

UNIVERSITE DE CARTHAGE

Faculté des Sciences de Bizerte
Laboratoire de Biosurveillance de
l'Environnement (L.B.E)



UNIVERSITE DE MONTPELLIER II

Laboratoire Ecologie des Systèmes Marins
Côtiers (ECOSYM) & Station Méditerranéenne
de l'Environnement Littoral (SMEL)



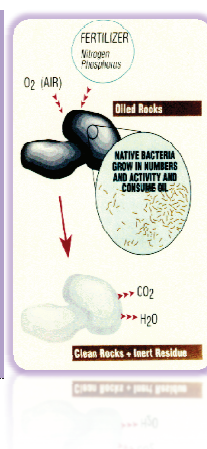
THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Héla LOUATI Ep. KHADRAOUI

Pour l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Biologiques

ETUDE DE LA BIOREMEDIATION DE SEDIMENTS CONTAMINES PAR DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES : IMPACT ECOLOGIQUE SUR LA MICROFLORE ET LA MEIOFAUNE DE LA LAGUNE DE BIZERTE



Soutenue à la FSB le 2 décembre 2013 devant le jury composé de :

Olivier PRINGAULT (Directeur de recherche IRD)

Ezzeddine MAHMOUDI (Pr, FSB, Bizerte)

Patricia AÏSSA (Pr, FSB, Bizerte)

Philippe CUNY (MC, Aix Marseille Université)

Sami SAYADI (Pr, CBS, Sfax)

Françoise ELBAZ-POULICHET (Directeur de recherche CNRS)

Robert DURAN (Pr, Université de Pau, UPPA)

Ahmed Afli (MC, INSTM)

Mohamed Néjib DALY-YAHYA (Pr, FSB, Bizerte)

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Codirectrice de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Président

AVANT PROPOS

❖ Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement (**LBE**) de Bizerte (Tunisie), à la Station Méditerranéenne de l'Environnement Littoral (**SMEL**) de Sète (France) et au laboratoire d'Ecologie des Systèmes Marins Côtiers (**ECOSYM**) de Montpellier (France).

❖ Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'un projet financé par le programme Hubert Curien UTIQUE (CMCU) intitulé «*Mise au point de bio-essais de biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques en vue de réhabiliter des sédiments marins contaminés et mesure en parallèle de l'impact écologique de la bioremédiation* » et d'un projet (CNRS) intitulé «*Evaluation du mode de fonctionnement d'un écosystème contaminé par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) : importance de la bioremédiation et du suivi de la nématofaune*».

❖ Ces deux projets ont été mis en place dans le cadre d'une coopération Nord-Sud avec le soutien de la Faculté des Sciences de Bizerte (FSB), du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD).

REMERCIEMENTS

"Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ; elles sont les charmants jardiniers par qui nos âmes sont fleuries."

Marcel Proust

Le seul moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder paraît-il ! Alors j'y cède en disant un grand Merci aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Mes plus vifs remerciements et toute ma reconnaissance vont en premier lieu à mes responsables scientifiques, faisant toute la valeur du sujet. Je salue aussi la souplesse et l'ouverture d'esprit de mes directeurs de thèse qui ont su me laisser une large marge de liberté pour mener à bien ce travail de recherche :

A Mme **Patricia Aïssa**, professeur à la Faculté des Sciences de Bizerte et co-directrice de cette thèse. Merci pour votre confiance et l'autonomie que vous m'avez laissée dès le début et pendant ces quatre années de travail. Le temps que vous m'avez consacré et l'excellence de vos conseils et idées m'ont considérablement aidée et guidé dans ma réflexion lors de la conception et la planification du sujet. Je tiens bien sûr à remercier Mme Aïssa pour sa disponibilité, son accessibilité et pour son investissement dans ce travail et ce, malgré un emploi du temps follement chargé. Merci pour votre supervision et vos corrections multiples aux cours de l'identification spécifique et de la rédaction du manuscrit. Je n'oublie pas non plus vos constants encouragements et votre soutien en particulier dans les situations difficiles.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Mr **Olivier Pringault**, Directeur de recherche IRD (Institut de Recherche pour le développement) à l'Université de Montpellier II (France) et spécialiste de l'écologie microbienne, qui fut pour moi un directeur de thèse attentif et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence, sa rigueur scientifique et sa clairvoyance m'ont beaucoup appris. Ils ont été et resteront des moteurs de mon travail de chercheur. Nos discussions et les points de vue échangés suite à mes recherches bibliographiques, vos conseils, vos orientations et vos précisions m'ont permis de retrouver une voie plus thématique et plus innovatrice.

A Mr **Ezzeddine Mahmoudi**, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Bizerte et spécialiste de la nématofaune. Merci pour ton encadrement et ta disponibilité dès que c'était nécessaire. Merci pour les conseils que tu m'as accordés lors de mes travaux de recherche.

J'exprime tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury en particulier Mr **Philiipe Cuny**, Mr **Sami Sayadi** et Mr **Ahmed Afli** ; je leur suis très

reconnaissante d'avoir accepté d'être rapporteurs et examinateurs de ce travail et pour leurs remarques et corrections très enrichissantes.

Mon comité de thèse m'a beaucoup aidé, en m'apportant à chaque réunion des regards extérieurs et critiques sur mon travail. Je suis très reconnaissante au représentant de l'école doctorale Sibaghe de l'Université de Montpellier II, Mme **Françoise Elbaz-Poulichet**.

Mes sincères remerciements vont également au président du jury le Professeur **Mohamed Néjib Daly-Yahya** qui a consacré une part importante de son temps à la lecture et à l'évaluation de ce travail.

J'adresse toute ma gratitude à toutes les personnes qui m'ont aidé, de près ou de loin, dans la réalisation de ce travail.

Je remercie Mr **Patrice Got** pour ses conseils enrichissants et son expertise, en particulier, au cours des analyses de la cytométrie en flux et de m'avoir permis de travailler dans des bonnes conditions.

Je remercie toutes les personnes formidables que j'ai rencontrées par le biais des projets CMCU et CNRS. Merci pour votre support et vos encouragements. Je pense particulièrement à l'équipe Environnement et microbiologie de l'Université de Pau et Pays de l'Adour (France) : Mr **Robert Duran** et Mme **Cristiane Cravo-Laureau** qui ont pris le temps de discuter les différentes parties de la thèse et de corriger les publications issues de ce travail.

Mention spéciale à **Olfa Ben Said**, pour son co-encadrement durant le travail de thèse. Très humblement, je voudrais te dire merci pour ton soutien pendant mes périodes de doutes et pour tes multiples encouragements répétés. *Bonne chance pour le poste de Maître assistant.*

Je ne saurais oublier de remercier les enseignants du Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement : **Hamouda, Mohamed, Fehmi, Amor, Naceur** pour leur aide morale et matérielle et leurs encouragements continus.

A toute la dynamique et sympathique équipe de chercheurs de l'unité d'écologie côtière et d'écotoxicologie marine du Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement qu'il m'a été donné de rencontrer durant les quatre années consacrées à la préparation de ma thèse : **Amel, Badreddine, Abdelhafidh, Amel, Soumaya, Ibtihel, Rahma, Fida, Ahmed, Naima...**et mes amis **Héla, Sonia, Sami, Tahani, Jihène, Imen, Ismaïl, Itab**. Je ne saurais terminer sans remercier toutes ces personnes dans l'ombre dont la contribution à mon travail est non négligeable.

Bonne chance et tous mes encouragements aux thésards suivants....



C'est aujourd'hui avec un réel pincement au coeur que j'en arrive à écrire ces remerciements car ils sont la conclusion finale de ces années de travail.

Je ne pourrai consacrer ma thèse de doctorat :

A mon cher frère **MOURAD**, hélas, n'est plus parmi nous depuis cinq ans. **MOURAD**, tu n'es plus à mes côtés, je le sais et ça me fait follement de la peine, pourtant, j'espère de tout cœur que j'ai pu en définitive satisfaire notre rêve.

A mes chers parents **Taher** et **Selma**, qui n'ont cessé de me prêter leur amour, leur attention, leur soutien et leur encouragement. Je t'exprime maman ma très vive reconnaissance pour tes sacrifices et pour tout le temps que tu as passé avec mes enfants.

Le travail exposé dans ce mémoire n'aurait pas vu le jour sans le concours de mes proches :

Mon plus profond « merci » va à mon mari **MAHER** qui m'a accompagnée, soutenue et supportée durant ces quatre longues années « dans la joie comme dans la douleur ». Ton soutien et ton amour sans faille ont été pour moi d'un grand réconfort.

Mes anges **MOHAMED YASSINE** et **YAHYA**

Mon frère **Mohamed** et mes sœurs **Dora, Arbia, Hanene, Aida** pour leur amour

Tous les membres de ma grande famille pour leurs aides morales, en particulier, ma belle mère **Arroussia** et mes belles sœurs **Zizi, Henda, Amel, Wassila, Souad, Farida Hayet**, mon beau frère **Abdelwaheb** et sa femme **Najoua**

A toute la famille **Louati** et **Khadraoui**.

LISTE DES PUBLICATIONS RELATIVES A LA THESE

Articles à comité de lecture impactés :

✓ **Louati H**, Ben Said O, Got P, Soltani A, Mahmoudi E, Cravo-Laureau P, Duran R Aissa P, Pringault O (2013). Microbial community responses to bioremediation treatments for the mitigation of low-dose anthracene in marine coastal sediments of Bizerte lagoon (Tunisia) Environmental Science Pollution Research **20**, 300-310. **IF 2.87**

✓ **Louati H**, Ben Said O, Soltani A, Got P, Mahmoudi E, Cravo-Laureau C, Duran R, Aissa P, Pringault O. Roles of biological interactions and pollutant contamination in shaping microbial benthic community structure. Chemosphere **93**, 2535–2546 .**IF 3.155**

✓ **Louati H**, Ben Said O, Soltani A, Got P, Cravo-Laureau C, Duran R, Aissa P, Pringault O, Mahmoudi E. Biostimulation as an attractive technique to reduce phenanthrene toxicity for meiofauna and bacteria in lagoon sediment. Environmental Science Pollution Research. DOI: 10.1007/s11356-013-2330-5. **IF 2.87**

✓ **Louati H**, Ben Said O, Soltani A, Cravo-Laureau C, Preud'Homme H, Duran R, Aissa P, Mahmoudi E, Pringault O. Impacts of bioremediation schemes for the mitigation of a low-dose anthracene contamination on free-living marine benthic nematodes. Ecotoxicology. DOI 10.1007/s10646-013-1163-9. **IF 2.355**.

✓ Ben Said O, **Louati H**, Soltani A, Mahmoudi E, Cravo-Laureau C, Duran R, Pringault O, Aissa P. (2012) Etude in vitro de l'impact de sédiments artificiellement contaminés par l'anthracène: effets sur les bactéries indigènes et les nématodes libres marins Canadian Journal of Civil Engineering **39**, 556-564. **IF 0.47**

Articles à comité de lecture non impactés :

✓ **Louati H**, Ben Said O, Soltani A, Mahmoudi E, Cravo-Laureau C, Duran R, Pringault O, Aissa P (2012). Interest of bioremediation in reducing the phenanthrene toxic effect on benthic bacteria and free-living nematode community. Bulletin de la Société Zoologique de France **136**, 131-144.

✓ **Louati H**, Ben Said O, Soltani A, Mahmoud E, Cravo-Laureau C, Duran R, Pringault O, Aissa P (2012). Biodepollution par ajout de nutriments : effets sur la biomasse des bactéries indigènes. Tunisian Journal of Medicinal Plants and Products **8** (1), 55-59.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE : Problématique et objectif général de la thèse	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	7
1. STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DES ECOSYSTEMES BENTHIQUES	8
1.1. DEFINITION	8
1.2. STRUCTURE DES COMMUNAUTES	9
1.3. ROLE DE LA MICROFLORE	9
1.4. ROLE DE LA MEIOFAUNE	11
1.5. INTERACTIONS MICROFAUNE-MEIOFAUNE	13
2. LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES	15
2.1. DEFINITION ET NOMENCLATURE	15
2.2. ORIGINE ET SOURCES	16
2.2.1. <i>Sources naturelles</i>	17
2.2.2. <i>Sources anthropiques</i>	17
2.3. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	17
2.3.1. <i>Propriétés physiques</i>	18
2.3.2. <i>Propriétés chimiques</i>	19
2.4. IMPACTS DES HAPS SUR LES COMMUNAUTES BENTHIQUES	19
2.4.1. <i>Toxicité des HAPs sur la structure du benthos</i>	20
2.4.2. <i>Toxicité des HAPs sur le fonctionnement du benthos</i>	21
2.4.3. <i>Relation microfaune-méiofaune</i>	23
2.5. DEVENIR ET BIODEGRADATION DES HAPS DANS LES ECOSYSTEMES BENTHIQUES	23
2.5.1. <i>Processus abiotiques de dégradation</i>	24
2.5.2. <i>Processus biotiques de dégradation</i>	24
3. METHODES DE REHABILITATION DES SEDIMENTS POLLUES PAR LES HAPS	29
3.1. METHODES PHYSICO-CHIMIQUES	29
3.2. METHODES BIOLOGIQUES	30
3.2.1. <i>Phytoremédiation</i>	30
3.2.2. <i>Biostimulation</i>	31
3.2.3. <i>Bioaugmentation</i>	32
3.2.4. <i>Combinaison Biostimulation et Bioaugmentation</i>	32
Références bibliographiques	34
CHAPITRE II: PROCEDURES EXPERIMENTALES	47
1. DESCRIPTION DU SITE D'ETUDE	48
2. PARAMETRES DESCRIPTEURS DE SITE D'ETUDE	49
2.1. MODALITES DE PRELEVEMENT	49
2.2. MESURE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUE DES EAUX	50
2.3. MESURE DES PARAMETRES HYDROLOGIQUES	50
2.4. MESURE DES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUE DES SEDIMENTS	52
3. PROTOCOLE EXPERIMENTAL	53
3.1. CONTAMINATION DES SEDIMENTS	53
3.2. TECHNIQUES DE BIOREMEDIATION	53
3.3. INCUBATION DES MICROCOSMES	54
3.4. DOSAGE DES HAPS	55

4. ETUDE BACTERIOLOGIQUE	56
4.1. MESURES DE LA CONSOMMATION D'OXYGENE	56
4.2. ESTIMATION DE LA BIOMASSE BACTERIENNE PAR CYTOMETRIE EN FLUX	57
4.3. DIVERSITE BACTERIENNE (T-RFLP)	59
5. ETUDE DE LA MEIOFAUNE	60
5.1. DETERMINATION DE LA DENSITE	60
5.2. DETERMINATION DE LA STRUCTURE DE LA NEMATOFaUNE	61
5.2.1. <i>Préparation des nématodes pour l'étude systématique</i>	61
5.2.2. <i>Détermination spécifique des nématodes libres marins</i>	62
5.2.3. <i>Indices de diversité et structure spécifique de la nématofaune</i>	68
6. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES	67
6.1. ANALYSES UNIVARIEES	67
6.2. ANALYSES MULTIVARIEES	68
Références bibliographiques	69
CHAPITRE III: EFFETS D'UNE SEULE MOLECULE DE HAP	73
PARTIE A : APPLICATION A DES SEDIMENTS CONTAMINES PAR UNE FAIBLE DOSE D'ANTHRACENE	74
I. INTRODUCTION	74
Références bibliographiques	76
II- PUBLICATION 1: MICROBIAL COMMUNITY RESPONSES TO BIOREMEDIATION TREATMENTS FOR THE MITIGATION OF LOW-DOSE ANTHRACENE IN MARINE COASTAL SEDIMENTS OF BIZERTE LAGOON (TUNISIA)	78
1. INTRODUCTION	80
2. MATERIALS AND METHODS	81
2.1. SITE DESCRIPTION AND SAMPLING	81
2.2. MICROCOSM SET-UP	82
2.3. FLOW CYTOMETRY MEASUREMENTS	83
2.4. OXYGEN MICROSENSOR MEASUREMENTS	84
2.4.1. <i>Oxygen microsensor</i>	84
2.4.2. <i>Diffusive oxygen flux calculation</i>	84
2.5. T-RFLP ANALYSIS	85
2.6. STATISTICAL ANALYSIS	86
3. RESULTS	86
3.1. BACTERIAL ABUNDANCE	86
3.2. SEDIMENT OXYGEN CONSUMPTION	89
3.3. BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE	92
4. DISCUSSION	93
5. CONCLUSION	97
6. ACKNOWLEDGMENTS	97
7. REFERENCES	98
III- PUBLICATION 2: IMPACTS OF BIOREMEDIATION SCHEMES ON FREE-LIVING MARINE BENTHIC NEMATODES IN ANTHRACENE-CONTAMINATED SEDIMENTS	102

1. INTRODUCTION	104
2. MATERIALS AND METHODS	106
2.1. SITE DESCRIPTION	106
2.2. COLLECTING SAMPLES	107
2.3. STOCK SOLUTION AND ANTHRACENE CONTAMINATION OF SEDIMENTS	107
2.4. EXPERIMENTAL SET-UP	107
2.5. ANTHRACENE ANALYSIS	109
2.6. SAMPLE PROCESSING	109
2.7. DATA ANALYSIS	109
3. RESULTS	110
3.1. ANTHRACENE DEGRADATION	110
3.2. ABUNDANCE AND DIVERSITY OF THE NEMATODE COMMUNITY	111
3.3. IMPACT OF TREATMENTS ON NEMATODE STRUCTURE	116
4. DISCUSSION	119
5. CONCLUSION	123
6. ACKNOWLEDGMENTS	123
7. REFERENCES	123
IV- PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION	128
PARTIE B : CONTAMINATION PAR LE PHENANTHRENE A FORTE DOSE	131
I- INTRODUCTION	131
Références bibliographiques	133
II- PUBLICATION 3: INTÉRÊT DE LA BIOREMÉDIATION DANS LA RÉDUCTION DE L'EFFET TOXIQUE DU PHÉNANTHRÈNE SUR LES COMMUNAUTÉS DE BACTÉRIES ET DE NÉMATODES LIBRES BENTHIQUES	134
1. INTRODUCTION	136
2. MATERIEL ET METHODES	137
2.1. MILIEU D'ETUDE ET STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE	137
2.2. EXPERIMENTATION	137
2.2.1. Contamination des sédiments par le phénanthrène	137
2.2.2. Inoculation des sédiments et techniques de bioremédiation	138
2.2.3. Démarrage de l'expérience	139
2.2.4. Dénombrement des bactéries hétérotrophes aérobies	139
2.2.5. Techniques d'étude de la nématofaune	140
2.2.6. Traitement statistique des données	140
3. Résultats	141
3.1. ÉTUDE BACTERIOLOGIQUE	141
3.1.1. Effets du phénanthrène sur les bactéries indigènes	141
3.1.2. Effets de la biostimulation sur les bactéries indigènes	141
3.1.3. Effets de l'association biostimulation-bioaugmentation sur les bactéries indigènes	142
3.1.4. Effets sur les bactéries capables d'utiliser le phénanthrène comme unique source de carbone et d'énergie	143
3.2. ÉTUDE NEMATOLOGIQUE	144
3.2.1. Effets du phénanthrène sur les densités de nématodes libres marins	144
3.2.2. Effets de la biostimulation sur les densités de nématodes libres marins	145
3.2.3. Effets de l'association biostimulation-bioaugmentation sur les nématodes libres	145

4. DISCUSSION ET CONCLUSION	146
5. REMERCIEMENTS	147
6. REFERENCES	148
III- PUBLICATION 4: BIOSTIMULATION AS AN ATTRACTIVE TECHNIQUE TO REDUCE PHENANTHRENE TOXICITY FOR MEIOFAUNA AND BACTERIA IN LAGOON SEDIMENT	151
1. INTRODUCTION	153
2. MATERIALS AND METHODS	154
2.1. FIELD SITE	154
2.2. PHENANTHRENE CONTAMINATION OF SEDIMENTS	155
2.3. MICROCOSM EXPERIMENT	156
2.4. PHENANTHRENE ANALYSIS	156
2.5. FLOW CYTOMETRY MEASUREMENTS	157
2.6. SAMPLE PROCESSING	158
2.7. DATA PROCESSING	158
3. RESULTS	158
3.1. PHENANTHRENE REMOVAL	158
3.2. BACTERIAL AND MEIOFAUNAL ABUNDANCE	159
3.3. NEMATOFUNA DIVERSITY	162
4. DISCUSSION	167
5. CONCLUSION	170
6. ACKNOWLEDGMENTS	170
7. REFERENCES	170
IV- PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION	174
CHAPITRE IV: EFFETS D'UN COCKTAIL DE HAP	176
I- INTRODUCTION	177
Références bibliographiques	179
II-PUBLICATION 5: THE ROLES OF BIOLOGICAL INTERACTIONS AND POLLUTANT CONTAMINATION IN SHAPING MICROBIAL BENTHIC COMMUNITY STRUCTURE	180
1. INTRODUCTION	182
2. MATERIALS AND METHODS	184
2.1. COLLECTING SITE	184
2.2. PAH CONTAMINATION OF SEDIMENTS	185
2.3. EXPERIMENTAL SETUP	185
2.4. PAH ANALYSIS	186
2.5. BACTERIAL COUNTS BY FLOW CYTOMETRY	186
2.6. MEIOFAUNA EXTRACTION	187
2.7. SEDIMENT OXYGEN CONSUMPTION MEASUREMENTS	187
2.8. T-RFLP BACTERIAL COMMUNITY ANALYSIS	188
2.9. STATISTICAL ANALYSIS	188
3. RESULTS	189
3.1. DEGRADATION OF MIXED PAHS	189
3.2. PERCENTAGE OF TOTAL ORGANIC CARBON	191

