

Dégradation d'Hydrocarbures dans les Vasières (DHYVA) : Rôle des mécanismes bactériens et effet de la bioturbation dans la biodisponibilité des polluants organiques

Magalie Stauffert¹, Cristiana Cravo-Laureau¹, Ronan Jézéquel², Marisol Goñi-Urriza¹, Lionel Huang¹, Christine Cagnon¹, Philippe Cuny³, Franck Gilbert⁴, Cécile Militon³, David Amouroux⁵, Fatima Mahdaoui⁵, Brice Bouyssié⁵, Georges Stora³, François-Xavier Merlin², Robert Duran^{1*}

¹Equipe Environnement et Microbiologie, Université de Pau et des Pays de l'Adour, IPREM UMR5254, BP 1155, 64013 Pau Cedex, robert.duran@univ-pau.fr

²CEDRE, CS 41836, 29218 Brest Cedex 1, Ronan.Jezequel@cedre.fr

³Laboratoire de Microbiologie, Géochimie Ecologie Marines UMR6117, COM-Université de la Méditerranée, BP 901, 13288 Marseille Cedex 9, philippe.cuny@univmed.fr

⁴EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle), Université de Toulouse/UPS/INP/CNRS - 31055 Toulouse, franck.gilbert@cict.fr

⁵Equipe Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, IPREM UMR5254, 64053 Pau Cedex 9, david.amouroux@univ-pau.fr

OBJECTIFS, SITUATION DU SUJET

Les hydrocarbures et les composés d'origine pétrolière, tout particulièrement les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), sont parmi les contaminants les plus toxiques et les plus abondants dans les estuaires et les zones côtières où ils s'accumulent dans les sédiments. Les zones côtières, notamment les vasières constituent de véritables réservoirs de polluants menaçant les écosystèmes et la santé humaine. Les micro-organismes jouent un rôle crucial dans le devenir des polluants, notamment dans la dégradation des hydrocarbures pétroliers (Leahy and Colwell, 1990). De nombreuses études ont montré que des microorganismes hydrocarbonoclastes étaient sélectionnés suite à la contamination (Yakimov et al., 2005; Head et al., 2006). L'effet des hydrocarbures sur les communautés microbiennes fait intervenir des mécanismes complexes dépendant de leurs capacités métaboliques, influencées par les paramètres environnementaux et la durée d'exposition aux polluants (Röling et al., 2002; Yakimov et al., 2004; Bordenave et al., 2007).

Le devenir des hydrocarbures ne dépend pas uniquement des activités microbiennes, mais aussi des caractéristiques du sédiment, des facteurs physico-chimiques (accepteurs d'électron, température, salinité...), de la disponibilité des nutriments et des co-métabolites, et aussi de la bioturbation (Berthecorti and Höpner, 2005). La macrofaune benthique par ses activités de remaniement introduit de l'oxygène dans les sédiments et influence les cycles biogéochimiques des nutriments, la dégradation des contaminants et le métabolisme des microorganismes (Banta and Andersen, 2003). Plusieurs études ont montré que la bioturbation permet l'enfouissement des contaminants et influence ainsi la dégradation des hydrocarbures (Gilbert et al., 1996), des HAP (Christensen et al., 2002a) et des hydrocarbures acycliques (Grossi et al., 2002). De plus, les organismes fouisseurs possèdent les activités enzymatiques permettant la solubilisation des composés de nature hydrophobe (Mayer et al., 1996; Mayer et al., 1997). Cette activité de remaniement sédimentaire affecte également le métabolisme microbien, favorise la nitrification (Satoh et al., 2007), influence la sulfato-réduction (Hansen et al., 1996; Mermillod-Blondin et al., 2004), augmente les activités microbiennes (Hansen and Kristensen, 1998; Lohrer et al., 2004; Kogure and Wada, 2005) et modifie la structure des communautés bactériennes (Cuny et al., 2007).

