as an equimolar pool of amplicons (10 nM), purified on a QIAquick PCR purification kit column (Qiagen), and sent for sequencing.

Sequence data were analysed following the MiSeq SOP procedure available in March 2017 and described in Kozich et al. (2013), using Mothur v.1.36.0 (Schloss et al., 2009). Paired-end reads were trimmed to a minimum QScore of 20 (both 16S and 18S rRNA reads), and joined using the following criteria: no ambiguous bases, and 404 bp < length < 430 bp or 348 bp < length < 359 bp for 16S or 18S paired-end reads, respectively. Chimeras detected using Uchime (Edgar et al., 2011) and singletons (sequences appearing only once among all samples) were removed. Alignment of unique sequences and taxonomy was assigned using the Silva V132 database (released in Dec. 2017) with a cutoff = 80 and using the Wang method. Sequences affiliated to archaea, chloroplasts, unknown, mitochondria, and eukaryota were removed for 16S sequences, while sequences affiliated to archaea, chloroplasts, unknown, mitochondria, and bacteria were removed for 18S sequences. Bacterial and fungal sequences were clustered in Operational Taxonomic Units (OTUs) at 97% similarity. Finally, datasets were rarefied to the lowest number of sequences per sample (19 404 and 14 961 reads/sample for bacterial and fungal sequences, respectively).

2.8 Statistical analyses

All statistical analyses were performed using RStudio v1.1.442. In order to assess significant differences (¹³C mineralisation, 16S and 18S rRNA gene copy number) among soils, we used Kruskal-Wallis rank sum test followed by multiple comparison test included in the agricolae R package (Mendiburu, 2017). Linear correlations between all data were explored using rcorr function included in the Hmisc R package (Harell et al., 2018).

3 RESULTS

3.1 Respirations of initial soils

The soil basal respiration (BR) and respiration induced after cellulose addition (cellulose-SIR) were monitored during 21 days (**Figure S6.1**). Ctrl-Mo, ctrl-He and sh-Te showed the highest basal respiration activity, while sp-RM, sh-Uc and sh-NM showed the lowest one. The cumulative CO₂ production at the end of incubation was higher in cellulose-SIR than in BR, except for ctrl-He soil. Sh-Te and sp-MsM have the higher cellulose-SIR level compared to their BR, followed then by sh-Uc, sh-Ho and ctrl-Mo soils. Difference of CO₂ production between BR and cellulose-SIR at each time was also presented (**Figure S6.1**). Globally, we found that after 14-17 days of incubation, almost all soils showed a high difference in CO₂ production between the two conditions indicating that most of the spiked-cellulose has been degraded. Based on this observation, we choose to perform SIP incubation during 17 days.

3.2 ¹³C-cellulose mineralisation in soils

We measured cellulose mineralisation based on $\delta^{13}\text{C}$ level in soils and in atmosphere flasks (**Figure 6.1**). We are aware that similar mineralisation level does not necessary imply a similar cellulose degradation level, due to balance between C assimilation and mineralisation which depends on the type of microorganisms and on edaphic conditions. Percentage of mineralized ¹³C-celulose based $\delta^{13}\text{C}$ level in soils was variable among soils, ranging from 5.5% (sp-RM) to 70.8% (ctrl-Di). A negative percentage (-53.1%) of mineralised ¹³C was found for sh-NM soil, probably due to a higher mineralisation of ¹²C compounds than ¹³C-cellulose. Ctrl-Di and sp-Po soils presented the highest mineralised ¹³C, while sh-Te, sh-Uc, sp-MsM and sp-RM soils presented the lowest ¹³C mineralisation and sh-NM soil no detectable mineralisation (Kruskal Wallis test, $p = 0.001$). Also, we calculated the percentage of mineralised ¹³C-celulose based on $\delta^{13}\text{C}$ measures of the CO₂ produced during SIP experiment. These very sensitive measurements confirmed that sh-Uc and sh-NM soils did not mineralise the cellulose.

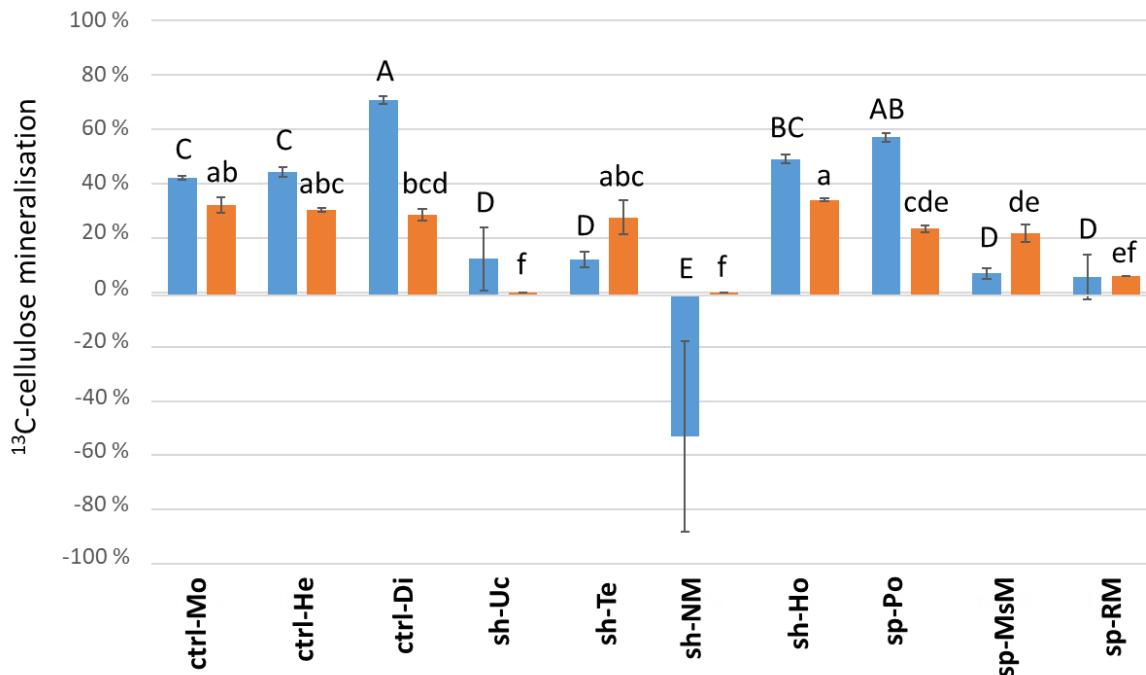


Figure 6.1. Percentage of ^{13}C mineralised during SIP incubation based on $\delta^{13}\text{C}$ measures on soil (blue) and CO_2 (orange). Error-bars represented the standard error of the mean ($n = 3$). Statistical differences of dissipated ^{13}C in soil and of mineralised ^{13}C -cellulose are indicated by capital and small letters, respectively (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). Percentage of mineralised ^{13}C -cellulose was calculated based on ^{13}C - CO_2 accumulated between 3-10 and 10-17 days of incubation, lacking the values between 0-3 days.

Interestingly, percentage of mineralized ^{13}C -cellulose based on $\delta^{13}\text{C}$ level in soils and in atmosphere flasks were both positively correlated to 16S rRNA gene abundance ($p = 0.01$, $R = 0.46$; $p = 0.001$, $R = 0.55$, respectively), to fungal richness (Chao1 index; $p = 0.002$, $R = 0.53$; $p = 0.008$, $R = 0.47$, respectively), and to DOC ($p = 0.006$, $R = 0.49$; $p = 2 \times 10^{-5}$, $R = 0.70$, respectively) and organic acid content ($p = 0.0004$, $R = 0.61$; $p = 2 \times 10^{-6}$, $R = 0.75$, respectively) of the ten unspiked-soils. Additionally, percentage of mineralised ^{13}C -cellulose based on $\delta^{13}\text{C}$ -soil showed a positive correlation with bacterial richness (Chao1 index; $p = 0.01$, $R = 0.45$), and a positive tendency with 18S rRNA gene abundance ($p = 0.056$, $R = 0.35$) of the ten unspiked-soils (**Figure 6.2**).

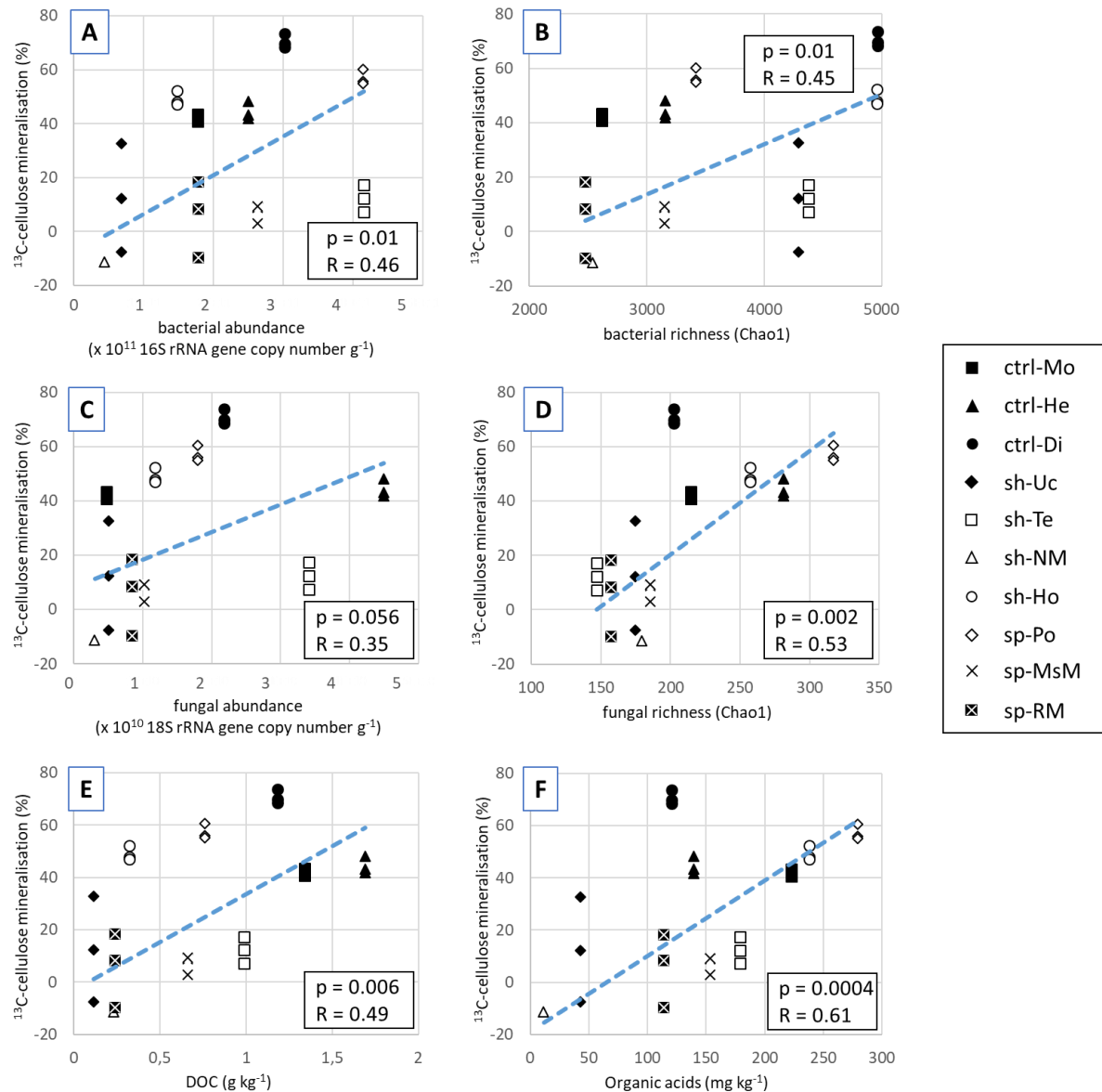


Figure 6.2. Correlation between the percentage of dissipated ^{13}C -cellulose mineralisation and biotic/abiotic factors measured on initial soils. Correlation with bacterial abundance and community richness (A and B), with fungal abundance and community richness (C and D), and dissolved organic carbon (DOC) and organic acid contents (E and F). ^{13}C -cellulose mineralisation value of the second replicate for sh-NM soil (i.e. -122.8%) was excluded from graphs but included in the correlation analysis.

3.3 Evidence for ¹³C-labelled DNA

Bacterial 16S rRNA (**Figure S6.2**) and fungal 18S rRNA (**Figure S6.3**) gene abundance were both quantified on the DNA fractions obtained after ultracentrifugation of gDNA from ¹²C-cellulose (control) and ¹³C-cellulose microcosms. The “heavy” DNA corresponded to the fractions with a buoyant density ranging from 1.742 to 1.733 g ml⁻¹, while most of the “light” DNA was in the fractions with buoyant density inferior to 1.719 g ml⁻¹. Higher number of 16S rRNA or 18S rRNA gene copies in the heavy DNA fractions collected from ¹³C microcosms than in the ¹²C controls highlighted the presence of ¹³C-labelled DNA belonging to the cellulose-responsive bacteria or fungi, respectively.

3.4 Identity of cellulose-responsive bacteria and fungi

Based on 16S and 18S rRNA gene quantification results, heavy fractions were pooled and used as template for 16S rDNA and 18S rDNA amplicon library for Illumina sequencing. A total of 6 683 951 and 4 043 425 reads were obtained after sequencing and 3 118 530 and 2 886 583 reads were kept after the trimming steps for 16S and 18S rDNA, respectively. To compare the samples, data were then rarefied to 19 404 and 14 961 reads per sample, for bacterial and fungal reads, respectively. OTUs sharing the same taxonomic affiliation were gathered in OTU groups. Bacterial and fungal OTU groups at least 3-fold and 2-fold more abundant in ¹³C than ¹²C microcosms heavy DNAs were considered as cellulose-responsive bacteria and fungi, respectively. Among them, OTU groups presenting an abundance of at least 2% and 1% (related to the whole of cellulose-responsive bacteria and fungi, respectively) were reported in **Figure 6.3** and **Figure 6.4** and considered as major cellulose-responsive bacteria and fungi, respectively.

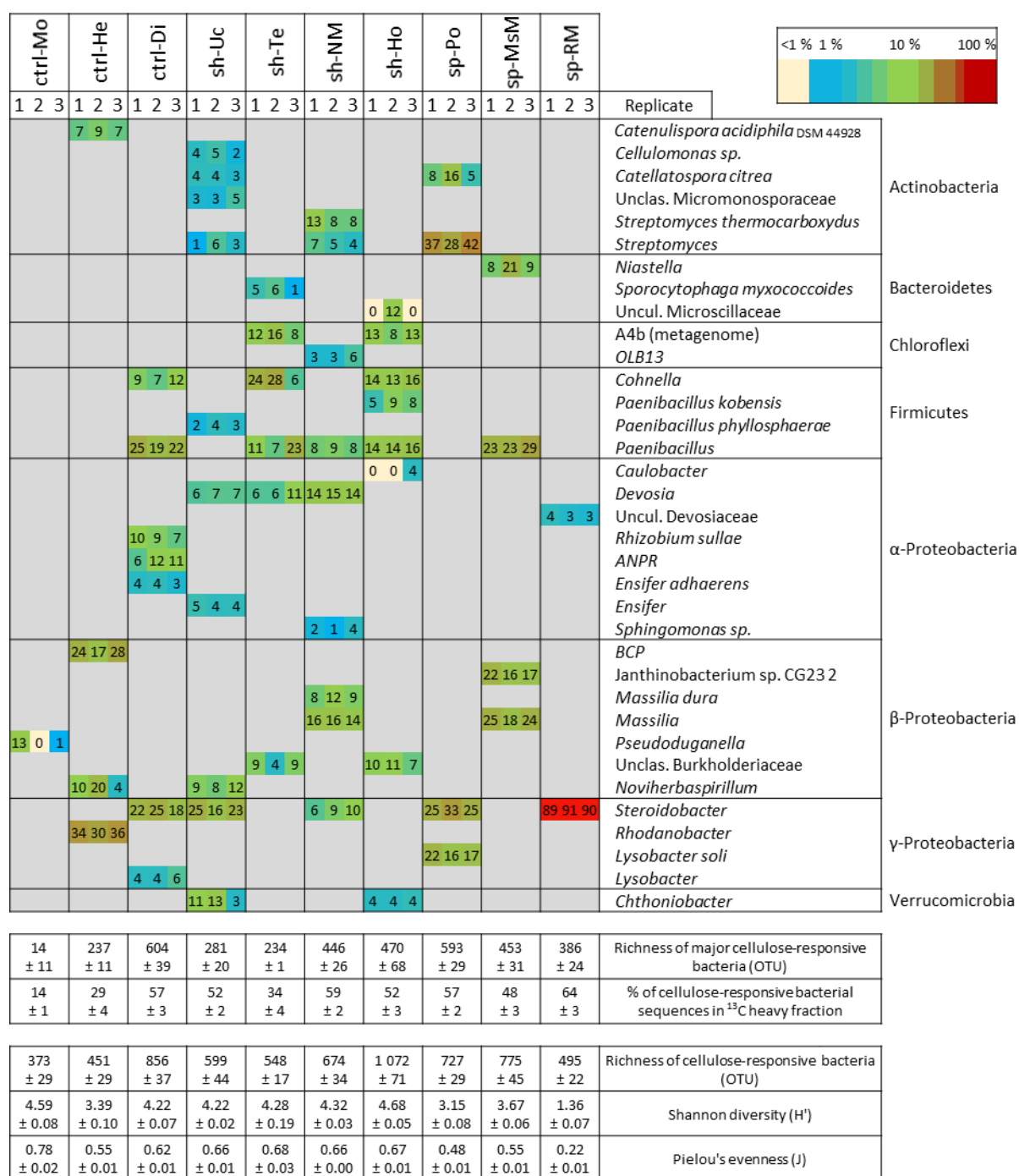


Figure 6.3. Abundance of OTU groups representing the major ¹³C-labelled cellulose-responsive bacteria. OTU groups with an abundance at least 3-fold higher in ¹³C than in ¹²C microcosms were considered as cellulose-responsive. Cellulose-responsive bacteria representing an abundance of at least 2% in one replicate in ¹³C microcosms were considered as major cellulose-responsive bacteria and are shown on the figure with their best taxonomic affiliation. Colour gradient represents abundance of OTU groups, related to the whole of cellulose-responsive bacteria. OTU groups originally classified as β -proteobacteriales order in the γ -Proteobacteria class (in Silva V132 database) were indicated as β -Proteobacteria. BCP and ANPR corresponded to *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* and *Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* genus, respectively.

Concerning bacteria, a total of 126 (sh-Uc) to 379 (sh-Ho) OTU groups (representing 373 to 1 072 OTUs) were highlighted as cellulose-responsive, while among them only 1 (ctrl-Mo) to 11 (sh-Uc) groups (representing 14 to 604 OTUs) were considered as major cellulose-responsive bacteria (**Figure 6.3**). Compared to the total number of 16S rDNA reads sequenced from ¹³C heavy DNA fractions, reads corresponding to cellulose-responsive bacteria represented 14% (ctrl-Mo) to 64% (sp-RM). In total, 40 different OTU groups were considered as major cellulose-responsive bacteria and were diversely distributed among soils. These OTU groups belonged to Actinobacteria, Bacteroidetes, Chloroflexi, Firmicutes, Verrucomicrobia and Proteobacteria (α , β and γ) phyla. Although the composition of cellulose-responsive bacteria varied strongly among soils, OTU groups corresponding to *Devosia*, *Streptomyces*, *Cohnella*, *Paenibacillus* and *Steroidobacter* genera were found in at least three soils each time. The four last genera represented a relatively important part of the cellulose-responsive bacterial population in various soils, such as *Cohnella* in Te (6-28%), *Steroidobacter* (25-33%) and *Streptomyces* (28-42%) in Po, and *Paenibacillus* in ctrl-Di (18-25%) and sp-MsM (23-29%). Relative abundance of *Steroidobacter* genus was also important in ctrl-Di (18-25%), sh-Uc (16-25%) and sp-RM (89-91%). Other OTU groups represented also a significant part of the cellulose-responsive bacterial population in one or two soils, such as *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (BCP; 17-28%) and *Rhodanobacter* (30-36%) genera in ctrl-He, *Janthinobacterium sp. CG232* (16-22%) and *Massilia genus* (18-25%) in sp-MsM, and *Lysobacter soli* (16-22%) in sp-Po. We calculated alpha diversity indices (i.e species richness, Shannon diversity and Pielou's evenness) describing cellulose-responsive bacterial population of each soil replicate (**Figure 6.3**), but none of them correlated with the ¹³C mineralisation level of the soils. However, we noted that the richness of the cellulose-responsive bacteria was positively correlated to the richness ($p = 0.0003$, $R = 0.62$), Shannon diversity ($p = 0.0002$, $R = 0.63$) and Pielou's evenness ($p = 0.0008$, $R = 0.58$) indices describing bacterial communities in initial unspiked soils.

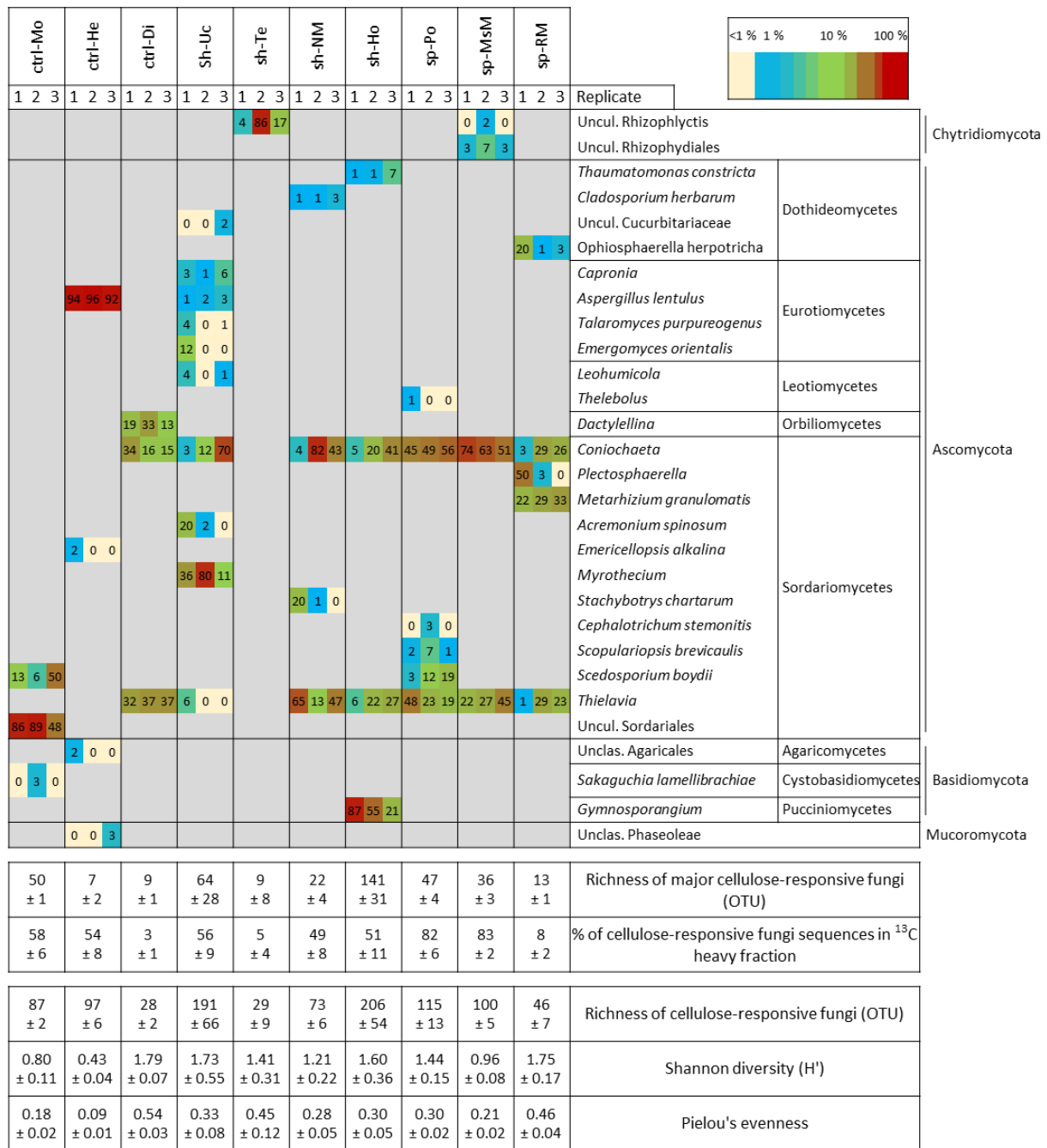


Figure 6.4. Abundance of OTU groups representing the major ¹³C-labelled cellulose-responsive fungi. OTU groups with an abundance at least 2-fold higher in ¹³C than in ¹²C microcosms were considered as cellulose-responsive. Cellulose-responsive fungi representing an abundance of at least 1% in one replicate in ¹³C microcosms were considered as major cellulose-responsive fungi and are shown on the figure with their best taxonomic affiliation. Colour gradient represents abundance of OTU groups, related to the whole of cellulose-responsive fungi.

Concerning fungi, a total of 17 (sh-Te) to 43 (sh-Ho) OTU groups constituted of 28 to 206 OTUs were highlighted as cellulose-responsive while among them, only 1 (sh-Te) to 10 (sh-Uc) OTU groups, corresponding to 9 to 141 OTUs, were considered as major cellulose-responsive fungi (**Figure 6.4**). Compared to the total number of 18S rDNA reads sequenced from ¹³C heavy DNA

fractions, reads corresponding to cellulose-responsive fungi represented in mean 3% (ctrl-Di) to 83% (sp-MsM). The low calculated abundance of sequences corresponding to cellulose-responsive fungi for ctrl-Di (3%), sh-Te (5%) and sp-RM (8%) is due to one highly dominant OTU in each soil representing 60 to 90% of the reads for both heavy DNA fraction coming from ^{12}C and ^{13}C microcosms. In ctrl-Di and sh-Te, this OTU corresponded to *Gymnosporangium* genus, while in sp-RM, it belonged to *Dactylellina* genus. Based on 18S rRNA quantifications in heavy DNA fractions, these OTUs were probably more abundant in ^{13}C than ^{12}C microcosms, but their relative proportion was similar in the two conditions, preventing to conclude on the implication of these OTUs in the cellulose degradation. In total, 29 OTU groups were considered as major cellulose-responsive fungi and belonged to Chytridiomycota, Mucoromycota, Basidiomycota and Ascomycota (mostly Sordariomycetes class) divisions; the latter being dominant for almost all soils. Depending on the soil, major cellulose-responsive fungi were mainly affiliated to *Aspergillus lentulus*, to *Coniochaeta*, *Myrothecium*, *Thielavia* and *Gymnosporangium* genera, to uncultured genera of Rhizosphlyctis family and to uncultured members of Sordariales order. In Sordariomycetes (Ascomycota), OTUs affiliated to *Coniochaeta* and *Thielavia* genera were always found together, and constituted dominant cellulose-responsive fungi in most of soils. Indeed, together they represented 52-67% in ctrl-Di, 72-92% in sp-Po, 69-90% in sh-NM and 90-96% in sp-MsM, of the cellulose-responsive fungi. Additionally, we noted that they represented, respectively, 11-67% and 10-71% of cellulose-responsive fungi in sh-Ho and sh-Uc soils, while *Gymnosporangium* (21-87%) and *Myrothecium* (11-80%) genera represented also a significant part in sh-Ho and sh-Uc soils, respectively, depending on the soil replicates. As for cellulose-responsive bacteria, we calculated alpha diversity index describing cellulose-responsive fungal population of each soil replicate (**Figure 6.4**). We found that Shannon diversity and Pielou's evenness indices describing cellulose-responsive fungal population were both negatively correlated to Shannon diversity ($p = 0.005$, $R = -0.49$ and $p = 0.009$, $R = -0.47$, respectively) and Pielou's evenness ($p = 0.004$, $R = -0.51$ and $p = 0.01$, $R = -0.46$, respectively) indices describing fungal community of initial soils. Additionally, Shannon diversity index of cellulose-responsive fungi was negatively correlated to soil DOC concentration ($p = 0.005$, $R = -0.49$).