SOMMAIRE

3.3. BACTERIAL AND MEIOFAUNAL ABUNDANCE	191
3.4. SEDIMENT OXYGEN CONSUMPTION	195
3.5. BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURE	198
4. DISCUSSION	200
4.1. NOTES ON THE METHODOLOGY EMPLOYED	200
4.2. IMPACT OF MEIOFAUNA ON MICROBIAL ACTIVITY AND STRUCTURE	200
4.3. IMPACT OF PAH ON MEIOFAUNA AND BACTERIA	202
4.4. IMPACT OF BIOREMEDIATION TREATMENTS ON MEIOFAUNA AND BACTERIA	204
5. CONCLUSION	205
6. ACKNOWLEDGMENTS	205
7. REFERENCES	205
III-PUBLICATION 6: RESPONSES OF A FREE-LIVING MARINE NEMATODE COMMUNITY TO BIOREMEDIATION OF MIXTURE PAH IN BIZERTE LAGOON (TUNISIA)	210
1. INTRODUCTION	212
2. MATERIALS AND METHODS	213
2.1. SEDIMENT SAMPLING	213
2.2. PAH SEDIMENT SPIKING	214
2.3. EXPERIMENTAL DESIGN	214
2.4. PROCESSING OF SAMPLES	215
2.5. PAH ANALYSIS	215
2.6. DATA ANALYSIS	216
3. RESULTS	216
3.1. PAH DEGRADATION	216
3.2. UNIVARIATE METRICS OF ASSEMBLAGES	217
3.3. DISTRIBUTIONAL PLOTS	220
3.4. TAXONOMIC COMPOSITION AND MULTIVARIATE ANALYSES	221
4. DISCUSSION	223
5. CONCLUSION	225
6. ACKNOWLEDGMENTS	226
7. REFERENCES	226
IV- PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION	231
CHAPITRE V: CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	233
I- SYNTHESE DES RESULTATS/ PRINCIPAUX CONCLUSIONS	234
II- PERSPECTIVES	239
Références bibliographiques	241
LISTE DES ABREVIATIONS	243
LISTE DES FIGURES ET PLANCHES	244
LISTE DES TABLEAUX ET TABLES	252
PRODUCTION SCIENTIFIQUE	256

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Le milieu marin représente un enjeu considérable en termes de développement socio-économique. Ces dernières décennies, la pollution des océans à travers le monde est devenue un sujet de préoccupation croissante à l'échelle internationale. En outre, les eaux côtières sont devenues un récepteur privilégié des micro-polluants, en provenance des zones urbaines, industrielles et agricoles. Leur présence avérée dans les eaux côtières et le manque de connaissances sur leur devenir dans l'environnement, sur leurs impacts potentiels sur la santé humaine et sur les écosystèmes sont devenus un sujet d'actualité pour la communauté scientifique. En effet, une grande partie de ces micro-polluants d'origine anthropique ou naturelle s'adsorbent sur les particules en suspension, puis s'accumulent au niveau des sédiments (Soclo *et al.*, 2000). Ainsi, les dépôts sédimentaires, à l'interface des zones océaniques, constituent de véritables filtres et réservoirs pour les contaminants et forment d'importantes sources de contamination. Parmi les polluants organiques retrouvés dans l'environnement marin et susceptibles d'induire des effets toxiques sur les êtres vivants, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs). Ils sont particulièrement suivis par les procédures législatives en raison de leurs propriétés toxiques et cancérigènes à faibles concentrations (Samanta *et al.*, 2002). Les HAPs ont un impact sur les organismes aquatiques qui en retour jouent un rôle dans leur devenir. Ils ont également des effets sur la population humaine consommatrice des ressources aquatiques présentes dans ces milieux (Louati *et al.*, 2001). Ceci explique que les HAPs figurent dans la liste des substances prioritaires «*présentant un risque significatif pour ou via l'environnement aquatique*» (DCE/60/2000). Il est donc primordial d'étudier d'une part l'impact des HAPs sur les communautés benthiques et d'autre part de tester différentes techniques de bioremédiation dans le but d'éliminer ces composés chimiques dans le milieu marin. En effet, les sédiments marins constituant d'importants "réservoirs" des HAPs variant de 1µg/kg à 300g/kg (Kanaly et Harayama, 2000 ; Lic *et al.*, 2001) abritent plusieurs populations bactériennes jouant un rôle capital dans la dégradation naturelle de ces polluants ou bioréhabilitation. Cette biodégradabilité naturelle a été utilisée ces dernières décennies comme une alternative rentable et prometteuse aux procédés physicochimiques de remédiation considérés comme plus agressifs (Mrozik *et al.*, 2003).

Ces procédés font appel à transférer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire, vers des points de récupération en se servant, pour leur transport, de fluides (eau ou gaz) injectés ou présents dans les sols (Gabet, 2004). Toutefois, l'atténuation naturelle de ces composés persistants demeure insuffisante dans le cas de polluants souvent récalcitrants comme les HAPs. De ce fait, différentes techniques de bioremédiation ont été développées comme par exemple la biostimulation avec l'ajout de composés limitants aux bactéries indigènes afin d'accélérer la dégradation des contaminants ou encore la bioaugmentation par l'inoculation de souches bactériennes qui se sont montrées capables de dégrader les HAPs. Plusieurs souches bactériennes ont été isolées des environnements pollués pour leur capacité à minéraliser des HAPs que ce soit en conditions aérobies (Kanaly et Harayama, 2000; Mrozik *et al.*, 2003; Ben Said *et al.*, 2008) ou anaérobies (Coates *et al.*, 1997).

Par ailleurs, les bactéries constituent une ressource nutritive pour d'autres organismes de la chaîne trophique benthique. C'est le cas de la méiofaune qui désigne des animaux de petite taille (entre 40 μm et 1 mm) qui vivent sur ou dans les substrats meubles à toutes les profondeurs, en eaux douces et en milieu marin et comprend plusieurs petits métazoaires mais aussi de grands protozoaires (ciliés, amibes). Elle joue un rôle important dans la reminéralisation, la transformation et le transport de la matière organique au sein du sédiment (Gerlach, 1978). En outre, la méiofaune participe aux processus de bioturbation des sédiments, au recyclage de la matière organique et dans le transfert trophique au sein des écosystèmes aquatiques (Coull, 1999). De fait, plusieurs interactions s'exercent entre les populations méiofaunistiques et bactériennes. La méiofaune et en particulier les nématodes libres (taxon prédominant de la méiofaune) agit indirectement en favorisant l'activité de la boucle bactérienne mais aussi directement par assimilation de la matière organique (Aïssa, 1992; Rysgaard *et al.*, 2000). Elle stimule indirectement la croissance des bactéries en leur assurant transport, oxygène et renouvellement du substrat, ce qui accroît leurs propres ressources alimentaires (Aïssa, 1992). Ces différentes interactions peuvent avoir des effets sur la dégradation des composés organiques persistants comme les HAPs. En effet, la méiofaune peut inhiber ou stimuler la dégradation des HAPs présents dans les sédiments. Ainsi, Näslund *et al.* (2010) ont observé que l'abondance élevée de la méiofaune inhibe la dégradation du naphthalène suite à la prédation des bactéries hydrocarbonoclastes. Cependant, d'autres études ont également révélé que la méiofaune

favorise la décomposition bactérienne par le maintien de la population bactérienne dans une phase de croissance active (Moens *et al.*, 2005 ; Nascimento *et al.*, 2012). Bien que la méiofaune constitue un outil communautaire pertinent dans la détection des perturbations aquatiques (Guo *et al.*, 2001; Mahmoudi *et al.*, 2007), la rareté des spécialistes a fait que les études de biosurveillance faisant appel aux organismes méiobenthiques se font de plus en plus rares. Actuellement, la tendance est l'utilisation de certains groupes voire même de certaines espèces méiofaunistiques dans des expériences en microcosmes (Guo *et al.*, 2001; Mahmoudi *et al.*, 2007; Beyrem *et al.*, 2010; Hedfi *et al.*, 2013) afin d'évaluer leurs réponses à différents contaminants.

Toutefois, les travaux relatifs à la bioremédiation de sédiments marins contaminés par les HAPs sont relativement restreints (Schratzberger *et al.*, 2003; Miyasaka *et al.*, 2006). Si plusieurs travaux réalisés en Méditerranée ont montré que les sédiments sont contaminés par les HAPs (Louati *et al.*, 2001; Ben Said *et al.*, 2010), peu d'études ont été consacrées au suivi de leurs effets sur les communautés benthiques. De même, l'impact écologique de la bioremédiation des HAPs avec les effets observés au niveau de la diversité des communautés bactériennes et nématologiques est relativement méconnu. Dans ce cadre, un projet financé par le programme Hubert Curien UTIQUE (CMCU) intitulé « *Mise au point de bio-essais de biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques en vue de réhabiliter des sédiments marins contaminés et mesure en parallèle de l'impact écologique de la bioremédiation* » a été mis en place dans le cadre d'une coopération Nord-Sud avec le soutien de la Faculté des Sciences de Bizerte (FSB), du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) pour apporter des réponses aux problématiques suivantes :

- ✓ Est-ce-que les HAPs ont un effet direct ou indirect sur les communautés bactériennes et méiofaunistiques benthiques en termes de densités, de biomasse et de diversité ?
- ✓ Quel est le rôle des interactions complexes entre la microflore et la méiofaune vis-à-vis de l'impact et du devenir des HAPs?
- ✓ Est-ce-que la méiofaune peut influencer ou non sur la dégradation des HAPs dans le sédiment ?
- ✓ Peut-on définir des espèces de nématodes libres indicatrices de pollution par les HAPs ? Celles-ci sont-elles tolérantes à un HAP particulier ou à un cocktail de HAPs ? Les espèces dites sensibles sont-elles affectées par la contamination des HAPs?

Comment se comportent les espèces de la nématofaune face à une bioremédiation des sédiments contaminés par les HAPs?

✓ D'un point de vue technologique et écologique, quelle méthode de bioremédiation (biostimulation, bioaugmentation ou combinaison des deux méthodes) est la plus efficace pour la dégradation des HAPs dans les milieux marins et quelle est celle qui présente un impact écologique minime vis-à-vis des communautés bactériennes et méiofaunistiques ?

La présente étude se propose de répondre à ces questions. De ce fait, la première partie de notre travail sera consacrée aux données bibliographiques. Le chapitre 1 «**Synthèse Bibliographique** » présentera d'une part la pollution des écosystèmes marins par les HAPs et leurs impacts sur les organismes benthiques ainsi que les interactions trophiques existant entre les bactéries et la méiofaune, et d'autre part l'intérêt de la bioremédiation dans la décontamination des écosystèmes marins.

Le second chapitre « **Procédures expérimentales** » précisera l'ensemble des méthodes expérimentales et analytiques utilisées pour atteindre ces objectifs.

Le chapitre 3 consacré à l'« **Effet d'une seule molécule de HAP**», sera scindé en deux parties :

La première partie sera réservée à l'effet d'une faible dose (1ppm) d'anthracène sur l'activité, la biomasse et la structure des bactéries de la lagune de Bizerte (publication n° 1).

Ensuite, nous mettrons l'accent sur l'impact de l'anthracène à faible dose (1ppm) et des différentes techniques de bioremédiation sur les nématodes libres marins en termes de densités et de composition spécifique (publication n°2).

La seconde partie de ce chapitre 3 est réservée d'une part à l'effet d'une forte dose (100ppm) de phénanthrène sur la microflore et la méiofaune de la lagune de Bizerte (publication n°3) et d'autre part à l'effet de deux techniques de bioremédiation du phénanthrène sur les bactéries, la méiofaune et principalement sur la structure spécifique des nématodes (publication n°4).

Le chapitre 4 sera consacré à l'« **Effet d'un cocktail de HAPs** » comportant trois molécules : phénanthrène, fluoranthène et pyrène commencera par exposer le pourcentage de dégradation des HAPs étudiés et leur impact sur l'activité, la biomasse,

la diversité des bactéries ainsi que sur la densité de la méiofaune (publication n°5). Ensuite, nous mettrons l'accent sur les interactions qui peuvent exister entre la microflore et la méiofaune et les conséquences de ces interactions vis-à-vis de l'impact (publication n°6) des HAPs. Finalement, nous présenterons la réponse des nématodes libres marins face à la bioremédiation des sédiments contaminés par le mélange de HAPs.

Ce mémoire s'achèvera par une «**conclusion générale**» récapitulant nos principaux résultats et développant nos perspectives de recherche.

Références bibliographiques

- Ben Said, O., Goni-Urriza, M., El Bour, M., Aissa, P. & Duran, R. (2010). Bacterial Community Structure of Sediments of the Bizerte Lagoon (Tunisia), a Southern Mediterranean Coastal Anthropized Lagoon. *Microbial Ecology*, **59**(3), 445-456.
- Ben Said, O., Goni-Urriza, M. S., El Bour, M., Dellali, M., Aissa, P. & Duran, R. (2008). Characterization of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments, Tunisia. *Journal of Applied Microbiology*, **104**(4), 987-997.
- 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**(9), 3589-3593. PMID:9341091.
- Coull, B. C. (1999). Role of meiofauna in estuarine soft-bottom habitats. *Australian Journal of Ecology*, **24**(4), 327-343.
- DCE/60/2000. Directive 2000/60/CE du Parlement européen. *Journal officiel de l'Union européenne* 327p. 1-73.
- Gabet, S. Remobilisation d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans les sols contaminés à l'aide d'un tensioactif d'origine biologique. Thèse de doctorat. Université de Limoges, pp. 177.
- Gerlach, S. A. (1978). Food chain relationships in subtidal silty sand, marine sediments and the role of meiofauna in stimulating bacterial productivity. *Oecologia (Berl.)*, **33**, 55-69.
- Guo, Y., Somerfield, P. J., M., W. R., et Zhang Z. & (2001). Large-scale patterns in the community structure and biodiversity of free living nematodes in the Bohai Sea, China. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **81**, 755-763.
- Kanaly, R. A., and Harayama, S. . (2000). Biodegradation of highmolecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, **182** : (8), 2059-2067. doi:10.1128/JB.182. 8.2059-2067.2000. PMID:10735846.
- Li.T., Zhaung H.K., Hsieh L.T., Lee W.J., Tsao M.C., PAH emission from the incineration of three plastic wastes. *Environ. Internat*, **27**, 61.

- Louati, A., Elleuch, B., Kallel, M., Saliot, A., Dagaut, J. & Oudot, J. (2001). Hydrocarbon contamination of coastal sediments from the Sfax area (Tunisia), Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, **42**(6), 445-452.
- Mahmoudi, E., Essid, N., Beyrem, H., Hedfi, A., Boufahja, F., Vitiello, P. & Aissa, P. (2007). Individual and combined effects of lead and zinc on a free-living marine nematode community: Results from microcosm experiments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **343**(2), 217-226.
- Miyasaka, T., Asami, H. & Watanabe, K. (2006). Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene-contaminated marine sediments. *Biodegradation*, **17**(3), 227-235.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z. & Łabużek, S. (2003). Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*, **12**, 15-25.
- Samanta, S. K., Singh, O. V. & Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, **20**(6), 243-248.
- Schratzberger, M., Daniel, F., Wall, C. M., Kilbride, R., Macnaughton, S. J. & Boyd, S. E., et al. (2003). Response of estuarine meio- and macrofauna to in situ bioremediation of oil-contaminated sediment. . *Marine Pollution Bulletin*, **46** (4), 430-443. doi:10.1016/S0025-326X(02)00465-4. PMID:12705916.
- Soclo, H. H., Garrigues, P. & Ewald, M. (2000). Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: Case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Marine Pollution Bulletin*, **40**(5), 387-396.

CHAPITRE I

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DES ECOSYSTEMES BENTHIQUES

1.1. Définition

Tout écosystème peut être défini comme un « système d'interactions complexes des espèces entre elles et entre celles-ci et le milieu » (Frontier and Pichod-Viale 1993). Cependant, selon la définition de la Convention sur la Diversité Biologique (CDB, 1994), l'écosystème est « un complexe dynamique constitué de communautés de plantes, d'animaux et de microorganismes, et de leur interactions, formant une unité fonctionnelle » (Lévêque and Mounolou, 2001). Dans un écosystème, les êtres vivants dépendent les uns des autres ; des relations alimentaires s'établissent entre eux : ce sont les relations trophiques (Fig.1). Un réseau trophique est défini comme une chaîne d'interactions consommateur-ressource entre différents groupes fonctionnels d'organismes (Bloem *et al.*, 1997).

Si le pélagos représente l'ensemble des organismes qui occupent la tranche d'eau supérieure, du fond à la surface, le benthos désigne l'ensemble des organismes aquatiques vivant au niveau des interfaces ou des sédiments. Des recherches récentes en écologie marine ont mis en évidence le rôle majeur que peuvent tenir les organismes benthiques dans les écosystèmes côtiers, non seulement en tant que régulateurs des flux de nutriments dans le couplage benthos-pelagos mais aussi comme témoins des variations environnementales et des perturbations anthropiques (Grall and Chauvaud, 2002). En fonction de la taille des organismes, on distingue : le macrobenthos, de taille supérieure à 1 mm; le meiobenthos, de taille comprise entre 40 μm (0,04mm) et 1 mm et; le microbenthos, de taille inférieure à 63 μm (Mare, 1942). Ainsi, la diversité de ces communautés biologiques joue un rôle déterminant dans le fonctionnement des écosystèmes (Roy *et al.*, 2001). En effet, la structure et le fonctionnement des communautés benthiques sont déterminés par des forçages, qu'ils soient sédimentaires (Gray, 1981), hydrodynamiques (Cabioch, 1968), climatiques (Tunberg and Nelson, 1998), biotiques (compétition : Huston, 1979; prédation : Paine, 1969) ou anthropiques (pêche : Hall, 1999 ; pollution chimique : Zaghdien *et al.*, 2005) et aussi par les apports de la matière organique.

1.2. Structure des communautés

La structure des principaux assemblages benthiques et la dynamique de chaque composant du benthos (microbenthos, méiofaune et macrofaune) diffèrent selon les conditions environnementales et les besoins trophiques (Danovaro *et al.*, 2000). Par leur abondance et leur diversité taxonomique et fonctionnelle, les organismes benthiques jouent un rôle prépondérant dans les flux de matière et d'énergie au sein des écosystèmes aquatiques. Le métabolisme benthique est assuré par le microphytobenthos jouant un rôle majeur dans la production primaire des écosystèmes côtiers (McIntyre *et al.*, 1996). Il constitue le premier maillon du réseau trophique benthique dans les sédiments meubles intertidaux et représente la première source de carbone pour la macrofaune (Hagerthey *et al.*, 2002), la méiofaune (Pinckney *et al.*, 2003) et les bactéries du sédiment (Middelburg *et al.*, 2000). Parmi ces maillons trophiques, le rôle fondamental des communautés microbiennes et méiofaunistiques dans le réseau trophique benthique a été bien étudié (Aïssa, 1991b; Lindgren *et al.*, 2012). Le transfert et le recyclage de la matière sont assurés par la boucle microbienne (Azam *et al.*, 1983). Les micro-organismes hétérotrophes (bactéries, flagellés, ciliés) assurent le recyclage des éléments nutritifs et ont un rôle clé puisqu'ils assurent également le transfert de la matière depuis les producteurs primaires vers les niveaux trophiques supérieurs.

1.3. Rôle de la microflore

Les microorganismes et en particulier les bactéries participent aux transferts de matières et d'énergie dans les écosystèmes aquatiques par leurs activités de minéralisation et de production de biomasse (Blackburn, 1988). Par leur capacité à utiliser différents accepteurs d'électrons, les bactéries contribuent activement aux flux de matière (organique et minérale) à l'interface eau-sédiment (Froelich *et al.*, 1979). Cependant, les macromolécules dissoutes ou particulières ne sont pas directement assimilables par les bactéries. Il faut que les polymères organiques soient hydrolysés, par des enzymes extracellulaires, en monomères qui sont alors incorporés dans les cellules bactériennes. La dégradation des molécules complexes en molécules de plus en plus simples est réalisée par des bactéries de plus en plus spécialisées (Demanèche *et al.*, 2004). Actuellement, les voies de dégradation pour les HAPs de gros poids moléculaire tels que le fluoranthène, le pyrène, le benzo[a]anthracène, le chrysène, le

benzo[a]pyrène ont été moins étudiées, relativement peu de données existent sur les bactéries qui sont capables de les dégrader (Juhasz et Naidu, 2000). Le métabolisme microbien est le processus majeur de dégradation des polluants dans les milieux contaminés (sédiment, sol, eau). La biodégradation se réalise soit en conditions aérobies, les molécules sont alors dégradées par des réactions d'oxygénation, soit en conditions anaérobies (par exemple : conditions dénitrifiantes, sulfato-réductrices ou méthanogènes) par différents groupes de micro-organismes. Cette biodégradation est réalisée par des systèmes enzymatiques différents tels que des dioxygénases, des monooxygénases de bactéries et des laccases de champignons (Heitkamp et Cerniglia, 1989 ; Schratzberger *et al.*, 2003), ce qui explique le développement de techniques de bioremédiation pour dépolluer des sites contaminés. Par exemples, les HAPs à 3 cycles sont métabolisés par les bactéries par action des dioxygénases en composés dihydrodiols puis en acides carboxyliques (Sutherland *et al.*, 1995 ; Schratzberger *et al.*, 2003). Cette approche de bioremédiation utilise les capacités naturelles des micro-organismes à dégrader les polluants parfois même jusqu'à leur minéralisation (Serrano *et al.*, 2007). De plus, cette dégradation microbienne des contaminants peut aussi être améliorée soit par adjonction d'agents stimulant les microorganismes endogènes (Perfumo *et al.*, 2007), soit par ajout de microorganismes épurateurs endogènes ou exogènes (Jacques *et al.*, 2007). Ces procédés sont nommés respectivement biostimulation et bioaugmentation.