Le projet DHYVA, par des approches pluridisciplinaires, avait pour objectif de comprendre comment les métabolismes bactériens interagissent dans la dégradation des polluants et d'estimer l'effet de la

bioturbation sur ces activités. Pour répondre à ces questions, nous avons conçu un dispositif expérimental original permettant de créer le cycle des marées tout en préservant la structure des sédiments. Des sédiments marins ont été maintenus en microcosmes durant 9 mois et soumis à quatre conditions : 1) pas de traitement (contrôle), 2) pétrole, 3) bioturbation (*Nereis diversicolor*) et 4) pétrole et bioturbation. Afin de caractériser les mécanismes microbiens mis en jeu dans le devenir du pétrole, la dégradation des hydrocarbures et le devenir du vanadium -indicateur de la dégradation de molécules complexe- ont été suivis, les activités de remaniement sédimentaire par les organismes fouisseurs ont été estimées tout au long de l'expérimentation et les communautés bactériennes ont été caractérisées par des approches moléculaires appliquées au niveau génomique et transcriptomique. Cette approche multidisciplinaire, en établissant des corrélations entre le devenir du polluant, l'activité de bioturbation et les communautés bactériennes apporte un éclairage nouveau sur le comportement des communautés bactériennes en réponse à la présence de pétrole dans des sédiments où la bioturbation est importante.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Dispositif expérimental

Les sédiments collectés dans l'aber Benoît (Treglonou, 48° 33'12.40"N; 4° 32'8.69"W ; Bretagne, France) ont été maintenus en microcosmes dans un dispositif expérimental permettant de recréer le cycle des marées (Figure 1). Quatre conditions ont été appliquées : i) pas de traitement (contrôle), ii) pétrole (BAL 110), iii) bioturbation (*Nereis diversicolor*) et iv) pétrole et bioturbation. Le pétrole BAL110 a été mélangé avec le sédiment et le mélange déposé à la surface des microcosmes. Les microcosmes ont été maintenus neuf mois et des échantillonnages ont été réalisés régulièrement (15 jours, 1, 3, 6 et 9 mois) pour des analyses chimiques et microbiologiques. Le mélange contenait 25.6 mg de BAL110. Des luminophores (Université de Kiel, Allemagne), particules inertes, ont été ajoutés comme traceurs afin d'estimer l'activité de bioturbation de la macrofaune. Les luminophores ont été déposés à la surface du sédiment dans chacun des microcosmes.



Figure 1 : Dispositif expérimental. Les sédiments de l'aber Benoit ont été maintenus en microcosmes au "CEDRE" (Brest, France). 12 microcosmes (30 L de sédiment chacun) ont été soumis à quatre conditions: trois contrôles (sédiments seuls), trois pollués avec du pétrole BAL 110, trois bioturbation dans lesquels *Nereis diversicolor* a été ajouté, et trois pollués avec bioturbation. Un collecteur récoltant les eaux de la marée a été placé au centre. A chaque cycle de marée l'eau de mer est renouvelée.

Structure des communautés bactériennes

L'impact des hydrocarbures et de la bioturbation sur la structure des communautés bactériennes a été analysé par T-RFLP (Terminal Restriction Length Polymorphism) selon le protocole décrit par Païssé et al. (2008). La T-RFLP a été appliquée afin d'observer la modification de la structure des communautés bactériennes totale (analyse au niveau de l'ADN) et des communautés bactériennes actives (analyse au niveau des ARN) au cours de l'expérimentation. La composition des communautés bactériennes a été obtenue par clonage et séquençage des gènes cibles. Les Domaines Bacteria et Archaea ont été ciblés par l'analyse des gènes ribosomiques 16S et leurs transcrits, ainsi que certains groupes fonctionnels tels que les méthanogènes (gène et transcrits *mcr*), les dénitrifiants (gène et transcrits *nir*) et les sulfato-réducteurs (gène et transcrits *dsr*). L'analyse fonctionnelle de dégradation a été entreprise en ciblant les gènes codant pour les monooxygénases (*alk*), les dioxygénases (*rhd*) et la bensylsuccinate synthase (*bss*) et leurs transcrits.