4 DISCUSSION

We investigated ^{13}C -cellulose mineralisation and identified bacteria and fungi involved in this process in a collection of ten soils showing a gradient of anthropisation represented by PAH and metallic pollutions.

We first explored whether the functions involved in the cellulose degradation process were maintained among the soil collection, even in the most polluted soils. Complete cellulose degradation involves multiple enzymatic steps, releasing by-products such as cellobiose, glucose and high molecular weight oligosaccharides (Lynd et al., 2002), conducting to assimilation and mineralisation processes. Although we are aware that the balance between C assimilation and mineralisation depends on the type of microorganisms and on environmental conditions, we used the soil $\delta^{13}\text{C}$ -soil data corresponding to the mineralisation levels as a proxy to estimate cellulose degradation. The cellulose mineralisation level was highly variable among our soils, indicating that even if present in soil these key-functions of the carbon cycle are not always as effective. Given that microbial cellulose degradation is responsible for one of the largest carbon flow in the biosphere (Lynd et al., 2002) one wonders whether a reduction of cellulose degradation rate could induce a malfunction of the carbon cycle. Plant material or cellulose decomposition has been described as a good bioindicator of ecosystem resistance/resilience after perturbation (Griffiths et al., 2001a), responding to agricultural management practices (Pankhurst et al., 1995) or soil degradation (Straalen and Krivolutsky, 1996). Indeed, this process is mostly influenced by soil physico-chemical properties (Schmidt and Ruschmeyer, 1958; Federle and Vestal, 1980) and microbial community (Hu and van Bruggen, 1997). In our study, the cellulose mineralisation level seemed to be slightly affected by soil pollution and properties, and plant cover while it depended mostly on the microbial communities inhabiting the soils.

Although the soils having the lowest cellulose mineralisation level (i.e. sh-Uc, sh-Te, sp-MsM, and sp-RM) were among the polluted ones, no correlation was found between the cellulose mineralisation and the soil pollution level. Similarly, previous studies did not establish a link between the pollution (e.g. metal, oil) level and the cellulose degradation (Post and Beeby, 1996; Mendelssohn and Slocum, 2004), although Chew et al. (2001) found that cellulose degradation rate was lower in high metal-polluted soils than in uncontaminated ones. One of the polluted soils (sh-NM) showed no (i.e. negative) ^{13}C -cellulose mineralisation during the experiment. Given that sh-NM soil was colonized *in situ* only by sparse herbaceous vegetation and no tree, we assumed that soil microbial communities were less adapted to litter

degradation and that microorganisms able to perform cellulose degradation were poorly represented. However, this hypothesis was refuted by Guenet et al. (2011), who showed that cellulose was mineralised as well in long-term bare fallow as in arable soil, indicating that metabolic capacities are kept for a long time. Then, ^{13}C -cellulose could be partly degraded in sh-NM soil but mainly used via assimilation pathway and therefore do not produce ^{13}C - CO_2 . The cellulose mineralisation was positively correlated to soil dissolved organic carbon and organic acid contents. The use of easily available carbon sources could provide energy to microbial growth and enhance synthesis of enzymes involved in cellulose degradation through co-metabolism (Kuzyakov et al., 2000; Pascual et al., 1998).

Moreover, bacterial and fungal abundance were also positively correlated to dissolved organic carbon content ($p = 0.003$, $R = 0.52$ and $p = 0.00001$, $R = 0.71$, for bacteria and fungi, respectively). Similarly, it was previously shown that, at short-term, the cellulose mineralisation was related to microbial biomass (Torres et al., 2014). One explanation could be that higher microbial abundance and activity could increase the release of dissolved organic carbon substrates enhancing the global microbial activities.

Positive relationships between cellulose mineralisation and total microbial (bacteria and fungi) richness and abundance were found. This was in accordance with the biodiversity ecosystem functioning conceptual framework (Loreau et al., 2002) which showed that higher biodiversity permits to maximize ecosystem processes. In this context, our results could be explained by three mechanisms. First, a highly diversified community has a greater chance of including species able to perform or be involved in cellulose degradation (i.e. sampling effect hypothesis; Hector et al., 2002). Secondly, the greater is the community, the higher is the chance to find species contributing indirectly to improve cellulose degradation through facilitation: e.g. nutrient acquisition (Hättenschwiler et al., 2005) or bacteria migration thanks to “fungal highway” (Yang and van Elsas, 2018). Third, as the cellulose degradation process is the result of multiple enzymatic reactions performed by various enzyme families, which can be produced by various microorganisms (Lynd et al., 2002), a metabolic complementarity between species could establish more easily in a soil having higher microbial diversity and abundance according to additive or synergistic effect of enzyme activities (Teeri, 1997; Lynd et al., 2002).

Our second objective was to see whether the active cellulose-responsive microbes are different depending on the pollution level of soils. Active cellulose-responsive bacteria and fungi were identified using the stable isotope probing technique. We noted that all soils

presented ^{13}C -labelling of their DNA, even if low or no cellulose mineralisation was detected, suggesting that microbes involved in cellulose degradation were active even at basal level in all soils, favouring in some cases the C-assimilation instead of mineralisation. Moreover, even if fungi are major cellulose-responsive microbes in the ten studied soils, the activity of bacteria (based on ^{13}C -labelling) was more variable depending on the soil. The cellulose mineralisation level did not depend on the diversity level of the cellulose-responsive bacteria and fungi. However, cellulose-responsive bacterial and fungal richnesses were positively and negatively correlated to the diversity of bacterial and fungal communities initially present in the soils, respectively. These opposite results between cellulose-responsive bacterial and fungal populations having different size, growth form and ecological niches (Boer et al., 2005), also highlight that different mechanisms probably drive activity and implication of bacteria and fungi in cellulose degradation. The negative relationship for cellulose responsive fungi could be explained by *in situ* enrichment of cellulose-degraders in soil before SIP incubation as observed in Eichorst and Kuske (2012).

When considering all soils, a large number of bacterial and fungal OTUs (gathered in OTU groups) were identified as cellulose-responsive. It is currently assumed that while cellulolytic capacities are common to various fungi (Boer et al., 2005), these capacities are restricted to certain groups of bacteria phylogenetically diverse (Lynd et al., 2002; Schellenberger et al., 2010; Štursová et al., 2012). No cellulose-responsive bacterial OTU group was found strongly dominant in soils (except in sp-RM soil). It is not really surprising that large diversity and no strongly dominant OTU was observed, given that the ability to hydrolyse cellulose or to use cellulose-derived-sugars is relatively widespread among bacteria (Lynd et al., 2002). The identified cellulose-responsive bacteria belong to a large diversity of phylum (α -, β -, γ -Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Chloroflexi and Verrucomicrobia). Similarly, when studying cellulose-responsive microorganisms, Eichorst and Kuske (2012) found also a high diversity that was generally unique to a certain soil type. OTUs belonging to *Cohnella*, *Streptomyces*, *Paenibacillus* and *Steroidobacter* genera were found in at least three soils and represented a significant part (ca. in mean 20-30%) of the ^{13}C -labelled bacteria. *Cohnella* is a bacterial genus accounting cellulolytic species isolated from a variety of habitats, such as compost (Eida et al., 2012), fresh water ecosystem (Shiratori et al., 2010) or buffalo faeces (Khiangam et al., 2012). Similarly, various strains of *Paenibacillus* were isolated or identified for their capacity to hydrolyse cellulose in decaying native forest (Ghio et al., 2012) and agricultural (Schellenberger et al., 2010) soils, or in sediments (Kim et al., 2018). *Streptomyces* genus is well-known to contain a variety of cellulolytic strains (Lynd et al., 2002)

and was, for example, found in other SIP experiment using ^{13}C maize residues (Fan et al., 2014). Finally, *Steroidobacter* genus was also highlighted as involved in maize residue degradation (Fan et al., 2014). In this study, the authors found that phylotypes affiliated to *Steroidobacter* were only present at the beginning of degradation, and suggested that these pioneer decomposers may be considered as r-strategist C-cycling taxa. OTUs affiliated to *Steroidobacter* genus were dominant (ca. 85% of bacterial cellulose-responsive population) in sp-RM soil. Previously, we found that sp-RM soil had the lowest metabolic activity (based on Biolog[®] microplate assay), mainly explained by the high metallic contamination (Lemmel et al., in press; chap. 3). Sp-RM had also the lowest average bacterial richness. The metallic toxicity could have reduced bacterial richness, possibly decreasing the diversity of cellulose-responsive bacteria, allowing *Steroidobacter* to be the single dominant taxa actively involved in cellulose degradation process.

Among all the fungal OTUs identified as active cellulose-responsive, only a low number of them were dominant. It is important to note that some OTUs were detected at a similar proportion in ^{12}C and ^{13}C DNA, avoiding to conclude that these species were involved in cellulose degradation, but relative to the DNA content these OTUs still had a very strong increase in their abundance. Similar data were previously described by Bastias et al. (2009) concluding that most fungi in soil incorporated ^{13}C from cellulose. However, some OTUs have been identified as significantly enriched. Most of these fungal OTUs were affiliated to Basidiomycota and Ascomycota, two divisions well-known to contain large numbers of cellulolytic species (Lynd et al., 2002). Among them, various OTU groups were found highly dominant in one soil, such as those affiliated to *Aspergillus lentulus* (ctrl-He), *Myrothecium* genus (sh-Uc) and Sordariales order (ctrl-Mo). When considering the ten soils, OTUs belonging to *Coniochaeta* and *Thielavia* genera were the main cellulose-responsive fungi because they were dominant in almost all soils. Interestingly, they were always found together, but at variable relative proportion, depending on the soil. From literature, various *Coniochaeta* species were described as cellulolytic through identification of cellulolytic enzymes (Ravindran et al., 2012) or by hemicellulose, cellulose and lignin degradation measurement (Lopez et al., 2007). Although only few *Thielavia* species were studied, cellulolytic activity within this genus was also reported by Langston et al. (2012) which showed that *Thielavia terrestris* secrete a complete set of enzymes for breakdown of lignocellulosic biomass. Additionally, *Coniochaeta* and *Thielavia* genera dominate the cellulose-responsive fungal population of PAH and/or metal polluted soils. Thus, we hypothesized that *Coniochaeta* and *Thielavia* genus probably have a better capacity to tolerate pollution than other fungi in our soils, explaining at least

partly their dominance in most of our polluted soils. Given that lignocellulose degrading enzymes are known to be able to act on PAH and initiate their degradation, *Coniochaeta* and *Thielavia* could be able to detoxify their close environment, providing them an advantage toward other fungi in PAH-contaminated soils. Additionally, *Coniochaeta fodinicola* tolerated high concentrations of metals (Russo et al., 2016), while *Thielavia* developed in lead-rich solid industrial waste (Silva Júnior et al., 2014) and in green roofs in New York City, a place subject to atmospheric deposition of metal elements and other pollutants (McGuire et al., 2013). Then, *Coniochaeta* and *Thielavia* are probably well adapted to both organic and metallic pollutions.

5 CONCLUSION

We studied degradation of ^{13}C -cellulose (i.e. through mineralisation) and identified cellulose-responsive bacteria and fungi in ten differently anthropised soils with a multi-pollution gradient. The cellulose mineralisation level was different among our soils and not directly linked to soil contamination level. However, our results suggest that cellulose mineralisation was slightly affected by soil pollution, plant cover and dissolved organic carbon content, but depended mainly on soil microbial communities. Indeed, cellulose mineralisation level was positively related to microbial (bacteria and fungi) richness and abundance, which could be explained by various mechanisms, possibly different between bacteria and fungi, such as facilitation and metabolic complementarity. Stable isotope probing allowed identification of various bacterial and fungal taxa that were involved in cellulose degradation in all soils, suggesting that cellulolytic microbes were present in all soils. Although no taxa were strongly dominant among cellulose-responsive bacteria, *Coniochaeta* and *Thielavia* genera were always found together and dominated cellulose-responsive fungal populations in almost all soils. Various members of these genera are known to be cellulolytic, but are also found in PAH or metal contaminated environments, which could explain their dominance, especially in polluted soils.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge Arcelor Mittal, EPFL, GISFI, ONF, and LTO of Montiers (ANDRA/INRA, M.P. Turpault and S. Uroz) for giving us access to the different sampling sites. We thank S. Uroz for access to ultracentrifuge and methodological advises. This work was funded by the French national program EC2CO (EcobioS project) and the OSU-OteLo (TraitMic project).

Chapitre 7 :
Discussion générale & Perspectives

Ces travaux de thèse avaient pour but d'étudier l'impact d'une multi-contamination à long terme sur les diversités taxonomique et fonctionnelle des communautés microbiennes en lien avec le cycle du carbone, mais aussi de mieux comprendre le lien qui unit ces deux diversités. L'originalité de ces travaux réside dans le choix d'étudier l'impact d'une multi-contamination ancienne des sols, dont les effets sont multiples mais difficilement prévisibles eu égard à la complexité inhérente aux sols. Le peu de travaux concernant l'impact d'une multi-contamination sur les communautés microbiennes et les résultats contrastés rapportés témoignent aussi de l'intérêt de cette étude. Plus globalement, au travers de l'étude de fonctions en lien avec le cycle du carbone, ces travaux de thèse s'intègrent aussi dans une problématique actuelle de meilleure gestion et de requalification des sols de friches industrielles, qui passe notamment par une meilleure compréhension du fonctionnement de ces écosystèmes perturbés afin de pouvoir adapter au mieux les choix de réutilisation de ces surfaces.

L'impact de la contamination (e.g. hydrocarbures, métaux, pesticides) sur les diversités taxonomique et fonctionnelle microbiennes des sols est majoritairement étudié en comparant l'effet d'un type de pollution à la fois, souvent sur peu de sols. Or, les différents types de pollution sont connus pour induire des effets différents, et parfois impacter les communautés microbiennes de manière synergique. En outre, l'impact de la pollution du sol sur les communautés microbiennes peut également varier dans le temps, conduisant à des observations différentes selon que l'on s'intéresse à une pollution fraîche ou ancienne. Dans ces travaux de thèse, nous avons travaillé sur une collection de 10 sols présentant une multi-pollution ancienne estimée à 30-40 ans, d'après les dates d'arrêt des activités industrielles. Par ailleurs, ces sols ont été classés en trois groupes correspondant à leurs usages passés, sur la base de leurs caractéristiques physico-chimiques et de leurs teneurs en polluants. Les sols « contrôles » étaient les moins contaminés par des ETM et des HAP. Parmi les sols pollués, les crassiers sidérurgiques (i.e. *slag heap*) présentaient une forte pollution par des HAP et un niveau de contamination intermédiaire par des ETM, tandis que les bassins à boues (i.e. *settling pond*) étaient caractérisés par une forte teneur en ETM et une concentration intermédiaire de HAP.

1 QUELLE EST L'INFLUENCE DE LA POLLUTION HISTORIQUE DES SOLS SUR LA DIVERSITE TAXONOMIQUE MICROBIENNE ?

Nous avons mis en évidence que la multi-pollution des sols de friches a modifié la composition des communautés bactériennes et fongiques, mais différemment selon le type de polluant. En effet, les pollutions par des HAP et des ETM ont toutes deux favorisé différents taxa bactériens (e.g. HAP : Nitrospirae ; ETM : Chloroflexi), tandis que seule la pollution par des ETM a eu un impact négatif sur l'abondance d'autres taxa bactériens (e.g. OTUs affiliées aux Verrucomicrobia). De manière similaire, certains taxa fongiques ont été globalement favorisés dans les sols pollués (e.g. Cryptomycota) tandis que d'autres étaient plus abondants dans les sols contrôles (e.g. Agaricomycètes), mais ces taxa n'étaient pas directement corrélés à la teneur en polluant, excepté les Dothideomycetes, d'autant plus abondants que les sols étaient pollués par des HAP.

De manière intéressante, nous avons également noté que les communautés des bassins à boues, majoritairement pollués par des ETM, avaient la plus forte proportion d'OTUs bactériennes et fongiques « *unclassified* ». Etant donné que la qualité des séquences n'était pas différente entre les sols et que les chimères ont été retirées durant l'analyse, ces OTUs ne semblent pas être des artefacts et constituent donc une diversité encore inconnue, qui pourrait contenir des espèces propres aux sols fortement contaminés par des ETM. Dans ces travaux, les alignements des séquences d'ARNr 16S et 18S ont été réalisés vis-à-vis de la base de données Silva. Il serait intéressant de réaliser un alignement en utilisant d'autres bases de données telles que les bases RDP (i.e. Ribosomal Database Project ; uniquement pour les séquences d'ARNr 16S) ou BLAST, qui sont parfois plus adaptées pour des échantillons environnementaux. De la même manière, on peut se demander si le résultat serait similaire en ciblant les ITS fongiques plutôt que leur ARNr 18S. Il est probable que les efforts constants pour alimenter les bases de données actuelles permettront, dans les prochaines années, d'identifier ces OTUs inconnues.

Bien que la pollution ait contribué à modifier la composition des communautés, les indices de diversité taxonomique n'étaient pas significativement différents entre sols pollués et sols contrôles, mais dépendaient plutôt d'autres propriétés des sols (par exemple de la texture, avec notamment une relation positive avec la fraction sableuse). A l'inverse, aucune caractéristique des sols n'expliquait les variations des indices de diversité fongique. Pour conforter nos observations concernant ce lien entre la diversité taxonomique et la pollution et/ou la physico-chimie des sols, il serait intéressant d'analyser un plus grand nombre de sols,

représentant des situations encore plus contrastées en termes de teneurs en polluants, permettant de réaliser des analyses statistiques plus robustes. Par ailleurs, même si en pratique cela est utopique pour des sols « naturels », constituer une collection de sols où seul le paramètre étudié (pollution, multi-pollution) varie permettrait de réaliser des études précises et robustes sans éventuels effets confondants dus à la variation d'autres paramètres.

Pourtant, nos résultats montrent aussi des indices de diversité bactérienne et fongique similaires entre sols contrôles et sols pollués, suggérant une possible adaptation des communautés des sols pollués. On pourrait se demander si cette adaptation des communautés à la pollution les a rendus plus, ou au contraire moins, robustes et stables face à un second stress. La littérature fournit des résultats contradictoires à ce sujet (Azarbad et al., 2016). Il serait donc intéressant d'analyser l'impact d'un nouveau stress (i.e. approche « *stress on stress* »), e.g. stress hydrique, sur la stabilité des communautés dans nos sols, en particulier les plus pollués. La stabilité des communautés d'un point de vue fonctionnel est également essentielle, puisqu'elle conditionne la réponse d'un écosystème face à des perturbations. Ainsi une grande diversité taxonomique n'est pas forcément garante d'une grande diversité de fonctions et d'un bon fonctionnement de l'écosystème. En effet, des microorganismes ayant une même affiliation taxonomique peuvent réaliser des fonctions différentes (e.g. suite à un transfert de gènes). A l'inverse, une même fonction peut également être réalisée par des taxa différents (e.g. fonction de dégradation du phénanthrène réalisée par de nombreuses espèces de Protéobactéries et Actinobactéries, e.g. *Pseudomonas* et *Mycobacterium* ; Ghosal et al., 2016). Ainsi, l'étude de la diversité fonctionnelle est également nécessaire pour comprendre l'impact de la multi-contamination sur le fonctionnement du sol.

2 LA DIVERSITE FONCTIONNELLE MICROBIENNE EST-ELLE IMPACTEE PAR LA POLLUTION DES SOLS ?

Dans ces travaux de thèse, la diversité fonctionnelle a été étudiée en ciblant les fonctions de dégradation d'une variété de substrats carbonés simples, à l'aide de microplaques Biolog® et MicroResp™, ou *via* des expériences de SIP en microcosmes ciblant la fonction de dégradation de substrats plus complexes.

Nous avons montré que la diversité fonctionnelle métabolique mesurée à partir d'une suspension de sol (microplaques Biolog®) était différente selon les sols et d'autant plus réduite que le sol était contaminé par des ETM, en particulier le zinc. Néanmoins, cette réduction de la diversité et de l'activité métabolique s'accompagnait d'une résistance accrue à la

contamination par le zinc, suggérant une adaptation des communautés à la pollution métallique. A contrario, la diversité fonctionnelle métabolique mesurée directement dans le sol (microplaques MicroResp™) était similaire entre les sols, probablement dû au faible nombre de substrats testés. Cependant, le niveau d'activité métabolique dans les sols était positivement lié à leur teneur totale en azote, suggérant que cet élément était limitant dans les sols étudiés.

Dans les expériences en microcosmes, nous avons étudié les fonctions de dégradation du phénanthrène et de la cellulose, choisis respectivement comme composés complexes modèles anthropiques et naturels. La dégradation de ces composés avait également été testée en microplaque Biolog® mais n'était pas significative, probablement en raison du temps d'incubation trop court et à la faible solubilité de ces composés dans l'eau. Nous avons observé que le potentiel de dégradation des HAP (basé sur l'abondance des gènes codant des HAP-dioxygénases) était d'autant plus élevé que les sols étaient contaminés par des HAP. Cela indique une sélection des microorganismes capables de dégrader les HAP dans les sols contaminés par ce type de pollution. Un potentiel fonctionnel élevé pourrait indiquer une meilleure capacité à réaliser une fonction, dans notre cas à dégrader une pollution fraîche par des HAP. Pour autant, les taux de dégradation du phénanthrène étaient variables entre les sols et sans lien avec leur niveau de pollution. De manière similaire, selon les sols, la cellulose a été minéralisée à des taux variables, voire nuls, et sans lien avec la pollution du sol. En outre, nous avons mis en évidence des microorganismes impliqués dans la dégradation du phénanthrène ou de la cellulose (marquage ^{13}C) dans chacun des 10 sols, indiquant que les fonctions de dégradation de ces 2 composés étaient présentes et s'exprimaient dans tous les sols, quel que soit le niveau de pollution. Ces différents résultats soulignent l'importance de la mesure de l'activité associée à une fonction. En effet, le potentiel fonctionnel basé sur la présence d'un gène est un bon indicateur de la présence des fonctions et permet d'estimer la diversité fonctionnelle. Toutefois, ce potentiel ne fait qu'indiquer la présence de la fonction, mais ne garantit pas qu'elle soit réellement exprimée dans les conditions environnementales. Il serait intéressant de cibler un plus grand nombre de fonctions pour confirmer ou infirmer nos différents résultats. Pour cela, nous pourrions d'abord estimer le potentiel fonctionnel *via* des analyses de méta-génomique (Jung et al., 2016) ou encore utiliser des outils tels que les puces à ADN. Par exemple, Azarbad et al. (2015) ont montré, *via* des puces GeoChip 4.2, que la diversité fonctionnelle potentielle était similaire le long d'un gradient de contamination métallique, mais que certaines catégories de gènes fonctionnels, tels que les gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques, étaient négativement affectés par le niveau de pollution.

Néanmoins, pour s'adresser aux fonctions réellement exprimées, des mesures d'activités enzymatiques (Wang et al., 2007) ou encore des analyses de méta-transcriptomiques (Bailly et al., 2007; Ranjan et al., 2018) ou méta-protéomiques (Heyer et al., 2017; Jia et al., 2017) seraient nécessaires.

Globalement, les différents résultats obtenus suggèrent que la pollution par des ETM a induit une sélection des communautés microbiennes, réduisant leur diversité fonctionnelle et les activités métaboliques de dégradation de substrats simples, tout en favorisant la fonction de résistance aux ETM. À l'inverse, la sélection des communautés par les HAP a favorisé la présence de la fonction de dégradation des HAP, mais ne semble pas avoir eu d'impact négatif sur les autres fonctions. Toutefois, la réduction de la diversité des fonctions de dégradation de substrats simples est à considérer avec prudence, puisque les fonctions de dégradation des deux substrats complexes étaient présentes et s'exprimaient dans tous les sols, même les plus multi-contaminés. Or, les fonctions de dégradation de substrats complexes sont supposées plus sensibles à la pollution car elles impliquent des organismes plus spécialisés et sont probablement moins redondantes que les fonctions de dégradation de substrats simples (Maron et al., 2018). Comment expliquer alors que des fonctions de dégradation de substrats simples ne soient pas présentes dans les sols les plus pollués alors que celles de substrats plus complexes le sont ? On peut se demander si cette différence vient de la méthode de mesure utilisée. L'étude de la dégradation des substrats simples en microplaque Biolog® montre clairement une réduction de l'activité métabolique et du nombre de substrats significativement dégradés. Mais ce faible nombre de substrats dégradés après un temps défini ne serait-il que la conséquence d'un temps d'incubation trop court et d'une réduction de l'activité métabolique dans les sols pollués par des ETM ? Une hypothèse serait que la pollution par des ETM a réduit les activités métaboliques, réduisant fortement l'expression des fonctions de dégradation, sans toutefois totalement les faire disparaître. En effet, une telle observation a été faite pour la fonction de dégradation de la cellulose (SIP), pour laquelle les activités les plus faibles sont celles observées pour les sols contaminés. Les mesures d'activités de dégradations des substrats dans les sols (microplaque MicroResp™ et microcosmes de SIP) indiquent que les taux de dégradations sont aussi contrôlés par la teneur en nutriments des sols et la diversité des communautés microbiennes. Mais de quelle manière la diversité microbienne impact-t-elle la diversité et l'expression des fonctions ? Le/les lien(s) unissant la diversité taxonomique et la diversité fonctionnelle restent à établir.

3 QUEL LIEN UNIT LES DIVERSITES TAXONOMIQUE ET FONCTIONNELLE ?

Dans la littérature, le lien entre diversité taxonomique et diversité fonctionnelle est de plus en plus étudié en écologie microbienne, notamment en analysant l'effet d'une érosion de la diversité microbienne sur le fonctionnement de certains processus. Il a été montré qu'une diminution de la diversité microbienne réduit la décomposition de la matière organique et que la redondance des fonctions de dégradation diminue avec la récalcitrance des sources de carbone (Maron et al., 2018). Ce résultat appuie l'hypothèse d'assurance écologique qui suppose qu'un nombre minimal d'espèces est essentiel pour maintenir des processus stables (Yachi and Loreau, 1999). A l'inverse, d'autres études montrent que même après une très forte réduction de la richesse bactérienne, ni les processus de minéralisation du carbone, ni les processus de dénitrification/nitrification n'étaient affectés, suggérant une forte redondance des fonctions impliquées dans ces processus (Wertz et al., 2006). Ces résultats montrent bien que la relation entre diversité/richeesse et fonctions microbiennes reste encore controversée et implique probablement différents mécanismes selon la fonction considérée, comme suggéré dans les études de Griffiths et al. (2000, 2001b).