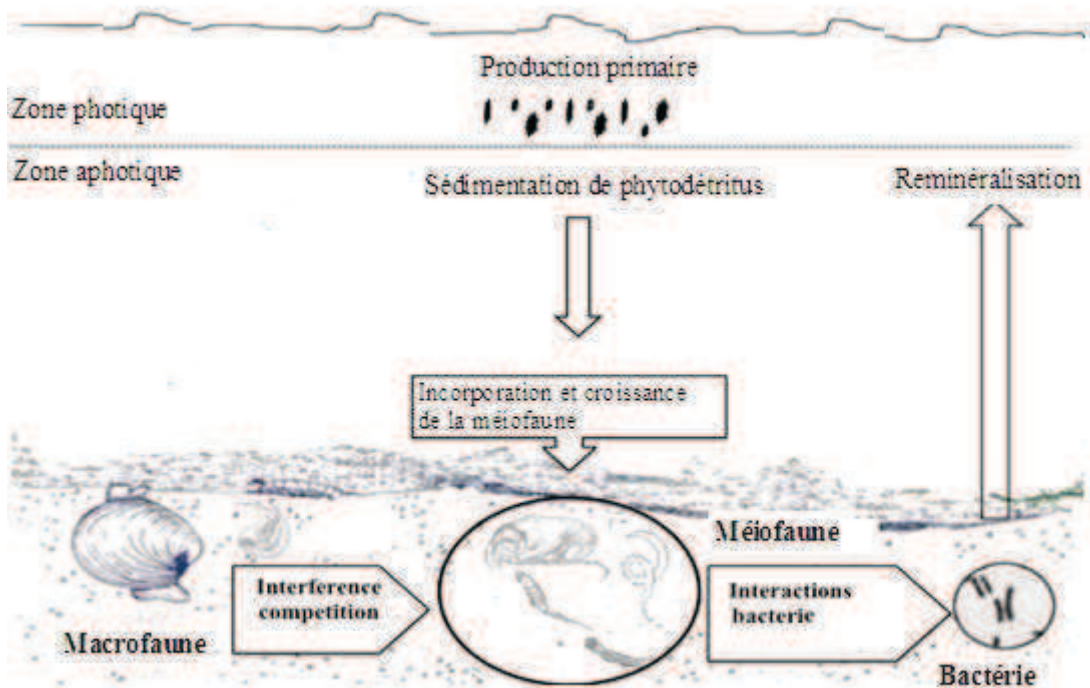


Fig. 1. Ecosystème benthique et principales interactions (In: Nascimento, 2010)

1.4. Rôle de la méiofaune

La méiofaune regroupe tous les métazoaires passant au travers d'un tamis de 1 mm de maille et qui sont retenus sur un tamis de 40 μm (Vitiello et Dinét, 1979; Lambshead, 1986; Aïssa, 1991). La méiofaune, se situant aux premiers niveaux des chaînes trophiques benthiques, représente un lien important entre les producteurs primaires et les niveaux trophiques plus élevés (Pinckney *et al.*, 2003; Moens *et al.*, 2002). Ainsi, elle joue un rôle important dans la transformation et le transport de la matière organique dans la colonne sédimentaire (Giere, 1993). Parmi les taxons communément rencontrés dans la méiofaune des sédiments marins et lagunaires, on peut citer les nématodes libres, les copépodes, les ostracodes, les larves des crustacés, les larves d'insectes, les polychètes, les oligochètes, les turbellariés, les acariens et les larves de mollusques. En effet, les nématodes, taxon prédominant de la méiofaune, sont les métazoaires les plus abondants dans les sédiments marins et lagunaires (Beyrem and Aïssa, 2000). Ils constituent environ 85% de la méiofaune totale (Montagna *et al.*, 1995). En termes de diversité spécifique, les nématodes libres constituent le groupe le plus riche du méiobenthos des écosystèmes aquatiques (Traunspurger, 2000) avec des densités

atteignant 20 millions d'individus par mètre carré de surface de l'océan marin (Platt et Warwick, 1980 ; Vranken et Heip, 1986). Du fait qu'ils représentent le taxon prédominant de la méiofaune, les nématodes constituent un maillon indispensable des chaînes alimentaires du domaine benthique. Cependant, l'évaluation exacte de leurs positions et de leurs importances trophiques paraît plus difficile car, appartenant à des groupes trophiques différents tous les nématodes n'occupent pas la même place dans la chaîne trophique benthique (Aïssa, 1991). Ainsi, ils peuvent être bactériophages, phytophages, détritivores ou carnivores consommant de petits nématodes, oligochètes et autres petits organismes méiobenthiques ou même omnivores (Aïssa, 1991). Ils constituent aussi des proies pour plusieurs prédateurs (adultes ou juvéniles) tels que les crevettes (Bell and Coull, 1978), les crabes ou certaines larves de poissons et de crustacés (Coull, 1990).

Les catégories alimentaires des nématodes ont été déterminées en se basant sur la morphologie de leur cavité buccale (qui peut présenter différents aspects reflétant une grande variation de leur régime alimentaire) (Planche 1) et en adoptant la classification de Wieser (1953), on distingue 4 groupes trophiques:

- Les consommateurs sélectifs de dépôts (1A) à cavité buccale absente ou virtuelle, l'animal avale de petites particules par succion œsophagique ;
- Les consommateurs non sélectifs de dépôts (1B) à cavité buccale conique ou cylindrique, sans dents. Les individus peuvent avaler (cas échéant) des diatomées ;
- Les brouteurs d'épistrates (2A) à cavité buccale pourvue de petites dents. La nourriture est grattée ou sucée après perforation de l'aliment consommé ;
- Les omnivores-prédateurs (2B) ayant une large cavité buccale le plus souvent pourvue de grosses et puissantes dents.

Au sein du benthos, l'utilisation de la méiofaune dans des études de perturbation environnementale présente plusieurs avantages telle que son rôle fondamental dans la détection des perturbations écosystémiques (Aïssa, 1991; Mahmoudi *et al.*, 2005). En plus, l'abondance des organismes méiofaunistiques dans les sédiments représente un avantage important pour les analyses écologiques et statistiques (Vincx et Heip, 1989). De ce fait, plusieurs méiobenthologistes se sont intéressés à ce groupe méiofaunistique prédominant, celui des nématodes libres marins (Mahmoudi *et al.*, 2002; Beyrem *et al.*, 2010). Les nématodes sont généralement considérés comme d'excellents indicateurs écologiques pour les habitats benthiques et sont souvent sélectionnés pour étudier les

impacts des différents genres de perturbations naturelles et anthropogènes dans l'environnement marin (Beyrem and Aissa, 2000; Mahmoudi *et al.*, 2002; Gyedu-Ababio and Baird, 2006).

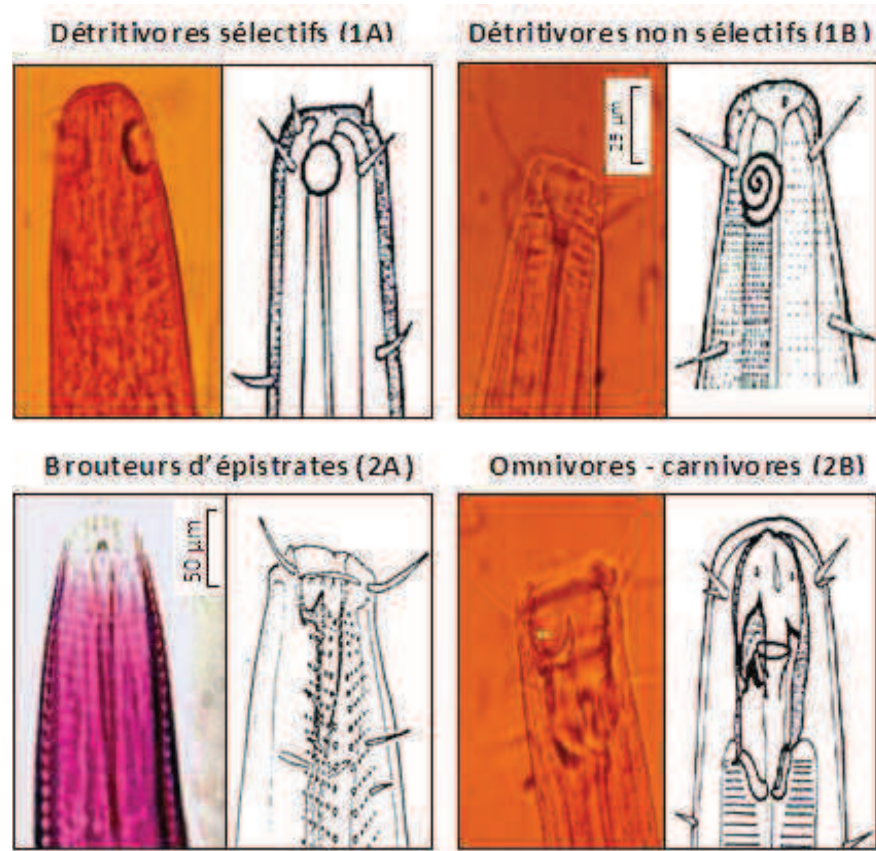


Planche 1. Organismes modèles des quatre groupes trophiques (1A, 1B, 2A et 2B) correspondant aux quatre types de cavités buccales des nématodes libres selon Wieser (In: Wieser, 1953).

1.5. Interactions Microfaune-Méiofaune

Les communautés bactériennes et méiofaunistiques jouent, entre autres, un rôle prépondérant dans les réseaux trophiques benthiques en participant activement à la reminéralisation de la matière organique déposée au fond des eaux (Azam *et al.*, 1983; Kaiser *et al.*, 2005). Ces communautés sont structurées par des relations de compétition et de prédation. Outre leur rôle dans le transfert et le recyclage de la matière, les bactéries constituent une ressource nutritive potentielle pour les échelons trophiques supérieurs tels les nématodes libres marins (Tietjen, 1971), certains d'entre eux

stimulant par leur action prédatrice la croissance des populations bactériennes. Certains auteurs ont montré que la fraction de production des bactéries consommées par la méiofaune est inférieure à 3 % (Epstein and Shiaris, 1992; Van Oevelen *et al.*, 2006) alors que Montagna (1984) a montré que la méiofaune seule peut réguler le compartiment bactérien. Ainsi, la méiofaune est de plus en plus considérée comme un compartiment biologique assurant un véritable lien entre le micro- et le macro-benthos. A l'exception des nématodes prédateurs, toutes les espèces de nématodes sont susceptibles de consommer des bactéries (Moens and Vincx, 1997). Les bactéries peuvent également être consommées par des copépodes benthiques (Carman, 1990). De fait, plusieurs interactions s'exercent entre les populations nématologiques et bactériennes et tendent à optimiser l'activité minéralisatrice des microorganismes :

- Tous les nématodes quel que soit leur niveau trophique et compte tenu de leur abondance favorisent la décomposition bactérienne en provoquant, par leur activité fouisseuse, un brassage continu des couches sédimentaires, et par suite une meilleure oxygénation du substrat (Aïssa, 1991),
- Les nématodes libres participent à la minéralisation de la matière organique dans les sédiments. En effet, cette faunule agit indirectement en favorisant l'activité de la boucle bactérienne mais aussi directement par assimilation de la matière organique (Aïssa, 1992; Rysgaard *et al.*, 2000),
- Les nématodes peuvent entrer en compétition avec les bactéries pour l'espace et les ressources (Montagna, 1984). Ces interactions sont souvent nutritionnelles. Ainsi, un microorganisme dépend d'un autre microorganisme pour la dégradation de produits ou de substrats spécifiques, ou différents microorganismes sont en compétition pour le même substrat (Trevors and Van Elsas, 1995).
- Enfin, la nématofaune peut influencer directement ou indirectement la composition spécifique des communautés microbiennes (De Mesel *et al.*, 2004; Moens *et al.*, 2005). En effet, Raghukumar *et al.* (2001) ont montré une corrélation positive et significative entre les biomasses bactérienne et méiofaunistique, suggérant un couplage étroit entre ces deux compartiments biologiques dans les sédiments marins. Par contre, des changements dans la composition spécifique des communautés bactériennes ont été observés en microcosmes avec une abondance élevée de la méiofaune (Naslund *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2012).

2. LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES

La pollution des écosystèmes marins constitue l'un des problèmes environnementaux majeurs par son impact sur la biosphère et la santé humaine. Les zones côtières sont le siège d'apports importants de micropolluants de différente nature qui finissent par s'accumuler dans les sédiments. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont parmi les polluants les plus fréquemment rencontrés dans ces environnements côtiers (Louati *et al.*, 2001; Zaghdien *et al.*, 2005). Ces composés souvent récalcitrants requièrent une attention particulière en raison de leur nature et de leurs propriétés (faible biodégradation, hydrophobicité élevée et, pour certains, toxicité). Ceci explique que plusieurs HAPs figurent dans la liste des substances prioritaires «présentant un risque significatif pour ou via l'environnement aquatique » (DCE/60/2000).

2.1. Définition et nomenclature

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont des composés organiques formés exclusivement d'atomes de carbone et d'hydrogène et constitués d'au moins deux noyaux aromatiques fusionnés (Li and Chen, 2002). Ils diffèrent par le nombre de noyaux accolés ainsi que par leur agencement qui peut être linéaire (anthracène), angulaire (phénanthrène) ou groupé (pyrène) (Fig.2). Ils se présentent le plus souvent sous forme de mélanges complexes. Ainsi, le fluoranthène est un HAP dit non alternant, isomère structurel du pyrène, qui est, lui, un HAP alternant ; les électrons π ne sont pas délocalisés dans l'ensemble de la molécule, contrairement au pyrène, qui est, pour cette raison, plus stable que le fluoranthène.

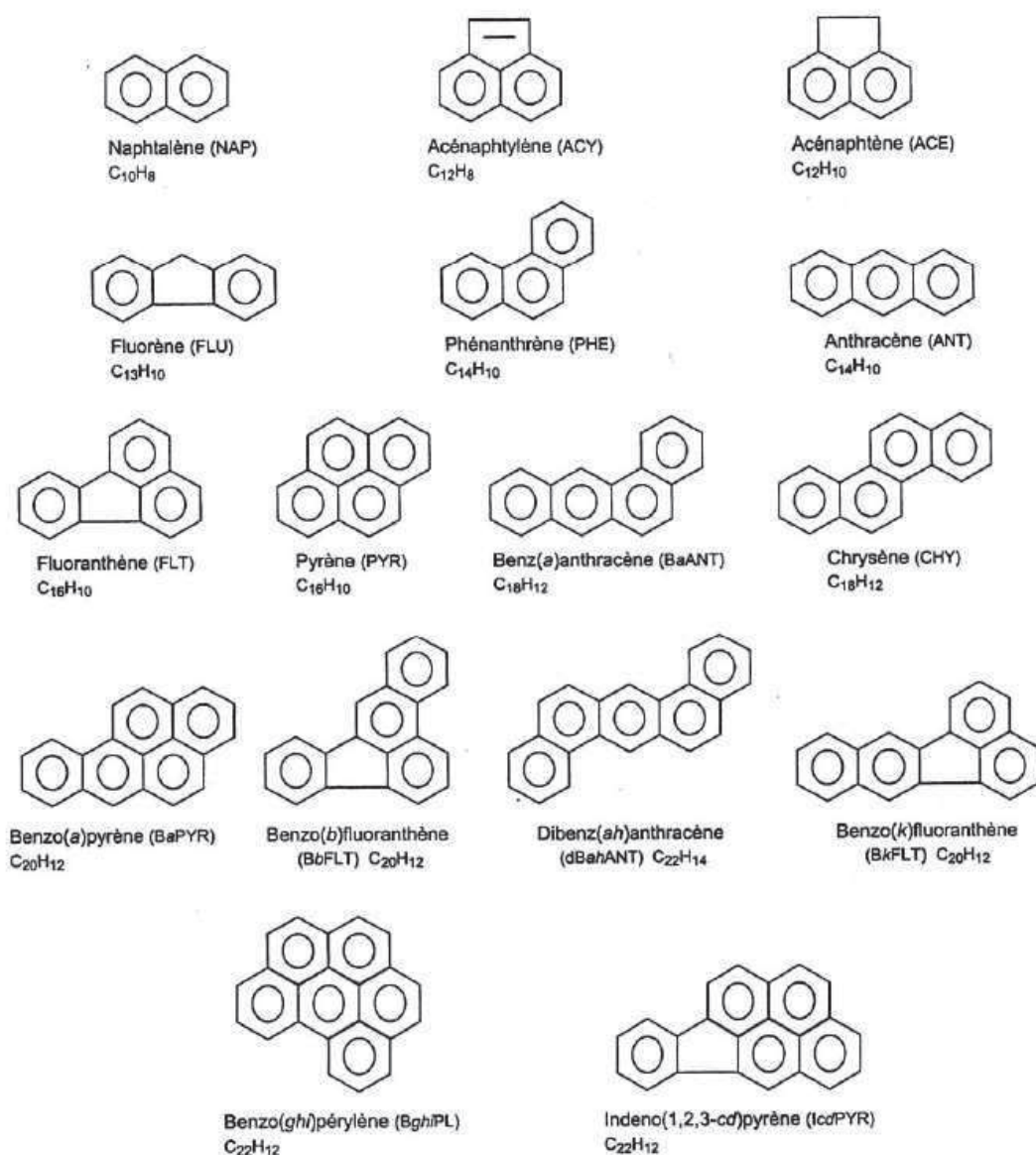


Fig. 2. Structure chimique des 16 HAPs prioritaires de la liste US-EPA (Agence Américaine de l'Environnement) (Habe and Omori, 2003)

2.2. Origine et sources

La distribution des HAPs dans l'environnement est fonction du mode d'émission et de leurs modes de transport. Il s'agit de composés ubiquistes produits par différents processus dans l'environnement : la diagenèse, la combustion et la pyrolyse de matières carbonées ainsi que par biogenèse (INERIS, 2000). On peut distinguer les sources naturelles et les sources anthropiques.

2.2.1. Sources naturelles

Elles incluent les émissions liées aux feux de forêts, aux éruptions volcaniques mais aussi les réactions biogènes de production dans les plantes et les bactéries (Juhasz and Naidu, 2000). Plusieurs travaux ont aussi mis en évidence l'origine biogène de certains HAPs tels que le naphthalène (Wilcke *et al.*, 2000; Wolfgang, 2000; Wolfgang *et al.*, 2003), le phénanthrène (Sims et Overcash, 1983; Wilcke *et al.*, 2000; Wilcke *et al.*, 2004), et le pérylène, produit de la dégradation naturelle de la chlorophylle (Wilcke *et al.*, 2000; Wilcke *et al.*, 2002). Il s'agit dans tous les cas de sources de contaminations mineures et diffuses (Wilcke, 2007). Un autre mode de formation des HAPs provient de la formation géologique des combustibles fossiles tels que le pétrole ou le charbon lors de la dégradation des substances organiques (processus de diagenèse) (Burgess *et al.*, 2003; Wilcke, 2007).

2.2.2. Sources anthropiques

Les principales sources de pollution par les HAPs sont anthropiques: certaines activités industrielles (industries pétrolières, aciéries, cimenteries...), le chauffage résidentiel, les émissions de véhicules à moteur, fumées de cigarette... (Lim *et al.*, 1999).

Le phénomène d'émission d'HAPs provenant d'imbrûlés de la matière organique est prévisible, étant donné les quantités d'HAPs déjà présentes dans les différents combustibles fossiles (Marr *et al.*, 1999).

2.3. Propriétés physico-chimiques

Le transport et la répartition des HAPs dans l'environnement marin dépendent notamment de leurs propriétés physico-chimiques (Tableau 1):

- la solubilité dans l'eau, qui est exprimée en moles l⁻¹ ou en mg l⁻¹, correspond à la concentration du produit en phase aqueuse lorsque l'équilibre est atteint ;
- la pression de vapeur, qui reflète la volatilité et donc la capacité d'un composé à rester en phase aqueuse ou à se volatiliser ;
- la constante d'Henry (KH), qui est caractéristique de l'équilibre entre les phases gazeuse et aqueuse ;
- le coefficient de partage octanol/eau (K_{ow}) : ce coefficient traduit la répartition d'une molécule d'un soluté entre la phase lipophile (octan-1-ol) et la phase hydrophile (eau) ;
- le coefficient normalisé de partage du carbone organique (K_{oc}) : ce coefficient indique la propension des HAPs à se lier à la matière organique du sol ou du sédiment.

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de 16 HAPs (Mackay *et al.*, 1991; Lundstedt, 2003).

Composés	Poids Moléculaire (g.mol ⁻¹)	Solubilité dans l'eau à 25°C (mg.l ⁻¹)	La constante d'Henry (KH) (Pa m ³ /mol)	Log K _{ow}	Log K _{oc}
Naphtalène	128	31,7	48,9	3,37	3,15
Acénaphthylène	150	16,1	8,40	4	1,4
Acénaphthène	154	3,8	14, 7	3,92	3,66
Fluorène	166	1,9	9,2	4,18	6,2
Phénanthrène	178	1,1	3,24	4,57	4,15
Anthracène	178	0,05	3,96	4,54	4,15
Fluoranthène	202	0,26	1,037	5,22	4,58
Pyrène	202	0,13	0,92	5,18	4,58
Benzo[a] anthracène	228	0,011	0,581	5,91	5,3
Chrysène	228	0,002	0,065	5,6	5,3
Benzo[b]fluoranthène	252	0,0015	0,05	5,8	5,74
Benzo[k] fluoranthène	252	0,0008	0,016	6	5,74
Benzo(a) pyrène	252	0,0038	0,046	6,06	6,74
Dibenzo[a,h] anthracène	278	0,0006	0,0005	6,75	6,52
Dibenzo[g,h,i] pérylène	268	0,00026	0,002	6,5	6,2
Indéno[1,2,3- c,d]pyrène	276	0,062	0,0008	6,6	6,2

2.3.1. Propriétés physiques

De façon générale, les HAPs sont des composés chimiquement très stables, hydrophobes et ayant une faible volatilité, donc peu solubles dans l'eau. Ces propriétés les rendent relativement résistants à la biodégradation naturelle. Ils ont tendance à s'adsorber sur les matrices solides et notamment les matières organiques (Accardi-Dey and Gschwend, 2002; Zhou *et al.*, 2004). Généralement, ces tendances s'accroissent lorsque la masse molaire augmente (Ferreira, 2001). D'autre part, les HAPs absorbent la lumière dans le spectre du visible (400-700nm) et des ultraviolets (290-400nm) (Huang *et al.*, 1993) .

Ces molécules peuvent induire une photo-toxicité sous lumière UV (El-Alawi *et al.*, 2001; Bleeker *et al.*, 2002).

2.3.2. Propriétés chimiques

Les HAPs sont subdivisés en deux groupes en fonction du nombre de cycles aromatiques qu'ils contiennent et de leurs masses molaires :

Les HAPs légers : dont la masse molaire est comprise entre 150 et 180 g.mol⁻¹ (2 à 3 cycles) ;

Les HAPs lourds dont la masse molaire varie de 200 à 280 g.mol⁻¹ (4 à 6 cycles).