Une méthode d'analyse des intégrons a été développée, permettant d'estimer le niveau d'expression de l'intégrase (enzyme permettant l'intégration de cassettes de gènes) et d'isoler les premières cassettes de gènes, les derniers gènes intégrés témoignant de l'activité des intégrons (Huang et al., 2009).

Par des approches culturales des consortia bactériens et des souches bactériennes ont été isolés pour leur capacité de dégradation d'hydrocarbures en conditions oxiques ou anoxiques selon Hernandez-Raquet (2006).

Méthodes analytiques

Dégradation des hydrocarbures

Les pétroles sont des mélanges complexes comprenant de nombreuses molécules allant de composés aliphatiques comme les alcanes, à des composés de haut poids moléculaire tels que les hydrocarbures poly-aromatiques (HAP). La modification de la composition en hydrocarbures du pétrole et les cinétiques de dégradation ont été suivies par chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse (GC-MS). La dégradation des hydrocarbures a été quantifiée au cours du temps afin d'évaluer l'importance de la biodégradation sur la dissipation du pétrole. Par ailleurs, l'effet de la bioturbation a été estimé en quantifiant la distribution des hydrocarbures en fonction de la profondeur du sédiment.

Analyse du vanadium

Les pétroles contiennent des éléments métalliques, principalement du nickel et du vanadium, qui sont complexés à des molécules de haut poids moléculaire comme les porphyrines, la concentration en métaux dans les pétroles pouvant atteindre plusieurs ppm. Le vanadium associé aux fractions pétrolières a été extrait par des extractions au xylène sur 2 g de sédiments. La concentration du vanadium a été analysé par microFIA ICP MS suivant la méthode décrite précédemment (Giusti et al., 2007; Caumette et al., 2009). La concentration en vanadium dans le BAL 110 a été estimée à $23 \pm 2 \mu\text{g/g}$.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Considérations générales

Caractérisation de l'activité de bioturbation

Comme attendu, les microcosmes où *N. diversicolor* était présents ont montré les coefficients de diffusion (D_b) plus importants (NEREIS: $0.70 \pm 0.08 \text{ cm}^2 \cdot \text{y}^{-1}$; $n=3$) en comparaison avec les autres microcosmes (D_b compris entre 0.18 et $0.33 \text{ cm}^2 \cdot \text{y}^{-1}$). Les microcosmes contaminés par le pétrole

montrant les Db les plus élevés (NEREIS+BAL: Db= 1.07 ±0.12 cm².y⁻¹; n=3), indiquant que l'activité de remaniement sédimentaire due à *N. diversicolor* était augmentée lorsque le pétrole est ajouté.

Dégradation des hydrocarbures

L'analyse des hydrocarbures totaux (TPH) montre que la dégradation des hydrocarbures démarre à partir du 90^{ème} jour d'incubation. A la fin de l'incubation (270 jours), 60% des hydrocarbures totaux étaient éliminés quelle que soit la condition considérée. Les concentrations finales en hydrocarbures étaient de 31.1 ± 14.7 et 36.3 ± 11.6 mg.g⁻¹ de sédiment frais dans les microcosmes contaminés avec ou sans la présence de *N. diversicolor* respectivement.

L'élimination du pétrole a également été estimée en suivant la concentration en vanadium, métal complexé à la fraction porphyrine (Amorim et al., 2007). La concentration en vanadium commence à diminuer à partir du 90^{ème} jour, en accord avec la diminution des TPH. Il est à noter que le vanadium n'est pas détectable dans les microcosmes non contaminés. A 180 jours, le vanadium n'est plus détectable, démontrant pour la première fois la transformation des hydrocarbures complexes. En effet, les résultats obtenus indiquent que le vanadium a été soit complètement transféré dans le milieu soit qu'il a été piégé plus fortement par les porphyrines.