Dans ces travaux de thèse nous avons d'abord estimé séparément la diversité taxonomique et la diversité fonctionnelle des communautés. Or, en étudiant ces deux diversités séparément, la relation qui les unit ne peut être établie qu'indirectement via des analyses statistiques. De cette manière, aucun lien n'a pu être mis en évidence. Alors, dans la 2^{ème} partie de ces travaux, nous avons utilisé la technique de *stable isotope probing*, qui présente l'énorme avantage de pouvoir identifier les microorganismes actifs dans l'utilisation d'un composé marqué par un isotope et donc d'établir un lien direct entre une fonction et une diversité taxonomique. Toutefois, cette technique présente certains biais dont il faut avoir conscience. En effet, elle ne permet d'identifier que les microorganismes ayant assimilé l'isotope du composé dégradé dans leur biomasse (e.g. ADN, PLFA), oubliant les microorganismes dégradant le composé sans l'assimiler (i.e. minéralisation uniquement ou co-métabolisme). En outre, les microorganismes à métabolisme rapide (*r-strategist*) seront d'avantage marqués que les microorganismes à métabolisme plus lent (*k-strategist*). Enfin, le choix des substrats utilisables est dépendant de leur disponibilité commerciale sous forme marquée, ce qui peut poser problème, par exemple pour des substrats très complexes ou difficiles à synthétiser/obtenir sous forme pure.

Dans les expériences de SIP réalisées au cours de cette thèse, nous avons mis en évidence une grande diversité de microorganismes actifs dans la dégradation du phénanthrène et de la cellulose, indiquant que les fonctions de dégradation de ces deux composés sont redondantes dans les communautés microbiennes des sols de la collection. Il faut toutefois noter que seules des bactéries ont été identifiées dans les populations dégradant le phénanthrène, tandis que les populations dégradant la cellulose étaient composées d'acteurs bactériens et fongiques. Ce résultat pourrait suggérer que la fonction de dégradation de la cellulose est plus répandue à travers les microorganismes que celle du phénanthrène, et donc davantage redondante. Toutefois, les champignons sont connus pour contribuer de manière indirecte (co-métabolisme) à la dégradation des HAP (Cerniglia and Sutherland, 2010) sans utiliser leur carbone pour synthétiser de la biomasse ; ils ne seraient donc pas marqués durant les expériences de SIP. Ainsi, nous ne pouvons exclure un rôle de certains champignons dans la dégradation du phénanthrène dans nos sols. Par ailleurs, les taux de dégradation/minéralisation du phénanthrène et de la cellulose étaient positivement corrélés à la richesse bactérienne (phénanthrène et cellulose) et fongique (cellulose uniquement) des sols. Ces résultats suggèrent que des mécanismes, tels que la facilitation ou la complémentarité métabolique, pourraient être impliqués dans la dégradation du phénanthrène et de la cellulose. Cette complémentarité métabolique pourrait s'exprimer de plusieurs manières : i) Une redondance des fonctions améliorerait la dégradation en augmentant le nombre des réactions enzymatiques. ii) La dégradation du phénanthrène et de la cellulose implique des intermédiaires métaboliques. Ainsi, plusieurs espèces, partageant chacune une partie de la voie métabolique, pourraient, par complémentarité, permettre la dégradation complète du substrat, sans accumulation d'intermédiaires (qui exercent généralement un rétrocontrôle sur certaines étapes de la voie métabolique). Néanmoins, nous avons aussi montré que le taux de dégradation du phénanthrène était d'autant plus élevé que l'indice de diversité de Shannon des populations dégradantes était faible. En effet, dans la majorité de nos sols, 2 genres bactériens (i.e. *Massilia* et *Mycobacterium*) contrôlaient principalement le taux de dégradation du PHE et, plus ces taxa étaient dominant dans les populations dégradantes, mieux le phénanthrène était dégradé. Ce résultat indique que même si une large diversité de microorganismes semble permettre un meilleur fonctionnement de certains processus de dégradation, certains groupes taxonomiques clés pourraient jouer un rôle crucial (Paine, 1995; Roume et al., 2015).

Finalement, les différents liens observés dans cette thèse montrent la complexité de la relation qui lie la diversité taxonomique à la diversité fonctionnelle, et que des travaux sont

encore nécessaires pour décortiquer les mécanismes impliqués. Pour aller plus loin et apporter de nouvelles informations sur le lien diversité-fonction, il serait intéressant de réaliser des expériences d'érosion de la diversité (Wertz et al., 2006; Maron et al., 2018), notamment en partant de communautés microbiennes issues de sols pollués. A l'inverse, on pourrait aussi réaliser des assemblages d'espèces pour recréer des communautés synthétiques (Bell et al., 2005; Toljander et al., 2006). Ces deux méthodes permettraient par exemple d'observer l'influence d'une réduction de la diversité, ou d'une communauté composée uniquement de *Massilia* et *Mycobacterium*, sur la dégradation du phénanthrène et d'apporter un nouvel éclairage sur les mécanismes supposés dans cette thèse.

4 QUELLES CONSEQUENCES DE LA MULTI-POLLUTION SUR LE FONCTIONNEMENT ET LA STABILITE DU CYCLE DU CARBONE, ET PLUS GLOBALEMENT DES ECOSYSTEMES ?

Les microorganismes du sol sont des acteurs essentiels du fonctionnement du cycle du carbone, et plus globalement des écosystèmes grâce aux nombreuses fonctions clés qu'ils réalisent. En outre, leurs diversités taxonomique (Yachi and Loreau, 1999) mais aussi fonctionnelle (Cadotte et al., 2011) sont essentielles, car elles permettent de maintenir les processus clés nécessaires au fonctionnement de l'écosystème en cas de perturbation.

La pollution métallique semble avoir réduit certaines activités métaboliques microbiennes. De plus, nos résultats indiquent une co-variation entre la teneur en carbone total des sols et la réduction des activités métaboliques. Cela suggère que la pollution par des ETM a réduit les activités microbiennes, conduisant à une accumulation de carbone dans les sols pollués. Dans la littérature, la réduction des activités enzymatiques due à la pollution métallique est connue (Kandeler et al., 1996; Kuperman and Carreiro, 1997). Par ailleurs, il a aussi été montré qu'une multi-pollution par une combinaison d'ETM réduit la respiration des communautés microbiennes, ce qui induit une accumulation de carbone dans le sol (Valsecchi et al., 1995).

Cette accumulation de carbone suggère donc que la pollution pourrait avoir entraîné une perturbation du cycle de carbone en réduisant les activités microbiennes. Toutefois, on peut se demander si les faibles niveaux d'activités microbiennes des sols pollués sont en partie dus à la nature du carbone présent dans ces sols. En effet, dans les sols faiblement pollués, la majorité de la matière organique est d'origine naturelle, tandis que dans les sols contaminés on retrouve principalement de la matière organique anthropique (e.g. charbon, coke, goudron), considérée comme chimiquement réfractaire (De Junet et al., communication

personnelle). Ainsi, on pourrait supposer que la matière organique réfractaire a induit une sélection de communautés microbiennes plus spécifiques mais ayant un métabolisme plus lent.

Par ailleurs, il faut noter que la réduction des activités de dégradation microbienne a été mesurée en conditions contrôlées en laboratoire, mais le résultat serait-il le même *in situ*, en conditions non contrôlées ? Pour répondre à cette question, nous pourrions dans un premier temps estimer l'activité potentielle dans le sol, à l'aide de mesures d'activités enzymatiques à partir d'échantillons de sols frais. Néanmoins, pour déterminer les activités réelles il serait intéressant de réaliser des mesures de respiration des sols, par exemple après ajout d'un composé sur une parcelle expérimentale, à l'aide d'analyseurs de terrain, tels qu'un micro-GC (i.e. micro-chromatographe en phase gazeuse ; Allaire et al., 2012), un IRGA (i.e. Infra-red gaz analyser) ou un analyseur spectroscopique à cavité optique (e.g. analyseur Picarro WS-CRDS). En plus de quantifier les gaz, ce dernier outil permet de mesurer un ratio isotopique (Krevor et al., 2010). Il serait ainsi possible de suivre la minéralisation *in situ* d'un composé marqué par un isotope et donc de cibler plus précisément certaines fonctions de dégradation.

Plus globalement, si le cycle du carbone est impacté par la pollution, qu'en est-il des autres cycles biogéochimiques ? Les cycles du carbone et de l'azote étant très étroitement liés (Madsen, 2011), nous pourrions supposer que la pollution par les ETM a également un impact sur certaines étapes clés du cycle de l'azote. Ainsi, nous pourrions chercher à étudier certaines fonctions clés du cycle de l'azote (e.g. nitrification, dénitrification ; Hayatsu et al., 2008 ou encore tracer le flux d'azote, à l'aide d'expérience de marquage isotope *in situ* (El Zein et al., 2011).

Enfin, dans un contexte de requalification des sols de friches industrielles, la présence d'une pollution exclut un usage de ces sols pour produire de la biomasse alimentaire, en raison du risque de transfert de polluants dans les aliments. Toutefois, la production de biomasse végétale pour un autre usage (e.g. fibre d'isolation ou textile, combustible) peut être envisagée. Nous avons montré que l'activité métabolique microbienne dans nos sols semblait être limitée par leur teneur en azote. De plus, les communautés bactériennes étaient d'autant plus diversifiées que les sols avaient une texture sableuse. Il serait ainsi intéressant de tester si un amendement azoté *in situ* pourrait augmenter l'activité microbienne, ou si un changement de la texture du sol par amendement de sable permettrait une plus grande diversité taxonomique microbienne, et si ces modifications des propriétés des sols impacteraient la diversité fonctionnelle microbienne et le fonctionnement du sol.

Par ailleurs, même si certaines étapes des cycles biogéochimiques sont perturbées, il est difficile de prédire l'impact sur l'écosystème. On peut se demander si la réduction de l'activité de dégradation de la matière organique pourrait impacter les autres organismes (i.e. réseau trophique), et par exemple la croissance des végétaux. Toutefois, une accumulation de carbone dans les sols peut aussi être considérée comme positive. En effet, dans un contexte de réduction des émissions de gaz à effet de serre, ces sols pourraient présenter un intérêt en tant que « puits de carbone ». Toutefois, il faudrait d'abord préciser les flux de carbone à l'échelle de l'écosystème grâce à des mesures des quantités de carbone assimilées par photosynthèse et minéralisées par les sols (Valentini et al., 2000).

5 CONCLUSION GENERALE

L'anthropisation est largement connue pour diminuer la diversité des organismes vivants dit « supérieurs ». Mais concernant l'écodynamique et l'écotoxicité des contaminants, la prise en compte des effets cocktails de contaminants et des effets multi-stress restent des verrous scientifiques majeurs. Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes placés dans des conditions réalistes de sols anthropisés, qui présentent souvent une contamination multiple. Nous avons montré que la diversité des microorganismes et la diversité fonctionnelle (i.e. activité métabolique, tolérance à la pollution métallique) étaient impactées dans ces sols anthropisés et contaminés par divers éléments et molécules. Nos travaux soulignent la complexité des interactions entre microorganismes-caractéristiques des sols et contaminants. Ils mettent aussi en évidence une résilience taxonomique qui mériterait d'être davantage étudiée (e.g. amplitude, effet seuil). Quant à une résilience fonctionnelle elle reste encore largement à évaluer. L'analyse de la diversité fonctionnelle, par une approche basée sur les traits, qui commence à se développer pour les microorganismes du sol, pourrait aussi apporter un éclairage complémentaire.

Même si une approche multiple, utilisant différents outils et techniques, paraît pertinente et nécessaire, un outil tel que la SIP est un atout précieux pour mieux comprendre le rôle des microorganismes et de leur diversité dans le fonctionnement des cycles biogéochimiques tel que celui du carbone. Ainsi le rôle des microorganismes et des interactions entre microorganismes et matières organiques (sources de carbone et/ou polluants) dans le devenir des polluants peut être précisé et quantifié. Ce type d'approche permet de contribuer à prendre en compte les actions et rétroactions du vivant et devrait permettre de mieux intégrer

la diversité en particulier microbienne et son activité dans les modèles biogéochimiques et de transfert ou de transformation des polluants.

Dans mes travaux, la pollution métallique, en réduisant l'activité microbienne, pourrait conduire à l'accumulation de carbone dans les sols les plus pollués. Cela suggère que le cycle du carbone pourrait être modifié dans ces sols et possiblement les services écosystémiques qu'ils peuvent rendre. Ce schéma conceptuel de processus biogéochimiques mériterait d'être testé et validé *in situ*, par exemple grâce à différentes expériences mêlant l'utilisation d'isotopes stables et la mesure des flux de carbone du sol.

Références bibliographiques

- A -

- Abdel-Azeem, A., El-Morsy, E., Nour El-Dein, M., Rashad, M., 2015. Occurrence and diversity of mycobiota in heavy metal contaminated sediments of Mediterranean coastal lagoon El-Manzala, Egypt. *Mycosphere* 6. doi:10.5943/mycosphere/6/2/12
- Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum* 25, 107–123. doi:10.1016/j.ejpe.2015.03.011
- Abdu, N., Abdullahi, A.A., Abdulkadir, A., 2017. Heavy metals and soil microbes. *Environmental Chemistry Letters* 15, 65–84. doi:10.1007/s10311-016-0587-x
- Adriano, D.C., 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability, and Risks of Metals, 2nd ed. Springer-Verlag, New York.
- Alexander, M., 2000. Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants. *Environmental Science & Technology* 34, 4259–4265. doi:10.1021/es001069+
- Allaire, S.E., Lange, S.F., Lafond, J.A., Pelletier, B., Cambouris, A.N., Dutilleul, P., 2012. Multiscale spatial variability of CO₂ emissions and correlations with physico-chemical soil properties. *Geoderma* 170, 251–260. doi:10.1016/j.geoderma.2011.11.019
- Allard, A.-S., Remberger, M., Neilson, A.H., 2000. The negative impact of aging on the loss of PAH components in a creosote-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 43–49. doi:10.1016/S0964-8305(00)00050-0
- Allison, S.D., Martiny, J.B.H., 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 11512–11519. doi:10.1073/pnas.0801925105
- Al-Mailem, D.M., Sorkhoh, N.A., Al-Awadhi, H., Eliyas, M., Radwan, S.S., 2010. Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. *Extremophiles: Life Under Extreme Conditions* 14, 321–328. doi:10.1007/s00792-010-0312-9
- Andersson, J.T., Achten, C., 2015. Time to Say Goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an Up-to-Date Use of PACs for Environmental Purposes. *Polycyclic Aromatic Compounds* 35, 330–354. doi:10.1080/10406638.2014.991042
- Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M.A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., Colombo, M., Gianfreda, L., 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57, 401–412. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.06.013
- Andrews, J.A., Matamala, R., Westover, K.M., Schlesinger, W.H., 2000. Temperature effects on the diversity of soil heterotrophs and the $\delta^{13}\text{C}$ of soil-respired CO₂. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 699–706. doi:10.1016/S0038-0717(99)00206-0
- Appert-Collin, J.C., Dridi-Dhaouadi, S., Simonnot, M.O., Sardin, M., 1999. Nonlinear sorption of naphthalene and phenanthrene during saturated transport in natural porous media. *Physics and Chemistry of the Earth, Part B: Hydrology, Oceans and Atmosphere* 24, 543–548. doi:10.1016/S1464-1909(99)00042-8
- Atlas, R.M., Bartha, R., 1998. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications* - 4th ed. Benjamin/Cummings.
- ATSDR, A. for T.S. and D.R., 1995. Toxicological profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service., Atlanta.
- Aubert, G., Boulaïne, J., 1967. *La pédologie*. Presses universitaires de France, Paris.

- Auguet, J.-C., Barberan, A., Casamayor, E.O., 2010. Global ecological patterns in uncultured Archaea. *The ISME Journal* 4, 182–190. doi:10.1038/ismej.2009.109
- Azarbad, H., Niklińska, M., Laskowski, R., van Straalen, N.M., van Gestel, C.A.M., Zhou, J., He, Z., Wen, C., Röling, W.F.M., 2015. Microbial community composition and functions are resilient to metal pollution along two forest soil gradients. *FEMS Microbiology Ecology* 91, 1–11. doi:10.1093/femsec/fiu003
- Azarbad, H., van Gestel, C.A.M., Niklinska, M., Laskowski, R., Roling, W.F.M., van Straalen, N.M., 2016. Resilience of Soil Microbial Communities to Metals and Additional Stressors: DNA-Based Approaches for Assessing “Stress-on-Stress” Responses. *International Journal of Molecular Sciences* 17, UNSP 933. doi:10.3390/ijms17060933

- B -

- Bååth, E., 1989. Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air, and Soil Pollution* 47, 335–379. doi:10.1007/BF00279331
- Bååth, E., Díaz-Raviña, M., Bakken, L.R., 2005. Microbial biomass, community structure and metal tolerance of a naturally Pb-enriched forest soil. *Microbial Ecology* 50, 496–505. doi:10.1007/s00248-005-0008-3
- Badri, D.V., Vivanco, J.M., 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell & Environment* 32, 666–681. doi:10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x
- Bailly, J., Fraissinet-Tachet, L., Verner, M.-C., Debaud, J.-C., Lemaire, M., Wésolowski-Louvel, M., Marmeisse, R., 2007. Soil eukaryotic functional diversity, a metatranscriptomic approach. *The ISME Journal* 1, 632–642. doi:10.1038/ismej.2007.68
- Baize, D., 2000. Teneurs totales en « métaux lourds » dans les sols français : résultats généraux du programme ASPITET. *Courrier de l'Environnement de l'Inra* 39.
- Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A., 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55, 541–555.
- Baquiran, J.P., Thater, B., Songco, K., Crowley, D.E., 2012. Characterization of Culturable PAH and BTEX Degrading Bacteria from Heavy Oil of the Rancho La Brea Tar pits. *Polycyclic Aromatic Compounds* 32, 600–614. doi:10.1080/10406638.2011.651678
- Bardgett, R.D., Freeman, C., Ostle, N.J., 2008. Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *The ISME Journal* 2, 805–814. doi:10.1038/ismej.2008.58
- Barles, S., Breyse, D., Guillerme, A., Leyval, C., 1999. Le sol urbain. *Anthropos*.
- BASOL [WWW Document], 2016. URL <http://basol.developpement-durable.gouv.fr/> (accessed 9.11.17).
- Bastiaens, L., Springael, D., Wattiau, P., Harms, H., deWachter, R., Verachtert, H., Diels, L., 2000. Isolation of adherent polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading bacteria using PAH-sorbing carriers. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1834–1843.
- Bastias, B.A., Anderson, I.C., Rangel-Castro, J.I., Parkin, P.I., Prosser, J.I., Cairney, J.W.G., 2009. Influence of repeated prescribed burning on incorporation of ¹³C from cellulose by forest soil fungi as determined by RNA stable isotope probing. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 467–472. doi:10.1016/j.soilbio.2008.11.018
- Bates, S.T., Berg-Lyons, D., Caporaso, J.G., Walters, W.A., Knight, R., Fierer, N., 2011. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *The ISME Journal* 5, 908–917. doi:10.1038/ismej.2010.171

- Beeck, M.O.D., Lievens, B., Busschaert, P., Rineau, F., Smits, M., Vangronsveld, J., Colpaert, J.V., 2015. Impact of metal pollution on fungal diversity and community structures. *Environmental Microbiology* 17, 2035–2047. doi:10.1111/1462-2920.12547
- Bell, T., Newman, J.A., Silverman, B.W., Turner, S.L., Lilley, A.K., 2005. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 436, 1157–1160. doi:10.1038/nature03891
- Bell, T.H., El-Din Hassan, S., Lauron-Moreau, A., Al-Otaibi, F., Hijri, M., Yergeau, E., St-Arnaud, M., 2014. Linkage between bacterial and fungal rhizosphere communities in hydrocarbon-contaminated soils is related to plant phylogeny. *The ISME Journal* 8, 331–343. doi:10.1038/ismej.2013.149
- Bengtsson, J., 1998. Which species? What kind of diversity? Which ecosystem function? Some problems in studies of relations between biodiversity and ecosystem function. *Applied Soil Ecology* 10, 191–199. doi:10.1016/S0929-1393(98)00120-6
- Bérard, A., Capowiez, L., Mombo, S., Schreck, E., Dumat, C., Deola, F., Capowiez, Y., 2016. Soil microbial respiration and PICT responses to an industrial and historic lead pollution: a field study. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 4271–4281. doi:10.1007/s11356-015-5089-z
- Bertrand, J.-C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., 2011. *Ecologie Microbienne - Microbiologie des milieux naturels anthropisés*. Presses Universitaires de Pau et des Pays de l'Adour, Pau.
- 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. doi:10.1016/j.envpol.2008.06.020
- Biache, C., Ouali, S., Cébron, A., Lorgeoux, C., Colombano, S., Faure, P., 2017. Bioremediation of PAH-contaminated soils: Consequences on formation and degradation of polar-polycyclic aromatic compounds and microbial community abundance. *Journal of Hazardous Materials* 329, 1–10. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.01.026
- Bissett, A., Richardson, A.E., Baker, G., Thrall, P.H., 2011. Long-term land use effects on soil microbial community structure and function. *Applied Soil Ecology* 51, 66–78. doi:10.1016/j.apsoil.2011.08.010
- Blackwell, M., 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany* 98, 426–438. doi:10.3732/ajb.1000298
- Blanck, H., 2002. A Critical Review of Procedures and Approaches Used for Assessing Pollution-Induced Community Tolerance (PICT) in Biotic Communities. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 8, 1003–1034. doi:10.1080/1080-700291905792
- Blondel, J., 1979. *Biogéographie et écologie*. Masson, Paris ; New York.
- Blumer, M., 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. *Scientific American* 234, 35–45.
- Bodour, A.A., Wang, J.M., Brusseau, M.L., Maier, R.M., 2003. Temporal change in culturable phenanthrene degraders in response to long-term exposure to phenanthrene in a soil column system. *Environmental Microbiology* 5, 888–895. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00481.x
- Boer, W. de, 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. doi:10.1016/j.femsre.2004.11.005

- Bonneau, M., Souchier, B., 1994. *Pédologie - 2. Constituants et propriétés des sols*. Masson, Paris.
- Boshoff, M., De Jonge, M., Dardenne, F., Blust, R., Bervoets, L., 2014. The impact of metal pollution on soil faunal and microbial activity in two grassland ecosystems. *Environmental Research, Linking Exposure and Health in Environmental Public Health Tracking* 134, 169–180. doi:10.1016/j.envres.2014.06.024
- Boulter, J.R., Gielow, W.O., 1973. Properties of D-arabinose isomerase purified from two strains of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 113, 687–696.
- Bourceret, A., Cébron, A., Tisserant, E., Poupin, P., Bauda, P., Beguiristain, T., Leyval, C., 2016. The Bacterial and Fungal Diversity of an Aged PAH- and Heavy Metal-Contaminated Soil is Affected by Plant Cover and Edaphic Parameters. *Microbial Ecology* 71, 711–724. doi:10.1007/s00248-015-0682-8
- Bourceret, A., Leyval, C., Fouquet, C. de, Cébron, A., 2015. Mapping the Centimeter-Scale Spatial Variability of PAHs and Microbial Populations in the Rhizosphere of Two Plants. *PLOS ONE* 10, e0142851. doi:10.1371/journal.pone.0142851
- Bourrelier, P.-H., Berthelin, J., 1998. Contamination des sols par les éléments en traces: Les risques et leur gestion (Rapport de l'Académie des sciences N° 42) ACADÉMIE DES SCIENCES. Lavoisier / Tec et Doc.
- Bradl, H.B., 2005. *Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation*, Volume 6. Milton Keynes.
- Brallier, S., Harrison, R.B., Henry, C.L., Dongsen, X., 1996. Liming effects on availability of Cd, Cu, Ni and Zn in a soil amended with sewage sludge 16 years previously. *Water, Air and Soil Pollution* 195–206.
- Breedveld, G.D., Sparrevik, M., 2000. Nutrient-limited biodegradation of PAH in various soil strata at a creosote contaminated site. *Biodegradation* 11, 391–399. doi:10.1023/A:1011695023196
- Brewer, T.E., Handley, K.M., Carini, P., Gilbert, J.A., Fierer, N., 2017. Genome reduction in an abundant and ubiquitous soil bacterium *Candidatus Udaeobacter copiosus*. *Nature Microbiology* 2, 16198. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.198
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., Forterre, P., 2008. Mesophilic crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology* 6, 245–252. doi:10.1038/nrmicro1852
- Brochier-Armanet, C., Forterre, P., Gribaldo, S., 2011. Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. *Current Opinion in Microbiology* 14, 274–281. doi:10.1016/j.mib.2011.04.015
- Brockett, B.F.T., Prescott, C.E., Grayston, S.J., 2012. Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada. *Soil Biology and Biochemistry* 44, 9–20. doi:10.1016/j.soilbio.2011.09.003
- Buckley, D.H., Schmidt, T., 2002. Exploring the biodiversity of soil - A microbial rain forest.
- 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. *The New Phytologist* 184, 449–456. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03003.x
- Bugg, T.D.H., Ahmad, M., Hardiman, E.M., Rahmanpour, R., 2011. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural Product Reports* 28, 1883–1896. doi:10.1039/c1np00042j
- Burteaux, M., 1991. Haut fourneau - Théorie. Ref : TIP554WEB - "Élaboration et recyclage des métaux."