En raison de leurs caractéristiques physico-chimiques et de la multitude de sources, une fois émis dans l'atmosphère, ces composés vont avoir tendance à s'accumuler dans les différents compartiments de l'environnement (eau, sol, sédiment) : dans les poussières atmosphériques (gaz d'échappement et rejets industriels)(Simcik *et al.*, 1999), dans les sols (retombées atmosphériques)(Carrera *et al.*, 2000), les eaux de ruissellement (lessivage par les pluies) et les sédiments (retombées atmosphériques, déversements accidentels, eaux de ruissellement) (Notar *et al.*, 2001). Ils peuvent être facilement transférés dans les différents maillons de la chaîne alimentaire aquatique à cause de leur caractère lipophile (Muller *et al.*, 2001), et peuvent atteindre l'homme suivant des cycles de complexité variable (Smith *et al.*, 2001; Grova *et al.*, 2002).

Le comportement des HAPs dans la chaîne alimentaire joue un rôle majeur dans l'étude de l'exposition de l'homme, de la faune et de la flore à ces contaminants (Grova *et al.*, 2002). Ainsi, de nombreuses études ont montré l'aptitude des HAPs les plus lipophiles à se concentrer au niveau des tissus gras, ce qui favorise leur insertion dans la chaîne trophique avec des phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification (Fent, 2004). Ce dernier phénomène dépend de deux caractéristiques physico-chimiques des HAPs (Fent, 2004) :

- ✓ Leur stabilité chimique et métabolique, qui explique à la fois leur faible dégradation dans le milieu, et leur accumulation dans les organismes vivants ;
- ✓ Leur caractère lipophile qui entraîne leur passage facilité par diffusion passive à travers les membranes biologiques des êtres vivants.

2.4. Impacts des HAPs sur les communautés benthiques

L'Agence Américaine de l'Environnement (US-EPA) a retenu 16 HAPs essentiellement pris en compte dans l'analyse des données toxicologiques et environnementales. Ces

composés ubiquistes sont connus pour être à des degrés divers toxiques, génotoxiques, cancérigènes et facilement bioaccumulables (Samanta *et al.*, 2002). De plus, les polluants hydrophobes comme les HAPs ont le pouvoir de s'accumuler dans les sédiments par adsorption (Hughes *et al.*, 1997; Ke *et al.*, 2002). De ce fait, les organismes benthiques sont directement exposés à ces contaminants, que ces derniers soient adsorbés sur la phase particulaire, dissous à l'interface eau-sédiment ou dans l'eau interstitielle des sédiments meubles. En effet, la toxicité des HAPs varie en fonction de la molécule considérée, du type d'exposition (aigue ou chronique), de l'organisme et des cellules cibles ainsi que des conditions environnementales (Fent, 2003). Leur toxicité est très variable : certains sont faiblement toxiques, alors que d'autres, comme le benzo (a) pyrène, sont cancérigènes (INERIS, 2004).

2.4.1. Toxicité des HAPs sur la structure du benthos

Si la toxicité des HAPs est bien connue pour les diatomées, les gastéropodes, les crustacés et les poissons (Ana *et al.*, 2007), l'impact des HAPs sur le méiobenthos a été relativement peu étudié. En zone intertidale, Giere (1976) a constaté la sensibilité des nématodes aux HAPs se traduisant par une chute de leur abondance après 6 semaines d'exposition artificielle à ces hydrocarbures. Plusieurs études réalisées *in situ* s'accordent à dire que la contamination par les hydrocarbures influence négativement le méiobenthos (Carman *et al.*, 1997; Mahmoudi *et al.*, 2005). De même, Beyrem (1999) a constaté que les nématodes libres répondent à la pollution pétrolière permanente, causée par la raffinerie de Bizerte, par une réduction de leurs effectifs, de leurs biomasses et de leurs indices de diversité spécifique ainsi que par une modification de leur structure trophique et de leur état de maturité. Chez les oligochètes, Weinstein (2003) a constaté la sensibilité de l'oligochète *Monopylephorus rubroniveus* au fluoranthène par rapport à d'autres espèces. Des effets toxiques similaires ont été observés avec le pyrène causant une diminution significative de l'abondance des nématodes, des copépodes, et des juvéniles de polychètes et les oligochètes (Petersen *et al.*, 2009).

D'autres travaux ont montré des changements dans la structure des communautés bactériennes à la réponse à une seule molécule de HAP, par exemple, 200 ppm de phénanthrène (Muckian *et al.*, 2009), 50 ppm de pyrène (Hjorth *et al.*, 2007) ou à un mélange de HAPs (20ppm pour chaque HAP : phénanthrène, pyrène et benzo(a)pyrène) (Zhou *et al.*, 2009). Par contre, Paisse *et al.* (2010) ont montré qu'une forte

concentration de HAP peut provoquer des changements mineurs ou non significatifs sur la structure des bactéries, ce qui suggère la présence de populations bactériennes tolérantes à la pollution pétrolière de l'environnement marin. En effet, la toxicité des hydrocarbures diffère selon leur nature et la dose à laquelle ils sont présents dans le milieu d'étude. La biodisponibilité de ces contaminants hydrophobes est étroitement liée à la nature du sédiment (Ditoro *et al.*, 1991). En outre, les communautés benthiques provenant de zones contaminées par les hydrocarbures sont plus tolérantes à ces contaminants que les associations de sites moins pollués (Carman *et al.*, 2000).

2.4.2. Toxicité des HAPs sur le fonctionnement du benthos

De nombreuses études ont évalué les toxicités aiguë et chronique des HAPs sur différents organismes aquatiques.

✓ Toxicité aiguë

La toxicité aiguë est évaluée par une brève exposition d'un organisme à une substance chimique à forte dose. D'une manière générale, on considère que la toxicité aiguë des HAPs est faible à modérée selon le composé considéré (Pickering *et al.*, 1999). Ces tests permettent d'établir des valeurs de CL50 qui présente la concentration d'une substance déduite statistiquement provoquant au cours d'une exposition ou, après celle-ci, la mort de 50% des animaux exposés pendant une durée déterminée. Concernant l'écotoxicité aiguë des HAPs sur les invertébrés benthiques, il a été rapporté que leurs CL50 varient de 3,7 à 300 mg/kg pour des essais menés sur des sédiments enrichis en phénanthrène. Ainsi, l'amphipode *Rhepoxynius abronius* montre une grande sensibilité vis-à-vis des HAPs, la CL50 (10 j) pour le phénanthrène est de 66,63 mg l⁻¹ (Swartz *et al.*, 1997). Alors que la toxicité aiguë de l'anthracène envers le copépode *Daphnia pulex* est de 750 µg.L⁻¹ (Scannell *et al.*, 2005).

✓ Toxicité chronique

La toxicité chronique est celle obtenue avec une exposition prolongée d'un organisme à une faible dose de substance chimique. Elle augmente avec le nombre de cycles aromatiques du HAP pour une même espèce. Ces tests permettent d'établir des valeurs de NOEC (*No Observed Effect Concentration*) et LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*). La NOEC correspond à la plus forte concentration n'entraînant pas d'effet par rapport au témoin alors que la LOEC correspond à la plus faible concentration entraînant un effet significatif par rapport au témoin. Comme pour la toxicité aiguë, les HAPs de plus haut poids moléculaire présentent une toxicité chronique plus forte : ainsi,

la NOEC est égale à 450 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pour le naphthalène et de 5,4 $\mu\text{g.l}^{-1}$ pour l'anthracène chez l'espèce *Pimephales promelas* (Oris and Giesy, 1987).

De nombreuses études ont montré que des organismes aquatiques marins collectés dans des zones fortement polluées aux HAPs ne présentaient que de faibles teneurs en contaminants (Ruddock *et al.*, 2003). Par contre, une forte corrélation entre le degré de contamination du milieu marin et des effets mutagènes et cancérigènes a été démontrée chez les poissons et d'autres vertébrés (MacRae et Hall, 1998; Monteiro et al., 2000). Ainsi, les effets toxiques de la pollution par les HAPs se traduisent par des altérations biologiques tant aux niveaux moléculaires que populationnels, sur des organismes aussi divers que les bactéries (Sverdrup *et al.*, 2002; Maliszewska-Kordybach *et al.*, 2007), les Fungi (Chiapusio *et al.*, 2007), les protozoaires (Sverdrup *et al.*, 2002), les crustacés d'eau douce (Mekenyan *et al.*, 1994) et les mollusques (Narbonne *et al.*, 1999). Ainsi, la génotoxicité, la cancérogénicité, l'effet sur la reproduction et le développement (Capotorti *et al.*, 2004) et l'immunotoxicité des HAPs (Lyte *et al.*, 1987) ont été mis en évidence à des degrés divers selon les HAPs. Lotufo (1997) a montré des effets sublétaux du fluoranthène et du phénanthrène sur la reproduction et le comportement du copépode estuarien *Schizopera knabensis*.

D'autres travaux ont montré l'effet phototoxique (transformation des composés par photooxydation, donnant des polluants secondaires plus toxiques) de ces polluants organiques chez des organismes exposés à une contamination sédimentaire (Ankley *et al.*, 1994; Verrhiest *et al.*, 2001). En effet, El-Alawi *et al.* (2002) ont rapporté l'effet phototoxique de l'anthracène et secondairement du pyrène pour les bactéries luminescentes. Walker *et al.* (1975) ont également constaté une chute des activités métaboliques des communautés bactériennes avec du pétrole brut. Suite à une étude effectuée en microcosmes pour examiner les effets des HAPs sur l'abondance et la composition du microphytobenthos, Bennett *et al.* (1999) ont pu noter une corrélation négative entre les concentrations sédimentaires en fucoxanthine (biomarqueur de diatomées) et en HAPs.

Les HAPs peuvent être transférés au sein des réserves lipidiques des organismes et dans les membranes cellulaires (essentiellement constituées de phospholipides). La présence de telles molécules entraîne rapidement une réponse des systèmes biochimiques de détoxification qui interviennent notamment dans la solubilisation de ces composés. Au sein des organismes, des composés électrophiles peuvent se former au cours des

mécanismes de détoxification. Ces composés se fixent par la suite sur les acides nucléiques (ADN et ARN) aboutissant à des dysfonctionnements cellulaires. Des études sur la transformation des HAPs par les microorganismes ont montré leur toxicité cellulaire (Sikkema *et al.*, 1995).

2.4.3. Relation microfaune-méiofaune

En contaminant de façon non négligeable les milieux côtiers, réceptacles des effluents domestiques, industriels et portuaires, les HAPs sont donc susceptibles d'exercer une action toxique sur les organismes présents (Schwarzenbach *et al.*, 2003), entre autres sur le benthos qui joue, en retour, un rôle important dans leur devenir. Ces micropolluants peuvent affecter la structure des communautés benthiques. Dans leur étude en microcosmes, Näslund *et al.*, (2010) ont observé que l'abondance élevée de la méiofaune inhibe la dégradation du naphtalène suite à la prédation des bactéries hydrocarbonoclastes. Par contre, d'autres études ont également constaté que la méiofaune participe également à la dégradation de la matière organique par le maintien de la population bactérienne dans une phase de croissance active ce qui permet d'accroître la demande bactérienne en nutriments et d'accélérer probablement la décomposition de la matière organique (Moens *et al.*, 2005 ; Nascimento *et al.*, 2012).

2.5. Devenir et biodégradation des HAPs dans les écosystèmes benthiques

Le devenir et le comportement des HAPs dans les systèmes aquatiques sont déterminés par un certain nombre de processus physiques, chimiques et biologiques.

Selon leurs principales caractéristiques la plupart des HAPs classés prioritaires par l'US-EPA (Fig.2) sont peu volatils, très peu solubles dans l'eau (INERIS, 2005). Etant hydrophobes, liposolubles et généralement peu volatils, les HAPs ont tendance à s'adsorber sur les matrices solides et notamment les matières organiques (Accardi-Dey, 2002 ; Zhou, 2004). Il se déroule ainsi des échanges entre la phase particulaire et la phase dissoute. Ces échanges sont influencés par la teneur en matière organique (Ankley *et al.*, 1994) et la granulométrie du sédiment qui joue également un rôle important dans la distribution des HAPs. La persistance des HAPs augmente avec le nombre de cycles de la molécule. Par exemple, le naphtalène et les composés de faible poids moléculaire, plus solubles sont peu persistants et donc peu bioaccumulables (Kanaly et Harayama, 2000). La persistance des HAPs sera également fonction de leur temps de demi-vie, lequel est plus important pour les HAPs les plus lourds donc les moins solubles.

2.5.1. Processus abiotiques de dégradation

Les HAPs une fois adsorbés au sédiment peuvent subir des dégradations abiotiques (hydrolyse ou réactions photochimiques) et des transformations biotiques liées aux micro-organismes des sédiments (CNRC, 1983). Ces processus sont parmi les premiers mécanismes conduisant à la transformation de ces polluants en produits plus toxiques (Verrhiest *et al.*, 2001). Les HAPs sont plus persistants dans le compartiment sédimentaire et peuvent y être accumulés à de plus fortes concentrations que dans la colonne d'eau (Guzzella and de Paolis, 1994). De par leur aromaticité et leurs liaisons chimiques conjuguées, les HAPs peuvent être sujets à la photodégradation dans l'atmosphère et la zone photique de la colonne d'eau (Abrajano *et al.*, 2003). Ainsi, la lumière peut être considérée comme l'un des paramètres influençant notablement la dégradation des HAPs. En effet, la photo-oxydation des HAPs est une importante voie de transformation de ces composés (Huang *et al.*, 1993), qui forment rapidement, après une exposition à la lumière, des molécules pouvant être plus toxiques, par exemple l'anthracène qui absorbe fortement les rayons ultraviolets (Mallakin *et al.*, 1999). Letho *et al.* (2003) ont observé que les rayons UV peuvent provoquer une augmentation de la biodégradation de l'anthracène, du pyrène et du benzo [a] anthracène préalablement irradiés en présence de *Sphingomonas* sp. et *Sphingomonas yanoikuyae*.

Les transformations chimiques comme l'hydrolyse, les réactions redox et les réactions d'élimination ne sont pas des voies de dégradation dominantes des HAPs dans les systèmes aquatiques peu profonds (Abrajano *et al.*, 2003).

2.5.2. Processus biotiques de dégradation

La dégradation naturelle par les micro-organismes (bactéries, Fungi) a été reconnue comme le mécanisme le plus important permettant d'éliminer les HAPs des environnements contaminés (Yu *et al.*, 2005). Ainsi, la dégradation des HAPs et les processus d'atténuation naturelle dépendent de plusieurs facteurs physico-chimiques tels que la température, l'oxygène disponible, le pH, la salinité et les éléments nutritifs (Leahy and Colwell, 1990). Ces facteurs contrôlent également les besoins énergétiques et nutritionnels des communautés microbiennes et en même temps la disponibilité des polluants aux microorganismes du sédiment.

✓ Température

La température est un paramètre pouvant influencer la biodégradation du pétrole en modifiant son état physique, sa composition chimique, l'activité physiologique des

micro-organismes et par conséquent la vitesse de dégradation des hydrocarbures, ainsi que la nature et la concentration des espèces microbiennes présentes (Leahy et Colwell, 1990). Des températures plus élevées ont pour effet d'augmenter la vitesse de biodégradation (Walworth *et al.*, 2001), sauf pour les bactéries psychrophiles. Des membres du genre *Pseudomonas*, certains *Bacillus*, certains *Clostridium*, des *Psychrobacter*, des *Arthrobacter* sont des exemples de bactéries psychrophiles. Au delà de la température optimale de croissance et de biodégradation on assiste à une augmentation de la toxicité des hydrocarbures et une diminution de l'activité métabolique. Röling *et al.* (2003) mentionnent une inhibition totale de la biodégradation au delà de 80-90°C malgré l'isolement de bactéries thermophiles et d'Archae hyperthermophiles dans des puits de pétrole où la température peut atteindre 100°C.

✓ Oxygène

La concentration en oxygène a été identifiée comme une variable limitant la vitesse de la biodégradation du pétrole dans les eaux souterraines (Boyd *et al.*, 2001). Marin *et al.* (1996) ont constaté une augmentation de la dégradation des hydrocarbures totaux et des *n*-alcanes de 10 % par la bactérie *Acinetobacter calcoaceticus* après un apport supplémentaire d'oxygène par agitation. Les conditions aérobies sont, par suite, nécessaires pour cette voie d'oxydation microbienne des hydrocarbures dans l'environnement.

✓ Salinité et pH

L'effet de la concentration en NaCl sur la biodégradation dépend de la nature du substrat utilisé comme source de carbone (Bertrand *et al.*, 1993). La salinité moyenne des milieux océaniques est de l'ordre de 3,5 % et l'intervalle de variation se situe en général entre les limites de 3,3% et 3,7% (Soltani, 2004). Ces concentrations en sels sont compatibles avec la croissance des microorganismes hydrocarbonoclastes (Bertrand et Mille, 1989). Ward et Brock (1978) ont montré que la vitesse de la biodégradation des hydrocarbures décroît lorsque la salinité passe de 3,3 à 28,4%, et ils ont attribué ces résultats à une réduction générale des vitesses métaboliques des microorganismes.

L'influence du pH a été très peu étudiée, mais il joue un rôle relativement mineur en milieu marin. Contrairement à la plupart des écosystèmes aquatiques, les sols peuvent avoir des valeurs de pH très variables, allant de 2,5 à 11,0. Des valeurs extrêmes de pH, ce qui est le cas pour quelques types de sols, pourraient avoir une influence négative sur la capacité des microorganismes à dégrader les hydrocarbures. Ainsi, la croissance des

bactéries hétérotrophes et des champignons a été favorisée par un pH proche de la neutralité (Leahy et Colwell, 1990).

✓ Eléments nutritifs

Les nutriments, nécessaires à la croissance des bactéries indigènes, sont aussi des facteurs limitant la biodégradation des hydrocarbures dans les sédiments (Smith *et al.*, 1998) surtout lorsqu'on veut accélérer la dégradation des contaminants (Miyasaka *et al.*, 2006). La technique de biostimulation consiste à augmenter la biodégradation des polluants par apport de nutriments pouvant être incorporés au sein du compartiment contaminé, ou alors injectés sous forme dissoute (ex. : engrais soluble commercial) ou gazeuse.

On appelle biodégradation des hydrocarbures, l'ensemble des transformations des chaînes carbonées par l'action des micro-organismes appelés hydrocarbonoclastes. Ce processus de biodégradation est un phénomène complexe et largement dépendant des conditions influant sur l'activité bactérienne (Eckford *et al.*, 2002), à savoir les conditions environnementales et la biodisponibilité des éléments nutritifs. D'autre part, la biodégradation dépend notamment de la présence de micro-organismes indigènes susceptibles de métaboliser les HAPs. Ainsi, certaines bactéries sont capables d'utiliser les HAPs comme unique source de carbone et d'énergie (Churchill *et al.*, 1995; Demanèche *et al.*, 2004). Les HAPs sont des composés relativement réfractaires à la dégradation biologique et plus le nombre de cycles benzéniques est élevé, plus leur biodégradabilité diminue (Kanaly, 2000).

✓ Biodégradation aérobie

La biodégradation par voie aérobie est la plus efficace pour « casser » les liaisons des composés aromatiques (Tiehm et Schulze, 2003). Les bactéries oxydent initialement les hydrocarbures aromatiques polycycliques par l'incorporation de deux atomes d'oxygènes moléculaires dans le substrat pour former de *cis*-dihydrodiol-HAPs. Cette réaction est catalysée par une enzyme, la dioxygénase. Le cycle aromatique est ensuite ouvert par incorporation d'une autre molécule d'oxygène et peut alors être entièrement dégradé. Les voies de dégradation périphériques convertissent les polluants organiques étape par étape en produits du métabolisme intermédiaire à simple cycle central, par exemple l'acide salicylique ou le catéchol (Sutherland *et al.*, 1995 ; Kanaly et Harayama, 2000). Le naphthalène est l'un des HAPs les plus simples et les plus facilement biodégradables. Ainsi, les voies métaboliques de dégradation par des souches de

Pseudomonas sp. ont été les premières voies étudiées et sont bien connues (Sutherland *et al.*, 1995). Il est à souligner que les voies de dégradation des HAPs à trois cycles, comme l'acénaphthylène, le fluorène, l'anthracène et le phénanthrène suivent le même modèle. L'anthracène est ainsi métabolisé par la souche bactérienne *Pseudomonas aeruginosa* PaK1 (D84146) en acide salicylique (Fig.3). En présence d'oxygène, la biodégradation diminue avec l'augmentation du poids moléculaire des HAPs (Cerniglia, 1992). Toutefois, l'apport de substances nutritives semble permettre une dégradation cométabolique du benzo(a)pyrène (Juhasz et Naidu, 2000).

✓ Biodégradation anaérobie

La biodégradation des HAPs se fait aussi bien en condition aérobie qu'en condition anaérobie en présence de nitrates et de sulfates comme accepteurs terminaux d'électrons (Coates *et al.*, 1997). L'oxydation de différents HAPs dans des sédiments en conditions anaérobies sulfato-réductrices (Meckenstock *et al.*, 2000 ; Chang *et al.*, 2001) et nitrato-réductrices (Rockne *et al.*, 2000) a en effet été mise en évidence. Ainsi, les conditions de réduction des nitrates paraissent assez favorables à la dégradation des HAPs, mais restent moins performantes et moins rapides qu'en conditions d'aérobiose (Wilson and Bouwer, 1997). Différentes souches de bactéries anaérobies capables de dégrader ces contaminants ont été isolées de sites contaminés. En effet, plusieurs auteurs ont montré une biodégradation significative du naphtalène, du phénanthrène et du fluoranthène dans le cas de sédiments marins contaminés (Bedessem *et al.*, 1997 ; Coates *et al.*, 1997). L'étape initiale de dégradation correspondait à l'incorporation d'un groupement chimique réactif par carboxylation (Meckenstock *et al.*, 2000) ou par scission d'une molécule d'eau (hydroxylation) (Bedessem *et al.*, 1997). D'autres voies d'activation existent comme l'addition de Fumarates, par exemple, la première réaction de dégradation anaérobie de toluène implique une activation du groupe de méthyle par addition de Fumarates (Beller et Spormann, 1997).