Entre 90 et 270 jours le rapport n-C17/pristane diminue progressivement de 2,3 à 1, indiquant que l'élimination des hydrocarbures aliphatiques correspond à de la biodégradation. En effet, ce rapport diminue lorsque les hydrocarbures linéaires (n-C17), plus facilement dégradables que les hydrocarbures ramifiés (pristane) sont éliminés. A 270 jours, le ratio n-C17/pristane est inférieur en présence de *N. diversicolor* suggérant qu'en présence de *N. diversicolor* la biodégradation est favorisée. Toutefois, la distribution des TPH en fonction de la profondeur indique que le remaniement sédimentaire par la macrofaune est plus importante lorsque *N. diversicolor* a été ajouté. En présence de *N. diversicolor*, 23% des TPH sont retrouvés à l'horizon 2-4 cm alors qu'en absence de *N. diversicolor* la proportion de TPH est de 10% dans cet horizon. Gilbert et al. (1996) ont montré une augmentation du remaniement sédimentaire par la macrofaune benthique en présence de pétrole, mais dans les conditions de laboratoire, le phénomène inverse est décrit i.e. une diminution de l'activité de bioturbation (Gilbert et al., 1994).

Dynamique des communautés bactériennes

Plusieurs études ont montré l'influence de contaminants pétroliers sur la dynamique et la structure des communautés bactériennes. Par exemple, Röling et al. (2002) ont montré qu'après une contamination pétrolière, les *Gammaproteobacteria* devenaient dominantes avec un enrichissement concomitant des *Alphaproteobacteria*. La dynamique des communautés bactériennes dépend des hydrocarbures présents et de leurs concentrations (Head et al. 2006). Les bactéries dégradent, dans un premier temps, les hydrocarbures les plus accessibles. Ces premières dégradations modifient la composition du pétrole avec l'apparition de métabolites. D'autres composés deviennent dominants et la communauté bactérienne change. Ceci se traduit par une succession de populations microbiennes aux différentes étapes de la dégradation des composés pétroliers (Bordenave et al. 2007). L'analyse T-RFLP a montré que les communautés bactériennes des microcosmes contaminés présentaient des modifications différentes lorsque *N. diversicolor* était présent. L'analyse au niveau des ARN a révélé que les populations actives appartenaient aux *Alpha*, *Beta*- et *Gammaproteobacteria*. En présence de *N. diversicolor*, les bactéries appartenant aux *Betaproteobacteria* deviennent dominantes, notamment des membres du genre *Ralstonia*. Les *Gamma*- et *Alphaproteobacteria* étant également détectées. En absence de *N. diversicolor*, ces groupes restent constants. L'inventaire moléculaire des populations bactériennes actives (analyse ARN) présentes dans les communautés bactériennes à 270 jours a confirmé les différences (Figure 2).

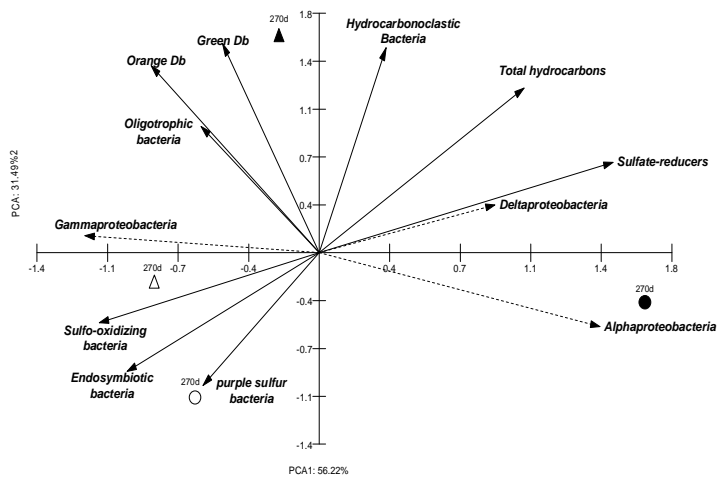


Figure 2 : Analyse en composantes principales (PCA) montrant la composition des communautés bactériennes dans les différents microcosmes. L'analyse a été réalisée à 270 jours sur les populations actives (ARN).
 ○ contrôle, ● BAL110, △ Nereis, ▲ Nereis + BAL110.