- C -

- Cadotte, M.W., Carscadden, K., Mirotchnick, N., 2011. Beyond species: functional diversity and the maintenance of ecological processes and services. *Journal of Applied Ecology* 48, 1079–1087. doi:10.1111/j.1365-2664.2011.02048.x
- Caldeira, M.C., Ryel, R.J., Lawton, J.H., Pereira, J.S., 2001. Mechanisms of positive biodiversity–production relationships: insights provided by $\delta^{13}\text{C}$ analysis in experimental Mediterranean grassland plots. *Ecology Letters* 4, 439–443. doi:10.1046/j.1461-0248.2001.00238.x
- Campbell, C.D., Chapman, S.J., Cameron, C.M., Davidson, M.S., Potts, J.M., 2003. A rapid microtiter plate method to measure carbon dioxide evolved from carbon substrate amendments so as to determine the physiological profiles of soil microbial communities by using whole soil. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3593–3599.
- Cao, K.-A.L., Rohart, F., Gonzalez, I., Gautier, S.D. with key contributors B., Monget, F.B. and contributions from P., Coquery, J., Yao, F., Liquet, B., 2017. mixOmics: Omics Data Integration Project.
- Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 Suppl 1, 4516–4522. doi:10.1073/pnas.1000080107
- Carmichael, L.M., Pfaender, F.K., 2009. Polynuclear aromatic hydrocarbon metabolism in soils: Relationship to soil characteristics and preexposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 666–675. doi:10.1002/etc.5620160410
- Caspi, R., Altman, T., Billington, R., Dreher, K., Foerster, H., Fulcher, C.A., Holland, T.A., Keseler, I.M., Kothari, A., Kubo, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L.A., Ong, Q., Paley, S., Subhraveti, P., Weaver, D.S., Weerasinghe, D., Zhang, P., Karp, P.D., 2014. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of Pathway/Genome Databases. *Nucleic Acids Research* 42, D459–D471. doi:10.1093/nar/gkt1103
- Catão, E., Castro, A.P., Barreto, C.C., Krüger, R.H., Kyaw, C.M., 2013. Diversity of Archaea in Brazilian savanna soils. *Archives of Microbiology* 195, 507–512. doi:10.1007/s00203-013-0882-x
- Cébron, A., Arsène-Ploetze, F., Bauda, P., Bertin, P.N., Billard, P., Carapito, C., Devin, S., Goulhen-Chollet, F., Poirel, J., Leyval, C., 2014. Rapid Impact of Phenanthrene and Arsenic on Bacterial Community Structure and Activities in Sand Batches. *Microbial Ecology* 67, 129–144. doi:10.1007/s00248-013-0313-1
- Cébron, A., Beguiristain, T., Bongoua-Devisme, J., Denonfoux, J., Faure, P., Lorgeoux, C., Ouvrard, S., Parisot, N., Peyret, P., Leyval, C., 2015. Impact of clay mineral, wood sawdust or root organic matter on the bacterial and fungal community structures in two aged PAH-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research International* 22, 13724–13738. doi:10.1007/s11356-015-4117-3
- Cébron, A., Beguiristain, T., Faure, P., Norini, M.-P., Masfarau, J.-F., Leyval, C., 2009. Influence of Vegetation on the In Situ Bacterial Community and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Degradation in Aged PAH-Contaminated or Thermal-Desorption-Treated Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6322–6330. doi:10.1128/AEM.02862-08
- Cébron, A., Bodrossy, L., Stralis-Pavese, N., Singer, A.C., Thompson, I.P., Prosser, J.I., Murrell, J.C., 2007. Nutrient Amendments in Soil DNA Stable Isotope Probing Experiments Reduce the Observed Methanotroph Diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 798–807. doi:10.1128/AEM.01491-06

- Cébron, A., Faure, P., Lorgeoux, C., Ouvrard, S., Leyval, C., 2013. Experimental increase in availability of a PAH complex organic contamination from an aged contaminated soil: consequences on biodegradation. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 177, 98–105. doi:10.1016/j.envpol.2013.01.043
- Cébron, A., Louvel, B., Faure, P., France-Lanord, C., Chen, Y., Murrell, J.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. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02376.x
- 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. *Journal of Microbiological Methods* 73, 148–159. doi:10.1016/j.mimet.2008.01.009
- Cennerazzo, J., de Junet, A., Audinot, J.-N., Leyval, C., 2017. Dynamics of PAHs and derived organic compounds in a soil-plant mesocosm spiked with ¹³C-phenanthrene. *Chemosphere* 168, 1619–1627. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.11.145
- Cerniglia, C.E., 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3, 351–368. doi:10.1007/BF00129093
- Cerniglia, C.E., Sutherland, J.B., 2010. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi, in: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 2079–2110. doi:10.1007/978-3-540-77587-4_151
- Chander, K., Joergensen, R.G., 2001. Decomposition of ¹⁴C glucose in two soils with different amounts of heavy metal contamination. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1811–1816. doi:10.1016/S0038-0717(01)00108-0
- Chau, J.F., Bagtzoglou, A.C., Willig, M.R., 2011. The Effect of Soil Texture on Richness and Diversity of Bacterial Communities. *Environmental Forensics* 12, 333–341. doi:10.1080/15275922.2011.622348
- Chauhan, A., Fazlurrahman, Oakeshott, J.G., Jain, R.K., 2008. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology* 48, 95–113. doi:10.1007/s12088-008-0010-9
- Chen, S., Peng, J., Duan, G., 2016. Enrichment of functional microbes and genes during pyrene degradation in two different soils. *Journal of Soils and Sediments* 16, 417–426. doi:10.1007/s11368-015-1204-5
- Chen, S.-C., Duan, G.-L., Ding, K., Huang, F.-Y., Zhu, Y.-G., 2018. DNA stable-isotope probing identifies uncultivated members of *Pseudonocardia* associated with biodegradation of pyrene in agricultural soil. *Fems Microbiology Ecology* 94, fiy026. doi:10.1093/femsec/fiy026
- Cheung, P.-Y., Kinkle, B.K., 2001. Mycobacterium Diversity and Pyrene Mineralization in Petroleum-Contaminated Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 2222–2229. doi:10.1128/AEM.67.5.2222-2229.2001
- Chew, I., Obbard, J.P., Stanforth, R.R., 2001. Microbial cellulose decomposition in soils from a rifle range contaminated with heavy metals. *Environmental Pollution* 111, 367–375. doi:10.1016/S0269-7491(00)00094-4
- Chuan, M.C., Shu, G.Y., Liu, J.C., 1996. Solubility of heavy metals in a contaminated soil: Effects of redox potential and pH. *Water, Air, and Soil Pollution* 90, 543–556. doi:10.1007/BF00282668
- CIRC, 2008. URL <http://www.cancer-environnement.fr/317-Classification-des-HAP.ce.aspx>

- Clemente, R., Escolar, Á., Bernal, M.P., 2006. Heavy metals fractionation and organic matter mineralisation in contaminated calcareous soil amended with organic materials. *Bioresource Technology* 97, 1894–1901. doi:10.1016/j.biortech.2005.08.018
- Cragg, S.M., Beckham, G.T., Bruce, N.C., Bugg, T.D., Distel, D.L., Dupree, P., Etxabe, A.G., Goodell, B.S., Jellison, J., McGeehan, J.E., McQueen-Mason, S.J., Schnorr, K., Walton, P.H., Watts, J.E., Zimmer, M., 2015. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Current Opinion in Chemical Biology, Energy • Mechanistic biology* 29, 108–119. doi:10.1016/j.cbpa.2015.10.018
- Craine, J.M., Morrow, C., Fierer, N., 2007. Microbial nitrogen limitation increases decomposition. *Ecology* 88, 2105–2113.
- Crampon, M., Cebren, A., Portet-Koltalo, F., Uroz, S., Le Derf, F., Bodilis, J., 2017. Low effect of phenanthrene bioaccessibility on its biodegradation in diffusely contaminated soil. *Environmental Pollution* 225, 663–673. doi:10.1016/j.envpol.2017.03.053
- Curtis, T.P., Sloan, W.T., Scannell, J.W., 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 10494–10499. doi:10.1073/pnas.142680199

- D -

- Dai, J., Becquer, T., Rouiller, J.H., Reversat, G., Bernhard-Reversat, F., Lavelle, P., 2004. Influence of heavy metals on C and N mineralisation and microbial biomass in Zn-, Pb-, Cu-, and Cd-contaminated soils. *Applied Soil Ecology* 25, 99–109. doi:10.1016/j.apsoil.2003.09.003
- Davis, M.R.H., Zhao, F.-J., McGrath, S.P., 2004. Pollution-induced community tolerance of soil microbes in response to a zinc gradient. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 2665–2672. doi:10.1897/03-645
- de Mattos-Shipley, K.M.J., Ford, K.L., Alberti, F., Banks, A.M., Bailey, A.M., Foster, G.D., 2016. The good, the bad and the tasty: The many roles of mushrooms. *Studies in Mycology* 85, 125–157. doi:10.1016/j.simyco.2016.11.002
- de Vries, F.T., Shade, A., 2013. Controls on soil microbial community stability under climate change. *Frontiers in Microbiology* 4, 265. doi:10.3389/fmicb.2013.00265
- Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A.M., Brewer, T.E., Benavent-González, A., Eldridge, D.J., Bardgett, R.D., Maestre, F.T., Singh, B.K., Fierer, N., 2018. A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science* 359, 320–325. doi:10.1126/science.aap9516
- Dell'Anno, A., Beolchini, F., Rocchetti, L., Luna, G.M., Danovaro, R., 2012. High bacterial biodiversity increases degradation performance of hydrocarbons during bioremediation of contaminated harbor marine sediments. *Environmental Pollution* 167, 85–92. doi:10.1016/j.envpol.2012.03.043
- Delmont, T.O., Prestat, E., Keegan, K.P., Faubladiet, M., Robe, P., Clark, I.M., Pelletier, E., Hirsch, P.R., Meyer, F., Gilbert, J.A., Le Paslier, D., Simonet, P., Vogel, T.M., 2012. Structure, fluctuation and magnitude of a natural grassland soil metagenome. *The ISME Journal* 6, 1677–1687. doi:10.1038/ismej.2011.197
- DeLong, E.F., 2005. Microbial community genomics in the ocean. *Nature Reviews Microbiology* 3, 459–469. doi:10.1038/nrmicro1158

- Dennis, P.G., Miller, A.J., Hirsch, P.R., 2010. Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities? *FEMS Microbiology Ecology* 72, 313–327. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00860.x
- Derry, A.M., Staddon, W.J., Trevors, J.T., 1998. Functional diversity and community structure of microorganisms in uncontaminated and creosote-contaminated soils as determined by sole-carbon-source-utilization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 571–578. doi:10.1023/A:1008812821516
- Dhelft, P., 1994. Épuration du gaz de haut fourneau. *Techniques de l'ingénieur Métaux Ferreux : Élaboration Du Métal Primaire TIB366DUO*. (ref. article : m7422).
- Diaz-Ravina, M., Baath, E., 1996. Development of Metal Tolerance in Soil Bacterial Communities Exposed to Experimentally Increased Metal Levels. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 2970–2977.
- Dictor, M.C., Berne, N., Mathieu, O., Moussay, A., Saada, A., 2003. Influence of Ageing of Polluted Soils on Bioavailability of Phenanthrene. *Oil & Gas Science and Technology* 58, 481–488. doi:10.2516/ogst:2003031
- Ding, G.-C., Heuer, H., He, Z., Xie, J., Zhou, J., Smalla, K., 2012. More functional genes and convergent overall functional patterns detected by geochip in phenanthrene-spiked soils. *FEMS Microbiology Ecology* 82, 148–156. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01413.x
- Ding, G.-C., Heuer, H., Zühlke, S., Spiteller, M., Pronk, G.J., Heister, K., Kögel-Knabner, I., Smalla, K., 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, 4765–4771. doi:10.1128/AEM.00047-10
- Dray, S., Dufour, A.-B., 2007. The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software* 22, 1–20. doi:10.18637/jss.v022.i04
- DREAL, I.D.G., 2016. DREAL EST [WWW Document]. URL <http://www.grand-est.developpement-durable.gouv.fr/sites-et-sols-pollues-a12469.html> (accessed 9.11.17).
- Duchêne, J.-M., Isler, D., Yax, É., 1991. Élaboration du métal primaire - Coke métallurgique. Ref : TIP554WEB - “Élaboration et recyclage des métaux.”
- Dumont, M.G., Murrell, J.C., 2005. Stable isotope probing - linking microbial identity to function. *Nature Reviews Microbiology* 3, 499–504. doi:10.1038/nrmicro1162
- Durand, T.C., Hausman, J.F., Carpin, S., Alberic, P., Baillif, P., Label, P., Morabito, D., 2010. Zinc and cadmium effects on growth and ion distribution in *Populus × Populus alba*. *Biologia Plantarum* 54, 191–194. doi:10.1007/s10535-010-0033-z

- E -

- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., Knight, R., 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics (Oxford, England)* 27, 2194–2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381
- Eichorst, S.A., Kuske, C.R., 2012. Identification of Cellulose-Responsive Bacterial and Fungal Communities in Geographically and Edaphically Different Soils by Using Stable Isotope Probing. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 2316–2327. doi:10.1128/AEM.07313-11

- Eida, M.F., Nagaoka, T., Wasaki, J., Kouno, K., 2012. Isolation and Characterization of Cellulose-decomposing Bacteria Inhabiting Sawdust and Coffee Residue Composts. *Microbes and Environments* 27, 226–233. doi:10.1264/jsme2.ME11299
- El Zahar Haichar, F., Achouak, W., Christen, R., Heulin, T., Marol, C., Marais, M.-F., Mougel, C., Ranjard, L., Balesdent, J., Berge, O., 2007. Identification of cellulolytic bacteria in soil by stable isotope probing. *Environmental Microbiology* 9, 625–634. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01182.x
- El Zein, R., Bréda, N., Gérant, D., Zeller, B., Maillard, P., 2011. Nitrogen sources for current-year shoot growth in 50-year-old sessile oak trees: an in situ (15)N labeling approach. *Tree Physiology* 31, 1390–1400. doi:10.1093/treephys/tpr118
- Ellis, R.J., Morgan, P., Weightman, A.J., Fry, J.C., 2003. Cultivation-Dependent and -Independent Approaches for Determining Bacterial Diversity in Heavy-Metal-Contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 3223–3230. doi:10.1128/AEM.69.6.3223-3230.2003
- Eom, I.C., Rast, C., Veber, A.M., Vasseur, P., 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 190–205. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.12.020
- Epelde, L., Lanzén, A., Blanco, F., Urich, T., Garbisu, C., 2015. Adaptation of soil microbial community structure and function to chronic metal contamination at an abandoned Pb-Zn mine. *FEMS Microbiology Ecology* 91, 1–11. doi:10.1093/femsec/fiu007
- Erdoğan, S.F., Mutlu, B., Korcan, S.E., Güven, K., Konuk, M., 2013. Aromatic Hydrocarbon Degradation by Halophilic Archaea Isolated from Çamaltı Saltern, Turkey. *Water, Air, & Soil Pollution* 224, 1449. doi:10.1007/s11270-013-1449-9
- Eriksson, J.E., 1989. The influence of pH, soil type and time on adsorption and uptake by plants of Cd added to the soil. *Water, Air, and Soil Pollution* 48, 317–335. doi:10.1007/BF00283334
- Evans, S.E., Wallenstein, M.D., 2014. Climate change alters ecological strategies of soil bacteria. *Ecology Letters* 17, 155–164. doi:10.1111/ele.12206

- F -

- Fan, F., Yin, C., Tang, Y., Li, Z., Song, A., Wakelin, S.A., Zou, J., Liang, Y., 2014. Probing potential microbial coupling of carbon and nitrogen cycling during decomposition of maize residue by ¹³C-DNA-SIP. *Soil Biology and Biochemistry* 70, 12–21. doi:10.1016/j.soilbio.2013.12.002
- Federle, T.W., Vestal, J.R., 1980. Lignocellulose Mineralization by Arctic Lake Sediments in Response to Nutrient Manipulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 32–39.
- Felske, A., Akkermans, A.D.L., Vos, W.M.D., 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.
- Ferrari, B.C., Zhang, C., van Dorst, J., 2011. Recovering Greater Fungal Diversity from Pristine and Diesel Fuel Contaminated Sub-Antarctic Soil Through Cultivation Using Both a High and a Low Nutrient Media Approach. *Frontiers in Microbiology* 2. doi:10.3389/fmicb.2011.00217
- Fierer, N., 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews. Microbiology* 15, 579–590. doi:10.1038/nrmicro.2017.87
- Fierer, N., Bradford, M.A., Jackson, R.B., 2007. Toward an Ecological Classification of Soil Bacteria. *Ecology* 88, 1354–1364.

- Fierer, N., Jackson, R.B., 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 626–631. doi:10.1073/pnas.0507535103
- Fierer, N., Lauber, C.L., Ramirez, K.S., Zaneveld, J., Bradford, M.A., Knight, R., 2012. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients. *The ISME Journal* 6, 1007–1017. doi:10.1038/ismej.2011.159
- Fog, K., 1988. The Effect of Added Nitrogen on the Rate of Decomposition of Organic Matter. *Biological Reviews* 63, 433–462. doi:10.1111/j.1469-185X.1988.tb00725.x
- Foght, J., 2008. Anaerobic Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons: Pathways and Prospects. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 15, 93–120. doi:10.1159/000121324
- Fontaine, S., Mariotti, A., Abbadie, L., 2003. The priming effect of organic matter: a question of microbial competition? *Soil Biology and Biochemistry* 35, 837–843. doi:10.1016/S0038-0717(03)00123-8
- Franzluebbers, A.J., Haney, R.L., Hons, F.M., Zuberer, D.A., 1996. Active fractions of organic matter in soils with different texture. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 1367–1372. doi:10.1016/S0038-0717(96)00143-5
- Frey, S.D., Drijber, R., Smith, H., Melillo, J., 2008. Microbial biomass, functional capacity, and community structure after 12 years of soil warming. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 2904–2907. doi:10.1016/j.soilbio.2008.07.020
- Frostegård, Å., Tunlid, A., Bååth, E., 1996. Changes in microbial community structure during long-term incubation in two soils experimentally contaminated with metals. *Soil Biology and Biochemistry* 28, 55–63. doi:10.1016/0038-0717(95)00100-X
- Fuchs, G., Boll, M., Heider, J., 2011. Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. *Nature Reviews Microbiology* 9, 803–816. doi:10.1038/nrmicro2652

- G -

- Gadd, G.M., 1992. Metals and microorganisms: A problem of definition. *FEMS Microbiology Letters* 100, 197–203. doi:10.1111/j.1574-6968.1992.tb14040.x
- Galand, P.E., Fritze, H., Conrad, R., Yrjälä, K., 2005. Pathways for methanogenesis and diversity of methanogenic archaea in three boreal peatland ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 2195–2198. doi:10.1128/AEM.71.4.2195-2198.2005
- Gans, J., Wolinsky, M., Dunbar, J., 2005. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science (New York, N.Y.)* 309, 1387–1390. doi:10.1126/science.1112665
- Ghio, S., Lorenzo, G.S.D., Lia, V., Talia, P., Cataldi, A., Grasso, D., Campos, E., 2012. Isolation of *Paenibacillus* sp. and *Variovorax* sp. strains from decaying woods and characterization of their potential for cellulose deconstruction. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 3, 352–364.
- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T.K., Ahn, Y., 2016. Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A Review. *Frontiers in Microbiology* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01369

- Gillan, D.C., Danis, B., Pernet, P., Joly, G., Dubois, P., 2005. Structure of sediment-associated microbial communities along a heavy-metal contamination gradient in the marine environment. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 679–690. doi:10.1128/AEM.71.2.679-690.2005
- Giller, K.E., Witter, E., Mcgrath, S.P., 1998. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1389–1414. doi:10.1016/S0038-0717(97)00270-8
- Girard, M.-C., Walter, C., Rémy, J.-C., Berthelin, J., Morel, J.-L., 2011. Sols et environnement - 2e édition - Cours, exercices et études de cas, 2e édition. ed. Dunod, Paris.
- Gleixner, G., Czimczik, C.J., Kramer, C., Lühker, B., Schmidt, M.W.I., 2001. 1.15 - Plant Compounds and Their Turnover and Stabilization as Soil Organic Matter, in: *Global Biogeochemical Cycles in the Climate System*. Academic Press, San Diego, pp. 201–215. doi:10.1016/B978-012631260-7/50017-0
- Gloor, G.B., Hummelen, R., Macklaim, J.M., Dickson, R.J., Fernandes, A.D., MacPhee, R., Reid, G., 2010. Microbiome Profiling by Illumina Sequencing of Combinatorial Sequence-Tagged PCR Products. *PLOS ONE* 5, e15406. doi:10.1371/journal.pone.0015406
- Gobat, J.-M., Aragno, M., Matthey, W., 2010. Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols. PPUR Presses polytechniques.
- Gogolev, A., Wilke, B.-M., 1997. Combination effects of heavy metals and fluoranthene on soil bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 25, 274–278. doi:10.1007/s003740050314
- Gomez, E., Ferreras, L., Toresani, S., 2006. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. *Bioresource Technology* 97, 1484–1489. doi:10.1016/j.biortech.2005.06.021
- González-Paredes, Y., Alarcón, A., Almaraz Juan, J., Cruz-Sánchez Jesús, S., Mendoza-López Ma., R., Ormeño-Orrillo, E., 2013. Tolerance, growth and degradation of phenanthrene and benzo[a]pyrene by *Rhizobium tropici* CIAT 899 in liquid culture medium. *Applied Soil Ecology* 63, 105–111. doi:10.1016/j.apsoil.2012.09.010
- Grangeteau, C., Gerhards, D., Terrat, S., Dequiedt, S., Alexandre, H., Guilloux-Benatier, M., von Wallbrunn, C., Rousseaux, S., 2016. FT-IR spectroscopy: A powerful tool for studying the inter- and intraspecific biodiversity of cultivable non-Saccharomyces yeasts isolated from grape must. *Journal of Microbiological Methods* 121, 50–58. doi:10.1016/j.mimet.2015.12.009
- Grant, R.J., Muckian, L.M., Clipson, N.J.W., Doyle, E.M., 2007. Microbial community changes during the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Letters in Applied Microbiology* 44, 293–300. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02066.x
- Grathwohl, P., 1990. Influence of organic matter from soils and sediments from various origins on the sorption of some chlorinated aliphatic hydrocarbons: implications on Koc correlations. *Environmental Science & Technology* 24, 1687–1693. doi:10.1021/es00081a010
- Greer, C.W., Whyte, L.G., Niederberger, T.D., 2010. Microbial Communities in Hydrocarbon-Contaminated Temperate, Tropical, Alpine, and Polar Soils 2313–2328. doi:10.1007/978-3-540-77587-4_168
- Griffiths, B.S., Bonkowski, M., Roy, J., Ritz, K., 2001a. Functional stability, substrate utilisation and biological indicators of soils following environmental impacts. *Applied Soil Ecology* 16, 49–61. doi:10.1016/S0929-1393(00)00081-0

- Griffiths, B.S., Kuan, H.L., Ritz, K., Glover, L.A., McCaig, A.E., Fenwick, C., 2004. The relationship between microbial community structure and functional stability, tested experimentally in an upland pasture soil. *Microbial Ecology* 47, 104–113. doi:10.1007/s00248-002-2043-7
- Griffiths, B.S., Ritz, K., Bardgett, R.D., Cook, R., Christensen, S., Ekelund, F., Sørensen, S.J., Bååth, E., Bloem, J., Rüter, P.C.D., Dolfing, J., Nicolardot, B., 2000. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity–ecosystem function relationship. *Oikos* 90, 279–294. doi:10.1034/j.1600-0706.2000.900208.x
- Griffiths, B.S., Ritz, K., Wheatley, R., Kuan, H.L., Boag, B., Christensen, S., Ekelund, F., Sørensen, S.J., Müller, S., Bloem, J., 2001b. An examination of the biodiversity–ecosystem function relationship in arable soil microbial communities. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1713–1722. doi:10.1016/S0038-0717(01)00094-3
- Grover, S.P., Butterly, C.R., Wang, X., Tang, C., 2017. The short-term effects of liming on organic carbon mineralisation in two acidic soils as affected by different rates and application depths of lime. *Biology and Fertility of Soils* 53, 431–443. doi:10.1007/s00374-017-1196-y
- Gu, H., Chen, Y., Liu, X., Wang, H., Shen-Tu, J., Wu, L., Zeng, L., Xu, J., 2017. The effective migration of *Massilia* sp. WF1 by *Phanerochaete chrysosporium* and its phenanthrene biodegradation in soil. *Science of The Total Environment* 593–594, 695–703. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.03.205
- Gu, H., Lou, J., Wang, H., Yang, Y., Wu, L., Wu, J., Xu, J., 2016. Biodegradation, Biosorption of Phenanthrene and Its Trans-Membrane Transport by *Massilia* sp. WF1 and *Phanerochaete chrysosporium*. *Frontiers in Microbiology* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00038
- Gubry-Rangin, C., Nicol, G.W., Prosser, J.I., 2010. Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils. *FEMS Microbiology Ecology* 74, 566–574. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00971.x
- Gueidan, C., Aptroot, A., Cáceres, M., Badali, H., Stenroos, S., 2014. A reappraisal of orders and families within the subclass Chaetothyriomycetidae (Eurotiomycetes, Ascomycota). *Mycological Progress* 13. doi:10.1007/s11557-014-0990-2
- Guenet, B., Juarez, S., Bardoux, G., Pouteau, V., Cheviron, N., Marraud, C., Abbadie, L., Chenu, C., 2011. Metabolic capacities of microorganisms from a long-term bare fallow. *Applied Soil Ecology* 51, 87–93. doi:10.1016/j.apsoil.2011.07.006
- Guo, G., Tian, F., Ding, K., Wang, L., Liu, T., Yang, F., 2017. Bacterial Communities Predominant in the Degradation of C-13-Labeled Pyrene in Red Soil. *Soil & Sediment Contamination* 26, 709–721. doi:10.1080/15320383.2017.1406448
- Gupta, P., Samant, K., Sahu, A., 2012. Isolation of Cellulose-Degrading Bacteria and Determination of Their Cellulolytic Potential. *International Journal of Microbiology*. doi:10.1155/2012/578925

- H -

- Habe, H., Omori, T., 2003. Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67, 225–243. doi:10.1271/bbb.67.225
- Haferburg, G., Kothe, E., 2007. Microbes and metals: interactions in the environment. *Journal of Basic Microbiology* 47, 453–467. doi:10.1002/jobm.200700275
- Harell, F.E., Dupont, C., others, with contributions from C.D. and many, 2018. Hmisc: Harrell Miscellaneous.

- Hättenschwiler, S., Tiunov, A.V., Scheu, S., 2005. Biodiversity and Litter Decomposition in Terrestrial Ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36, 191–218. doi:10.1146/annurev.ecolsys.36.112904.151932
- Hatzinger, P.B., Alexander, M., 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science & Technology* 29, 537–545. doi:10.1021/es00002a033
- Hayatsu, M., Tago, K., Saito, M., 2008. Various players in the nitrogen cycle: Diversity and functions of the microorganisms involved in nitrification and denitrification. *Soil Science and Plant Nutrition* 54, 33–45. doi:10.1111/j.1747-0765.2007.00195.x
- He, H., Li, W., Yu, R., Ye, Z., 2017. Illumina-Based Analysis of Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities in Paddy Fields Under Mixed Heavy Metal Contamination. *Pedosphere* 27, 569–578. doi:10.1016/S1002-0160(17)60352-7
- He, N., Yu, G., 2016. Stoichiometrical regulation of soil organic matter decomposition and its temperature sensitivity. *Ecology and Evolution* 6, 620–627. doi:10.1002/ece3.1927
- He, Y., Qi, Y., Dong, Y., Xiao, S., Peng, Q., Liu, X., Sun, L., 2013. Effects of Nitrogen Fertilization on Soil Microbial Biomass and Community Functional Diversity in Temperate Grassland in Inner Mongolia, China. *Clean-Soil Air Water* 41, 1216–1221. doi:10.1002/clen.201200021
- Hector, A., Bazeley-White, E., Loreau, M., Otway, S., Schmid, B., 2002. Overyielding in grassland communities: testing the sampling effect hypothesis with replicated biodiversity experiments. *Ecology Letters* 5, 502–511. doi:10.1046/j.1461-0248.2002.00337.x
- Hemida, S.K., Omar, S.A., Abdel-Mallek, A.Y., 1997. Microbial populations and enzyme activity in soil treated with heavy metals. *Water, Air, and Soil Pollution* 95, 13–22. doi:10.1007/BF02406152
- Hemme, C.L., Deng, Y., Gentry, T.J., Fields, M.W., Wu, L., Barua, S., Barry, K., Tringe, S.G., Watson, D.B., He, Z., Hazen, T.C., Tiedje, J.M., Rubin, E.M., Zhou, J., 2010. Metagenomic insights into evolution of a heavy metal-contaminated groundwater microbial community. *The ISME Journal* 4, 660–672. doi:10.1038/ismej.2009.154
- Heyer, R., Schallert, K., Zoun, R., Becher, B., Saake, G., Benndorf, D., 2017. Challenges and perspectives of metaproteomic data analysis. *Journal of Biotechnology, Bioinformatics Solutions for Big Data Analysis in Life Sciences presented by the German Network for Bioinformatics Infrastructure* 261, 24–36. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.06.1201
- Hill, T.C.J., Walsh, K.A., Harris, J.A., Moffett, B.F., 2003. Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 1–11. doi:10.1111/j.1574-6941.2003.tb01040.x
- Hoffland, E., Findenegg, G.R., Nelemans, J.A., 1989. Solubilization of rock phosphate by rape: II. Local root exudation of organic acids as a response to P-starvation. *Plant and Soil* 113, 161–165.
- Hoffman, M.T., Arnold, A.E., 2010. Diverse Bacteria Inhabit Living Hyphae of Phylogenetically Diverse Fungal Endophytes. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 4063–4075. doi:10.1128/AEM.02928-09
- Hong, C., Si, Y., Xing, Y., Li, Y., 2015. Illumina MiSeq sequencing investigation on the contrasting soil bacterial community structures in different iron mining areas. *Environmental Science and Pollution Research International* 22, 10788–10799. doi:10.1007/s11356-015-4186-3
- Hooper, D.U., Vitousek, P.M., 1998. Effects of Plant Composition and Diversity on Nutrient Cycling. *Ecological Monographs* 68, 121–149. doi:10.2307/2657146
- Hu, S., van Bruggen, A.H.C., 1997. Microbial Dynamics Associated with Multiphasic Decomposition of ¹⁴C-Labeled Cellulose in Soil. *Microbial Ecology* 33, 134–143. doi:10.1007/s002489900015

Huot, H., 2013. Formation, fonctionnement et évolution d'un Technosol sur des boues sidérurgiques. Université de Lorraine.