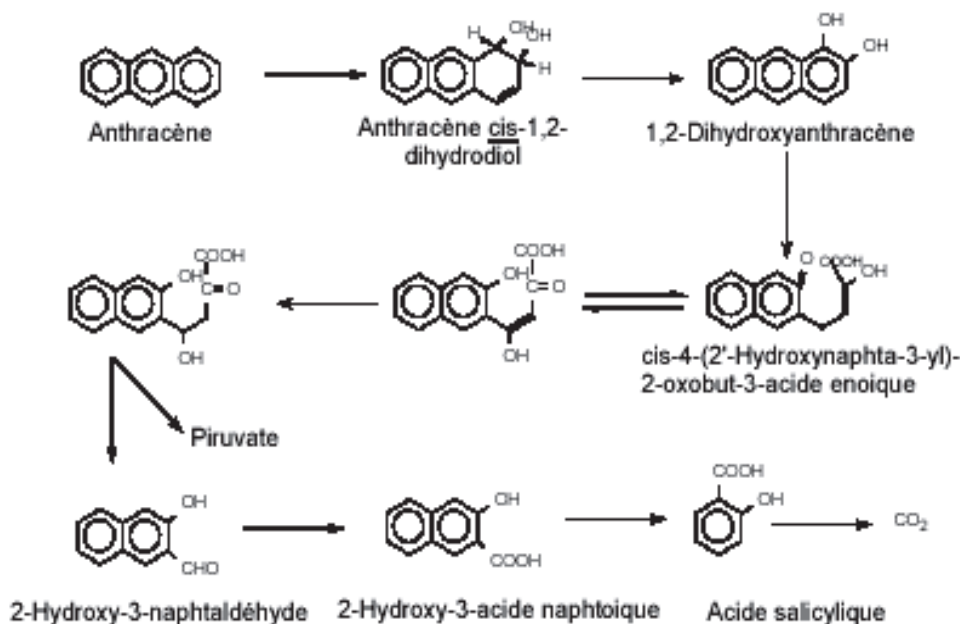


Fig.3. La voie aérobie de dégradation bactérienne de l'anthracène par *Pseudomonas aeruginosa* (Sutherland *et al.*, 1995).

Dans les environnements côtiers, soumis à l'impact des marées noires, les microorganismes jouent un rôle crucial dans le devenir des hydrocarbures pétroliers. Toutefois, de nombreux facteurs influencent les activités microbiennes, notamment les organismes bioturbateurs qui modifient la pénétration de l'oxygène dans les sédiments (Cuny *et al.*, 2011). Des études antérieures ont montré que ces organismes modifient la structure des communautés microbiennes hydrocarbonoclastes ainsi que leur potentiel de dégradation (Näslund *et al.*, 2011). Dans ce cadre, des projets de recherche ont été mis en place pour évaluer la réponse des communautés microbiennes à une contamination pétrolière en présence d'organismes bioturbateurs. On peut citer à titre d'exemple, le projet DHYVA (Dégradation des Hydrocarbures dans les Vasières) et le projet DECAPAGE (Caractérisation des capacités de dégradation de communautés bactériennes de sédiments marins : adaptation, processus métaboliques et influence des régimes d'oxygénation) financé par l'Agence Nationale de Recherche en France.

3. METHODES DE REHABILITATION DES SEDIMENTS POLLUES PAR LES HAPS

3.1. Méthodes physico-chimiques

La dépollution peut être mise en oeuvre à travers plusieurs méthodes, associant éventuellement la combinaison de plusieurs techniques (Flotron *et al.*, 2003 ; Miyasaka *et al.*, 2006). Les techniques physico-chimiques sont employées dans de nombreux procédés de traitement de sols ou de sédiments, à une échelle industrielle. La décontamination par voie biologique a été reconnue comme la méthode la plus employée pour éliminer les HAPs des sédiments.

Les différentes techniques de dépollution peuvent être classées :

- ✓ en fonction de la nature des procédés employés ;
- ✓ en fonction du lieu de traitement ;
- ✓ en fonction du devenir des polluants.

Les principaux traitements "*in situ*" et "*ex situ*" qu'il s'agisse de procédés physico-chimiques, biologiques ou thermiques ont été principalement développés pour les sols et les eaux souterraines :

- ✓ les méthodes physiques consistent à transférer et concentrer les polluants, sans les modifier ou les détruire, en se servant de fluides (eau ou gaz) pour transporter la pollution vers des points d'extraction ou pour l'immobiliser ;
- ✓ les méthodes thermiques consistent à chauffer le matériel contaminé pour en extraire le polluant et le détruire (ex : incinération), l'isoler (ex : désorption thermique, thermolyse, etc.), ou le rendre inerte (ex : vitrification, etc.) ;
- ✓ les méthodes chimiques, font appel à un principe réactionnel (action d'un solvant, oxydation, etc) pour transformer le polluant en un composé moins toxique et inerte vis-à-vis de l'environnement. Parmi ces méthodes chimiques, l'ozone sert à traiter les effluents liquides mais peut aussi être utilisé *in situ*. En effet, Masten et Davies (1997) ont observé une réduction de la concentration de chrysène de 100 à 50 mg kg⁻¹ sur un sol contaminé pour une durée d'ozonation de 4 heures et un flux d'ozone de 250 mg.h⁻¹. Toutefois, très peu de travaux ont étudié l'ozonation des HAPs adsorbés sur des sédiments. L'efficacité du couplage ozonation/procédé biologique a également été démontrée pour éliminer les HAPs en solution (Zeng *et al.*, 2000) ou dans les sédiments (Zeng et Hong, 2002). La biodégradabilité des échantillons est alors estimée par les mesures des demandes biologiques et chimiques en oxygène.

3.2. Méthodes biologiques

Les méthodes biologiques s'appuient sur le métabolisme et l'activité des communautés de bactéries, Fungi, Viridiplantae, pour évacuer, dégrader ou stabiliser les polluants. La décontamination par voie biologique consiste donc à stimuler un phénomène naturel pour en augmenter le rendement afin de détruire le polluant organique qui sera utilisé comme source de carbone. Ainsi, de nombreux micro-organismes ont été isolés à partir de milieux fortement contaminés pour leurs propriétés de dégradation et de minéralisation des HAPs (Sutherland *et al.*, 1995). De plus, l'efficacité des stratégies de biorestauration varie selon la nature du sédiment et le type de contaminant (Balba *et al.*, 1998).

3.2.1. Phytoremédiation

Certaines plantes permettent de transformer (phytoremédiation) ou stabiliser (phytostabilisation) les polluants dans les sols. La bioremédiation assistée par les plantes implique l'interaction des racines et des microorganismes associés aux systèmes racinaires. Les plantes adsorbent, accumulent ou volatilisent ces composés, elles augmentent également l'activité microbiologique au sein de la rhizosphère dans le sol. La rhizosphère est particulièrement impliquée dans la dégradation des HAPs (Newman et Reynolds, 2004). Les principaux mécanismes de phytodépollution sont la phyto-extraction, la phyto-dégradation, la rhyzo-dégradation et la phyto-stabilisation (Vila, 2006). Elle peut être utilisée sur des substrats solides (sols pollués), liquides (eaux contaminées) ou gazeux (filtration d'air chargé en composés nocifs volatils) (Pilon-Smits, 2005).

La phytoremédiation peut se faire à l'aide de diverses espèces végétales : *Avena fatua*, *Avena sterilis subsp.ludoviciana*, *Brassica naspus* (Liste et Alexander, 2000). Dans la plupart des cas, la phytoremédiation a été étudiée sur des sols riches en argile. Ballerini *et al.* (1998) indique que le système fibreux racinaire des plantes facilite à la fois l'accessibilité des contaminants et le métabolisme microbien. En terme de biodégradation, les plantes possèdent également des enzymes capables de métaboliser certains HAPs (déhalogénases, nitroréductases et nitrilases) (Chroma *et al.*, 2002). Liste et Alexander (2000) ont obtenu en 8 semaines 74% d'élimination du pyrène (concentration initiale du pyrène égale à 100 ppm) sur un sol avec des plantes. Les rendements chutent à moins de 40 % pour un sol sans plantes. Des études récentes,

menées au laboratoire, ont montré que les plantes distribuent de l'oxygène au niveau de la rhizosphère, augmentant ainsi l'activité bactérienne de dégradation du pyrène (Jouanneau *et al.*, 2005). Cette technique n'a pas été étudiée en milieu marin.

3.2.2. Biostimulation

La biostimulation consiste à stimuler l'activité des populations microbiennes indigènes par apport de nutriments et par ajustement des conditions de milieu (potentiel d'oxydoréduction, humidité...). La forme la plus courante de biostimulation est l'addition d'éléments nutritifs, principalement l'azote, le phosphore et le potassium nécessaires aux bactéries indigènes du sédiment, du sol ou de l'eau souterraine afin d'accélérer la dégradation des contaminants (Miyasaka *et al.*, 2006). On peut aussi ajouter des sources de carbone comme le glucose, des oligo-éléments, des protéines, des enzymes et des hormones. En effet, les microorganismes ont besoin de nutriments et d'une source carbonée pour fournir l'énergie nécessaire à leur croissance et leur survie. La biostimulation des microorganismes dépollueurs peut donc être aussi obtenue par l'apport de divers donneurs d'électrons comme le NO_3^- , SO_4^{2-} , ou bien l'oxygène (North *et al.*, 2004; Riser-Roberts, 1998). L'oxygène peut être fourni par un système d'aération forcée, par l'injection d'oxydants chimiques à faible concentration (ex. : peroxyde d'hydrogène) ou par l'utilisation de composés à relâchement progressif d'oxygène.

L'impact de l'ajout d'éléments nutritifs dans la biorestauration des HAPs a été étudié en grande partie dans le cadre de déversements de pétroles. Ainsi, l'addition d'éléments nutritifs augmente généralement la biodégradation du pétrole que ce soit au laboratoire (Churchill *et al.*, 1995) ou *in situ* (Venosa *et al.*, 1996). Cauchi (1986) a montré un accroissement significatif de la croissance des bactéries hétérotrophes totales dans un bassin de béton soumis aux conditions climatiques extérieures sur l'île des Embiez (Var) et pollué par le pétrole brut après son enrichissement azoté et phosphaté après seulement 48 h de traitement par rapport au bassin non traité. Par contre, Yu *et al.* (2005) ont rapporté des effets négatifs de la biostimulation pour la biodégradation du phénanthrène et du fluoranthène bien que ce traitement ait augmenté significativement la minéralisation du pyrène dans des sédiments de Mangrove. En fait, le taux de dégradation des HAPs dans les sédiments varie largement en fonction de la quantité de nutriments ajoutés (Smith *et al.*, 1998). Ces derniers ont suggéré que les taux de biodégradation des HAPs doivent être optimisés par des concentrations et des rapports appropriés en nutriments qui peuvent varier en fonction des différents micro-

organismes hydrocarbonoclastes. Straube *et al.* (2003) ont constaté, quant à eux, une réelle amélioration des taux de dégradation des HAPs après avoir ajouté de l'azote (augmentation de 10 % du taux de biodégradation). De même, Kuzyakov *et al.* (2000) ont montré que le concept "Priming effect" défini par l'ajout de composés limitants (engrais organiques ou minéraux) pour la biomasse microbienne permet d'accélérer la minéralisation de la matière organique dans les sols.

3.2.3. Bioaugmentation

La bioaugmentation consiste à augmenter la biodégradation ou la biotransformation des HAPs, en inoculant des microorganismes spécifiques isolés à partir des milieux contaminés. Les micro-organismes peuvent être naturels ou génétiquement modifiés (Odokuma et Dickson, 2003). Ainsi, les recherches sur la dégradation des HAPs ont permis l'isolement de nombreuses espèces de bactéries, de Fungi et d'organismes photo-autotrophes multicellulaires capables de dégrader les HAPs (Sutherland *et al.*, 1995). Les microorganismes sélectionnés doivent cibler les contaminants et ils ne doivent pas entrer en compétition avec les populations *in situ*. Miyasaka *et al.* (2006) en comparant trois méthodes de bioremédiation [bioaugmentation ; biostimulation et la combinaison de deux techniques] à la contamination de sédiments marins par du naphtalène, ont montré que la bioaugmentation était la méthode de décontamination la plus performante. De même, Prasanna *et al.* (2008) ont constaté que la bioaugmentation des sols contaminés par l'antracène renforçait le taux de dégradation de ce HAP. Par contre, d'autres travaux ont montré que la bioaugmentation n'était pas toujours efficace dans la biodégradation des HAPs qui peut s'expliquer par la compétition entre les espèces pour l'accès aux ressources (Yu *et al.* 2005 ; Perelo, 2010). En effet, L'efficacité des stratégies de biorestauration varie cependant selon la nature du sédiment et le type de contaminant (Balba *et al.*, 1998b). Yu *et al.* (2005) ont montré que les pourcentages de dégradation des HAPs après bioaugmentation étaient après une semaine similaires à celles de l'atténuation naturelle des sédiments de la Mangrove avec un pourcentage de dégradation de 50% de fluorène et de 70% de phénanthrène.

3.2.4. Combinaison Biostimulation et Bioaugmentation

Il est possible de combiner des actions de bioaugmentation avec des actions de biostimulation (ex : ensemencement et ajout de fertilisants). Ces deux techniques de bioremédiation ont été appliquées sur le terrain (Schratzberger *et al.*, 2003 ; Winchell

et Novak, 2008) ou en microcosmes (Miyasaka *et al.*, 2006 ; Hamdi *et al.*, 2007) pour dépolluer les sédiments ou les sols contaminés par certains produits tels que les pesticides, les hydrocarbures et les métaux lourds.

Dans leur étude en microcosmes, Miyasaka *et al.* (2006) ont montré que la dégradation du naphtalène était similaire et efficace dans les trois tests de bioremédiation [bioaugmentation ; biostimulation et la combinaison de deux techniques]. Plusieurs études ont montré que la biostimulation par ajout de nutriments et la bioaugmentation par inoculation de bactéries renforcent le taux de dégradation du pétrole brut et des HAPs dans les sites contaminés (Venosa *et al.*, 1996). Quoi qu'il en soit, le rôle des bactéries dans les réseaux trophiques benthiques est influencé par la disponibilité des nutriments, les conditions environnementales, la biodisponibilité des HAPs et la nature du sédiment (Smith *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2005).

La combinaison de deux procédés de dépollution, la phytoremédiation et la bioaugmentation, a donné naissance à une technologie nouvelle : la rizhoremédiation (Kuiper *et al.*, 2004). Cette technique a été largement développée pour la remédiation de sols contaminés par les polluants organiques (Barac *et al.*, 2004).

Références bibliographiques

- Accardi-Dey, A. & Gschwend, P. M. (2002). Assessing the combined roles of natural organic matter and black carbon as sorbents in sediments. *Environmental Science & Technology*, **36**(1), 21-29.
- Abrajano, J., T.A., Y., B., S., J., Bopp, R., O'Malley, V., Heinrich, D.H., Karl, K.T., (2003). High Molecular Weight Petrogenic and Pyrogenic Hydrocarbons in Aquatic Environments. In *Treatise on Geochemistry*, Oxford: Pergamon.
- Aïssa, P. (1991). Ecologie des nématodes libres de la lagune de Bizerte : dynamique et biocénotique. Thèse de doctorat d'état, Faculté des Sciences de Tunis, pp. 370.
- Aïssa, P. (1992). Importance des nématodes libres dans le milieu aquatique. *Rev. Fac. Sci Tunis*, **5 (D)**, 115-128
- Ana, D. C., Renata, G., Martin, S., Marta, F. & Maria, A. R. H. (2007). Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **347**, 109-122.
- Ankley, G.T., Collyard, S.A., Monson, P.D., Kosian, P.A., (1994). Influence of ultraviolet light on the toxicity of sediments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**, 1791-1796. doi:1710.1002/etc.5620131110.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyerreil, L. A. & Thingstad, F. (1983). The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Marine Ecology Progress Series*, **10**(3), 257-263.
- Balba, M. T., Al-Awadhi, N. & Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, **32**(2), 155-164. doi:10.1016/S0167-7012(98)00020-7.
- Ballerini, D., Gatellier, C., Vogel, T., (1998). Techniques de traitement par voie biologique des sols pollués In: Editions, A. (Ed.), p. 198.
- Bedessem, M.E., Swoboda-Colberg, N.G., Colberg, P.J.S., (1997). Naphthalene mineralization coupled to sulfate reduction in aquifer-derived enrichments. *FEMS Microbiol Lett*, **152**, 213-218
- Bell, S.S., Coull, B.C., (1978). Field evidence that shrimp predation regulates meiofauna. *Oecologia*, **35**, 141-148.
- Beller, H.R., Spormann, A.M. (1997). Anaerobic activation of toluene and o-xylene by addition to fumarate in denitrifying strain T. *J. Bacteriol.*, **179** (3), 670-676.
- Bennett, P., Calman, K., (1999). Pulling the threads together. In *Risk Communication and Public Health* In: an), e.P.B.a.K.C. (Ed.), Oxford University, Press, Oxford, pp. 205-206.
- Bertrand, J.C. et Mille, G., 1989. Devenir de la matière organique exogène. Un modèle: les hydrocarbures. In: Bianchi, M., Marty, D., Bertrand, J.C., Caumette, P. et Gauthier, M.J. (Eds.), *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Masson (Paris), Chapitre **13**, pp. 343-385.

- Bertrand, R., Bassirou, K., Kabirou, N.M., (1993). La dégradation des sols des périmètres irrigués des grandes vallées subsahariennes (cas de l'Office du Niger au Mali). *Cahiers Agriculture*, **3**, 313-329.
- Beyrem, H. (1999). Ecologie des nématodes libres de deux milieux anthropiquement perturbés: la baie de Bizerte et le lac Ichkeul, Vol. Thèse doct. , Fac. Sci. Bizerte, pp. 297
- Beyrem, H. & Aissa, P. (2000). Free-living nematodes, bio-indicators of the evolution of hydrocarbon concentrations in the bay of Bizerta (Tunisia). *Cahiers de Biologie Marine*, **41**(3), 329-342.
- Beyrem, H., Louati, H., Essid, N., Aissa, P. & Mahmoudi, E. (2010). Effects of two lubricant oils on marine nematode assemblages in a laboratory microcosm experiment. *Marine Environmental Research*, **69**(4), 248-253.
- Bleeker, E. A. J., Wiegman, S., de Voogt, P., Kraak, M., Leslie, H. A., de Haas, E. & Admiraal, W. (2002). Toxicity of azaarenes. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol 173*, Vol. 173, Springer. New York, pp. 39-83.
- Blackburn, T., (1988). Benthic mineralization and bacterial production. In: Blackburn TH, Sørensen J (eds) Nitrogen cycling in Coastal Marine Environment. John Wiley & Sons, pp. 175-190.
- Bloem, L.J., Foroud, T.M., Ambrosius, W.T., Hanna, M.P., , Tewksbury, D.A., Pratt, J.H., , (1997). Association of the angiotensinogen gene to serum angiotensinogen in blacks and whites. *Hypertension*, **29**, 1078-1082.
- Boyd, C.E., Hargreaves, J.A., Clay, J.W. (2001). The New Wave, Proceedings of the Special Session on Sustainable Shrimp Culture, Aquaculture Codes of conduct for marine shrimp aquaculture. C.L Browdy, D.E Jory (Eds.). The World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 303-321.
- Burgess, R. M., Ahrens, M. J. & Hickey, C. W. (2003). Geochemistry of PAHs in Aquatic Environments: Source, Persistence and Distribution. John Wiley & Sons, Ltd.
- Cabioch, (1968). Contribution à la connaissance des peuplements benthiques de la Manche occidentale. *Cah. Biol. Mar.*, **9**, 493-720.
- Cauchi, B.P., (1986). Variations métaboliques des communautés bactériennes lors d'une pollution par pétrole brut, avec ou sans traitement. In: Colloques., A.d. (Ed.), GERBAM . Deuxième Colloque International de Bactériologie marine — CNRS, Brest, IFREMER, pp. 663-671.
- Carman, K. R. (1990). Mechanisms of Uptake of Radioactive Labels by Meiobenthic Copepods During Grazing Experiments. *Marine Ecology Progress Series*, **68**(1-2), 71-83.
- Carman, K. R., Fleeger, J. W. & Pomarico, S. M. (2000). Does historical exposure to hydrocarbon contamination alter the response of benthic communities to diesel contamination? *Marine Environmental Research*, **49**(3), 255-278.
- Carman, K. R., Fleeger, J. W. & Pomarico, S. M. (1997). Response of a benthic food web to hydrocarbon contamination. *Limnology and Oceanography*, **42**(), 561-571.
- Carrera, G., Fernández P., Vilanova R.M. & J.O., G. (2000). Persistent organic pollutants in snow from European high mountain areas. *Atmos Environ*, **35**, 245-254.