Les séquences affiliées aux bactéries du cycle du soufre sont les plus abondantes, notamment les séquences des bactéries sulfato-réductrices dans les microcosmes contaminés par le BAL110 alors que les séquences affiliées aux bactéries sulfo-oxydantes sont les plus abondantes dans les microcosmes où *N. diversicolor* a été ajouté. De manière surprenante, les séquences affiliées aux bactéries hydrocarbonoclastes ne sont représentées qu'à de faibles abondances. Plusieurs travaux ont montré que les bactéries hydrocarbonoclastes dominaient les écosystèmes contaminés (Berthe-Corti and Höpner, 2005; Yakimov et al., 2005; Yoshida et al., 2006). Certains auteurs ont montré que les bactéries impliquées dans le cycle du soufre pouvaient également être largement présentes (Paissé et al., 2008; Kleikemper et al., 2002). Les bactéries sulfato-réductrices jouent un rôle important dans la dégradation anaérobie des hydrocarbures (Coates et al., 1997; Rothermich et al., 2002; Grossi et al., 2008). Nos résultats montrent que l'ajout de *N. diversicolor*, dans les microcosmes contaminés ou non, ne modifie pas l'abondance des bactéries sulfato-réductrices. Par contre, la présence de pétrole, en absence de *N. diversicolor*, augmente leur abondance. La bioturbation dans les sédiments marins est généralement associée avec une augmentation des zones oxiques grâce au flux d'eau riche en oxygène dans le sédiment. Toutefois, l'activité de la macrofaune peut également augmenter le nombre de micro-niches anoxiques favorisant le métabolisme anaérobie comme la sulfato-réduction (Bertics et al., 2010), mais dans la plupart des études la bioturbation semble diminuer le taux de sulfato-réduction (Gribsholt and Kristensen, 2003; Mermillod-Blondin et al., 2004).

Parallèlement aux études moléculaires, des consortia bactériens et des souches pures ont été isolés pour leur capacité de dégradation de molécules modèles. Leur caractérisation permettra de comprendre les réactions de dégradation, notamment les mécanismes anaérobies, encore mal connus.

Grâce à un dispositif expérimental en microcosmes original et à une approche multidisciplinaire, nous avons montré l'influence de la bioturbation et de la contamination par du pétrole sur la structure des communautés bactériennes. La présence du polychaete, *N. diversicolor* modifie la structure de la communauté bactérienne mais ne permet pas d'augmenter significativement les taux de dégradation. Des séquences affiliées à des bactéries hydrocarbonoclastes et des transcrits de gènes impliqués dans la dégradation ont pu être détectées de manière spécifique dans chacune des conditions. De plus, l'analyse des intégrons a révélé l'expression de ces gènes adaptatifs dans les microcosmes contaminés au démarrage (3 mois) des processus de dégradation. Nous avons développé une méthode permettant de capturer les premières cassettes de gènes des intégrons, témoignant du dernier événement adaptatif (Huang et al., 2009). La composition des communautés microbiennes a révélé des phylotypes différents affiliés à des groupes phylogénétiques impliqués dans le cycle du soufre. La capacité de dégradation

d'hydrocarbures de deux communautés microbiennes de composition différente s'explique par la redondance fonctionnelle ou par des mécanismes fonctionnels différents mais résultant à des taux de dégradation identiques (Allison et Martiny 2008). Une meilleure connaissance des mécanismes adaptatifs permettant la mise en place de cette redondance fonctionnelle peuvent être d'une importance cruciale pour le management des ressources microbiennes lors de procédés de bioréhabilitation.

PRINCIPALES PUBLICATIONS

Bordenave, S., M. S. Goñi-Urriza, P. Caumette, R. Duran (2007) Effects of Heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6089-6097.

Bordenave, S., M.S. Goñi-Urriza, P. Caumette, R. Duran (2009) Differential display analysis of cDNA involved in microbial mats response after heavy fuel oil contamination. *Journal of Microbial & Biochemical Technology* 1: 1-4.