Hütsch, B.W., Augustin, J., Merbach, W., 2002. Plant rhizodeposition — an important source for carbon turnover in soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 165, 397–407. doi:10.1002/1522-2624(200208)165:4<397::AID-JPLN397>3.0.CO;2-C

- I -

Irha, N., Slet, J., Petersell, V., 2003. Effect of heavy metals and PAH on soil assessed via dehydrogenase assay. *Environment International* 28, 779–782. doi:10.1016/S0160-4120(02)00124-1

- J -

Jacques, R.J.S., Okeke, B.C., Bento, F.M., Teixeira, A.S., Peralba, M.C.R., Camargo, F.A.O., 2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresource Technology* 99, 2637–2643. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.047

Janssen, C.R., Heijerick, D.G., De Schampelaere, K.A.C., Allen, H.E., 2003. Environmental risk assessment of metals: tools for incorporating bioavailability. *Environment International*, Secotox S.I. 28, 793–800. doi:10.1016/S0160-4120(02)00126-5

Janssen, P.H., 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 1719–1728. doi:10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006

Jia, X., Xi, B.-D., Li, M.-X., Yang, Y., Wang, Y., 2017. Metaproteomics analysis of the functional insights into microbial communities of combined hydrogen and methane production by anaerobic fermentation from reed straw. *PLoS ONE* 12. doi:10.1371/journal.pone.0183158

Jiang, W., Wang, J., Tang, J., Hou, F., Lu, Y., 2010. Soil bacterial functional diversity as influenced by cadmium, phenanthrene and degrade bacteria application. *Environmental Earth Sciences* 59, 1717–1722. doi:10.1007/s12665-009-0153-y

John, B., Yamashita, T., Ludwig, B., Flessa, H., 2005. Storage of organic carbon in aggregate and density fractions of silty soils under different types of land use. *Geoderma, Mechanisms and regulation of organic matter stabilisation in soils* 128, 63–79. doi:10.1016/j.geoderma.2004.12.013

Johnsen, A.R., Karlson, U., 2005. PAH Degradation Capacity of Soil Microbial Communities: Does It Depend on PAH Exposure? *Microbial Ecology* 50, 488–495.

Johnsen, A.R., Wick, L.Y., Harms, H., 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environmental Pollution* 133, 71–84. doi:10.1016/j.envpol.2004.04.015

Johnson, D., Leake, J.R., Lee, J.A., Campbell, C.D., 1998. Changes in soil microbial biomass and microbial activities in response to 7 years simulated pollutant nitrogen deposition on a heathland and two grasslands. *Environmental Pollution* 103, 239–250. doi:10.1016/S0269-7491(98)00115-8

Johnson, D.L., Anderson, D.R., McGrath, S.P., 2005. Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 2334–2336. doi:10.1016/j.soilbio.2005.04.001

- Joimel, S., Cortet, J., Jolivet, C.C., Saby, N.P.A., Chenot, E.D., Branchu, P., Consalès, J.N., Lefort, C., Morel, J.L., Schwartz, C., 2016. Physico-chemical characteristics of topsoil for contrasted forest, agricultural, urban and industrial land uses in France. *Science of The Total Environment* 545, 40–47. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.12.035
- Jojima, T., Omumasaba, C.A., Inui, M., Yukawa, H., 2010. Sugar transporters in efficient utilization of mixed sugar substrates: current knowledge and outlook. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85, 471–480. doi:10.1007/s00253-009-2292-1
- Joner, E.J., Corgié, S.C., Amellal, N., Leyval, C., 2002. Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 859–864. doi:10.1016/S0038-0717(02)00018-4
- Jones, D.L., 1999. Amino acid biodegradation and its potential effects on organic nitrogen capture by plants. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 613–622. doi:10.1016/S0038-0717(98)00167-9
- Jones, D.L., 1998. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant and Soil* 205, 25–44. doi:10.1023/A:1004356007312
- Jones, D.L., Farrar, J., Giller, K.E., 2003. Associative Nitrogen Fixation and Root Exudation - What is Theoretically Possible in the Rhizosphere? *Symbiosis* 35, 19–38.
- Jones, D.L., Hodge, A., Kuzyakov, Y., 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytologist* 163, 459–480. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01130.x
- Jones, D.L., Prabowo, A.M., Kochian, L.V., 1996. Kinetics of malate transport and decomposition in acid soils and isolated bacterial populations: The effect of microorganisms on root exudation of malate under Al stress. *Plant and Soil* 182, 239–247. doi:10.1007/BF00029055
- Jones, D.L., Willett, V.B., 2006. Experimental evaluation of methods to quantify dissolved organic nitrogen (DON) and dissolved organic carbon (DOC) in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 38, 991–999. doi:10.1016/j.soilbio.2005.08.012
- Jones, M.D., Singleton, D.R., Carstensen, D.P., Powell, S.N., Swanson, J.S., Pfaender, F.K., Aitken, M.D., 2008. Effect of incubation conditions on the enrichment of pyrene-degrading bacteria identified by stable-isotope probing in an aged, PAH-contaminated soil. *Microbial Ecology* 56, 341–349. doi:10.1007/s00248-007-9352-9
- Jones, M.D.M., Forn, I., Gadelha, C., Egan, M.J., Bass, D., Massana, R., Richards, T.A., 2011. Discovery of novel intermediate forms redefines the fungal tree of life. *Nature* 474, 200–203. doi:10.1038/nature09984
- Jung, J., Philippot, L., Park, W., 2016. Metagenomic and functional analyses of the consequences of reduction of bacterial diversity on soil functions and bioremediation in diesel-contaminated microcosms. *Scientific Reports* 6, 23012. doi:10.1038/srep23012

- K -

- Kalbitz, K., Schwesig, D., Rethemeyer, J., Matzner, E., 2005. Stabilization of dissolved organic matter by sorption to the mineral soil. *Soil Biology and Biochemistry* 37, 1319–1331. doi:10.1016/j.soilbio.2004.11.028
- Kandeler, F., Kampichler, C., Horak, O., 1996. Influence of heavy metals on the functional diversity of soil microbial communities. *Biology and Fertility of Soils* 23, 299–306. doi:10.1007/BF00335958

- Keiluweit, M., Bougoure, J.J., Nico, P.S., Pett-Ridge, J., Weber, P.K., Kleber, M., 2015. Mineral protection of soil carbon counteracted by root exudates. *Nature Climate Change* 5, 588–595. doi:10.1038/nclimate2580
- Kelly, J.J., Häggblom, M., Tate, R.L., 1999. Changes in soil microbial communities over time resulting from one time application of zinc: a laboratory microcosm study. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1455–1465. doi:10.1016/S0038-0717(99)00059-0
- Kemnitz, D., Kolb, S., Conrad, R., 2007. High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. *FEMS Microbiology Ecology* 60, 442–448. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00310.x
- Keough, B.P., Schmidt, T.M., Hicks, R.E., 2003. Archaeal nucleic acids in picoplankton from great lakes on three continents. *Microbial Ecology* 46, 238–248.
- Khiangam, S., Tanasupawat, S., Akaracharanya, A., Kim, K.K., Lee, K.C., Lee, J.-S., 2012. *Cohnella cellulositytica* sp. nov., isolated from buffalo faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62, 1921–1925. doi:10.1099/ijs.0.032607-0
- Killham, K., 1994. *Soil Ecology*. Cambridge University Press.
- Kim, B.-S., Oh, H.-M., Kang, H., Chun, J., 2005. Archaeal diversity in tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)* 43, 144–151.
- Kim, E.S., Kim, B.-S., Kim, K.-Y., Woo, H.-M., Lee, S.-M., Um, Y., 2018. Aerobic and anaerobic cellulose utilization by *Paenibacillus* sp. CAA11 and enhancement of its cellulolytic ability by expressing a heterologous endoglucanase. *Journal of Biotechnology* 268, 21–27. doi:10.1016/j.jbiotec.2018.01.007
- Kim, R.-Y., Yoon, J.-K., Kim, T.-S., Yang, J.E., Owens, G., Kim, K.-R., 2015. Bioavailability of heavy metals in soils: definitions and practical implementation--a critical review. *Environmental Geochemistry and Health* 37, 1041–1061. doi:10.1007/s10653-015-9695-y
- Klamerus-Iwan, A., Blonska, E., Lasota, J., Kalandyk, A., Waligorski, P., 2015. Influence of Oil Contamination on Physical and Biological Properties of Forest Soil After Chainsaw Use. *Water Air and Soil Pollution* 226, 389. doi:10.1007/s11270-015-2649-2
- Kleber, M., 2010. What is recalcitrant soil organic matter ? *Environmental Chemistry*.
- Klimek, B., 2013. Scots Pine Roots Modify the Short-Term Effects of Temperature and Moisture on Soil Bacteria and Fungi. *Applied Ecology and Environmental Research* 11, 173–188. doi:10.15666/aeer/1102_173188
- Knittel, K., Lösekann, T., Boetius, A., Kort, R., Amann, R., 2005. Diversity and Distribution of Methanotrophic Archaea at Cold Seeps. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 467–479. doi:10.1128/AEM.71.1.467-479.2005
- Kögel-Knabner, I., 2002. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry* 34, 139–162. doi:10.1016/S0038-0717(01)00158-4
- Konopka, A., Oliver, L., R. F. Turco, J., 1998. The Use of Carbon Substrate Utilization Patterns in Environmental and Ecological Microbiology. *Microbial Ecology* 35, 103–115. doi:10.1007/s002489900065
- Kozich, J.J., Westcott, S.L., Baxter, N.T., Highlander, S.K., Schloss, P.D., 2013. Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 5112–5120. doi:10.1128/AEM.01043-13

- Krevor, S., Perrin, J.-C., Esposito, A., Rella, C., Benson, S., 2010. Rapid detection and characterization of surface CO₂ leakage through the real-time measurement of $\delta^{13}\text{C}$ signatures in CO₂ flux from the ground. *International Journal of Greenhouse Gas Control* 4, 811–815. doi:10.1016/j.ijggc.2010.05.002
- Krull, E.S., Baldock, J.A., Skjemstad, J.O., 2003. Importance of mechanisms and processes of the stabilisation of soil organic matter for modelling carbon turnover. *Functional Plant Biology*.
- Kuperman, R.G., Carreiro, M.M., 1997. Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry* 29, 179–190. doi:10.1016/S0038-0717(96)00297-0
- Kuzyakov, Y., Friedel, J., Stahr, K., 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1485–1498. doi:10.1016/S0038-0717(00)00084-5

- L -

- Langston, J.A., Brown, K., Xu, F., Borch, K., Garner, A., Sweeney, M.D., 2012. Cloning, expression, and characterization of a cellobiose dehydrogenase from *Thielavia terrestris* induced under cellulose growth conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1824, 802–812. doi:10.1016/j.bbapap.2012.03.009
- Lara, E., Moreira, D., López-García, P., 2010. The environmental clade LKM11 and Rozella form the deepest branching clade of fungi. *Protist* 161, 116–121. doi:10.1016/j.protis.2009.06.005
- Larousse, É., 2018. Dictionnaires Larousse [WWW Document]. URL <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais> (accessed 5.17.18).
- Lauber, C.L., Hamady, M., Knight, R., Fierer, N., 2009. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 5111–5120. doi:10.1128/AEM.00335-09
- Lauber, C.L., Ramirez, K.S., Aanderud, Z., Lennon, J., Fierer, N., 2013. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. *ISME Journal* 7, 1641–1650. doi:10.1038/ismej.2013.50
- Lauber, C.L., Strickland, M.S., Bradford, M.A., Fierer, N., 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry, Special Section: Enzymes in the Environment* 40, 2407–2415. doi:10.1016/j.soilbio.2008.05.021
- Leahy, J.G., Colwell, R.R., 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 54, 305–315.
- Lemire, J.A., Harrison, J.J., Turner, R.J., 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature Reviews Microbiology* 11, 371–384. doi:10.1038/nrmicro3028
- Leys, N.M., Bastiaens, L., Verstraete, W., Springael, D., 2005a. Influence of the carbon/nitrogen/phosphorus ratio on polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by *Mycobacterium* and *Sphingomonas* in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology* 66, 726–736. doi:10.1007/s00253-004-1766-4
- Leys, N.M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Wattiau, P., Top, E.M., Verstraete, W., Springael, D., 2005b. Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology* 51, 375–388. doi:10.1016/j.femsec.2004.09.015

- 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. doi:10.1007/s005720050174
- Li, F., Liu, M., Li, Z., Jiang, C., Han, F., Che, Y., 2013. Changes in soil microbial biomass and functional diversity with a nitrogen gradient in soil columns. *Applied Soil Ecology* 64, 1–6. doi:10.1016/j.apsoil.2012.10.006
- Li, J., Luo, C., Zhang, D., Song, M., Cai, X., Jiang, L., Zhang, G., 2018. Autochthonous Bioaugmentation-Modified Bacterial Diversity of Phenanthrene Degraders in PAH-Contaminated Wastewater as Revealed by DNA-Stable Isotope Probing. *Environmental Science & Technology* 52, 2934–2944. doi:10.1021/acs.est.7b05646
- Li, X., Li, P., Lin, X., Zhang, C., Li, Q., Gong, Z., 2008. Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. *Journal of Hazardous Materials* 150, 21–26. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.04.040
- Liang, Y., Li, G., Nostrand, J.D.V., He, Z., Wu, L., Deng, Y., Zhang, X., Zhou, J., 2009. Microarray-based analysis of microbial functional diversity along an oil contamination gradient in oil field. *FEMS Microbiology Ecology* 70, 324–333. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00774.x
- Liang, Y., Van Nostrand, J.D., Deng, Y., He, Z., Wu, L., Zhang, X., Li, G., Zhou, J., 2011. Functional gene diversity of soil microbial communities from five oil-contaminated fields in China. *The ISME Journal* 5, 403–413. doi:10.1038/ismej.2010.142
- Liebich, J., Schloter, M., Schäffer, A., Vereecken, H., Burauel, P., 2007. Degradation and humification of maize straw in soil microcosms inoculated with simple and complex microbial communities. *European Journal of Soil Science* 58, 141–151. doi:10.1111/j.1365-2389.2006.00816.x
- Lindgren, J.F., Hassellöv, I.-M., Nyholm, J.R., Östin, A., Dahllöf, I., 2017. Induced tolerance in situ to chronically PAH exposed ammonium oxidizers. *Marine Pollution Bulletin* 120, 333–339. doi:10.1016/j.marpolbul.2017.05.044
- Lipinska, A., Kucharski, J., Wyszowska, J., 2014. The Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on the Structure of Organotrophic Bacteria and Dehydrogenase Activity in Soil. *Polycyclic Aromatic Compounds* 34, 35–53. doi:10.1080/10406638.2013.844175
- Liu, J., Liu, M., Wu, M., Jiang, C., Chen, X., Cai, Z., Wang, B., Zhang, J., Zhang, T., Li, Z., 2018. Soil pH rather than nutrients drive changes in microbial community following long-term fertilization in acidic Ultisols of southern China. *Journal of Soils and Sediments* 18, 1853–1864. doi:10.1007/s11368-018-1934-2
- Lock, K., Janssen, C.R., 2005. Influence of soil zinc concentrations on zinc sensitivity and functional diversity of microbial communities. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 136, 275–281. doi:10.1016/j.envpol.2004.12.038
- Longcore, J.E., Simmons, D.R., 2012. Chytridiomycota, in: ELS. American Cancer Society. doi:10.1002/9780470015902.a0000349.pub3
- Lopez, M.J., Vargas-García, M. del C., Suárez-Estrella, F., Nichols, N.N., Dien, B.S., Moreno, J., 2007. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: Application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 794–800. doi:10.1016/j.enzmictec.2006.06.012
- Loreau, M., Naeem, S., Inchausti, P., 2002. *Biodiversity and Ecosystem Functioning: Synthesis and Perspectives*. Oxford University Press.

- Lu, M., Xu, K., Chen, J., 2013. Effect of pyrene and cadmium on microbial activity and community structure in soil. *Chemosphere* 91, 491–497. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.12.009
- Lucisine, P., Lecerf, A., Danger, M., Felten, V., Aran, D., Auclerc, A., Gross, E.M., Huot, H., Morel, J.-L., Muller, S., Nahmani, J., Maunoury-Danger, F., 2015. Litter chemistry prevails over litter consumers in mediating effects of past steel industry activities on leaf litter decomposition. *Science of The Total Environment* 537, 213–224. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.07.112
- 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. doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00535.x
- Luthy, R.G., Dzombak, D.A., Peters, C.A., Roy, S.B., Ramaswami, A., Nakles, D.V., Nott, B.R., 1994. Remediating tar-contaminated soils at manufactured gas plant sites. *Environmental Science & Technology* 28, 266A-276A. doi:10.1021/es00055a002
- Lützow, M. v, Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Matzner, E., Guggenberger, G., Marschner, B., Flessa, H., 2006. Stabilization of organic matter in temperate soils: mechanisms and their relevance under different soil conditions – a review. *European Journal of Soil Science* 57, 426–445. doi:10.1111/j.1365-2389.2006.00809.x
- Lv, X., Kankan, Z., Li, H., Ma, B., 2018. Niche partition of phenanthrene-degrading bacteria along a *Phragmites australis* rhizosphere gradient. *Biology and Fertility of Soils* 54, 607–616. doi:10.1007/s00374-018-1287-4
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Zyl, W.H. van, Pretorius, I.S., 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66, 506–577. doi:10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002

- M -

- Maagd, P.G.-J. de, Hulscher, D.T.E.M. ten, Heuvel, H. van den, Opperhuizen, A., Sijm, D.T.H.M., 1998. Physicochemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons: Aqueous solubilities, n-octanol/water partition coefficients, and Henry's law constants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 251–257. doi:10.1002/etc.5620170216
- Mackay, D., Shiu, W.Y., Ma, K.-C., 1992. *Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals, Volume II*, 1 edition. ed. CRC Press, Boca Raton.
- Macura, J., Kubátová, Z., 1973. Control of carbohydrate utilization by soil microflora. *Soil Biology and Biochemistry* 5, 193–204. doi:10.1016/0038-0717(73)90002-3
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., 2007. *Brock Biology of Microorganisms (11th edn)*. Pearson Education Inc.
- Madsen, E.L., 2011. Microorganisms and their roles in fundamental biogeochemical cycles. *Current Opinion in Biotechnology, Energy biotechnology – Environmental biotechnology* 22, 456–464. doi:10.1016/j.copbio.2011.01.008
- Malik, A.A., Thomson, B.C., Whiteley, A.S., Bailey, M., Griffiths, R.I., 2017. Bacterial Physiological Adaptations to Contrasting Edaphic Conditions Identified Using Landscape Scale Metagenomics. *Mbio* 8, e00799-17. doi:10.1128/mBio.00799-17

- Mallakin, A., McConkey, B.J., Miao, G., McKibben, B., Snieckus, V., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., 1999. Impacts of Structural Photomodification on the Toxicity of Environmental Contaminants: Anthracene Photooxidation Products. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43, 204–212. doi:10.1006/eesa.1999.1764
- Mangenot, F., 1980. The ecological and pedological significance of forest litter [WWW Document]. URL <http://hdl.handle.net/2042/21417>
- Mansfeldt, T., Dohrmann, R., 2004. Chemical and Mineralogical Characterization of Blast-Furnace Sludge from an Abandoned Landfill. *Environmental Science & Technology* 38, 5977–5984. doi:10.1021/es040002+
- Manzetti, S., 2013. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Environment: Environmental Fate and Transformation. *Polycyclic Aromatic Compounds* 33, 311–330. doi:10.1080/10406638.2013.781042
- Markowicz, A., Cycon, M., Piotrowska-Seget, Z., 2016a. Microbial Community Structure and Diversity in Long-term Hydrocarbon and Heavy Metal Contaminated Soils. *International Journal of Environmental Research* 10, 321–332.
- Markowicz, A., Plaza, G., Piotrowska-Seget, Z., 2016b. Activity and functional diversity of microbial communities in long-term hydrocarbon and heavy metal contaminated soils. *Archives of Environmental Protection* 42, 3–11. doi:10.1515/aep-2016-0041
- Maron, P.-A., Sarr, A., Kaisermann, A., Lévêque, J., Mathieu, O., Guigue, J., Karimi, B., Bernard, L., Dequiedt, S., Terrat, S., Chabbi, A., Ranjard, L., 2018. High microbial diversity promotes soil ecosystem functioning. *Applied and Environmental Microbiology* AEM.02738-17. doi:10.1128/AEM.02738-17
- Martirani-Von Abercron, S., Marín, P., Solsona-Ferraz, M., Castañeda-Cataña, M., Marqués, S., 2017. Naphthalene biodegradation under oxygen-limiting conditions: community dynamics and the relevance of biofilm-forming capacity. *Microbial Biotechnology* 10, 1781–1796. doi:10.1111/1751-7915.12842
- McEnroe, N.A., Helmisaari, H.-S., 2001. Decomposition of coniferous forest litter along a heavy metal pollution gradient, south-west Finland. *Environmental Pollution* 113, 11–18. doi:10.1016/S0269-7491(00)00163-9
- McGuire, K.L., Payne, S.G., Palmer, M.I., Gillikin, C.M., Keefe, D., Kim, S.J., Gedallovich, S.M., Discenza, J., Rangamannar, R., Koshner, J.A., Massmann, A.L., Orazi, G., Essene, A., Leff, J.W., Fierer, N., 2013. Digging the New York City Skyline: Soil Fungal Communities in Green Roofs and City Parks. *PLOS ONE* 8, e58020. doi:10.1371/journal.pone.0058020
- McLaren, R.G., Swift, R. s, Williams, J.G., 1981. The adsorption of copper by soil materials at low equilibrium solution concentrations. *Journal of Soil Science* 32, 247–256. doi:10.1111/j.1365-2389.1981.tb01704.x
- McLean, J.E., Bledsoe, B.E., 1992. Behavior of Metals in Soils. US-EPA 25.
- Meier, S., Borie, F., Bolan, N., Cornejo, P., 2012. Phytoremediation of Metal-Polluted Soils by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 42, 741–775. doi:10.1080/10643389.2010.528518
- Mendelssohn, I.A., Slocum, M.G., 2004. Relationship between soil cellulose decomposition and oil contamination after an oil spill at Swanson Creek, Maryland. *Marine Pollution Bulletin* 48, 359–370. doi:10.1016/j.marpolbul.2003.08.015
- Mendiburu, F. de, 2017. agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research.

- Minderman, G., 1968. Addition, Decomposition and Accumulation of Organic Matter in Forests. *Journal of Ecology* 56, 355–362. doi:10.2307/2258238
- Misson, B., Garnier, C., Lauga, B., Dang, D.H., Ghiglione, J.-F., Mullot, J.-U., Duran, R., Pringault, O., 2016. Chemical multi-contamination drives benthic prokaryotic diversity in the anthropized Toulon Bay. *Science of The Total Environment* 556, 319–329. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.02.038
- Miyata, N., Iwahori, K., Foght, J.M., Gray, M.R., 2004. Saturable, Energy-Dependent Uptake of Phenanthrene in Aqueous Phase by Mycobacterium sp. Strain RJGII-135. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 363–369. doi:10.1128/AEM.70.1.363-369.2004
- Moffett, B.F., Nicholson, F.A., Uwakwe, N.C., Chambers, B.J., Harris, J.A., Hill, T.C.J., 2003. Zinc contamination decreases the bacterial diversity of agricultural soil. *FEMS Microbiology Ecology* 43, 13–19. doi:10.1111/j.1574-6941.2003.tb01041.x
- Moore, A., Becking, J., 1963. Nitrogen Fixation by Bacillus Strains Isolated from Nigerian Soils. *Nature* 198, 915-. doi:10.1038/198915a0
- Moorhead, D.L., Sinsabaugh, R.L., 2006. A Theoretical Model of Litter Decay and Microbial Interaction. *Ecological Monographs* 76, 151–174. doi:10.1890/0012-9615(2006)076[0151:ATMOLD]2.0.CO;2
- Muhammad, A., Xu, J., Li, Z., Wang, H., Yao, H., 2005. Effects of lead and cadmium nitrate on biomass and substrate utilization pattern of soil microbial communities. *Chemosphere* 60, 508–514. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.01.001
- Munro, A.W., Lindsay, J.G., 1996. Bacterial cytochromes P-450. *Molecular Microbiology* 20, 1115–1125. doi:10.1111/j.1365-2958.1996.tb02632.x
- Murphy, D., R. Cookson, W., Braimbridge, M., Marschner, P., Jones, D., A. Stockdale, E., Abbott, L., 2011. Relationships between soil organic matter and the soil microbial biomass (size, functional diversity, and community structure) in crop and pasture systems in a semi-arid environment. *Soil Research* 49, 582–594. doi:10.1071/SR11203
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 695–700.