- Capotorti, G., Digianvincenzo, P., Cesti, P., Bernardi, A., Guglielmetti, G., (2004). Pyrene and benzo(a)pyrene metabolism by an *Aspergillus terreus* strain isolated from a polycyclic aromatic hydrocarbons polluted soil. *Biodegradation*, **15**, 79-85.
- CDB. (1994). Convention sur la Diversité Biologique France.
- Cerniglia, C.E., (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, **3**, 351-368.
- Chang, B.V; Chang, J.S. and Yuan, S.Y., (2001). Anaerobic degradation of phenanthrene in river sediment under nitrate-reducing conditions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **67**, 898-905.
- Chroma, L., M. Mackova, P. Kucerova, C. in der Wiesche, J. Burkhard, Macek, T., (2002). Enzymes in plant metabolism of PCBs and PAHs. *Acta Biotechnologica*, **22**, 34-41.
- Churchill, S. A., Griffin, R. A., Jones, L. P. & Churchill, P. F. (1995). Biodegradation and bioremediation: biodegradation rate enhancement of hydrocarbons by an oleophilic fertilizer and a rhamnolipid biosurfactant. *Journal of Environmental Quality*, **24**(1), 19-28. doi:10.2134/jeq1995.00472425002400010003x.
- CNRC (Centre national des Recherches Canada), (1983). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans un milieu aquatique: Formation, sources, devenir et effets sur le biote aquatique. Publication no.18981. CNRC, Groupe d'experts sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques, Sous-comité de l'eau. Ottawa.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol*, **63**, 3589-3593.
- Coull, B. C. (1990). Are Members of the Meiofauna Food for Higher Trophic Levels. *Transactions of the American Microscopical Society*, **109**(3), 233-246.
- Cuny, P., Cravo-Laureau C., Grossi, V., Gilbert, F., Milton, C. (2011). Biodegradation of hydrocarbons in bioturbated marine sediments. *Microbial Bioremediation of Non-metals: Current Research*. Edited by Anna-Irini Koukkou, 55-84.
- Danovaro, R., Gambi, C., Manini, E., Fabiano, M., (2000). Meiofauna response to a dynamic river plume front. *Mar. Biol*, **137**, 359-370.
- DCE/60/2000. Directive 2000/60/CE du Parlement européen. *Journal officiel de l'Union européenne* 327p. 1-73.
- De Mesel, I., Derycke, S., Moens, T., Van der Gucht, K., Vincx, M. & Swings, J. (2004). Top-down impact of bacterivorous nematodes on the bacterial community structure: a microcosm study. *Environmental Microbiology*, **6**(7), 733-744.
- Demanèche, S., Meyer, C., Micoud, J., Louwagie, M., Willison, J. C., Jouanneau, Y. (2004). Identification and functional analysis of two aromatic-ring-hydroxylating dioxygenases from a *Sphingomonas* strain that degrades various polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(11), 6714-6725. doi:10.1128/AEM.70.11.6714-6725.2004. PMID:15528538.
- Ditoro, D. M., Zarba, C. S., Hansen, D. J., Berry, W. J., Swartz, R. C., Cowan, C. E., Pavlou, S. P., Allen, H. E., Thomas, N. A. & Paquin, P. R. (1991). Technical Basis for Establishing Sediment Quality Criteria for Nonionic Organic-Chemicals Using

- Equilibrium Partitioning. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **10**(12), 1541-1583.
- Eckford, R., Cook, F.D., Saul, D., Aislabie, J., Foght, J., (2002). Freelifving heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuelcontaminated antarctic soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 5181-5185.
- El-Alawi, Y. S., Dixon, D. G. & Greenberg, B. M. (2001). Effects of a pre-incubation period on the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Environmental Toxicology*, **16**(3), 277-286.
- El-Alawi, Y. S., McConkey, B. J., Dixon, D. G. & Greenberg, B. M. (2002). Measurement of short- and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **51**(1), 12-21.
- Epstein, S. S. & Shiaris, M. P. (1992). Rates of Microbenthic and Meiobenthic Bacterivory in a Temperate Muddy Tidal Flat Community. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(8), 2426-2431.
- Fent, K. (2004). Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, **205**(3), 223-240.
- Fent, K. (2003). Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*, **140**, 353-365.
- Ferreira, M. M. C. (2001). Polycyclic aromatic hydrocarbons: a QSPR study. *Chemosphere*, **44**, 125-146.
- Flotron, V., Delteil, C., Bermond, A., Camel, V., (2003). Remediation of matrices contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons: Use of Fenton's reagent. *Polycyclic Aromatic Compounds*, **23**, 353-376.
- Froelich, P.N. et al., (1979). Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the equatorial Atlantic, suboxic diagenesis. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **43**, 1075-1090.
- Frontier, S., Pichod-Viale, D., 1993. Ecosystèmes : structure, fonctionnement, évolution. Coll. écologie, Masson, Paris, p. 448.
- Frontier, S. & Pichod-Viale, D. (1993). Ecosystèmes : structure, fonctionnement, évolution. Coll. écologie, Masson, Paris, p. 448.
- Giere, O. (1976). The impact of oil pollution on intertidal meiofauna. Field studies after the La Coruna spill. *Cahiers de Biologie Marine*, **20**, 231-251.
- Giere, O. (1993). The microscopic fauna in aquatic sediments. In: Springer-Verlag, B. (Ed.), *Meiobenthology*, 328 pp.
- Grall, J., Chauvaud, L., (2002). Marine eutrophication and benthos: the need for new approaches and concepts. *Global Change Biology*, **8**, 813-830.
- Gray, J.S., 1981. Detecting pollution induced changes in communities using the log-normal distribution of individuals among species. *Mar. Pollut. Bull.*, **12**, 173-176.
- Grova, N., Feidt, C., Crepineau, C., Laurent, C., Lafargue, P. E., Hachimi, A. & Rychen, G. (2002). Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in milk collected near potential contamination sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**(16), 4640-4642.

- Grova, N., Feidt C., Crepineau C., Laurent C., Lafargue P.E., Hachimi A. & Rychen, G. (2002). Detection of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Levels in Milk Collected Near Potential Contamination Sources. *J.Agric.Food Chem*, **50**, 4640-4642.
- Guo, C. L., Zhou, H. W., Wong, Y. S. & Tam, N. F. Y. (2005). Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. *Marine Pollution Bulletin*, **51**(8-12), 1054-1061.
- Guzzella, L., de Paolis, A., (1994). Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Adriatic Sea. *Mar. Pollut. Bull*, **28** 159-165.
- Gyedu-Ababio, T. K. & Baird, D. (2006). Response of meiofauna and nematode communities to increased levels of contaminants in a laboratory microcosm experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **63**(3), 443-450.
- Habe, H. & Omori, T. (2003). Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **67**(2), 225-243.
- Hagerthey, S.E., Defew, E.C., Paterson, D.M., (2002). Influence of *Corophium volutator* and *Hydrobia ulvae* on intertidal benthic diatom assemblages under different nutrient and temperature regimes. *Marine Ecology Progress Series*, **245**, 47-59.
- Hall, S.J., (1999). The Effects of Fishing on Marine Ecosystems and Communities. Blackwell Science, Oxford.
- Heitkamp, Cerniglia, e., 1989. Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a *Mycobacterium* sp. in microcosms containing sediment and water from a pristine ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1968-1973.
- Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadžianas, L., Aoyama, I., Medici, N., (2007). Solid-phase bioassays and soil microbial activities to evaluate PAH-spiked soil ecotoxicity after a long-term bioremediation process simulating landfarming. *Chemosphere*, **70**, 135-143.
- Hughes, J. B., Beckles, D. M., Chandra, S. D., Ward, C. H. (1997). Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH contaminated sediments. . *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **18** (2-3), 152-160. doi:10.1038/sj.jim.2900308. PMID:9134762.
- Huston, M., (1979). A general hypothesis of species diversity. *Am. Nat*, **113**, 81-101.
- INERIS, (2000). Évaluation des risques sanitaires liés aux substances chimiques dans l'étude d'impact des installations classées pour la protection de l'environnement. In: 2.4., V.P. (Ed.), Direction des risques chroniques.
- INERIS. (2004). Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - benzène. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques. <http://www.ineris.fr>.
- INERIS (2005). "Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques". <http://www.ineris.fr>.
- Jacques, R.J.S., Okeke, B.C., Bento, F.M., Peralba, M.C.R., Camargo, F.A.O., (2007). Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming. *Biorem. J.*, **11** 1-11.

- Jouanneau, Y., J.C. Willison, C. Meyer, S. Krivobok, N. Chevron, J.L. Besombes, Blake, G., (2005). Stimulation of pyrene mineralization in freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation. *Environmental Science & Technology*, **39**, 5729-5735.
- Juhasz, A. L. & Naidu, R. (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **45**(1-2), 57-88.
- Kaiser, M. J., Attrill, M. J., Jennings, S., Thomas, D. N., Barnes, D. K. A., Brierley, A. S. & al, e. (2005). Marine ecology, processes, systems and impacts. Oxford University Press.
- Kanally, R. A., and Harayama, S. (2000). Biodegradation of highmolecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, **182** : (8), 2059-2067. doi:10.1128/JB.182. 8.2059-2067.2000. PMID:10735846.
- Ke, L., Wong, T. W. Y., Wong, Y. S. & Tam, N. F. Y. (2002). Fate of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination in a mangrove swamp in Hong Kong following an oil spill. . *Marine Pollution Bulletin*, **45**(1-12), 339-347. doi:10.1016/S0025-326X(02)00117-0. PMID:12398405.
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J., (2004). Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction. *MPMI*, **17**, 6-15.
- Kuzyakov, Y., Friedel, J.K., Stahr, K., (2000). Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biology and Biochemistry*, **32**, 1485-1498.
- LCPE (1994). Loi Canadienne sur la Protection de l'Environnement : Liste des substances d'intérêt prioritaire-Rapport d'évaluation-Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques 69.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R., (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*, **54**, 305-315.
- Letho, M.K., Puhakka, A.J., Lemmetyinen, H., (2003). Biodegradation of selected UV irradiated and non-irradiated PAHs Biodegradation, **14**, 249-263.
- Lévêque, C. & Mounolou, J. (2001). Biodiversité : Dynamique biologique et conservation.
- Li, J. L. & Chen, B. H. (2002). Cloud-point extraction of phenanthrene by nonionic surfactants. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, **33**(6), 581-589.
- Lim, L. H., Harrison, R. M. & Harrad, S. (1999). The contribution of traffic to atmospheric concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science & Technology*, **33**(20), 3538-3542.
- Lindgren, J. F., Hasselov, I. M. & Dahllof, I. (2012). Meiofaunal and bacterial community response to diesel additions in a microcosm study. *Marine Pollution Bulletin*, **64**(3), 595-601.
- Liste, H., Alexander, M., (2000). Plant promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere*, **40**, 7-10.
- Lotufo, G. R. (1997). Toxicity of sediment-associated PAHs to an estuarine copepod: Effects on survival, feeding, reproduction and behavior. *Marine Environmental Research*, **44**(2), 149-166.

- Louati, A., Elleuch, B., Kallel, M., Saliot, A., Dagaut, J. & Oudot, J. (2001). Hydrocarbon contamination of coastal sediments from the Sfax area (Tunisia), Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, **42**(6), 445-452.
- Lundstedt, S. (2003). Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes, www.google.com. University of Amsterdam, the Netherlands.
- Lyte, M.L., R. H. Blanton, Myers, M.J., Bick, P.H., (1987). *Int. J. Immunopharmacology*, **9**, 307.
- Mackay, D., W.y., S. & C., M. K. (1991). *Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals. Volume II. Polynuclear aromatic hydrocarbons, polychlorinated dioxins, and dibenzofurans*. Lewis Publishers. Boca Raton.
- MacRae, J., Hall K., (1998). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in marine sediment under denitrifying conditions. *Water Sci Technol*, **38**, 177-185.
- Mahmoudi, E., Baccar, L., Beyrem, H. & Aïssa, P. (2002). Response of free-living nematodes to the quality of waters and sediments at Bou Ghrara lagoon (Tunisia) during winter 2000. *Medit. Mar. Sci*, **2**, 133-146.
- Mahmoudi, E., Essid, N., Beyrem, H., Hedfi, A., Boufahja, F., Vitiello, P. & Aïssa, P. (2005). Effects of hydrocarbon contamination on a free living marine nematode community: Results from microcosm experiments. *Marine Pollution Bulletin*, **50**(11), 1197-1204.
- Mallakin A., Mcconkey B.J., Miao G., Mckibben B., Snieckus V., Dixon D.G., B.M., G., (1999). Impacts of structural photomodification on the toxicity of environmental contaminants: Anthracene photooxidation products. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, **43**, 204-212.
- Maliszewska-Kordybach, B., Klimkowicz-Pawlas, A., Smreczak, B., Janusauskaite, D., (2007). Ecotoxicological effect of phenanthrene on nitrifying bacteria in soils of different properties. *J. Environ. Qual*, **36** 1635-1645.
- Mare, MF., (1942). A study of a marine benthic community with special reference to the micro-organisms. *J Mar Biol Ass UK*, **25** 517-554.
- Marin, M., Pedregosa, A., F, L., (1996). Emulsifier production and microscopial study of emulsions and biofilms formed by the hydrocarbon-utilizing bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* MM5. *Applied Microbial Biotechnology*, **44**, 660-667.
- Marr, L. C., Kirchstetter, T. W., Harley, R. A., Miguel, A. H., Hering, S. V. & Hammond, S. K. (1999). Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in motor vehicle fuels and exhaust emissions. *Environmental Science & Technology*, **33**(18), 3091-3099.
- Masten, S.J., Davies, S.H.R., (1997). Efficacy of in-situ ozonation for the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soils. *J. Contam. Hydrol*, **28**, 327-335.
- Meckenstock, R.U., Annweiler, E., Michaelis, W., Richnow, H.H., Schink, B., (2000). Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl Environ Microbiol*, **66** 2743-2747.

- Mekenyan, O.G., Ankley, G.T., Veith, G., Call, D., (1994). QSARs for photoinduced toxicity: acute lethality of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna*. *Chemosphere*, **28**, 567–582. doi:510.1016/0045-6535(1094)90299-90292.
- McIntyre, S., Barrett, G.W., Ford, H.A. (1996). Communities and ecosystems. In: in I. F.Spellerberg, e.C.b. (Ed.), Longman, Harlow, United Kingdom. pp.154 170.
- Miyasaka, T., Asami, H. & Watanabe, K. (2006). Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene-contaminated marine sediments. *Biodegradation*, **17**(3), 227-235.
- Moens, T., dos Santos, G. A. P., Thompson, F., Swings, J., Fonseca-Genevois, V., Vincx, M. & De Mesel, I. (2005). Do nematode mucus secretions affect bacterial growth? *Aquatic Microbial Ecology*, **40**(1), 77-83.
- Moens, T., Luyten, C., Middelburg, J.J., Herman, P.M.J., Vincx, M., (2002). Tracing organic matter sources of estuarine tidal flat nematodes with stable carbon isotopes. *Marine Ecology Progress Series*, **234**, 127-137.
- Moens, T. & Vincx, M. (1997). Observations on the feeding ecology of estuarine nematodes. *J Mar Biol Assoc UK*, **77**, 211–227.
- Montagna, P. A. (1984). In situ measurement of meiobenthic grazing rates on sediment bacteria and edaphic diatoms. *Marine Ecology Progress Series*, **18**, 119-130.
- Montagna, P., Plazzi, G., Cortelli, P., Carelli, V., Lugaresi, E., Barboni, B., Fiocchi, M., (1995). Abnormal lactate after effort in healthy carriers of Leber's hereditary optic neuropathy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. **58**, 640-641.
- Monteiro, P.R.R., Reis-Henriques M.A., Coimbra. J. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit *in vitro* ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquat Toxicol*, **48**, 549-559.
- Muckian, L. M., Grant, R. J., Clipson, N. J. W. & Doyle, E. M. (2009). Bacterial community dynamics during bioremediation of phenanthrene- and fluoranthene-amended soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **63**(1), 52-56.
- Muller, J. F., Manomanii, K., Mortimer, M. R. & McLachlan, M. S. (2001). Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in the polyethylene/water system. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **371**(6), 816-822.
- Narbonne, J. F., Djomo, J. E., Ribera, D., Ferrier, V. & Garrigues, P. (1999). Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusk *Corbicula fluminea*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **42**(1), 1-8.
- Nascimento, F.J.A., (2010). Trophic ecology of meiofauna: Response to sedimentation of phytoplankton blooms in the Baltic Sea. Department of Systems Ecology. Stockholm University. 30p.
- Nascimento, F. J. A., Naslund, J. & Elmgren, R. (2012). Meiofauna enhances organic matter mineralization in soft sediment ecosystems. *Limnology and Oceanography*, **57**(1), 338-346.
- Naslund, J., Nascimento, F. J. A. & Gunnarsson, J. S. (2010). Meiofauna reduces bacterial mineralization of naphthalene in marine sediment. *Isme Journal*, **4**(11), 1421-1430.

- Newman, L., Reynolds, C., (2004). Phytodegradation of organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, **15**, 225-230.
- North, N.N., Dollhopf, S.L., Petrie, L., Istok, J.D., Balkwill, D.L., Kostka, J.E., (2004). Change in bacterial community structure during in situ biostimulation of subsurface sediment cocontaminated with uranium and nitrate *Appl. Environ. Microbiol.* **70** 4911-4920.
- Notar, M., Leskovsek, H. & Faganeli, J. (2001). Composition, distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments of the Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, **42**(1), 36-44.
- Odokuma, L.O., Dickson, A.A., (2003). Bioremediation of a crude oil polluted tropical rain forest soil. *Global Journal of Environmental Sciences*, **2**, 29-40.
- Oris, J.T., Giesy, J.J.P., 1987. The photo-induced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to larvae of the fathead minnow *Pimephales promelas*. *Chemosphere*, **16**, 1395-1404.
- Paine, R.T., (1969). The Pisaster-Tegula interaction: prey patches, predator food preference, and intertidal community structure. *Ecology*, **50**, 950-961.
- Paisse, S., Goni-Urriza, M., Coulon, F. & Duran, R. (2010). How a Bacterial Community Originating from a Contaminated Coastal Sediment Responds to an Oil Input. *Microbial Ecology*, **60**(2), 394-405.
- Perelo LW (2010) Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J Hazard Mater*, **177**, 81-89.
- Perfumo, A., Banat, I.M., Marchant, R., Vezzulli, L., (2007). Thermally enhanced approaches for bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils. *Chemosphere*, **66**, 179-184.
- Petersen, D. G., Sundback, K., Larson, F. & Dahllof, I. (2009). Pyrene toxicity is affected by the nutrient status of a marine sediment community: Implications for risk assessment. *Aquatic Toxicology*, **95**(1), 37-43.
- Pickering, R. W., Phil M. & F.I., B. (1999). A toxicological review of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J.Toxicol.Cut & ocular Toxicol*, **182**, 101-135.
- Pilon-Smits, E., (2005). Phytoremediation, Annual Review of Plant Biology. In: 56 (Ed.), pp. 15-39.
- Pinckney, J.L., Carman, K.R., Lumsden, S.E., Hymel, S.N., (2003). Microalgal-meiofaunal trophic relationships in muddy intertidal estuarine sediments. *Aquat. Microb. Ecol*, **31**, 99-108.
- Pinckney, J.L., Carman, K.R., Lumsden, S.E., Hymel, S.N., (2003). Microalgal-meiofaunal trophic relationships in muddy intertidal estuarine sediments. *Aquat. Microb. Ecol*, **31**, 99-108.
- Platt, H. M and Warwick, R. M., (1980). "Chapter 10, The significance of free-living nematodes to the littoral ecosystem," in the Shore Environment—2. Ecosystems, J. H. Price and D. E. G. Irvine, Eds., pp. 729-759, London, UK.
- Prasanna, D., Mohan, S. V., Reddy, B. P. & Sarma, P. N. (2008). Bioremediation of anthracene contaminated soil in bio-slurry phase reactor operated in periodic discontinuous batch mode. *Journal of Hazardous Materials*, **153**(1-2), 244-251.

- Raghukumar, C., Bharathi, P. A. L., Ansari, Z. A., Nair, S., Ingole, B., Sheelu, G., Mohandass, C., Nath, B. N. & Rodrigues, N. (2001). Bacterial standing stock, meiofauna and sediment-nutrient characteristics: indicators of benthic disturbance in the Central Indian Basin. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography*, **48**(16), 3381-3399.
- Riser-Roberts, E. (1998). Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes. Lewis Publishers, Boca Raton. p. 5-313.
- Rockne, K.J., Chee-Sanford, J.C., Sanford, R.A., Hedlund, B.P., Staley, J.T., Strand, S.E., 2000. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 1595-1601.
- Roy, P. S., R. J. Williams, A. R. Jones, I. Yassini, P. J. Gibbs. B. Coastes, R. J. West, P. R. Scanes, Hudson, J. P. & ., S. N. (2001). Structure and function of South-east Australian estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **53**, 351-384.
- Ruddock, P.J., Bird, D.J., McEvoy, J., Peters, L.D., (2003). Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in European eels *Anguilla anguilla* from United Kingdom estuaries. *Sci. Total Environ*, **301**, 105-117.
- Rysgaard, S., Christensen, P. B., Sorensen, M. V., Funch, P. & Berg, P. (2000). Marine meiofauna, carbon and nitrogen mineralization in sandy and soft sediments of Disko Bay, West Greenland. *Aquatic Microbial Ecology*, **21**(1), 59-71.
- Samanta, S. K., Singh, O. V. & Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, **20**(6), 243-248.
- Scannell, P. W. D. D., Duffy L., Perkins R. & O'Hara T. (2005). Acute and Chronic toxicity of PAHs in marine and fresh water with an emphasis on Alaska species: a review of the literature. Alaska Department of Environmental Conservation, 201p.
- Schratzberger, M., Daniel F, Wall CM, Kilbride R, Macnaughton SJ, Boyd SE, (2003). Response of estuarine meio- and macrofauna to in situ bioremediation of oil-contaminated sediment. *Marine Pollution Bulletin*, **46**, 430-443.
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M., Imboden, D.M., (2003). Environmental Organic Chemistry. In: ed.)Wiley-Interscience, s. (Ed.), Hoboken, NJ, p. 1313.
- Serrano, S., Espejo, R., Villarcjo, M., Jodral, M.L., (2007). Diastase and invertase activities in Andalusian honeys. *International Journal of Food Sciences and Technology*, **42**, 76-79.
- Sikkema, J., De Bont, J.A., Poolman, B., (1995). Mechanismes of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev*, **59**, 201-222.
- Simcik, M. F., Eisenreich, S. J. & Liroy, P. J. (1999). Source apportionment and source/sink relationships of PAHs in the coastal atmosphere of Chicago and Lake Michigan. *Atmospheric Environment*, **33**(30), 5071-5079.
- Sims, R. C. & Overcash, M. R. (1983). Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Residue Reviews* (**68**), 1-68.
- Smith, C., Huang, W. L., Walcott, C., Maggio, V., Grainger, J. & Patterson, D. (2001). Quantification of the PAH (Polycyclic Aromatic hydrocarbons) metabolites as a

- biomarker for PAH exposure. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **221**, U87-U87.
- Smith, V. H., Graham, D. W. & Cleland, D. D. (1998). Application of resource ratio theory to hydrocarbon biodegradation. *Environmental Science & Technology*, **32**(21), 3386–3395. doi:10.1021/es9805019.
- Soltani, M. (2004). Distribution lipidique et voies métaboliques chez quatre bactéries Gram-négatives hydrocarbonoclastes. Variation en fonction de la source de carbone. *Thèse de Doctorat*, Université Paris 6. pp 84.
- Straube, W.L., C.C. Nestler, L.D. Hansen, D. Ringleberg, P.H. Pritchard, Jones-Meehan, J., (2003). Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation. *Acta Biotechnologica*, **23**, 179-196.
- Sutherland, J.B., Raffi, F., Khan, A.A., Cerniglia, C.E., (1995). Mechanisms of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation. In Microbial Transformation and degradation of toxic organic chemicals. In: Edited by Young, L.L and C.E. Cerniglia. Wiley-Liss. New York.
- Sverdrup, L.E., Nielsen, T., Krogh, P.H., (2002). Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. *Environmental Science & Technology* **36**, 2429–2435. doi:10.1021/es010180s.PMID:12075800.
- Swartz, R. C., Ferraro S.P., Lamberson J.O., Cole F.A., Ozretich R.J., B.L., B. & D.W, S. (1997). Photoactivation and toxicity of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in marine sediment. *Environ Toxicol Chem*, **16**, 2151-2157.
- Tiehm, A., Schulze, S., (2003). Intrinsic aromatic hydrocarbon biodegradation for groundwater remediation. *Oil Gas Sci. Technol.-Rev. IFP*, **58**, 449-462.
- Tietjen, J. H. (1971). Ecology and Distribution of Deep-Sea Meiobenthos Off North-Carolina. *Deep-Sea Research*, **18**(10), 941-&.
- Traunspurger, W., (2000). The biology and ecology of lotic nematodes. *Freshw. Biol*, **44** 29-45.
- Trevors, J.T., Van Elsas, J., (1995). Nucleic acids in the environnement: methods and application In: Springer, V., Heidelberg (Ed.), pp. 241-256.
- Tunberg, B.G., Nelson, W.G., (1998). Do climatic oscillations influence cyclical patterns of soft bottom macrobenthic communities on the Swedish west coast? *Mar. Ecol. Prog. Ser*, **170**, 85-94.
- Van Oevelen, D., Middelburg, J. J., Soetaert, K. & Moodley, L. (2006). The fate of bacterial carbon in an intertidal sediment: Modeling an in situ isotope tracer experiment. *Limnology and Oceanography*, **51**(3), 1302-1314.
- Venosa, A. D., Suidan, M. T., Wrenn, B. A., Strohmeier, K. L., Haines, J. R., Eberhart, B. L., King, D. & Holder, E. (1996). Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. *Environmental Science & Technology*, **30** (5), 1764–1775. doi:10.1021/es950754r.
- Verrhiest, G., Clement, B., Blake, G., (2001). Single and combined effects of sediment-associated PAHs on three species of freshwater macroinvertebrates. *Ecotoxicology*, **10**, 363-372.