Bordenave, S., M.S. Goñi-Urriza, C. Vilette, S. Blanchard, P. Caumette, R. Duran (2008) Diversity of ring-hydroxylating dioxygenases in pristine and oil contaminated microbial mats at genomic and transcriptomic levels. *Environ. Microbiol.* 10: 3201-3211.

Goñi-Urriza, M.S., R. Duran (2010). The Gulf Oil Spill: We Have Been Here Before. Can We Learn From the Past? *Journal of Cosmology.* 8: 2006-2008.

Huang, L., C. Cagnon, P. Caumette, R. Duran (2009) First gene cassettes of integrons as targets in finding adaptive genes in metagenomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3823-3825.

Paisse, S., F. Coulon, M.S. Goñi-Urriza, L. Peperzak, T.J. Mcgenity, R. Duran (2008) Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in coastal sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66: 295-305.

Pischedda L., Poggiale, J. C., Cuny P. & Gilbert F. (2008). Imaging Oxygen Distribution in Marine Sediments. The Importance of Bioturbation and Sediment Heterogeneity. *Acta Biotheor.*, 56 : 123-135.

Pischedda L., Poggiale, J. C., Cuny P. & Gilbert F., en révision. Spatial oxygen heterogeneity in a *Nereis diversicolor* irrigated burrow. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.*

6 autres publications sont en cours de préparation ou de soumission, 15 participations à des colloques, 4 masters, 4 thèses.

FAITS MARQUANTS, RETOMBÉES PREVISIBLES ET PERSPECTIVES DE VALORISATION

Le projet DHYVA a permis d'acquérir des connaissances sur la structuration des communautés bactériennes lors d'une contamination pétrolière en fonction des activités de remaniement sédimentaire de la macrofaune, de mettre en évidence les mécanismes adaptatifs et de développer des outils analytiques permettant d'apprécier les capacités de dégradation des microorganismes. Les principales retombées du projet DHYVA sont :

1. Le dispositif expérimental développé au cours du projet permet de se rapprocher au plus près des conditions environnementales, notamment en mimant le cycle des marées. Ce dispositif expérimental sera utilisé dans d'autres programmes de recherche fondamentale et appliquée.

2. La mise en évidence de la redondance fonctionnelle ouvre de nouvelles perspectives dans la gestion des ressources microbiennes dans les procédés de bioréhabilitation. Le remaniement sédimentaire, du aux activités de bioturbation, modifie la structure et la composition de la communauté bactérienne tout en maintenant le potentiel de dégradation. Afin d'augmenter le potentiel de dégradation, des moyens physiques de remaniement sédimentaires sont maintenant investigués.

3. Des consortia bactériens et des souches bactériennes ont été isolés pour leur capacité de dégradation de molécules modèles. Outre les retombées sur les connaissances fondamentales des mécanismes de dégradation -notamment en anaérobiose- des cocktails de souches dégradantes pourront être établis afin d'augmenter les capacités de dégradation soit *in situ* (bioaugmentation), soit dans des bioréacteurs.

4. Des outils moléculaires permettant d'appréhender les capacités de dégradation des communautés bactériennes ont été développés : détection des gènes (ou transcrits) codant pour des dio-oxygénase, mono-oxygénases et intégrases. Une méthode de capture de la première cassette de gènes d'intégrons a été mise au point, elle devrait permettre d'accéder à de nouveaux gènes impliqués

dans l'adaptation des microorganismes à la présence de polluants. L'utilisation des intégrons comme outils de bio-indication sont en cours de développement dans le cadre d'un projet financé par le conseil général des Pyrénées Atlantiques.

5. L'analyse des métaux liés aux fractions lourdes du pétrole -vanadium- ouvre de nouvelles perspectives pour le développement de marqueurs témoignant de la dégradation des pétroles.

6. Le projet DHYVA a permis de former de jeunes chercheurs par et pour la recherche : 4 masters et 4 doctorants ont été ainsi formés.

7. D'un point de vue fondamental, les résultats issus du projet DHYVA ont donné lieu à 8 publications, 6 autres sont prévues à court terme.