- N -

- Nacke, H., Thürmer, A., Wollherr, A., Will, C., Hodac, L., Herold, N., Schöning, I., Schruppf, M., Daniel, R., 2011. Pyrosequencing-based assessment of bacterial community structure along different management types in German forest and grassland soils. *PLoS One* 6, e17000. doi:10.1371/journal.pone.0017000
- Nam, J.J., Thomas, G.O., Jaward, F.M., Steinnes, E., Gustafsson, O., Jones, K.C., 2008. PAHs in background soils from Western Europe: Influence of atmospheric deposition and soil organic matter. *Chemosphere* 70, 1596–1602. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.08.010
- Nam, K., Chung, N., Alexander, M., 1998. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environmental Science & Technology* 32, 3785–3788. doi:10.1021/es980428m
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M.T., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G., 2003. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science* 54, 655–670. doi:10.1046/j.1351-0754.2003.0556.x

- Narendrula, R., Nkongolo, K., 2017. Bacterial and fungal community structure and diversity in a mining region under long-term metal exposure revealed by metagenomics sequencing. *Ecological Genetics and Genomics* 2, 13–24. doi:10.1016/j.egg.2016.11.001
- Nealson, K.H., 1997. Sediment bacteria: who's there, what are they doing, and what's new? *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 25, 403–434. doi:10.1146/annurev.earth.25.1.403
- Neufeld, J.D., Vohra, J., Dumont, M.G., Lueders, T., Manefield, M., Friedrich, M.W., Murrell, J.C., 2007. DNA stable-isotope probing. *Nature Protocols* 2, 860–866. doi:10.1038/nprot.2007.109
- Ni, C., Horton, D.J., Rui, J., Henson, M.W., Jiang, Y., Huang, X., Learman, D.R., 2016. High concentrations of bioavailable heavy metals impact freshwater sediment microbial communities. *Annals of Microbiology* 66, 1003–1012. doi:10.1007/s13213-015-1189-8
- Ni, N., Wang, F., Song, Y., Shi, R., Jia, M., Bian, Y., Jiang, X., 2017. Effects of cationic surfactant on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in rice and the soil microbial community structure. *RSC Advances* 7, 41444–41451. doi:10.1039/C7RA07124H
- Nielsen, U.N., Ayres, E., Wall, D.H., Bardgett, R.D., 2011. Soil biodiversity and carbon cycling: a review and synthesis of studies examining diversity–function relationships. *European Journal of Soil Science* 62, 105–116. doi:10.1111/j.1365-2389.2010.01314.x
- Niepceron, M., Martin-Laurent, F., Crampon, M., Portet-Koltalo, F., Akpa-Vinceslas, M., Legras, M., Bru, D., Bureau, F., Bodilis, J., 2013. GammaProteobacteria as a potential bioindicator of a multiple contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soils. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 180, 199–205. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.040
- Niklińska, M., Chodak, M., Stefanowicz, A., 2004. Community level physiological profiles of microbial communities from forest humus polluted with different amounts of Zn, Pb, and Cd—Preliminary study with BIOLOG ecoplates. *Soil Science and Plant Nutrition* 50, 941–944. doi:10.1080/00380768.2004.10408558
- Nordgren, A., Bååth, E., Söderström, B., 1988. Evaluation of soil respiration characteristics to assess heavy metal effects on soil microorganisms using glutamic acid as a substrate. *Soil Biology and Biochemistry* 20, 949–954. doi:10.1016/0038-0717(88)90109-5
- Northcott, G.L., Jones, K.C., 2001. Partitioning, Extractability, and Formation of Nonextractable PAH Residues in Soil. 1. Compound Differences in Aging and Sequestration. *Environmental Science & Technology* 35, 1103–1110. doi:10.1021/es000071y
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H., 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 178, 5636–5643.

- O -

- Obuekwe, I.S., Semple, K.T., 2013. Impact of Zn, Cu, Al and Fe on the partitioning and bioaccessibility of 14C-phenanthrene in soil. *Environmental Pollution* 180, 180–189. doi:10.1016/j.envpol.2013.05.020
- Ochsenreiter, T., Selezi, D., Quaiser, A., Bonch-Osmolovskaya, L., Schleper, C., 2003. Diversity and abundance of Crenarchaeota in terrestrial habitats studied by 16S RNA surveys and real time PCR. *Environmental Microbiology* 5, 787–797.

- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E., Wagner, H., 2017. *vegan: Community Ecology Package*.
- O'Neill, R.V., Deangelis, D.L., Waide, J.B., Allen, T.F.H., 1986. *A Hierarchical Concept of Ecosystems*. (MPB-23), Volume 23. Princeton University Press.
- Ophoff, H., Stork, A., Veerkamp, W., Führ, F., 1996. Volatilization and Mineralization of [3-¹⁴C]Fluoranthene After Soil Incorporation and Soil Surface Application. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 64, 97–109. doi:10.1080/03067319608028339
- Ordoñez, J.C., Bodegom, P.M.V., Witte, J.-P.M., Wright, I.J., Reich, P.B., Aerts, R., 2009. A global study of relationships between leaf traits, climate and soil measures of nutrient fertility. *Global Ecology and Biogeography* 18, 137–149. doi:10.1111/j.1466-8238.2008.00441.x
- Ouvrard, S., Barnier, C., Bauda, P., Beguiristain, T., Biache, C., Bonnard, M., Caupert, C., Cébron, A., Cortet, J., Cotellet, S., Dazy, M., Faure, P., Masfaraud, J.F., Nahmani, J., Palais, F., Poupin, P., Raoult, N., Vasseur, P., Morel, J.L., Leyval, C., 2011. In Situ Assessment of Phytotechnologies for Multicontaminated Soil Management. *International Journal of Phytoremediation* 13, 245–263. doi:10.1080/15226514.2011.568546

- P -

- Padmanabhan, P., Padmanabhan, S., DeRito, C., Gray, A., Gannon, D., Snape, J.R., Tsai, C.S., Park, W., Jeon, C., Madsen, E.L., 2003. Respiration of ¹³C-Labeled Substrates Added to Soil in the Field and Subsequent 16S rRNA Gene Analysis of ¹³C-Labeled Soil DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 1614–1622. doi:10.1128/AEM.69.3.1614-1622.2003
- Paine, R.T., 1995. A Conversation on Refining the Concept of Keystone Species. *Conservation Biology* 9, 962–964.
- Pankhurst, C.E., Hawke, B.G., McDonald, H.J., Kirkby, C.A., Buckerfield, J.C., Michelsen, P., O'Brien, K.A., Gupta, V., Doube, B.M., 1995. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35, 1015–1028. doi:10.1071/ea9951015
- Pascual, J., Hernandez, T., Garcia, C., Garcia, A., 1998. Changes in the organic matter mineralization rates of an arid soil after amendment with organic wastes. *Arid Soil Research and Rehabilitation* 12, 63–72. doi:10.1080/15324989809381498
- Pędziwiatr, A., Kierczak, J., Waroszewski, J., Ratié, G., Quantin, C., Ponzevera, E., 2018. Rock-type control of Ni, Cr, and Co phytoavailability in ultramafic soils. *Plant and Soil* 423, 339–362. doi:10.1007/s11104-017-3523-3
- 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 Reviews* 32, 927–955. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x
- Pennanen, T., 2001. Microbial communities in boreal coniferous forest humus exposed to heavy metals and changes in soil pH—a summary of the use of phospholipid fatty acids, Biolog® and 3H-thymidine incorporation methods in field studies. *Geoderma* 100, 91–126. doi:10.1016/S0016-7061(00)00082-3
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T., Martínez, J., 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology* 5, 53–63. doi:10.1007/s10123-002-0062-3

- Pöggeler, S., Wöstemeyer, J. (Eds.), 2011. *Evolution of Fungi and Fungal-Like Organisms, The Mycota*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Poonthrigpun, S., Pattaragulwanit, K., Paengthai, S., Kriangkripiat, T., Juntongjin, K., Thaniyavarn, S., Petsom, A., Pinphanichakarn, P., 2006. Novel Intermediates of Acenaphthylene Degradation by *Rhizobium* sp. Strain CU-A1: Evidence for Naphthalene-1,8-Dicarboxylic Acid Metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6034–6039. doi:10.1128/AEM.00897-06
- Post, R.D., Beeby, A.N., 1996. Activity of the Microbial Decomposer Community in Metal-Contaminated Roadside Soils. *Journal of Applied Ecology* 33, 703–709. doi:10.2307/2404941
- Potila, H., Sarjala, T., 2004. Seasonal fluctuation in microbial biomass and activity along a natural nitrogen gradient in a drained peatland. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1047–1055. doi:10.1016/j.soilbio.2004.02.014
- Preston-Mafham, J., Boddy, L., Randerson, P.F., 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles – a critique. *FEMS Microbiology Ecology* 42, 1–14. doi:10.1016/S0168-6496(02)00324-0
- Prévost-Bouré, N.C., Christen, R., Dequiedt, S., Mougél, C., Lelièvre, M., Jolivet, C., Shahbazkia, H.R., Guillou, L., Arrouays, D., Ranjard, L., 2011. Validation and Application of a PCR Primer Set to Quantify Fungal Communities in the Soil Environment by Real-Time Quantitative PCR. *PLOS ONE* 6, e24166. doi:10.1371/journal.pone.0024166
- Prosser, J.I., 1990. Autotrophic Nitrification in Bacteria, in: Rose, A.H., Tempest, D.W. (Eds.), *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 125–181. doi:10.1016/S0065-2911(08)60112-5

- R -

- Rachwał, M., Magiera, T., Wawer, M., 2015. Coke industry and steel metallurgy as the source of soil contamination by technogenic magnetic particles, heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere* 138, 863–873. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11.077
- Rajapaksha, R.M.C.P., Tobor-Kapłon, M.A., Bååth, E., 2004. Metal toxicity affects fungal and bacterial activities in soil differently. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 2966–2973.
- Ramirez, K.S., Lauber, C.L., Knight, R., Bradford, M.A., Fierer, N., 2010. Consistent effects of nitrogen fertilization on soil bacterial communities in contrasting systems. *Ecology* 91, 3463–3470. doi:10.1890/10-0426.1
- Ranjan, R., Rani, A., Finn, P.W., Perkins, D.L., 2018. Evaluating bacterial and functional diversity of human gut microbiota by complementary metagenomics and metatranscriptomics. *BioRxiv* 363200. doi:10.1101/363200
- Ravindran, A., Adav, S.S., Sze, S.K., 2012. Characterization of extracellular lignocellulolytic enzymes of *Coniochaeta* sp. during corn stover bioconversion. *Process Biochemistry* 47, 2440–2448. doi:10.1016/j.procbio.2012.10.003
- Reid, B.J., Stokes, J.D., Jones, K.C., Semple, K.T., 2000. Nonexhaustive Cyclodextrin-Based Extraction Technique for the Evaluation of PAH Bioavailability. *Environmental Science & Technology* 34, 3174–3179. doi:10.1021/es990946c
- Reis, M.P., Barbosa, F.A.R., Chartone-Souza, E., Nascimento, A.M.A., 2013. The prokaryotic community of a historically mining-impacted tropical stream sediment is as diverse as that from a pristine stream sediment. *Extremophiles* 17, 301–309. doi:10.1007/s00792-013-0517-9

- Ren, G., Teng, Y., Ren, W., Dai, S., Li, Z., 2016. Pyrene dissipation potential varies with soil type and associated bacterial community changes. *Soil Biology and Biochemistry* 103, 71–85. doi:10.1016/j.soilbio.2016.08.007
- Richter, H., Howard, J.B., 2000. Formation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their growth to soot—a review of chemical reaction pathways. *Progress in Energy and Combustion Science* 26, 565–608.
- Rieuwerts, J.S., Thornton, I., Farago, M.E., Ashmore, M.R., 1998. Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chemical Speciation & Bioavailability* 10, 61–75. doi:10.3184/095422998782775835
- Robert, M., Saugier, B., 2003. Contribution des écosystèmes continentaux à la séquestration du carbone. *Comptes Rendus Geoscience* 335, 577–595. doi:10.1016/S1631-0713(03)00094-4
- Robertson, C.E., Harris, J.K., Spear, J.R., Pace, N.R., 2005. Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. *Current Opinion in Microbiology* 8, 638–642. doi:10.1016/j.mib.2005.10.003
- Roesch, L.F., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K., Kent, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F.A., Farmerie, W.G., Triplett, E.W., 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal* 1, 283–290. doi:10.1038/ismej.2007.53
- Rohart, F., Gautier, B., Singh, A., Cao, K.-A.L., 2017. mixOmics: An R package for ‘omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Computational Biology* 13, e1005752. doi:10.1371/journal.pcbi.1005752
- Rojas-Jimenez, K., Wurzbacher, C., Bourne, E.C., Chiuchiolo, A., Priscu, J.C., Grossart, H.-P., 2017. Early diverging lineages within Cryptomycota and Chytridiomycota dominate the fungal communities in ice-covered lakes of the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Scientific Reports* 7, 15348. doi:10.1038/s41598-017-15598-w
- Roume, H., Heintz-Buschart, A., Muller, E.E.L., May, P., Satagopam, V.P., Laczny, C.C., Narayanasamy, S., Lebrun, L.A., Hoopmann, M.R., Schupp, J.M., Gillece, J.D., Hicks, N.D., Engelthaler, D.M., Sauter, T., Keim, P.S., Moritz, R.L., Wilmes, P., 2015. Comparative integrated omics: identification of key functionalities in microbial community-wide metabolic networks. *Npj Biofilms and Microbiomes* 1, 15007. doi:10.1038/npjbiofilms.2015.7
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G., Knight, R., Fierer, N., 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal* 4, 1340–1351. doi:10.1038/ismej.2010.58
- Rousk, J., Brookes, P.C., Bååth, E., 2009. Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 1589–1596. doi:10.1128/AEM.02775-08
- Rovira, A.D., 1969. Plant root exudates. *The Botanical Review* 35, 35–57. doi:10.1007/BF02859887
- Ruggeri, C., Franzetti, A., Bestetti, G., Caredda, P., La Colla, P., Pintus, M., Sergi, S., Tamburini, E., 2009. Isolation and characterisation of surface active compound-producing bacteria from hydrocarbon-contaminated environments. *International Biodeterioration & Biodegradation, 14th International Biodeterioration and Biodegradation Symposium* 63, 936–942. doi:10.1016/j.ibiod.2009.05.003
- Rühling, Å., Tyler, G., 1973. Heavy Metal Pollution and Decomposition of Spruce Needle Litter. *Oikos* 24, 402–416. doi:10.2307/3543816

Russo, G., Libkind, D., Giraudo, M.R., Daniel Delgado, O., 2016. Heavy metal capture by autochthonous yeasts from a volcanic influenced environment of Patagonia. *Journal of Basic Microbiology* 56, 1203–1211. doi:10.1002/jobm.201600048

- S -

Salvo, V.S., Gallizia, I., Moreno, M., Fabiano, M., 2005. Fungal communities in PAH-impacted sediments of Genoa-Voltri Harbour (NW Mediterranean, Italy). *Marine Pollution Bulletin* 50, 553–559. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.01.001

Sawulski, P., Clipson, N., Doyle, E., 2014. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on microbial community structure and PAH ring hydroxylating dioxygenase gene abundance in soil. *Biodegradation* 25, 835–847. doi:10.1007/s10532-014-9703-4

Schellenberger, S., Kolb, S., Drake, H.L., 2010. Metabolic responses of novel cellulolytic and saccharolytic agricultural soil Bacteria to oxygen. *Environmental Microbiology* 12, 845–861. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02128.x

Schimel, J.P., Schaeffer, S.M., 2012. Microbial control over carbon cycling in soil. *Frontiers in Microbiology* 3, 348. doi:10.3389/fmicb.2012.00348

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D.H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Horn, D.J.V., Weber, C.F., 2009. Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 7537–7541. doi:10.1128/AEM.01541-09

Schmidt, E., Ruschmeyer, O., 1958. Cellulose Decomposition in Soil Burial Beds .1. Soil Properties in Relation to Cellulose Degradation. *Applied Microbiology* 6, 108–114.

Schmidt, M.W.I., Torn, M.S., Abiven, S., Dittmar, T., Guggenberger, G., Janssens, I.A., Kleber, M., Kögel-Knabner, I., Lehmann, J., Manning, D.A.C., Nannipieri, P., Rasse, D.P., Weiner, S., Trumbore, S.E., 2011. Persistence of soil organic matter as an ecosystem property. *Nature* 478, 49–56. doi:10.1038/nature10386

Semple, K.T., Morriss, A.W.J., Paton, G.I., 2003. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science* 54, 809–818. doi:10.1046/j.1351-0754.2003.0564.x

Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M.H., Kirchmann, H., Kandeler, E., 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 4215–4224. doi:10.1128/AEM.67.9.4215-4224.2001

Setälä, H., McLean, M.A., 2004. Decomposition rate of organic substrates in relation to the species diversity of soil saprophytic fungi. *Oecologia* 139, 98–107. doi:10.1007/s00442-003-1478-y

Shen, G., Lu, Y., Zhou, Q., Hong, J., 2005. Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on soil enzyme. *Chemosphere* 61, 1175–1182. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.02.074

Shen, S., Li, X.-F., Cullen, W.R., Weinfeld, M., Le, X.C., 2013. Arsenic Binding to Proteins. *Chemical Reviews* 113, 7769–7792. doi:10.1021/cr300015c

Sherman, C., Steinberger, Y., 2012. Microbial Functional Diversity Associated with Plant Litter Decomposition Along a Climatic Gradient. *Microbial Ecology* 64, 399–415. doi:10.1007/s00248-012-0037-7

- Shiratori, H., Tagami, Y., Beppu, T., Ueda, K., 2010. *Cohnella fontinalis* sp. nov., a xylanolytic bacterium isolated from fresh water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60, 1344–1348. doi:10.1099/ij.s.0.014605-0
- Silva Júnior, F.M.R. da, Pereira, S.V., Silva Júnior, F.M.R. da, Pereira, S.V., 2014. Filamentous fungi isolated from Brazilian semiarid tolerant to metallurgical industry wastes: an ex situ evaluation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 57, 723–727. doi:10.1590/S1516-8913201402190
- Simon, H.M., Dodsworth, J.A., Goodman, R.M., 2000. Crenarchaeota colonize terrestrial plant roots. *Environmental Microbiology* 2, 495–505.
- Simoni, R.D., Roseman, S., Saier, M.H., 1976. Sugar transport. Properties of mutant bacteria defective in proteins of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *The Journal of Biological Chemistry* 251, 6584–6597.
- Smit, E., Leeflang, P., Glandorf, B., Dirk van Elsas, J., Wernars, K., 1999. Analysis of Fungal Diversity in the Wheat Rhizosphere by Sequencing of Cloned PCR-Amplified Genes Encoding 18S rRNA and Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2614–2621.
- Smith, S.E., Read, D. (Eds.), 2008. Mycorrhizal symbiosis, in: *Mycorrhizal Symbiosis* (Third Edition). Academic Press, London, pp. vii–ix.
- Smith, T.M., Smith, R.M., 2009. *Elements of Ecology*, 7th ed. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Smith, V.H., Graham, D.W., Cleland, D.D., 1998. Application of Resource-Ratio Theory to Hydrocarbon Biodegradation. *Environmental Science & Technology* 32, 3386–3395. doi:10.1021/es9805019
- Smreczak, B., Maliszewska-Kordybach, B., Martyniuk, S., 1999. Effect of PAHs and Heavy Metals on Activity of Soil Microflora. doi:10.1007/978-94-015-9235-2_19
- Song, M., Jiang, L., Zhang, D., Luo, C., Wang, Y., Yu, Z., Yin, H., Zhang, G., 2016. Bacteria capable of degrading anthracene, phenanthrene, and fluoranthene as revealed by DNA based stable-isotope probing in a forest soil. *Journal of Hazardous Materials* 308, 50–57. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.01.009
- Sorokin, D.Y., Toshchakov, S.V., Kolganova, T.V., Kublanov, I.V., 2015. Halo(natrono)archaea isolated from hypersaline lakes utilize cellulose and chitin as growth substrates. *Frontiers in Microbiology* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00942
- Sprocati, A.R., Alisi, C., Tasso, F., Fiore, A., Marconi, P., Langella, F., Haferburg, G., Nicoara, A., Neagoe, A., Kothe, E., 2014. Bioprospecting at former mining sites across Europe: microbial and functional diversity in soils. *Environmental Science and Pollution Research International* 21, 6824–6835. doi:10.1007/s11356-013-1907-3
- Stazi, S.R., Moscatelli, M.C., Papp, R., Crognale, S., Grego, S., Martin, M., Marabottini, R., 2017. A Multi-biological Assay Approach to Assess Microbial Diversity in Arsenic (As) Contaminated Soils. *Geomicrobiology Journal* 34, 183–192. doi:10.1080/01490451.2016.1189015
- Stefanowicz, A.M., Niklińska, M., Laskowski, R., 2008. Metals affect soil bacterial and fungal functional diversity differently. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 591–598. doi:10.1897/07-288.1
- Steinman, H.M., Weinstein, L., Brenowitz, M., 1994. The manganese superoxide dismutase of *Escherichia coli* K-12 associates with DNA. *The Journal of Biological Chemistry* 269, 28629–28634.

- Sterckeman, T., 2004. Caractérisation du fond géochimique en éléments en traces dans les sols issus de roches sédimentaires du Nord de la France. INPL.
- Straalen, N.M. van, Krivolutsky, D.A., 1996. *Bioindicator Systems for Soil Pollution*. Springer Science & Business Media.
- Stülke, J., Hillen, W., 1999. Carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 2, 195–201. doi:10.1016/S1369-5274(99)80034-4
- Štursová, M., Žifčáková, L., Leigh, M.B., Burgess, R., Baldrian, P., 2012. Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. *FEMS Microbiology Ecology* 80, 735–746. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01343.x
- Suess, M.J., 1976. The environmental load and cycle of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Science of The Total Environment* 6, 239–250. doi:10.1016/0048-9697(76)90033-4
- Sullivan, T.S., McBride, M.B., Thies, J.E., 2013. Rhizosphere microbial community and Zn uptake by willow (*Salix purpurea* L.) depend on soil sulfur concentrations in metalliferous peat soils. *Applied Soil Ecology* 67, 53–60. doi:10.1016/j.apsoil.2013.02.003
- Sun, R., Crowley, D.E., Wei, G., 2015. Study of phenanthrene utilizing bacterial consortia associated with cowpea (*Vigna unguiculata*) root nodules. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31, 415–433. doi:10.1007/s11274-014-1796-8
- Sutherland, J.B., 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *Journal of Industrial Microbiology* 9, 53–61.
- Sutton, N.B., Maphosa, F., Morillo, J.A., Abu Al-Soud, W., Langenhoff, A.A.M., Grotenhuis, T., Rijnaarts, H.H.M., Smidt, H., 2013. Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 619–630. doi:10.1128/AEM.02747-12

- T -

- Tardy, V., Chabbi, A., Charrier, X., Berranger, C. de, Reignier, T., Dequiedt, S., Faivre-Primot, C., Terrat, S., Ranjard, L., Maron, P.-A., 2015. Land Use History Shifts In Situ Fungal and Bacterial Successions following Wheat Straw Input into the Soil. *PLOS ONE* 10, e0130672. doi:10.1371/journal.pone.0130672
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N.S., Wijesundera, R., Ruiz, L.V., Vasco-Palacios, A.M., Thu, P.Q., Suija, A., Smith, M.E., Sharp, C., Saluveer, E., Saitta, A., Rosas, M., Riit, T., Ratkowsky, D., Pritsch, K., Põldmaa, K., Piepenbring, M., Phosri, C., Peterson, M., Parts, K., Pärtel, K., Otsing, E., Nouhra, E., Njouonkou, A.L., Nilsson, R.H., Morgado, L.N., Mayor, J., May, T.W., Majuakim, L., Lodge, D.J., Lee, S.S., Larsson, K.-H., Kohout, P., Hosaka, K., Hiiesalu, I., Henkel, T.W., Harend, H., Guo, L., Greslebin, A., Grelet, G., Geml, J., Gates, G., Dunstan, W., Dunk, C., Drenkhan, R., Dearnaley, J., Kesel, A.D., Dang, T., Chen, X., Buegger, F., Brearley, F.Q., Bonito, G., Anslan, S., Abell, S., Abarenkov, K., 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science* 346, 1256688. doi:10.1126/science.1256688
- Teeri, T.T., 1997. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology* 15, 160–167. doi:10.1016/S0167-7799(97)01032-9
- Teng, Y., Shen, Y., Luo, Y., Sun, X., Sun, M., Fu, D., Li, Z., Christie, P., 2011. Influence of *Rhizobium meliloti* on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials* 186, 1271–1276. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.11.126

- Thavamani, P., Malik, S., Beer, M., Megharaj, M., Naidu, R., 2012. Microbial activity and diversity in long-term mixed contaminated soils with respect to polyaromatic hydrocarbons and heavy metals. *Journal of Environmental Management* 99, 10–17. doi:10.1016/j.jenvman.2011.12.030
- Thion, C., Cebon, A., Beguiristain, T., Leyval, C., 2012. Long-term in situ dynamics of the fungal communities in a multi-contaminated soil are mainly driven by plants. *Fems Microbiology Ecology* 82, 169–181. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01414.x
- Thomas, F., Cébron, A., 2016. Short-Term Rhizosphere Effect on Available Carbon Sources, Phenanthrene Degradation, and Active Microbiome in an Aged-Contaminated Industrial Soil. *Systems Microbiology* 92. doi:10.3389/fmicb.2016.00092
- Tian, J., McCormack, L., Wang, J., Guo, D., Wang, Q., Zhang, X., Yu, G., Blagodatskaya, E., Kuzyakov, Y., 2015. Linkages between the soil organic matter fractions and the microbial metabolic functional diversity within a broad-leaved Korean pine forest. *European Journal of Soil Biology* 66, 57–64. doi:10.1016/j.ejsobi.2014.12.001
- Tian, J.-H., Pourcher, A.-M., Bouchez, T., Gelhaye, E., Peu, P., 2014. Occurrence of lignin degradation genotypes and phenotypes among prokaryotes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 9527–9544. doi:10.1007/s00253-014-6142-4
- Tiunov, A.V., Scheu, S., 2005. Facilitative interactions rather than resource partitioning drive diversity-functioning relationships in laboratory fungal communities. *Ecology Letters* 8, 618–625. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00757.x
- Toljander, Y.K., Lindahl, B.D., Holmer, L., Högborg, N.O.S., 2006. Environmental fluctuations facilitate species co-existence and increase decomposition in communities of wood decay fungi. *Oecologia* 148, 625–631. doi:10.1007/s00442-006-0406-3
- Tolosa, I., Bayona, J.M., Albaigés, J., 1996. Aliphatic and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Sulfur/Oxygen Derivatives in Northwestern Mediterranean Sediments: Spatial and Temporal Variability, Fluxes, and Budgets. *Environmental Science & Technology* 30, 2495–2503. doi:10.1021/es950647x
- Torn, M.S., Swanston, C.W., Castanha, C., Trumbore, S.E., 2009. Storage and Turnover of Organic Matter in Soil, in: *Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems*. Wiley-Blackwell, pp. 219–272. doi:10.1002/9780470494950.ch6
- Torres, I.F., Bastida, F., Hernández, T., Bombach, P., Richnow, H.H., García, C., 2014. The role of lignin and cellulose in the carbon-cycling of degraded soils under semiarid climate and their relation to microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 75, 152–160. doi:10.1016/j.soilbio.2014.04.007
- Torsvik, V., Øvreås, L., Thingstad, T.F., 2002. Prokaryotic diversity--magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science (New York, N.Y.)* 296, 1064–1066. doi:10.1126/science.1071698
- Truu, J., Talpsep, E., Heinaru, E., Stottmeister, U., Wand, H., Heinaru, A., 1999. Comparison of API 20NE and Biolog GN identification systems assessed by techniques of multivariate analyses. *Journal of Microbiological Methods* 36, 193–201.
- Trzesicka-Mlynarz, D., Ward, O.P., 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a mixed culture and its component pure cultures, obtained from PAH-contaminated soil. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 470–476.

- U -

- Uroz, S., Oger, P., Tisserand, E., Cébron, A., Turpault, M.-P., Buée, M., Boer, W.D., Leveau, J.H.J., Frey-Klett, P., 2016. Specific impacts of beech and Norway spruce on the structure and diversity of the rhizosphere and soil microbial communities. *Scientific Reports* 6, 27756. doi:10.1038/srep27756
- US EPA, 1985. EVALUATION AND ESTIMATION OF POTENTIAL CARCINOGENIC RISKS OF POLYNUCLEAR AROMATIC HYDROCARBONS (PAH).