- Vila, M., (2006). Utilisation de plantes agronomiques et lacustres dans la dépollution des sols contaminés par le RDX et le TNT : approches en laboratoire. *Xénobiotiques* (Toulouse, France).
- Vincx M. et Heip C., (1989). Section D. The use of meiobenthos in pollution monitoring studies: a review. *ICES J. Mar. Sci.*, **16**, 50-67.
- Vranken. G., Heip. C., (1986). The productivity of marine nematodes. *Ophelia*, **26**, 429-442.
- Walker, J.D., Seesman, P.A., Colwell, R.R., (1975). Effect of South Louisiana crude oil and no. 2 fuel oil on growth of heterotrophic microorganisms including proteolytic, lipolytic, chitinolytic and cellulolytic bacteria. *Environ. Pollut.* **9**, 13-33. doi:10.1016/0013-9327(1075)90053-90051.
- Walworth, J., Braddock, J., Woolard., (2001). Nutrient and temperature interactions in bioremediation of cryic soil. *Cold Region Science and Technology*, **32**, 85-91.
- Ward, D.M. and Brock, T.D., 1978. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, **35**, 353-359.
- Weinstein, J. E. (2003). Influence of salinity on the bioaccumulation and photoinduced toxicity of fluoranthene to an estuarine shrimp and oligochaete. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**(12), 2932-2939.
- Wieser, W. (1953). Die Beziehung zwischen Mundhohlen-gestalt, Ernährungsweise und Vorkommen beifreilebenden marinen Nematoden. *Ark. Zool. Ser*, **2**(4), 439 - 484.
- Wilcke, W., Amelung, W., Martius, C., Garcia, M. V. B. & Zech, W. (2000). Biological Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Amazonian Rain Forest. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **163**(1), 27-30.
- Wilcke, W., Krauss, M. & Amelung, W. (2002). Carbon isotope signature of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): evidence for different sources in tropical and temperate environments? *Environmental Science & Technology*, **36**(16), 3530-5.
- Wilcke, W., Krauss, M., Lilienfein, J. & Amelung, W. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbon storage in a typical Cerrado of the Brazilian savanna. *Journal of Environmental Quality*, **33**(3), 946-55.
- Wilcke, W. (2007). Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. *Geoderma*, **141**(3-4), 157-166.
- Wilson, L.P., Bouwer, E.J., (1997). Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, **18**, 116-130.
- Winchell, L.J., Novak, P.J., (2008). Enhancing polychlorinated biphenyl dechlorination in fresh water sediment with biostimulation and bioaugmentation. *Chemosphere*, **71**, 176-182.
- Wolfgang, W. (2000). SYNOPSIS Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Soil - a Review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **163**(3), 229-248.
- Wolfgang, W., Martin, K., Gabriela, B., ccaron et íková. (2003). Persistent organic pollutant concentrations in air- and freeze-dried compared to field-fresh extracted soil samples of an eastern Slovak deposition gradient. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **166**(1), 93-101.

- Yu, K. S. H., Wong, A. H. Y., Yau, K. W. Y., Wong, Y. S. & Tam, N. F. Y. (2005). Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, **51**(8-12), 1071-1077.
- Zaghden, H., Kallel, M., Louati, A., Elleuch, B., Oudot, J. & Saliot, A. (2005). Hydrocarbons in surface sediments from the Sfax coastal zone, (Tunisia) Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, **50**(11), 1287-1294.
- Zeng, Y., Hong, A.K., Wavrek, A.D., (2000). Chemical-biological treatment of pyrene. *Water Res*, **34**, 1157-1172.
- Zeng, Y., Hong, A.K., (2002). Slurry-Phase Ozonation for Remediation of Sediments Contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *J. Air & Waste Manage Assoc*, **68**, 52-58.
- Zhou, Y. M., Liu, R. X. & Tang, H. X. (2004). Kinetics study of aqueous sorption of phenanthrene to humic acids and sediments. *Journal of Environmental Sciences-China*, **16**(3), 408-413.
- Zhou, H. W., Wong, A. H. Y., Yu, R. M. K., Park, Y. D., Wong, Y. S. & Tam, N. F. Y. (2009). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Structural Shift of Bacterial Communities in Mangrove Sediment. *Microbial Ecology*, **58**(1), 153-160.

CHAPITRE II

PROCEDURES

EXPERIMENTALES

PROCEDURES EXPERIMENTALES

1. DESCRIPTION DU SITE D'ETUDE

La lagune de Bizerte, une lagune côtière du nord de la Tunisie (latitude Nord 37°08' - 37°16 et longitude Est 9°46' - 9°56') (Photo 1), est une dépression de 150 km² connue depuis longtemps par sa position géostratégique du fait qu'elle est reliée d'une part à la mer Méditerranée par un canal artificiel (Louiz *et al.*, 2009) d'environ 1500 m de long et 300 m de large et d'environ 12 m de profondeur et d'autre part au lac Ichkeul par un chenal étroit et sinueux appelé "Oued Tinja" d'environ 5 km de long (Fig.1). Sa profondeur moyenne est de 7 m et peut atteindre 12 m par endroits (Aïssa, 1991). La lagune de Bizerte fortement affectée par de multiples pressions anthropiques, reçoit des quantités importantes d'eaux usées urbaines des villes et villages avoisinants. Elle est aussi caractérisée par un nombre croissant d'unités industrielles qui couvrent des activités variées (petites et moyennes industries, industrie portuaire, aciéries, cimenterie de Bizerte etc.). Cette lagune est chroniquement exposée à des xénobiotiques tels que les métaux lourds (Yoshida *et al.*, 2002), les pesticides (Cheikh *et al.*, 2002) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (Trabelsi et Driss, 2005; Louiz *et al.*, 2008).



Planche 1. Image satellitaire montrant la situation géographique de la lagune de Bizerte (Modifié d'après Internet [1]).

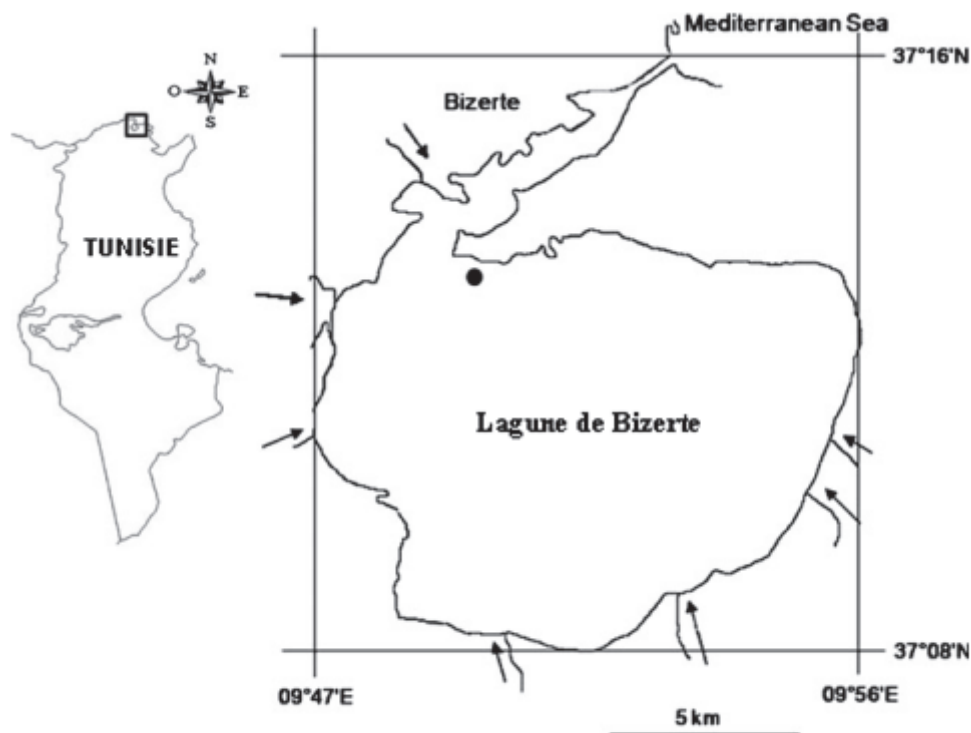


Fig. 1. Localisation géographique de la station prospectée dans la lagune de Bizerte.

● : Echaraà.

2. PARAMETRES DESCRIPTIFS DU SITE D'ETUDE

Du sédiment avec sa méiofaune naturelle a été prélevé au niveau d'une seule station Echaâra (37° 13' N 9° 49' E) localisée dans la lagune de Bizerte. D'après les études antérieures, cette station présente des concentrations faibles en HAPs (Mzoughi *et al.*, 2002; Trabelsi et Driss, 2005) (Fig. 1).

2.1. Modalités de prélèvement

✓ Prélèvements des échantillons d'eau :

Les prélèvements d'eau pour le dosage au laboratoire des nutriments (phosphates, nitrates et nitrites) et de la chlorophylle *a* ont été effectués dans des bouteilles en polyéthylène conservées ensuite dans de la glace à l'abri de la lumière. D'autres échantillons d'eau ont été prélevés dans des bouteilles de 1 litre afin de déterminer les teneurs en matière en suspension (MES).

✓ Prélèvements des échantillons de sédiment :

Les échantillons du sédiment destinés à l'étude microcosmique ont été extraits de façon stérile (OMS, 1995) à l'aide de carottiers en plexiglas de 10 cm² de section (Vitiello et

Aïssa, 1985) qui sont introduits à une profondeur de 10 cm avant de transférer leur contenu dans des tubes en plexiglas préalablement passés à l'autoclave. D'autres échantillons du sédiment ont été prélevés dans des sachets en plastique pour effectuer l'analyse granulométrique et la détermination des teneurs sédimentaires en carbone organique total, en azote total et en matière organique totale.

2.2. Mesure des paramètres physico-chimiques des eaux

- ✓ La température est un facteur important qui conditionne la nature des peuplements ainsi que leur dynamique et la croissance des organismes aquatiques (Anras et Guesdon, 2007).
- ✓ La mesure de la salinité représentant la quantité de sels dissous dans l'eau de mer est importante dans l'étude du milieu marin.
- ✓ L'oxygène dissous est un paramètre important des écosystèmes aquatiques qui gouverne la majorité des processus biologiques et un excellent indicateur de la qualité de l'eau (Ramade, 1982).

Ces différents paramètres (température, salinité, oxygène dissous et pH) ont été mesurés *in situ* en utilisant un multi-paramètre portatif de type WTW LF196.

2.3. Mesure des paramètres hydrologiques

- ✓ La Matière en suspension (MES) a été mesurée au laboratoire après filtration d'un litre d'eau sur des filtres Whatman millipores (0,45µm). Les filtres utilisés ont été pesés avant et après filtration, la différence des pesées indique la quantité de matières en suspension relative au volume d'eau filtrée (Baretta-Beakker *et al.*, 1992).

$$MES = \frac{(X2 - X1)}{V}$$

MES : matière en suspension en mg/l.

X1 : poids du filtre avant filtration en mg.

X2 : poids du filtre après filtration en mg.

V : volume d'eau filtrée en l.

✓ Teneurs des eaux en chlorophylle *a*

Les teneurs des eaux en chlorophylle *a* ont été déterminées selon la technique de Strickland et Parsons (1965) après mesure de la densité optique à 665 et 750 nm d'un extrait acétonique (90%) de pigments chlorophylliens, avant et après acidification, afin de distinguer la chlorophylle des phéopigments. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre de type Beckman DU-series 500.

✓ Teneurs des eaux en nutriments

Des échantillons d'eau prélevés dans des bouteilles propres et immédiatement conservés dans de la glace sont ramenés au laboratoire pour effectuer les dosages des sels nutritifs. L'appareil utilisé est un spectrophotomètre de type Beckman DU-Serie 520.

▪ Dosage des ions phosphates (PO_4^{3-})

La méthode colorimétrique de Murphy et Riley (1962) a été utilisée pour doser les ions phosphates dissous dans l'eau de mer.

▪ Dosage des nitrites (NO_2^-)

Le dosage des ions nitrites est effectué selon la méthode de Bendschneider et Robinson (1965). Une diazotation par les ions nitrites de la sulfanilamide en milieu acide ($\text{pH} = 2$) suivie de sa copulation avec la N - naphtyl - éthylène diamine, permet de donner un complexe de couleur rose à pourpre susceptible d'un dosage colorimétrique à une longueur d'onde égale à 543 nm.

▪ Dosage des ions nitrates (NO_3^-)

Le dosage des ions nitrates a été effectué selon la méthode de Strickland et Parsons (1965). Les ions nitrates sont réduits à 95 % environ lors de la manipulation en ions nitrites (Aminot et Chaussepied, 1983) à travers une colonne réductrice de cadmium traitée par une solution cuivrique (Wood *et al.*, 1967) puis dosés par colorimétrie. On mesure en réalité la somme des concentrations des ions nitrites et nitrates (à 543 nm). La concentration en nitrates de la prise d'eau est déduite après mesure directe puis soustraction de la concentration en nitrites de l'échantillon.

2.4. Mesure des paramètres physico-chimiques des sédiments

✓ Teneurs sédimentaires en matière organique totale (MOT)

La détermination de la matière organique totale a été réalisée selon la méthode de la perte au feu (Beyers *et al.*, 1978). L'échantillon de sédiment a été séché à l'air atmosphérique pendant quelques jours. Ensuite, l'incinération de l'échantillon de sédiment à 45°C permet de calciner la totalité de la matière organique présente. La différence de poids du sous-échantillon avant et après incinération, reportée en pourcentage par rapport au poids initial, permet de déterminer sa teneur en matière organique.

✓ Teneurs sédimentaires en carbone organique total (COT)

La teneur sédimentaire en matière organique totale peut aussi être évaluée par le dosage de son élément constitutif majeur « le carbone ». Le dosage du carbone organique total dans le sédiment a été réalisé par Coulométrie à l'aide du Coulomat 702 (Espitalie *et al.*, 1986).

✓ Teneurs sédimentaires en azote total

Dans le sédiment, l'azote se présente sous deux formes : une forme organique engagée dans les molécules organiques des débris d'organismes et des colloïdes humiques et une forme minérale représentée par les sels d'ammonium et les nitrates. La méthode de Kjeldahl (1883) a été utilisée pour estimer la teneur du sédiment en azote total.

✓ Analyse granulométrique

Un tamisage par voie humide (Walter *et al.*, 1997) a été effectué au préalable pour séparer la fraction fine (particules de taille inférieure à 63 µm) de la fraction grossière (particules de taille supérieure à 63 µm). La prise de sédiment a été desséchée dans une étuve de type WTB Binder ED-53 à 45°C. Pour chaque échantillon, 200 g (M1) de sédiment sec ont été prélevés et soumis à un courant d'eau continu sur un tamis de 63 µm de maille afin d'éliminer la fraction fine de taille inférieure à 63 µm (argile, silt ...). Le refus du tamis a été de nouveau déshydraté puis pesé (M2). Le pourcentage de la fraction fine (FF) a été alors déterminé selon la formule suivante :

$$FF \text{ (\%)} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100$$

Le reste de sédiment, déshydraté au préalable, a été prélevé et passé sur une colonne de tamis superposés dans l'ordre, de mailles respectives : 0,8 mm – 0,63 mm – 0,5 mm – 0,425 mm – 0,250 mm – 0,160 mm – 0,080 mm – 0,063 mm selon les normes AFNOR. Après tamisage, les fractions granulaires de chaque tamis ont été pesées à l'aide d'une balance de précision. Les fractions granulaires de chaque tamis ont été pesées et exprimées en pourcentage afin d'établir les courbes cumulatives semi-logarithmiques.

3. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

3.1. Contamination des sédiments

Les HAPs ont tendance à s'adsorber sur les matrices solides et notamment les matières organiques, les sols et les sédiments (Prasanna *et al.*, 2008). La contamination a été réalisée sur la fraction fine des sédiments (<63 µm) après préparation d'une solution de HAP dissous dans l'acétone de concentration finale choisie à partir d'une solution-mère de HAP. Après l'évaporation du solvant, 100g ou 200g (en fonction des expérimentations) de sédiment humide ont été ajoutés et une première agitation a été effectuée pendant 2 h à température ambiante à 128 tours/min. Le sédiment a ensuite été recouvert d'eau de mer filtrée (0,2 µm) puis laissé stabuler pendant 24 h.

3.2. Techniques de bioremédiation

Une quantité de 100g ou 200g (en fonction des expérimentations) de sédiment naturel a été ajoutée aux microcosmes contenant les sédiments contaminés par un HAP ou un cocktail de HAPs. En ce qui concerne les microcosmes témoins, 100 g de sédiment dépourvu de méiofaune et non contaminé ont été ajoutés à 100 g de sédiment naturel. Pour les microcosmes destinés au comptage des nématodes libres, 100 g de sédiment naturel contenant la méiofaune ont été ajoutés à 100 g de sédiment contaminé.

Pour la biostimulation consistant à ajouter des nutriments aux sédiments contaminés par les HAPs afin d'accélérer leur dégradation par les bactéries indigènes, les concentrations des éléments nutritifs ont été choisis d'après les études de Yu *et al.* (2005) et Jacques *et al.* (2008).

Pour la bioaugmentation, il a été ajouté aux sédiments contaminés le culot d'une suspension bactérienne d'une souche dégradant les HAPs contenant un nombre de cellules déterminé et mesuré par cytométrie en flux. Les souches utilisées ont été isolées à partir des sédiments de la lagune de Bizerte (Ben Said *et al.*, 2008).

L'association des deux techniques précédentes (biostimulation et bioaugmentation) a été également prise en compte pour déterminer son impact sur la méiofaune et la microflore indigène. Dans ce but, les sels nutritifs et le culot de la souche bactérienne ont été ajoutés aux sédiments contaminés.

Après l'ajout d'éléments nutritifs et du culot bactérien aux différents microcosmes de bioremédiation, une deuxième agitation a été effectuée dans tous les microcosmes pendant 30 min à température ambiante et à 120 tours/min.

3.3. Incubation des microcosmes

Chacun des microcosmes fonctionnant comme un système fermé avec une aération continue assurée par une pompe d'aquarium a été rempli d'eau de mer stérilisée et filtrée (volume final de 1 L) (Fig.2). La fiabilité de tels dispositifs expérimentaux a été vérifiée par plusieurs auteurs (Schratzberger et Warwick, 1998; Mahmoudi *et al.*, 2005). Après une période d'incubation des microcosmes, des échantillons de sédiment ont été prélevés pour les différentes analyses bactériologiques et méiofaunistiques. D'autres échantillons de sédiment ont été consacrés à l'analyse du carbone organique total et au dosage des HAPs. Les sédiments des microcosmes destinés à l'étude méiobenthique ont été conservés dans du formol neutre à 4 % contenant un tampon pH. Pour chaque type de microcosme, trois replicats ont été considérés.