REFERENCES

- Allison, S.D., Martiny, J.B.H., 2008. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 11512-11519.
- Amorim, F.A.C., Welz, B., Costa, A.C.S., Lepri, F.G., Vale, M.G.R., Ferreira, S.L.C., 2007. Determination of vanadium in petroleum and petroleum products using atomic spectrometric techniques. *Talanta* 72, 349-359.
- Banta, G.T., Andersen, O., 2003. Bioturbation and the fate of sediment pollutants- Experimental case studies of selected infauna species. *Vie et Milieu* 53, 233-248.
- Bertics, V.J., Sohm, J.A., Treude, T., Chow, C.E.T., Capone, D.G., Fuhrman, J.A., Ziebis, W., 2010. Burrowing deeper into benthic nitrogen cycling: The impact of Bioturbation on nitrogen fixation coupled to sulfate reduction. *Marine Ecology Progress Series* 409, 1-15.
- Berthe-Corti, L., Höpner, T., 2005. Geo-biological aspects of coastal oil pollution. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 219, 171-189.
- Bordenave, S., Goñi-Urriza, M.S., Caumette, P., Duran, R., 2007. Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 6089-6097.
- Caumette, G., Lienemann, C.P., Merdrignac, I., Paucot, H., Bouyssièrè, B., Lobinski, R., 2009. Sensitivity improvement in ICP MS analysis of fuels and light petroleum matrices using a microflow nebulizer and heated spray chamber sample introduction. *Talanta* 80, 1039-1043.
- Christensen, M., Andersen, O., Banta, G.T., 2002a. Metabolism of pyrene by the polychaetes *Nereis diversicolor* and *Arenicola marina*. *Aquatic Toxicology* 58, 15-25.
- Coates, J.D., Woodward, J., Allen, J., Philp, P., Lovley, D.R., 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3589-3593.
- Cuny, P., Miralles, G., Cornet-Barthaux, V., Acquaviva, M., Stora, G., Grossi, V., Gilbert, F., 2007. Influence of bioturbation by the polychaete *Nereis diversicolor* on the structure of bacterial communities in oil contaminated coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin* 54, 452-459.
- Gilbert, F., Rivet, L., Bertrand, J.C., 1994. The in vitro influence of the burrowing polychaete *Nereis diversicolor* on the fate of petroleum hydrocarbons in marine sediments. *Chemosphere* 29, 1-12.
- Gilbert, F., Stora, G., Bertrand, J.C., 1996. In situ bioturbation and hydrocarbon fate in an experimental contaminated mediterranean coastal ecosystem. *Chemosphere* 33, 1449-1458.
- Giusti, P., Nuevo Ordonez, Y., Philippe Lienemann, C., Schaumloffel, D., Bouyssièrè, B., Lobinski, R., 2007. [small mu]Flow-injection-ICP collision cell MS determination of molybdenum, nickel and vanadium in petroleum samples using a modified total consumption micronebulizer. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 22, 88-92.
- Gribsholt, B., Kristensen, E., 2003. Benthic metabolism and sulfur cycling along an inundation gradient in a tidal *Spartina anglica* salt marsh. *Limnology and Oceanography* 48, 2151-2162.
- Grossi, V., Cravo-Laureau, C., Guyoneaud, R., Ranchou-Peyruse, A., Hirschler-Réa, A., 2008. Metabolism of n-alkanes and n-alkenes by anaerobic bacteria: A summary. *Organic Geochemistry* 39, 1197-1203.
- Grossi, V., Massias, D., Stora, G., Bertrand, J.C., 2002. Burial, exportation and degradation of acyclic petroleum hydrocarbons following a simulated oil spill in bioturbated Mediterranean coastal sediments. *Chemosphere* 48, 947-954.
- Hansen, K., King, G.M., Kristensen, E., 1996. Impact of the soft-shell clam *Mya arenaria* on sulfate reduction in an intertidal sediment. *Aquatic Microbial Ecology* 10, 181-194.
- Hansen, K., Kristensen, E., 1998. The impact of the polychaete *Nereis diversicolor* and enrichment with macroalgal (*Chaetomorpha linum*) detritus on benthic metabolism and nutrient dynamics in organic-poor and organic-rich sediment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 231, 201-223.
- Head, I.M., Jones, D.M., Röling, W.F., 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature reviews. Microbiology* 4, 173-182.
- Hernandez-Raquet, G., Caumette, P., Muyzer, G., Dabert, P., Budzinski, H., Duran, R., 2006. Molecular diversity studies of bacterial communities of oil polluted microbial mats from the Etang de Berre (France) FEMS Microbiol. Ecol. 58: 550-562.
- Huang, L., Cagnon, C., Caumette, P., Duran, R. 2009. First gene cassettes of integrons as targets in finding adaptive genes in metagenomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 3823-3825.
- Kogure, K., Wada, M., 2005. Impacts of macrobenthic bioturbation in marine sediment on bacterial metabolic activity. *Microbes and Environment* 20, 191-199.
- Kleikemper, J., Schroth, M.H., Sigler, W.V., Schmucki, M., Bernasconi, S.M., Zeyer, J., 2002. Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 1516-1523.
- Lohrer, A.M., Thrush, S.F., Gibbs, M.M., 2004. Bioturbators enhance ecosystem function through complex biogeochemical interactions. *Nature* 431, 1092-1095.
- Mayer, L.M., Chen, Z., Findlay, R.H., Fang, J., Sampson, S., Self, R.F.L., Jumars, P.A., Quetel, C., Donard, O.F.X., 1996.