- V -

- Vainio, E.J., Hantula, J., 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research* 104, 927–936. doi:10.1017/S0953756200002471
- Val, C.D., Barea, J.M., Azcón-Aguilar, C., 1999. Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungus Populations in Heavy-Metal-Contaminated Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 718–723.
- Valentini, R., Matteucci, G., Dolman, A.J., Schulze, E.-D., Rebmann, C., Moors, E.J., Granier, A., Gross, P., Jensen, N.O., Pilegaard, K., Lindroth, A., Grelle, A., Bernhofer, C., Grünwald, T., Aubinet, M., Ceulemans, R., Kowalski, A.S., Vesala, T., Rannik, Ü., Berbigier, P., Loustau, D., Guðmundsson, J., Thorgeirsson, H., Ibrom, A., Morgenstern, K., Clement, R., Moncrieff, J., Montagnani, L., Minerbi, S., Jarvis, P.G., 2000. Respiration as the main determinant of carbon balance in European forests. *Nature* 404, 861–865. doi:10.1038/35009084
- Valsecchi, G., Gigliotti, C., Farini, A., 1995. Microbial biomass, activity, and organic matter accumulation in soils contaminated with heavy metals. *Biology and Fertility of Soils* 20, 253–259. doi:10.1007/BF00336086
- Van Nevel, L., Mertens, J., Demey, A., De Schrijver, A., De Neve, S., Tack, F.M.G., Verheyen, K., 2014. Metal and nutrient dynamics in decomposing tree litter on a metal contaminated site. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 189, 54–62. doi:10.1016/j.envpol.2014.02.009
- Verdin, A., Sahraoui, A.L.-H., Durand, R., 2004. Degradation of benzo[a]pyrene by mitosporic fungi and extracellular oxidative enzymes. *International Biodeterioration & Biodegradation* 53, 65–70. doi:10.1016/j.ibiod.2003.12.001
- Viñas, M., Sabaté, J., Espuny, M.J., Solanas, A.M., 2005. Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7008–7018. doi:10.1128/AEM.71.11.7008-7018.2005
- Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., Garnier, E., 2007. Let the concept of trait be functional! *Oikos* 116, 882–892. doi:10.1111/j.0030-1299.2007.15559.x
- Vitousek, P.M., 1998. Foliar and Litter Nutrients, Nutrient Resorption, and Decomposition in Hawaiian *Metrosideros polymorpha*. *Ecosystems* 1, 401–407.
- Vivas, A., Moreno, B., Val, C. del, Macci, C., Masciandaro, G., Benitez, E., 2008. Metabolic and bacterial diversity in soils historically contaminated by heavy metals and hydrocarbons. *Journal of Environmental Monitoring* 10, 1287–1296. doi:10.1039/B808567F

- W -

- Wald, J., Hroudova, M., Jansa, J., Vrchotova, B., Macek, T., Uhlik, O., 2015. Pseudomonads Rule Degradation of Polyaromatic Hydrocarbons in Aerated Sediment. *Frontiers in Microbiology* 6, 1268. doi:10.3389/fmicb.2015.01268
- Wallace, K.J., 2007. Classification of ecosystem services: Problems and solutions. *Biological Conservation* 139, 235–246. doi:10.1016/j.biocon.2007.07.015
- Wang, F., Yao, J., Si, Y., Chen, H., Russel, M., Chen, K., Qian, Y., Zaray, G., Bramanti, E., 2010. Short-time effect of heavy metals upon microbial community activity. *Journal of Hazardous Materials* 173, 510–516. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.08.114
- Wang, H., Lou, J., Gu, H., Luo, X., Yang, L., Wu, L., Liu, Y., Wu, J., Xu, J., 2016. Efficient biodegradation of phenanthrene by a novel strain *Massilia* sp WF1 isolated from a PAH-contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 13378–13388. doi:10.1007/s11356-016-6515-6
- Wang, J., Wang, Yuhui, Song, X., Wang, Yuan, Lei, X., 2017. Elevated Atmospheric CO₂ and Drought Affect Soil Microbial Community and Functional Diversity Associated with *Glycine max*. *Revista Brasileira De Ciencia Do Solo* 41, e0160460. doi:10.1590/18069657rbcs20160460
- Wang, Y., Shi, J., Wang, H., Lin, Q., Chen, X., Chen, Y., 2007. The influence of soil heavy metals pollution on soil microbial biomass, enzyme activity, and community composition near a copper smelter. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67, 75–81. doi:10.1016/j.ecoenv.2006.03.007
- Wardle, D.A., 1992. A Comparative Assessment of Factors Which Influence Microbial Biomass Carbon and Nitrogen Levels in Soil. *Biological Reviews* 67, 321–358. doi:10.1111/j.1469-185X.1992.tb00728.x
- Wertz, S., Degrange, V., Prosser, J.I., Poly, F., Commeaux, C., Freitag, T., Guillaumaud, N., Roux, X.L., 2006. Maintenance of soil functioning following erosion of microbial diversity. *Environmental Microbiology* 8, 2162–2169. doi:10.1111/j.1462-2920.2006.01098.x
- Wick, L.Y., Ruiz de Munain, A., Springael, D., Harms, H., de, M.A.R., 2002. Responses of *Mycobacterium* sp. LB501T to the low bioavailability of solid anthracene. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 378–385. doi:10.1007/s00253-001-0898-z
- Wilcke, W., 2000. SYNOPSIS Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soil — a Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 163, 229–248. doi:10.1002/1522-2624(200006)163:3<229::AID-JPLN229>3.0.CO;2-6
- Wilhelm, R.C., Cardenas, E., Leung, H., Szeitz, A., Jensen, L.D., Mohn, W.W., 2017. Long-Term Enrichment of Stress-Tolerant Cellulolytic Soil Populations following Timber Harvesting Evidenced by Multi-Omic Stable Isotope Probing. *Frontiers in Microbiology* 8, 537. doi:10.3389/fmicb.2017.00537
- Will, C., Thürmer, A., Wollherr, A., Nacke, H., Herold, N., Schrumpf, M., Gutknecht, J., Wubet, T., Buscot, F., Daniel, R., 2010. Horizon-specific bacterial community composition of German grassland soils, as revealed by pyrosequencing-based analysis of 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* 76, 6751–6759. doi:10.1128/AEM.01063-10
- Wilson, S.C., Jones, K.C., 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Environmental Pollution* 81, 229–249. doi:10.1016/0269-7491(93)90206-4

- Winding, A., Hendriksen, N.B., 2007. Comparison of CLPP and enzyme activity assay for functional characterization of bacterial soil communities. *Journal of Soils and Sediments* 7, 411–417. doi:10.1065/jss2007.11.262
- Wohl, D.L., Arora, S., Gladstone, J.R., 2004. Functional Redundancy Supports Biodiversity and Ecosystem Function in a Closed and Constant Environment. *Ecology* 85, 1534–1540. doi:10.1890/03-3050
- Wold, S., Ruhe, A., Wold, H., Dunn, I., W., 1984. The Collinearity Problem in Linear Regression. The Partial Least Squares (PLS) Approach to Generalized Inverses. *SIAM Journal on Scientific and Statistical Computing* 5, 735–743. doi:10.1137/0905052
- Wold, S., Sjöström, M., Eriksson, L., 2001. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, PLS Methods* 58, 109–130. doi:10.1016/S0169-7439(01)00155-1

- Y -

- Yachi, S., Loreau, M., 1999. Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 1463–1468.
- Yan, J., Quan, G., Ding, C., 2013. Effects of the combined pollution of lead and cadmium on soil urease activity and nitrification, in: Quan, X. (Ed.), 2013 International Symposium on Environmental Science and Technology (2013 Isest). Elsevier Science Bv, Amsterdam, pp. 78–83.
- Yang, P., van Elsas, J.D., 2018. Mechanisms and ecological implications of the movement of bacteria in soil. *Applied Soil Ecology* 129, 112–120. doi:10.1016/j.apsoil.2018.04.014
- Yang, S., Wen, X., Zhao, L., Shi, Y., Jin, H., 2014. Crude Oil Treatment Leads to Shift of Bacterial Communities in Soils from the Deep Active Layer and Upper Permafrost along the China-Russia Crude Oil Pipeline Route. *PLOS ONE* 9, e96552. doi:10.1371/journal.pone.0096552
- Yang, Y., Chen, Y.X., Tian, G.M., Zhang, Z.J., 2005. Microbial activity related to N cycling in the rhizosphere of maize stressed by heavy metals. *Journal of Environmental Sciences* 17, 448–451.
- Yao, M., Rui, J., Niu, H., Heděnec, P., Li, J., He, Z., Wang, J., Cao, W., Li, X., 2017. The differentiation of soil bacterial communities along a precipitation and temperature gradient in the eastern Inner Mongolia steppe. *CATENA* 152, 47–56. doi:10.1016/j.catena.2017.01.007
- Yin, B., Crowley, D., Sparovek, G., Melo, W.J.D., Borneman, J., 2000. Bacterial Functional Redundancy along a Soil Reclamation Gradient. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4361–4365. doi:10.1128/AEM.66.10.4361-4365.2000

- Z -

- Zak, J.C., Willig, M.R., Moorhead, D.L., Wildman, H.G., 1994. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 1101–1108. doi:10.1016/0038-0717(94)90131-7

- Zarei, M., Hempel, S., Wubet, T., Schäfer, T., Savaghebi, G., Jouzani, G.S., Nekouei, M.K., Buscot, F., 2010. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil chemical properties and heavy metal contamination. *Environmental Pollution* 158, 2757–2765. doi:10.1016/j.envpol.2010.04.017
- Zhang, D., Hui, D., Luo, Y., Zhou, G., 2008. Rates of litter decomposition in terrestrial ecosystems: global patterns and controlling factors. *Journal of Plant Ecology* 1, 85–93. doi:10.1093/jpe/rtn002
- Zhang, N., Liu, W., Yang, H., Yu, X., Gutknecht, J.L.M., Zhang, Z., Wan, S., Ma, K., 2013. Soil microbial responses to warming and increased precipitation and their implications for ecosystem C cycling. *Oecologia* 173, 1125–1142. doi:10.1007/s00442-013-2685-9
- Zhang, W., Chen, L., Zhang, R., Lin, K., 2016. High throughput sequencing analysis of the joint effects of BDE209-Pb on soil bacterial community structure. *Journal of Hazardous Materials* 301, 1–7. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.08.037
- Zhang, W., Parker, K.M., Luo, Y., Wan, S., Wallace, L.L., Hu, S., 2005. Soil microbial responses to experimental warming and clipping in a tallgrass prairie. *Global Change Biology* 11, 266–277. doi:10.1111/j.1365-2486.2005.00902.x
- Zhang, W., Wang, H., Zhang, R., Yu, X.-Z., Qian, P.-Y., Wong, M.H., 2010. Bacterial communities in PAH contaminated soils at an electronic-waste processing center in China. *Ecotoxicology* 19, 96–104. doi:10.1007/s10646-009-0393-3
- Zhang, Zhao, L., Xu, S.J., Liu, Y.Z., Liu, H.Y., Cheng, G.D., 2013. Soil moisture effect on bacterial and fungal community in Beilu River (Tibetan Plateau) permafrost soils with different vegetation types. *Journal of Applied Microbiology* 114, 1054–1065. doi:10.1111/jam.12106
- Zhao, D., Li, F., Yang, Q., Wang, R., Song, Y., Tao, Y., 2013. The influence of different types of urban land use on soil microbial biomass and functional diversity in Beijing, China. *Soil Use and Management* 29, 230–239. doi:10.1111/sum.12034
- Zhou, Z.-F., Wang, M.-X., Zuo, X.-H., Yao, Y.-H., 2017. Comparative Investigation of Bacterial, Fungal, and Archaeal Community Structures in Soils in a Typical Oilfield in Jiangnan, China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 72, 65–77. doi:10.1007/s00244-016-0333-1

Annexes

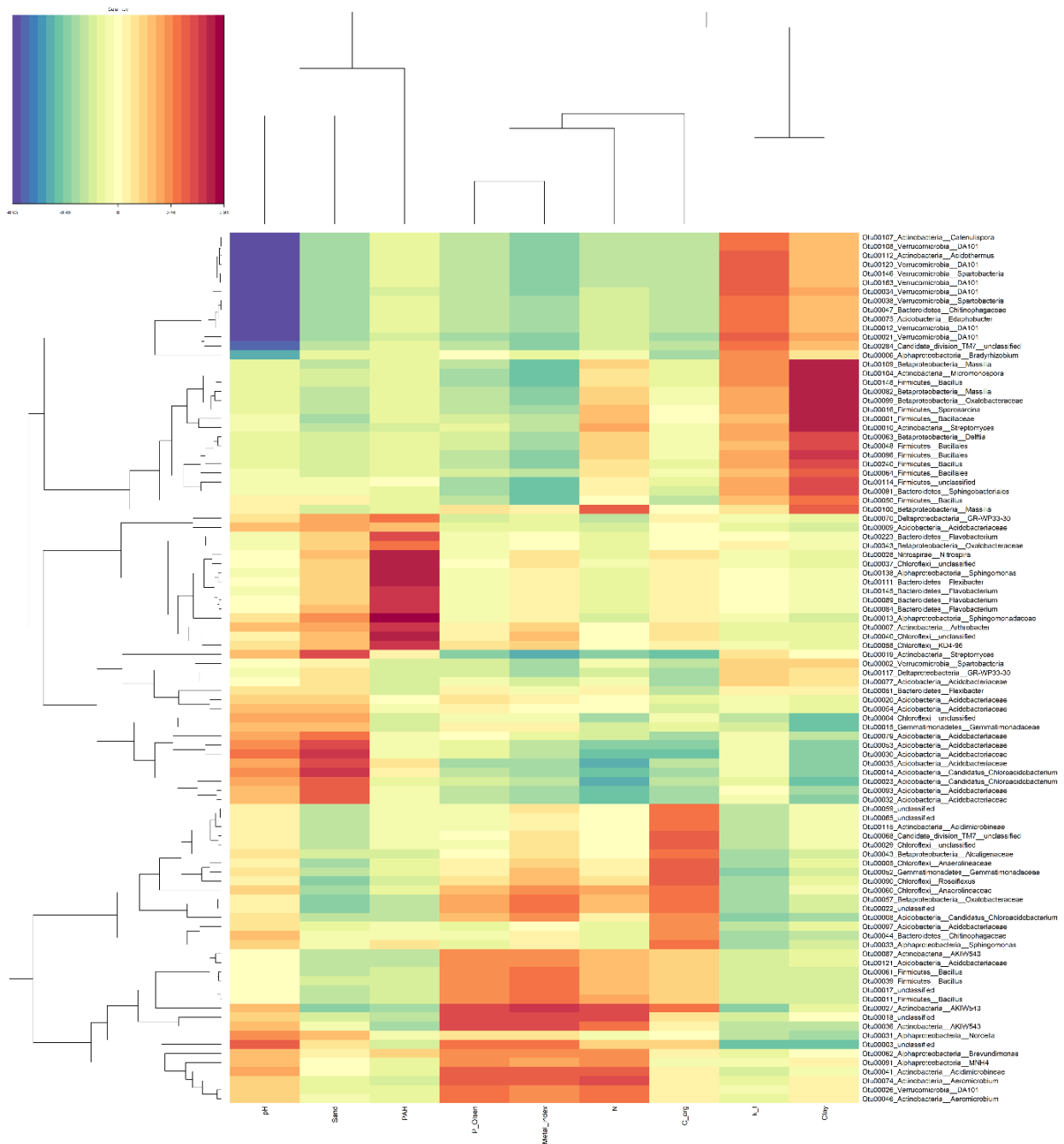


Figure S3.1. Heatmap based on the similarity matrix obtained from the PLSr analysis (implemented using 5 components). The heatmap depicts the positive (red) and negative (blue) correlations between OTU abundances (the predictor matrix) and the soil physico-chemical properties (the response variables) investigated in this study. Dendrograms indicate the level of similarity among the clusters present in the heatmap. The hierarchical clustering was based on the Euclidean distance and the complete linkage method.

Table S3.1. Substrates used in the Biolog® and MicroResp™ experiments. Substrates classified in guilds based on Preston-Mafham et al. (2002).

Chemical guild	Substrate	Chemical formula	Biolog		MicroResp	
			Eco	MT2	Substrate	Time (h)
PAHs	Phenanthrene	C ₁₄ H ₁₀		✓		
	Pyrene	C ₁₆ H ₁₀		✓		
	Fluoranthene	C ₁₆ H ₁₀		✓		
	Fluorene	C ₁₃ H ₁₀		✓		
Aromatic acids	Benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₂		✓		
	Protocatechuic acid	C ₇ H ₆ O ₄		✓		
	Phtalic acid	C ₈ H ₆ O ₄		✓		
	P-Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃		✓		
	Ferulic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₄		✓		
	Syringic acid	C ₉ H ₁₀ O ₅		✓		
Carboxylic acids	Pyruvic acid	C ₃ H ₄ O ₃		✓	✓	4.67
	Propionic acid	C ₃ H ₆ O ₂		✓		
	D-Gluconic acid	C ₆ H ₁₂ O ₇		✓		
	Oxalic acid	C ₂ H ₂ O ₄		✓		
	Succinic acid	C ₄ H ₆ O ₄		✓	✓	6.67
	Citric acid	C ₆ H ₈ O ₇		✓	✓	6.17
	Trans-Aconitic acid	C ₆ H ₆ O ₆		✓		
	L-Tartaric acid	C ₄ H ₆ O ₆		✓		
	D-Galactonic acid γ-lactone	C ₆ H ₁₀ O ₆	✓			
	D-Galacturonic acid	C ₆ H ₁₀ O ₇	✓			
	γ-Hydroxybutyric acid	C ₄ H ₈ O ₃	✓			
	D-Glucosaminic acid	C ₆ H ₁₃ NO ₆	✓			
	Itaconic acid	C ₅ H ₆ O ₄	✓			
	α-Ketobutyric acid	C ₄ H ₆ O ₃	✓			
	D-Malic acid	C ₄ H ₆ O ₅	✓			
	2-Hydroxy benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	✓			
	4-Hydroxy benzoic acid	C ₇ H ₆ O ₃	✓			
Amino acids	L-Proline	C ₅ H ₉ NO ₂		✓		
	Glycine	C ₂ H ₅ NO ₂		✓		
	L-Alanine	C ₃ H ₇ NO ₂		✓		
	L-Arginine	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	✓			
	L-Asparagine	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	✓		✓	5.33
	L-Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ NO ₂	✓			
	L-Serine	C ₃ H ₇ NO ₃	✓			
	L-Threonine	C ₄ H ₉ NO ₃	✓			
	Glycyl-L-Glutamic Acid	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₅	✓			
Carbohydrates	D-Ribose	C ₅ H ₁₀ O ₅		✓	✓	8.00
	D-Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆		✓		
	D-Fructose	C ₆ H ₁₂ O ₆		✓		
	D-Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		✓		
	D-Trehalose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁		✓		
	D-Mannose	C ₆ H ₁₂ O ₆		✓		
	β-Methyl-D-glucoside	C ₇ H ₁₄ O ₆	✓			
	D-Xylose	C ₅ H ₁₀ O ₅	✓			
	<i>i</i> -Erythritol	C ₄ H ₁₀ O ₄	✓			
	D-Mannitol	C ₆ H ₁₄ O ₆	✓		✓	8.17
	N-Acetyl-D-glucosamine	C ₈ H ₁₅ NO ₆	✓			
	D-Cellobiose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	✓			
	α-D-Lactose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	✓			
	Pyruvic acid methyl ester	C ₄ H ₆ O ₃	✓			
Polymers	Lignin (alkali)	(C ₁₄ H ₂₀ O ₃ S) _n		✓		
	Cellulose (from Spruce)	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n		✓		
	Xylan	(C ₅ H ₈ O ₅) _n		✓		
	Glycogen	(C ₆ H ₁₀ O ₅) _n	✓			
	α-Cyclodextrine	C ₃₆ H ₆₀ O ₃₀	✓			
	Tween 40		✓			
	Tween 80		✓			
Miscellaneous	Glucose-1-phosphate	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	✓			
	D,L-α-Glycerol phosphate	C ₃ H ₉ O ₆ P	✓			
	Phenylethyl-amine	C ₈ H ₁₁ N	✓			
	Putrescine	C ₄ H ₁₂ N ₂	✓			
	Catechol	C ₆ H ₆ O ₂		✓		

Table S3.2. The p values and F coefficients for axes and soil properties for the redundancy analyses presented on the Figure 6.

		F-value	P-value	
RDA-A	Axis 1	26.338	0.001 ***	
	Axis 2	1.683	0.216	
	Ti_metals	2.072	0.198	
	PAH	1.729	0.238	
	sand	16.304	0.002 **	
	pH	3.251	0.108	
RDA-B	Axis 1	10.353	0.002 **	
	Axis 2	2.815	0.111	
	C_org	4.458	0.009 **	
	N	8.709	0.002 **	
RDA-C	Axis 1	19.903	0.002 **	
	Axis 2	8.222	0.012 *	
	Ti_metals	7.767	0.010 **	
	PAH	1.047	0.412	
	C_org	2.963	0.110	
	N	4.708	0.032 *	
	K_t	2.396	0.139	

Stars indicate significant levels:
 * $p < 0.05$
 ** $p < 0.01$
 *** $p < 0.001$

Table S5.1. Microbial and physico-chemical characteristics of unspiked soils. *16S rRNA gene copy number and Chao1 index are presented by means ($n = 3$) \pm standard error of the mean (SEM). Zn, Pb and Cd values corresponded to total concentrations. Extracted from Lemmel et al. (in press; chap. 3).*

	16S rRNA Gene copy number per g dw soil ($\times 10^{10}$)	Chao1 richness index	pH (H ₂ O)	Total organic carbon (g kg ⁻¹)	Nitrogen (g kg ⁻¹)	C/N	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	Zn (mg kg ⁻¹)	Pb (mg kg ⁻¹)	Cd (mg kg ⁻¹)
He	25.0 \pm 2.2	3 162 \pm 441	5.4	72.1	2.85	25.3	25.5	69.0	5.5	248	93	0.27
Di	30.1 \pm 1.1	4 966 \pm 56	7.3	24.3	1.74	14.0	11.5	14.3	74.2	60.5	31	0.15
Uc	6.8 \pm 0.5	4 293 \pm 505	8.0	29.9	0.56	53.6	5.5	17.6	76.9	74	23	0.09
Mo	17.8 \pm 2.4	2 621 \pm 356	7.0	81.5	4.56	17.9	48.9	46.0	5.1	144	44	0.71
RM	17.9 \pm 0.4	2 478 \pm 26	7.6	149.0	3.83	38.8	10.9	74.6	14.5	119 000	39,500	22.00
Po	41.5 \pm 0.4	3 422 \pm 386	7.8	109.0	7.19	15.2	17.5	53.3	29.2	29 600	34 700	152.00
MsM	26.4 \pm 1.2	3 151 \pm 4	7.2	119.0	4.18	28.5	10.9	72.7	16.4	55 400	14 400	17.60
Te	41.5 \pm 1.2	4 381 \pm 66	7.7	88.2	4.35	20.3	10.0	20.7	69.3	1 650	475	4.55
Ho	14.8 \pm 0.7	4 966 \pm 173	7.5	159.0	2.92	54.6	7.0	12.0	81.0	314	303	1.10
NM	4.4 \pm 0.3	2 541 \pm 174	7.4	75.2	2.35	32.0	13.3	27.9	58.8	2 540	653	3.27

Table S5.2. P-value and adjusted R-squared of soil physico-chemical characteristics tested in order to explain PHE degradation among soils. *Based on simple linear correlations, the three soil characteristics showing the lowest P-values were selected to search multiple interactions, that could explain PHE degradation among soils.*

Explanatory variable	P-value	Adjust R-squared
P_Olsen	0.256	0.052
Cd_tot	0.265	0.046
C:N	0.281	0.036
P_Olsen * Cd_tot	0.185	0.292
P_Olsen * C:N	0.295	0.156
Cd_tot * C:N	0.396	0.054
P_Olsen * Cd_tot * C:N	0.568	0.041

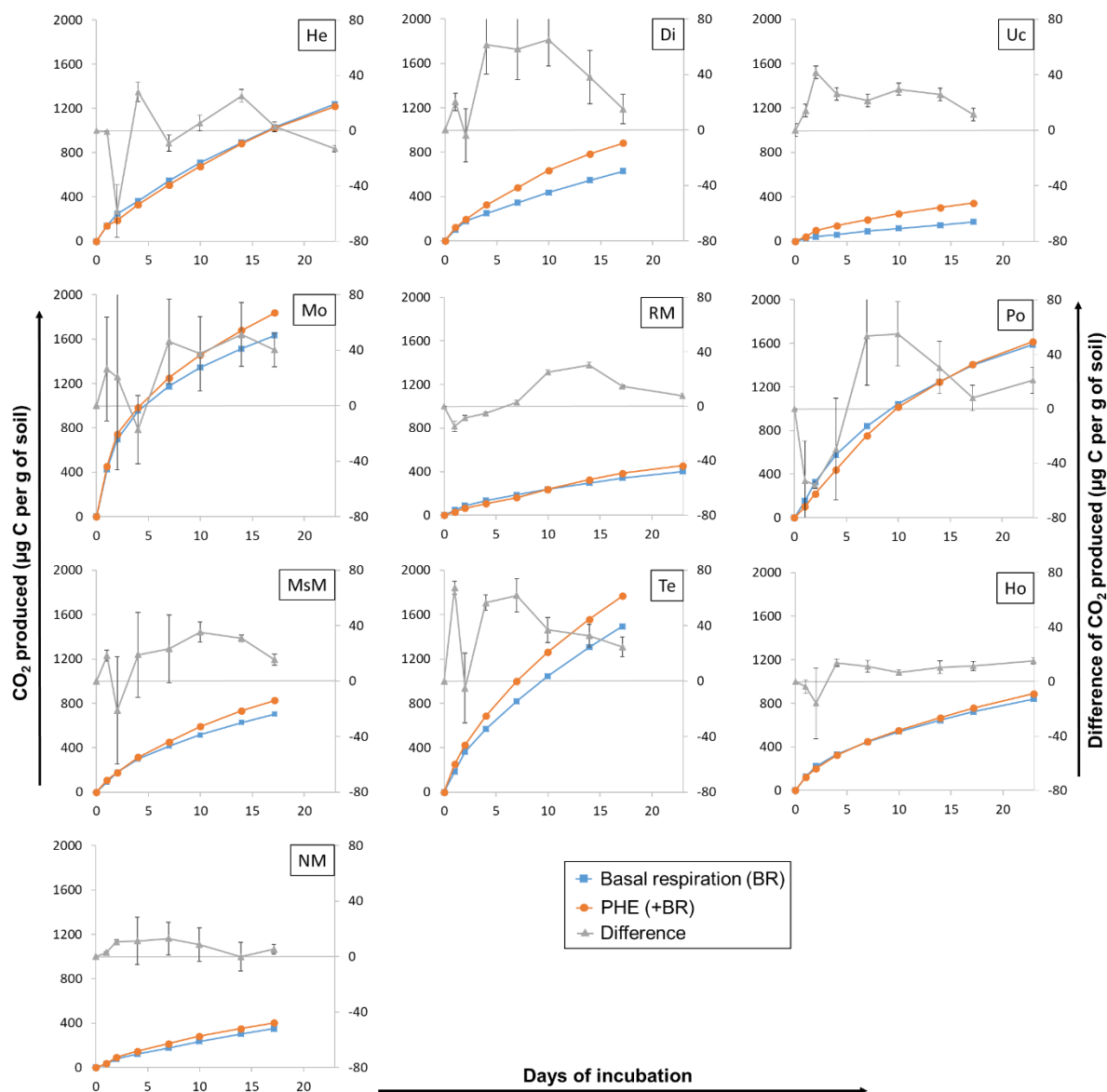


Figure S5.1. Soil respirations without substrate (basal respiration, in blue) or after phenanthrene spiking (in orange) and difference of CO₂ produced (in grey). Basal respiration and respiration after PHE addition are expressed as cumulative curves and their values correspond to left axis, whereas difference of CO₂ production was represented at each time of measurement and their values correspond to right axis. Error bars represent standard error to the mean (n = 3).