- Bioavailability of sedimentary contaminants subject to deposit-feeder digestion. *Environmental Science and Technology* 30, 2641-2645.
- Mayer, L.M., Schick, L.L., Self, R.F.L., Jumars, P.A., Findlay, R.H., Chen, Z., Sampson, S., 1997. Digestive environments of benthic macroinvertebrate guts: Enzymes, surfactants and dissolved organic matter. *Journal of Marine Research* 55, 785-812.
- Mermillod-Blondin, F., Rosenberg, R., François-Carcaillet, F., Norling, K., Mauclaire, L., 2004. Influence of bioturbation by three benthic infaunal species on microbial communities and biogeochemical processes in marine sediment. *Aquatic Microbial Ecology* 36, 271-284.
- Paissé, S., Coulon, F., Goni-Urriza, M., Peperzak, L., McGenity, T.J., Duran, R., 2008. Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment. *FEMS Microbiology Ecology* 66, 295-305.
- Röling, W.F.M., Milner, M.G., Jones, D.M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R.J.P., Head, I.M., 2002. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5537-5548.
- Rothermich, M.M., Hayes, L.A., Lovley, D.R., 2002. Anaerobic, sulfate-dependent degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum-contaminated harbor sediment. *Environmental Science and Technology* 36, 4811-4817.
- Satoh, H., Nakamura, Y., Okabe, S., 2007. Influences of infaunal burrows on the community structure and activity of ammonia-oxidizing bacteria in intertidal sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1341-1348.
- Yakimov, M.M., Denaro, R., Genovese, M., Cappello, S., D'Auria, G., Chernikova, T.N., Timmis, K.N., Golyshin, P.N., Giluliano, L., 2005. Natural microbial diversity in superficial sediments of Milazzo Harbor (Sicily) and community successions during microcosm enrichment with various hydrocarbons. *Environmental Microbiology* 7, 1426-1441.
- Yakimov, M.M., Gentile, G., Bruni, V., Cappello, S., D'Auria, G., Golyshin, P.N., Giuliano, L., 2004. Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 49, 419-432.
- Yoshida, A., Nomura, H., Toyoda, K., Nishino, T., Seo, Y., Yamada, M., Nishimura, M., Wada, M., Okamoto, K., Shibata, A., Takada, H., Kogure, K., Ohwada, K., 2006. Microbial responses using denaturing gradient gel electrophoresis to oil and chemical dispersant in enclosed ecosystems. *Marine Pollution Bulletin* 52, 89-95.