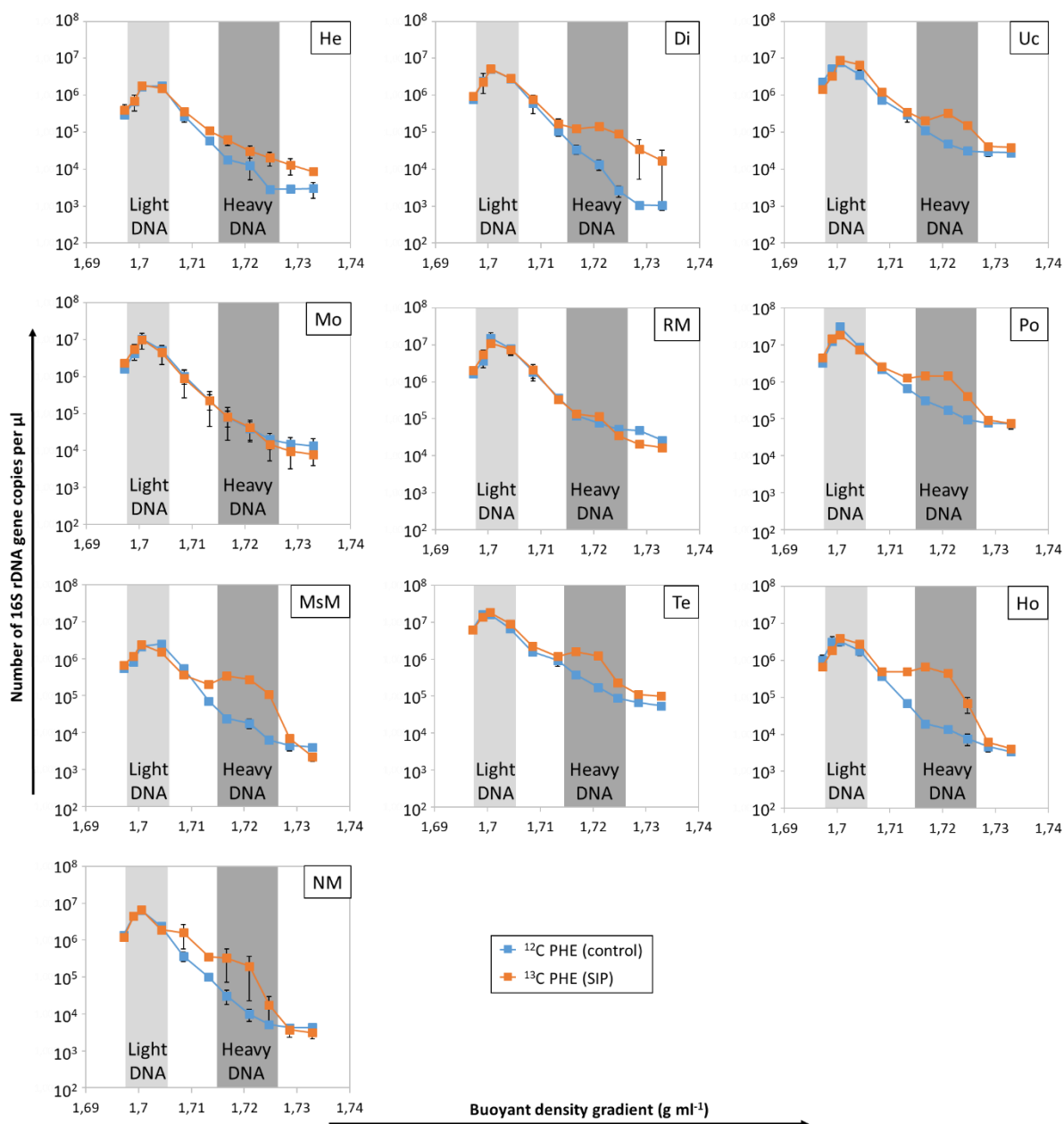


Figure S5.2. Quantification of bacterial 16S rRNA gene copy numbers in the 11 fractions (the fractions n°1 and 13 were eliminated) separated by CsCl gradients using real-time quantitative PCR for ^{12}C (in blue) and ^{13}C (in orange) microcosms. Data are presented for the 10 soils of the collection. Error bars represent standard error to the mean ($n=3$). Light and dark grey bar represent, respectively, light and heavy fractions used for PAH RDHA α gene quantifications and enrichment calculations. Heavy DNA corresponding to the fractions from 4 to 6 (highlighted by dark grey bar) were selected for DNA sequencing.

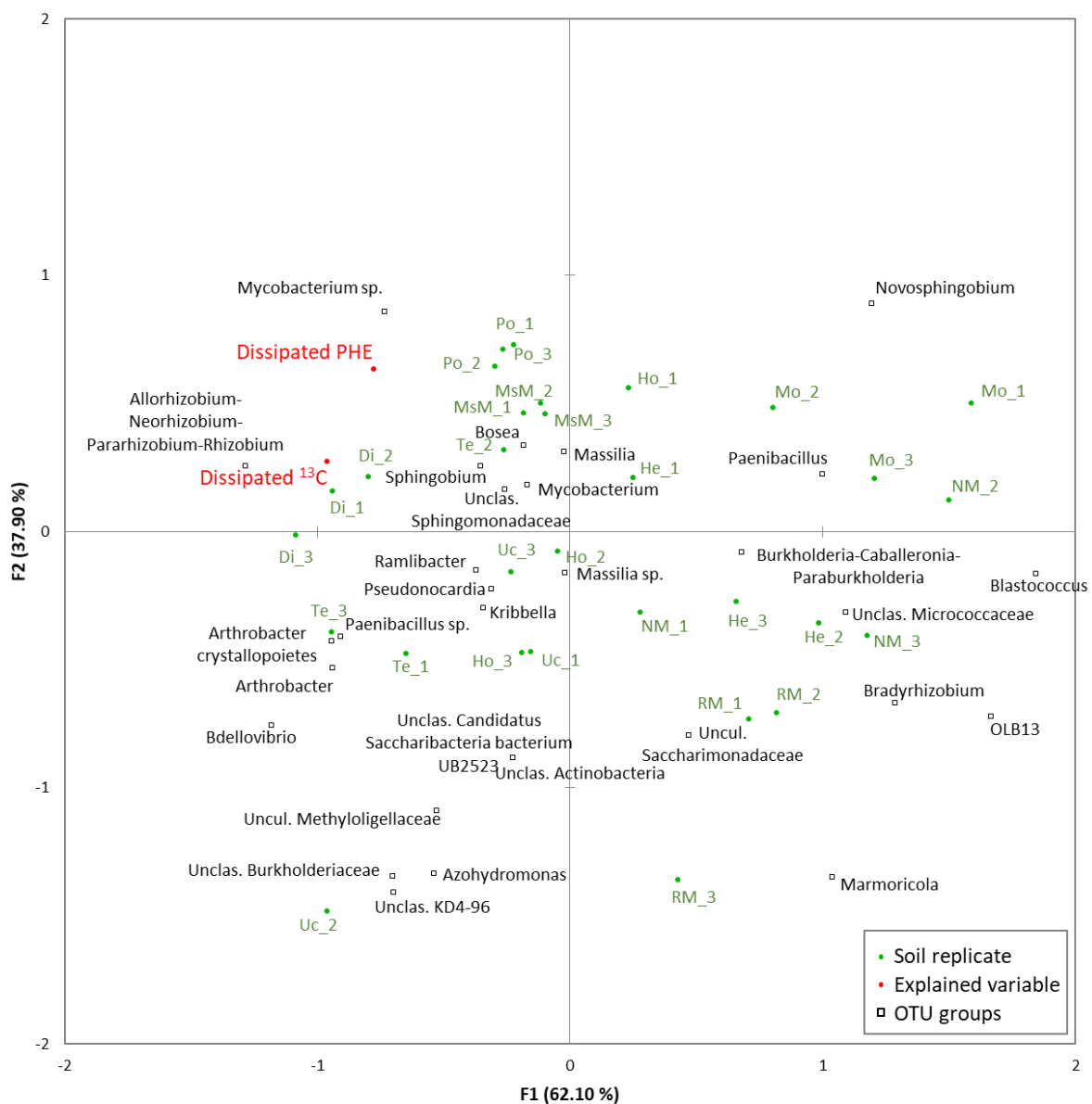


Figure S5.3. CCA ordination of major bacterial PHE-degraders (squares) and percentage of PHE and ¹³C dissipation (red points) showing the relationship between the abundance of major PHE-degraders and percentage PHE or ¹³C dissipation.

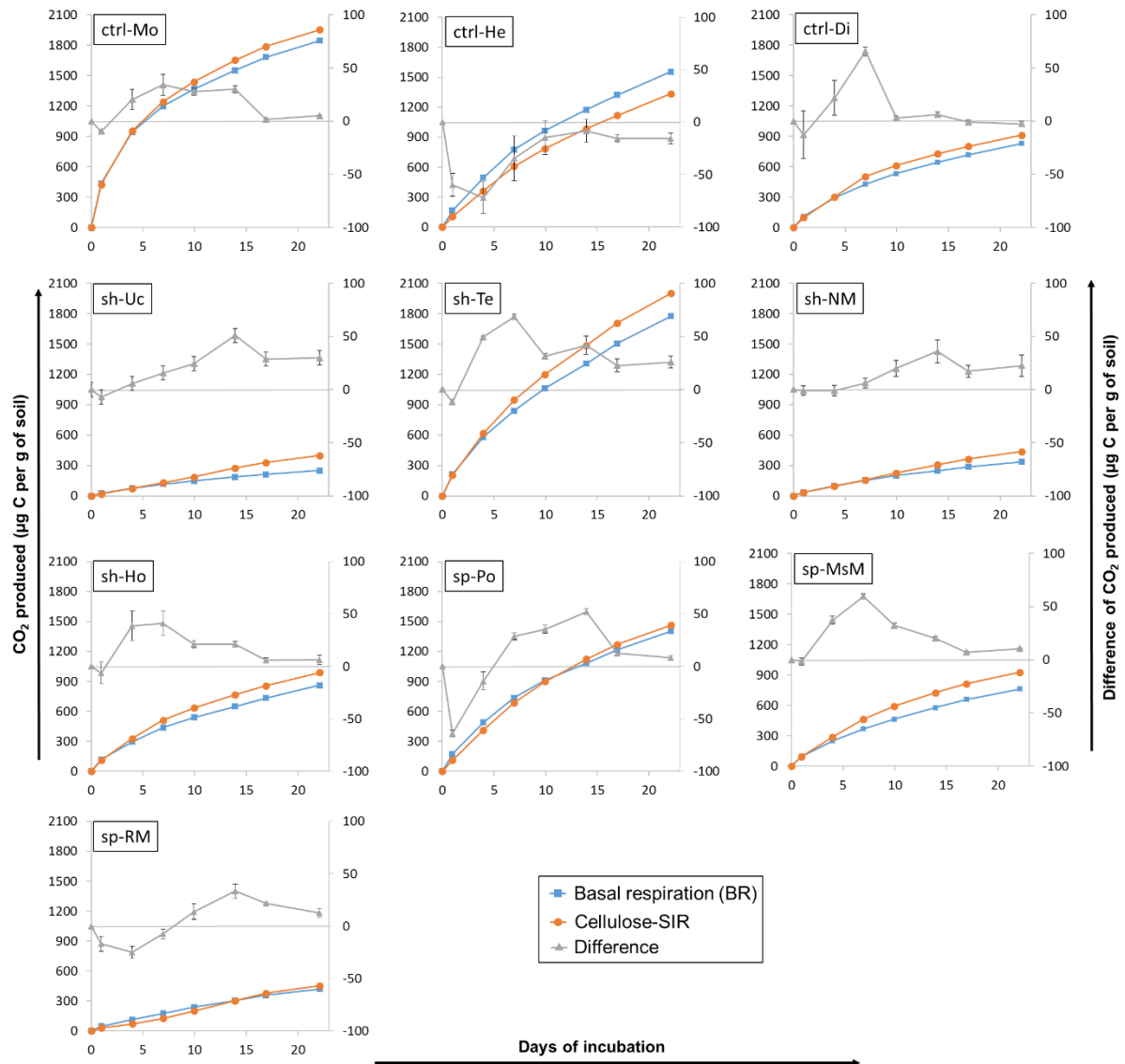


Figure S6.1. Soil basal respiration (BR) and substrate induce respiration (SIR) after cellulose addition and difference of CO₂ produced between BR and cellulose-SIR. Cumulative curves of CO₂ production (left axis) and difference of CO₂ production at each time of measurement (right axis). Error bars represent standard error to the mean.

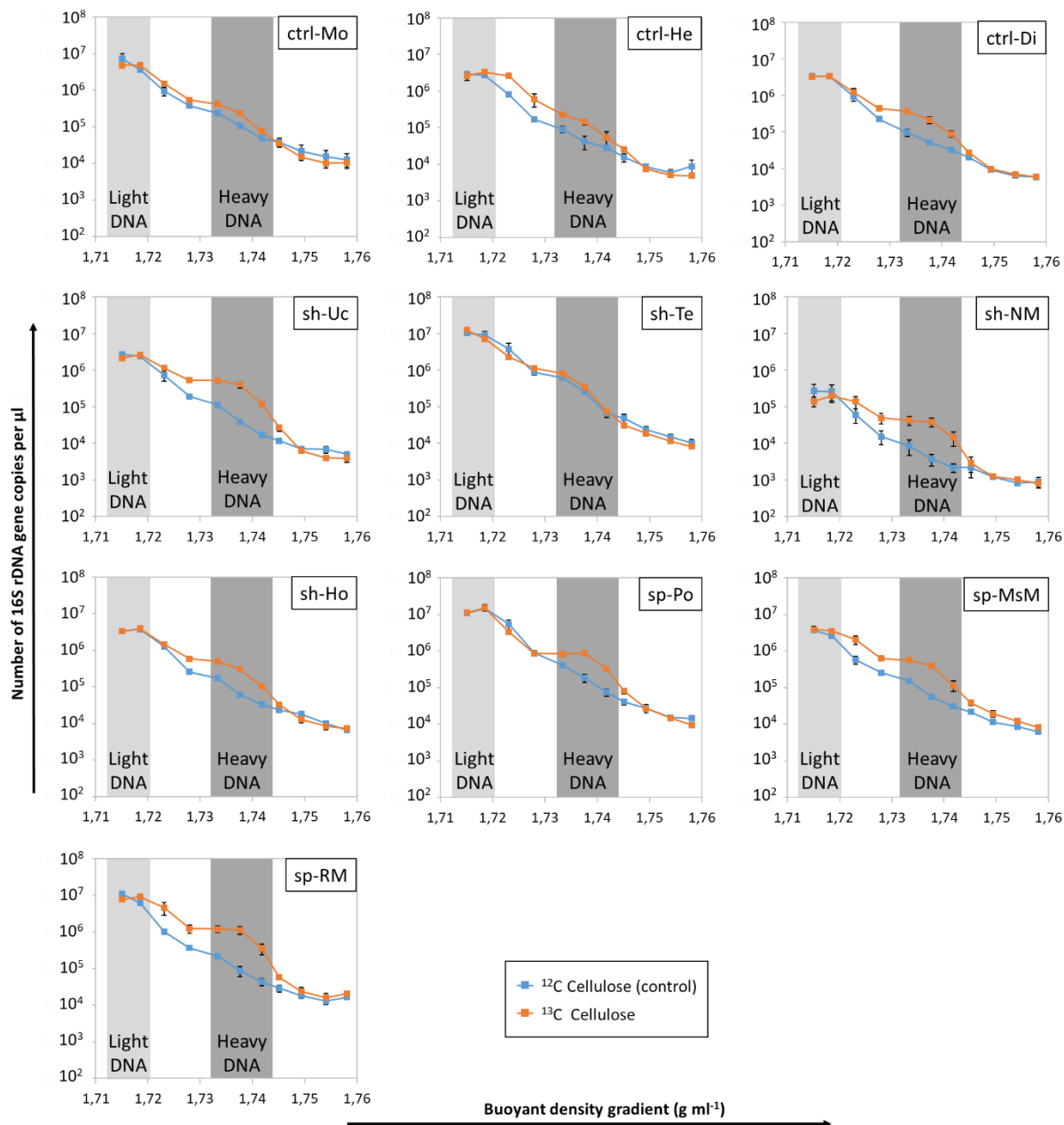


Figure S6.2. Quantification using real-time quantitative PCR of bacterial 16S rDNA gene copy numbers in the 11 fractions (the fractions n° 1 and 13 were excluded) separated by CsCl gradients. Data are presented for the 10 soils. Error bars represent standard error to the mean ($n = 3$). Fraction from 6 to 8 (dark grey bar) corresponding to heavy DNA were selected for DNA sequencing.

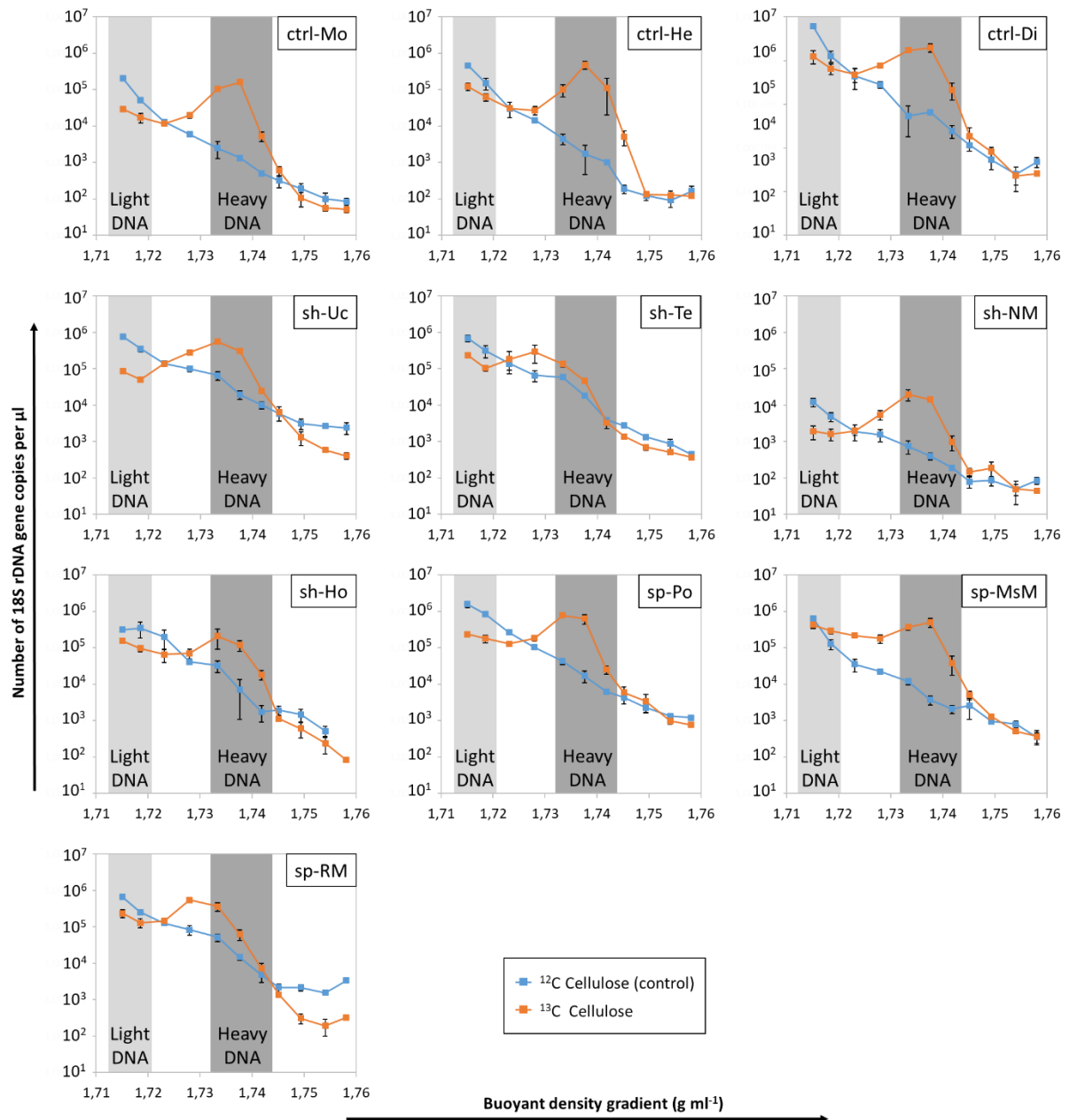


Figure S6.3. Quantification using real-time quantitative PCR of fungal 18S rRNA gene copy numbers in the 11 fractions (the fractions n° 1 and 13 were excluded) separated by CsCl gradients. Data are presented for the 10 soils. Error bars represent standard error to the mean ($n = 3$). Fraction from 6 to 8 (dark grey bar) corresponding to heavy DNA were selected for DNA sequencing.

DIVERSITES TAXONOMIQUE ET FONCTIONNELLE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES EN LIEN AVEC LE CYCLE DU CARBONE DANS UN GRADIENT DE SOLS MULTI-CONTAMINES

Les activités industrielles intensives du siècle dernier ont laissé derrière elles des sols de friches multi-contaminés. Cette multi-pollution a dû conduire à une adaptation des communautés microbiennes, impactant potentiellement leurs diversités et *in fine* le fonctionnement du sol. Dans ce contexte, les objectifs de mes travaux de thèse étaient : i) d'étudier la diversité taxonomique des communautés microbiennes mais aussi leur diversité fonctionnelle en lien avec le cycle du carbone, ii) d'identifier les éventuels liens qui unissent ces deux diversités et iii) de comprendre comment les caractéristiques des sols et leur pollution pouvaient modifier ces liens. Pour cela, une collection de sols présentant un gradient de pollution par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (i.e. HAP) et des éléments traces métalliques (i.e. ETM) a été étudiée. La diversité taxonomique des communautés bactériennes et fongiques a été obtenue par séquençage Illumina MiSeq, tandis que la diversité fonctionnelle métabolique a été estimée à l'aide de microplaques Biolog® et MicroResp™. La dégradation de deux substrats carbonés modèles marqués au ¹³C, l'un d'origine anthropique (i.e. un HAP, le phénanthrène), l'autre d'origine naturelle (i.e. cellulose) a également été analysée par la technique de *Stable Isotope Probing*, qui, en identifiant les microorganismes impliqués dans la dégradation de ces composés, permet de lier la diversité taxonomique et la fonction. Globalement, en sélectionnant les microorganismes, le niveau de contamination a diminué, ou au contraire augmenté, l'abondance relative de différents taxons bactériens et fongiques. La composition des communautés bactériennes était également influencée par la texture et la teneur en azote des sols. De plus, contrairement aux HAP, les ETM ont induit une diminution de la diversité fonctionnelle métabolique, mais aussi une tolérance accrue au zinc. Les taux de dégradation du phénanthrène et de la cellulose étaient d'autant plus élevés que l'abondance et la richesse spécifique microbienne des sols étaient grandes, mais ne dépendaient pas du niveau de pollution des sols. Bien que les sols fortement pollués par des HAP présentaient un fort potentiel fonctionnel (i.e. gènes codant des HAP-dioxygénases) la fonction de dégradation du phénanthrène était présente à des niveaux significatifs dans tous les sols, y compris dans les contrôles non pollués. En revanche la fonction de dégradation de la cellulose était présente à des niveaux variables, parfois très faibles dans certains sols. En outre, le taux de dégradation du phénanthrène était expliqué par les abondances relatives des genres *Massilia* et *Mycobacterium* identifiés parmi les bactéries dégradantes. Différents taxons bactériens et fongiques impliqués dans la dégradation de la cellulose ont été identifiés. Dans ces populations, les bactéries étaient plus diversifiées que les champignons, suggérant que différents mécanismes, probablement complémentaires, seraient en jeu dans la dégradation de la cellulose. En conclusion, nous avons observé une diminution de l'intensité de dégradation de plusieurs composés carbonés, voire la disparition totale de la fonction, pouvant témoigner d'un dysfonctionnement du cycle du carbone dans certains des sols les plus pollués.

Mots-clés : microorganismes, sols, HAP, ETM, diversité taxonomique, fonctions, cycle du carbone

TAXONOMIC AND FUNCTIONAL DIVERSITY OF MICROBIAL COMMUNITIES IN RELATION TO THE CARBON CYCLE IN A MULTI-CONTAMINATED SOIL GRADIENT

The intensive industrial activities of the last century have left behind multi-contaminated brownfields. Multi-pollution must have led to an adaptation of microbial communities, potentially impacting their diversity and ultimately the soil functioning. In this context, the objectives of my PhD thesis were to: i) study the taxonomic diversity of microbial communities but also their functional diversity in relation to the carbon cycle, ii) identify the possible links between these two diversities and iii) understand the impact of soil characteristics and pollution on communities. For this, a collection of soils with a pollution gradient of polycyclic aromatic hydrocarbons (i.e. PAH) and metallic trace elements (i.e. MTE) was studied. The taxonomic diversity of bacterial and fungal communities was obtained using Illumina MiSeq sequencing, while metabolic functional diversity was estimated using Biolog® and MicroResp™ microplates. The degradation of two model ¹³C-labelled carbon substrates, one anthropogenic (i.e. phenanthrene) and the other natural (i.e. cellulose), was also analysed by the Stable Isotope Probing technique, which, by identifying the microorganisms involved, allows to link diversity and function. Overall, by selecting microorganisms, the level of contamination has decreased or increased the relative abundance of different bacterial and fungal taxa. The composition of bacterial communities was also influenced by soil texture and nitrogen content. In addition, unlike PAH, the MTE induced a decrease in metabolic functional diversity, but also a greater zinc tolerance. The phenanthrene and cellulose degradation rates were not linked to the pollution level but were higher when microbial abundance and richness were high. Although PAH-polluted soils had high functional potential (i.e. genes encoding PAH-dioxygenases), the phenanthrene degradation function was present at significant levels in all soils, including in the unpolluted controls. On the contrary, the cellulose degradation function was present at varying and sometimes very low levels in some soils. In addition, the phenanthrene degradation rate was explained by the relative abundances of the genera *Massilia* and *Mycobacterium* identified as degrading bacteria. Different bacterial and fungal cellulose-responsive taxa have been identified. In these populations, bacteria were more diverse than fungi, suggesting that different, possibly complementary, mechanisms would be involved in the degradation of cellulose. In conclusion, we observed a decrease in the degradation intensity of several carbon compounds, or even the total disappearance of the function suggesting a dysfunction of the carbon cycle in some of the most polluted soils.

Keywords: microorganisms, soils, PAH, MTE, taxonomic diversity, functions, carbon cycle