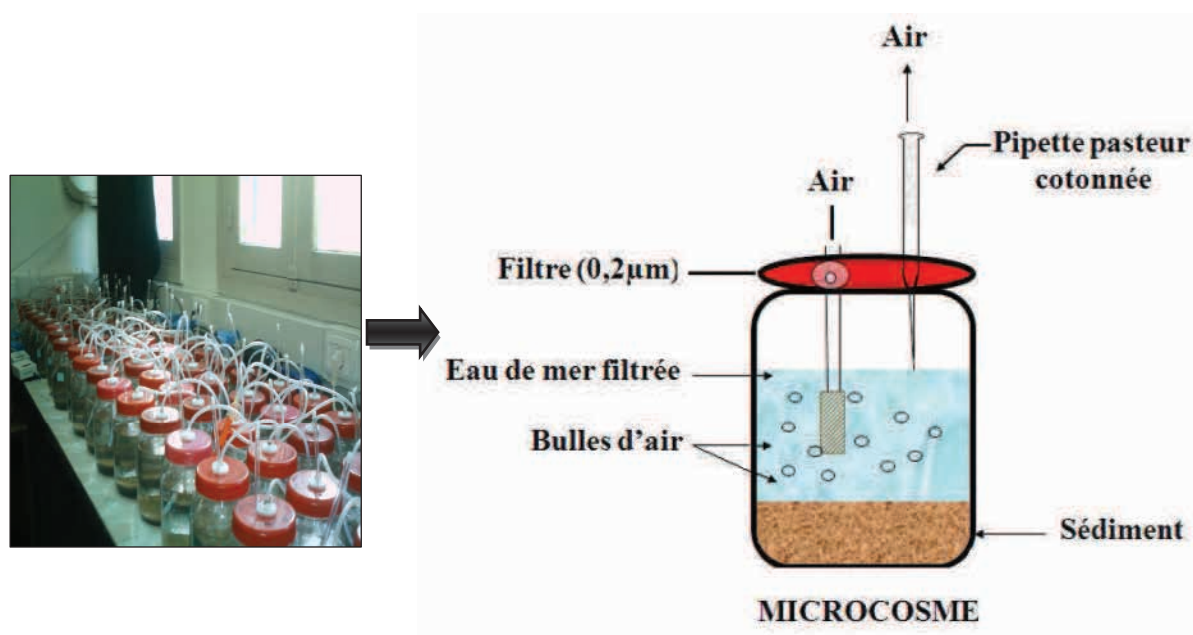


Fig. 2. Schéma d'un microcosme.

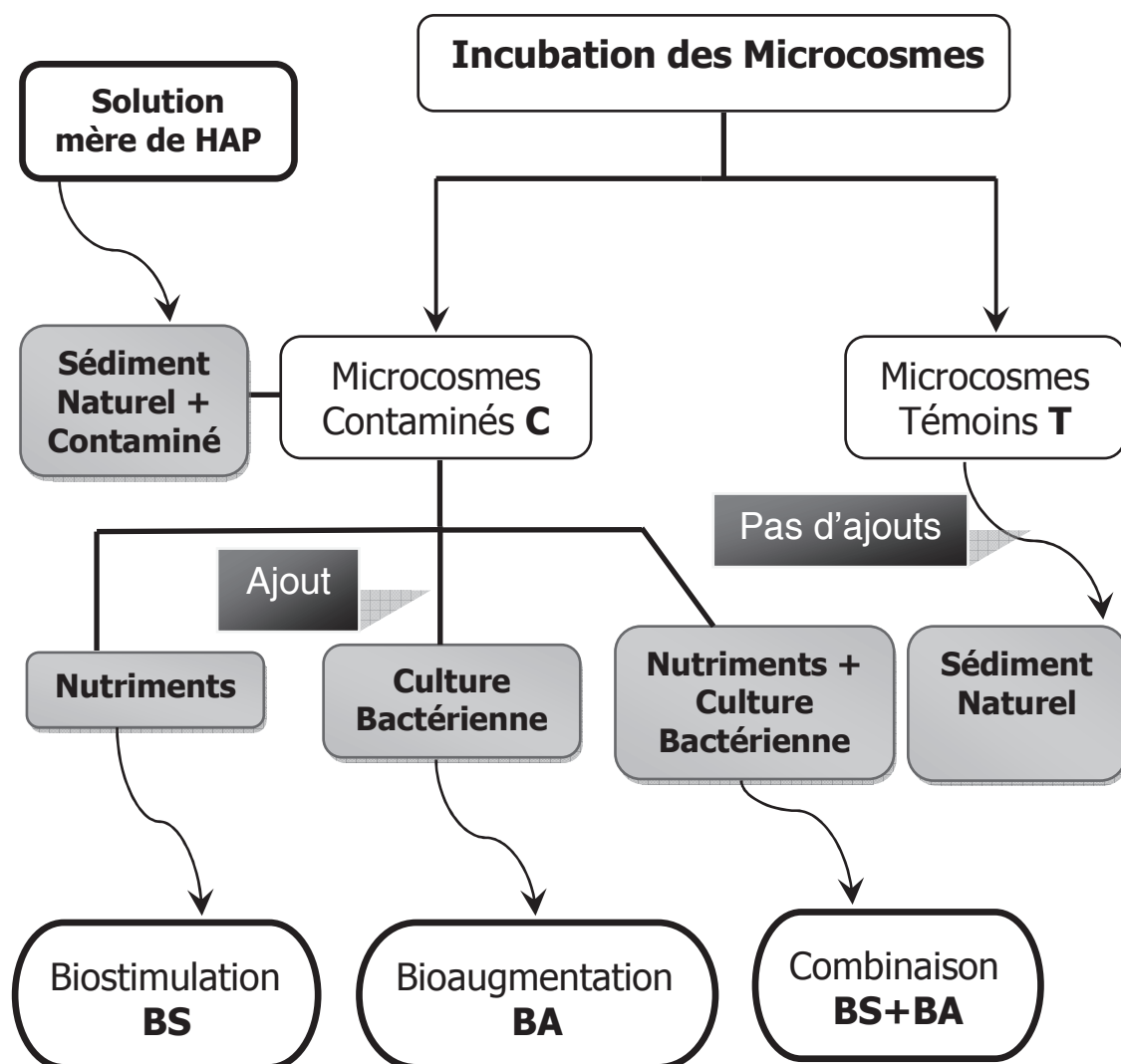


Fig.3. Représentation schématique du protocole expérimental utilisé.

3.4. Dosage des HAPs

Le dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques par chromatographie en phase gazeuse (GC) nécessite une extraction des composés organiques, y compris les hydrocarbures, de la matrice, leur purification, la séparation des différentes fractions et enfin l'analyse des fractions obtenues.

✓ Préparation des échantillons et protocole d'extraction

Après lyophilisation du sédiment, les HAPs sont extraits de la matrice sédimentaire (1g en poids sec) par un solvant organique (40ml d'acétone/ hexane (v/v)) avec du

2,2,4,4,6,8,8-heptaméthylnonane comme standard interne dans un bain à ultrasons (15 min).

✓ Purification et analyse de l'extrait

Avant l'analyse, l'extrait est éventuellement purifié sur micro-colonne de silice. Cet extrait contenant les HAPs est à nouveau re-concentré et mis en présence de l'étalon interne de contrôle de récupération avant d'être analysé par GC. Le GC (GC Agilent Technologies) a été équipé d'un détecteur à ionisation de flamme (290 ° C) et d'une colonne capillaire HP 5 (30 m x 320 µm x 0,25 µm, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). Les courbes d'étalonnage ont été établies avec des molécules simples et des mélanges d'HAPs.

4. ETUDE BACTERIOLOGIQUE

4.1. Mesures de la consommation d'oxygène

L'étude de l'impact des HAPs et de la bioremédiation sur l'activité à l'interface eau-sédiment a été réalisée en mesurant à l'aide de microélectrodes à oxygène la distribution verticale de la consommation d'oxygène. Ces microélectrodes à oxygène de type Clark sont largement utilisées dans les études d'écologie microbienne (Revsbech, 2005). Les micro-profils d'oxygène ont été réalisés avec une résolution en profondeur de 100 µm en utilisant un micromanipulateur motorisé. La microsonde à oxygène a été manuellement positionnée à la surface des sédiments et les données d'acquisition des profils ont été contrôlées par ordinateur (Planche 2).

La consommation d'oxygène des sédiments (SOC) a été estimée à partir des flux d'oxygène dans la couche limite de diffusion en suivant la méthode de Rasmussen et Jorgensen (1992). Les profils de la consommation d'oxygène des sédiments ont été estimés en utilisant le logiciel Profile (Berg *et al.*, 1998). Pour chaque type de microcosme, les profils verticaux de SOC ont été basés sur trois micro-profils d'oxygène mesurés au début et à la fin de la période d'incubation des microcosmes (en fonction de la manipulation).

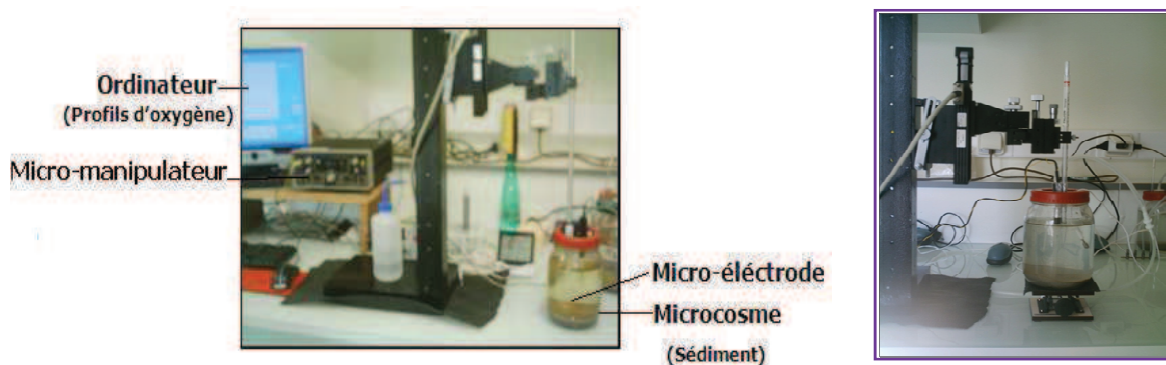


Planche 2. Procédure de mesure de la consommation d'oxygène.

4.2. Estimation de la biomasse bactérienne par cytométrie en flux

✓ Définition

La cytométrie en flux (CMF) est une méthode de dénombrement bactérien complémentaire à celle du dénombrement en épifluorescence. Cette méthode présente l'avantage d'être plus pratique en termes de précision, de vitesse et de facilité d'exécution. Elle permet une analyse individuelle multiparamétrique des cellules en suspension liquide à une fréquence de l'ordre de 500 à 1000 événements par seconde en routine.

✓ Principe

Le cytomètre en flux est un appareil permettant la quantification et la qualification individuelle de cellules en fonction de leur taille, leur fluorescence (liés aux pigments naturels ou aux marqueurs fluorochromiques) en réponse à une stimulation lumineuse (dans notre cas un laser de 488 nm). Ainsi, cette technique nous donne simultanément cinq informations à partir de l'analyse d'une même cellule :

- sa taille relative (Forward Scatter-FSC) ;
- sa granularité relative ou complexité interne (Side Scatter-SSC) ;
- son intensité relative de fluorescence à différentes longueurs d'ondes (FL1, FL2, FL3).

La quantification des cellules consiste à déduire le volume analysé à partir de billes dont on connaît au préalable la concentration. Ces billes sont appelées Trucount (TC), et représentent un nombre bien défini qu'on remet en suspension dans 500µl du liquide de gaine (liquide de passage) utilisé pour les échantillons.

✓ Acquisition et traitement des données

La fonction « acquisition » est la fonction qui permet de collecter les données issues du cytomètre. La taille relative des cellules sera déterminée grâce à la lumière diffractée aux petits angles, détectée sur le capteur Forward scatter (FSC). La lumière est diffractée aux grands angles et proportionnelle à la granularité de la cellule, elle sera détectée sur le capteur Side scatter(SSC). L'analyse consiste à lire un fichier de données dans le logiciel CellQuest. Ainsi on passe d'une acquisition à une analyse avec l'option acquisition-analyse. Pour l'analyse des données, il faut créer un cytogramme.

✓ Protocole d'analyse des échantillons

- Extraction des bactéries

L'extraction des bactéries dans les sédiments a été faite selon la méthode utilisée par Duhamel et Jacquet (2006). Tout d'abord, les échantillons de sédiment (1 g de poids humide) ont été fixés à la formaline (Concentration finale de 2%) puis 5 µl de Tween 80 (10%) plus 1 ml d'une solution de pyrophosphate de sodium (10 mM) et 4 ml d'eau MilliQ ont été ajoutés. Ensuite, les échantillons ont été traités par les ultrasons à trois reprises pendant 1 minute dans un bain d'eau en agitant manuellement après chaque minute. Les échantillons ont été ensuite centrifugés pendant 1 minute (800 × g). Le surnageant a été filtré sur une membrane de 5 µm et dilué dans un tampon TE-buffer 490 µl.

- Cytométrie en flux

L'analyse des échantillons a été réalisée sur un cytomètre FACS Calibur (Becton Dickinson) et l'exploitation des données a été faite avec le logiciel CellQuest Pro. La mesure des abondances bactériennes a été effectuée sur des échantillons fixés (formol 2%) et dont les acides nucléiques ont été marqués au SYBR Green-I (SYBR-I).

Le protocole optimisé utilisé pour l'analyse des échantillons par cytométrie en flux est présenté dans le tableau 1.

Tableau 1 : Protocole d'analyse des échantillons en cytométrie en flux.

Micro-organisme	Volumes (µl)	Volume final (µl)	Vitesse (µl/min)	Paramètre d'analyse de fluorescence	Temps d'acquisition (min)
Bactéries	- X ml d'échantillon - X µl du liquide de gaine - 20 µl d'un mélange de billes 1 µm et 2 µm -50 µl de billes TC	350	12-15	FL1	2

4.3. Diversité bactérienne (T-RFLP)

Les analyses moléculaires ont été effectuées à l'université de Pau et des pays de l'Adour Equipe Environnement et Microbiologie (France).

La biodiversité bactérienne a principalement été abordée par T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*), approche moléculaire d'écologie microbienne.

La technique de T-RFLP donne une vision dynamique des communautés bactériennes par l'analyse des fragments codant pour l'ARN ribosomique 16S en position terminale qui permet par la suite d'obtenir un inventaire moléculaire sur leur diversité.

✓ Extraction de l'ADN

Les extractions des ADN génomiques des sédiments ont été réalisées par Kit Ultra Clean Soil DNA Isolation (MoBio) en suivant les recommandations du fournisseur. La T-RFLP permet de mettre en évidence le polymorphisme de taille de fragments terminaux de l'ARN 16S obtenus suite à la digestion avec des endonucléases de restriction. La longueur de ces fragments de restriction varie d'une espèce à l'autre selon la position de la séquence nucléotidique reconnue par l'enzyme.

✓ Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Deux oligonucléotides constitués d'amorces universelles codant pour l'ARN 16S des bactéries : 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1489R (5'-TACCTTGTTACGACTTCA-3') permettent d'obtenir une représentation des populations bactériennes.

L'amplification est réalisée dans un thermo-cycler. La purification des produits PCR est réalisée avec le Kit commercial : GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit. Les produits issus de l'amplification par PCR ont été digérés par l'endonucléase de restriction HaeIII.

✓ Electrophorèse capillaire

Les produits de digestion ont été séparés par électrophorèse capillaire sur un séquenceur (ABI Prism 310 genetic analyser, Applied Biosystem).

La migration sur gel des produits fluorescents entraîne la séparation des fragments.

✓ Analyse des profils T-RFLP

Les profils de T-RFLP ont été ainsi comparés par les Analyses Canoniques de Correspondances (ACC) selon Fromin *et al.* (2002). Les ACC ont été réalisés par le logiciel MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey Wales).

5. ETUDE DE LA MEIOFAUNE

5.1. Détermination de la densité

✓ Fixation et extraction de la méiofaune

L'extraction de la méiofaune, formée d'organismes dont la taille est comprise entre 1 mm et 0,04 mm et qui vivent à l'interface eau-sédiment ou dans les premiers centimètres des sédiments aquatiques, a été réalisée par la technique de lévigation-tamassage (Vitiello et Dinet, 1979). Cette technique consiste à mettre l'échantillon dans un cristalliseur contenant environ 1,5 litre d'eau et à le remuer plusieurs fois à la main afin de mettre en suspension les organismes méiobenthiques. Après 20 à 30 secondes de décantation, l'eau de lavage est filtrée sur une série de tamis de mailles décroissantes (1 mm et 40 µm). Le tamis de 1 mm de maille est destiné à retenir la macrofaune et les grosses particules sédimentaires et celui de 40 µm à récupérer la nématofaune.

L'utilisation d'un tamis de maille 40 µm permet d'éliminer les particules fines du sédiment avec une perte minimale des organismes ne dépassant pas 1% de l'effectif total (De Bovee, 1981). Le refus du tamis de 40 µm est récupéré dans un flacon et conservé au formol neutre à 4%.

✓ Coloration

L'échantillon conservé au formol est coloré par quelques gouttes d'une solution aqueuse de rose Bengale 24 heures, au moins, avant le tri. Le rose Bengale est un colorant vital

qui colore sélectivement en rose la matière organique vivante fixée par le formol (Guo *et al.*, 2001) ; cette coloration permet de distinguer aisément les organismes des particules inertes (méiofaune morte, particules minérales etc.) non colorées.

✓ Numération

Le comptage de la méiofaune, facilité par la coloration au rose Bengale, a été effectué en transvasant l'échantillon dans une cuve de Dollfus à fond quadrillé et présentant 200 cases de 5 mm de côté, séparées les unes des autres par des limites en relief empêchant le déplacement des animaux lors du comptage. Toutes les cases ont été examinées par une translation latérale de la cuve sur la platine d'une loupe binoculaire de type WILD-M3B.

Les résultats du comptage ont été ensuite consignés par taxon dans un tableau préalablement préparé à cet effet. Les comptages de la méiofaune ont été effectués dans le but de déterminer les effectifs moyens des principaux taxons (nématodes, copépodes, polychètes) dans chaque type de microcosme (Planche 3).

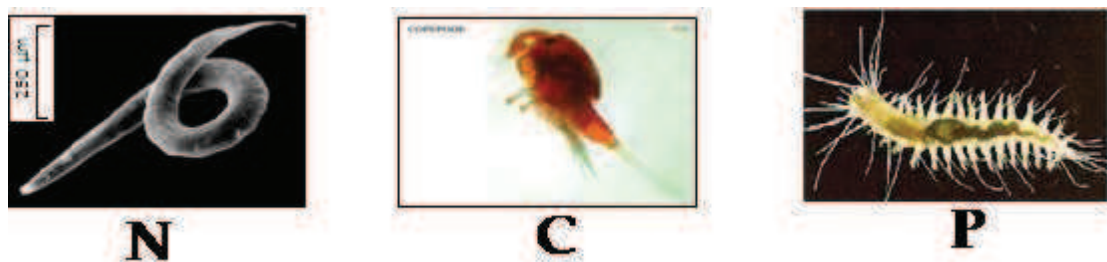


Planche 3. Les trois principaux taxons de la méiofaune (N : nématodes ; C : copépodes ; P : polychètes) (site web Internet 1).

5.2. Détermination de la structure de la nématofaune

5.2.1. Préparation des nématodes pour l'étude systématique

✓ Traitement des nématodes par la glycérine

Tous les individus recensés dans chacun des replicats ont été utilisés pour la détermination de la structure spécifique de la communauté nématologique. Les nématodes sont au préalable traités par la méthode rapide au glycéro – éthanol (Guo *et al.*, 2001). Celle-ci consiste à immerger les animaux dans des coupelles de verre contenant de l'eau glycinée à 1 % (solution I). Les coupelles portant les références correspondantes (date de prélèvement, code du microcosme étudié ainsi que le nombre des nématodes transférés) ont été placés dans un dessiccateur contenant du silicagel ayant la capacité d'absorber l'alcool et l'eau évaporée. Avant de placer les coupelles dans

le dessiccateur, il est nécessaire de vérifier que tous les spécimens baignent dans la solution. Après 24 heures, temps nécessaire à l'évaporation complète de l'alcool et de l'eau, quelques gouttes d'une solution d'éthanol glycéринé à 5 % (solution II) ont été ajoutées à chacun des coupelles. Par la suite, ces derniers ont été de nouveau remis dans le dessiccateur. L'évaporation lente de l'eau et de l'éthanol permet la substitution de l'eau par la glycérine. Cette technique a permis d'une part d'atténuer progressivement la coloration due au rose Bengale (Kotta et Boucher, 2001) et d'autre part de monter les animaux dans la glycérine pure, un fixateur qui a l'avantage de les décolorer et de bien conserver leurs structures internes.

Solution (I) : 20 ml d'alcool à 95° + 1 ml de glycérine + 79 ml d'eau distillée.

Solution (II) : 95 ml d'alcool à 95° + 5 ml de glycérine.

✓ Montage provisoire

Après l'évaporation complète de l'eau et de l'alcool, les nématodes ont été placés au fond d'une goutte de glycérine pure située au centre d'une lame en verre et à mi-distance de deux bandes de papiers cigarettes. Ces dernières, imprégnées dans une solution de glycérine pure et distantes d'environ 3 cm, servent comme support pour la lamelle afin d'éviter tout écrasement ou déformation des nématodes. La lamelle a été déposée tangentiellement à la goutte de glycérine tout en évitant la formation des bulles d'air et le déplacement des individus à la périphérie. Enfin, les lames, contenant chacune dix nématodes au maximum et portant les références nécessaires, ont été stockées dans des « boîtes à lames » maintenues horizontalement pour éviter l'écoulement de la glycérine.

✓ Observation microscopique

Un microscope de type Leitz Weltzlar HM-lux 3, équipé d'un tube à dessin et préalablement étalonné, permet d'effectuer les mesures indispensables à la détermination spécifique.

5.2.2 Détermination spécifique des nématodes libres marins

Le sous-échantillon de nématodes prélevé a été également utilisé pour l'étude systématique en vue de déterminer la composition spécifique des peuplements de nématodes libres. Les travaux taxinomiques en nématologie sont basés sur des critères morphométriques (Fig. 4). Les mensurations nécessaires pour l'identification des espèces décrites dans les guides faunistiques sont assez simples mais variés tels que l'habitus, l'aspect cuticulaire, la structure et la position de l'amphide, la forme de la

cavité buccale, la longueur et la disposition des soies céphaliques et la structure de l'appareil copulateur du mâle. En plus, sept mesures sont nécessaires pour pouvoir déterminer un spécimen donné (Tableau 2) :

- le diamètre céphalique, mesuré à la base des soies céphaliques les plus longues ;
- le diamètre au niveau du cardia (Fig. 4) ;
- le diamètre maximal corporel (Fig. 4) ;
- le diamètre anal chez la femelle et cloacal chez le mâle ;
- la longueur oesophagienne, allant de l'extrémité antérieure jusqu'au cardia ;
- la longueur caudale allant de l'anus jusqu'à l'extrémité caudale ;
- la longueur totale allant de l'extrémité antérieure jusqu'à l'extrémité caudale.

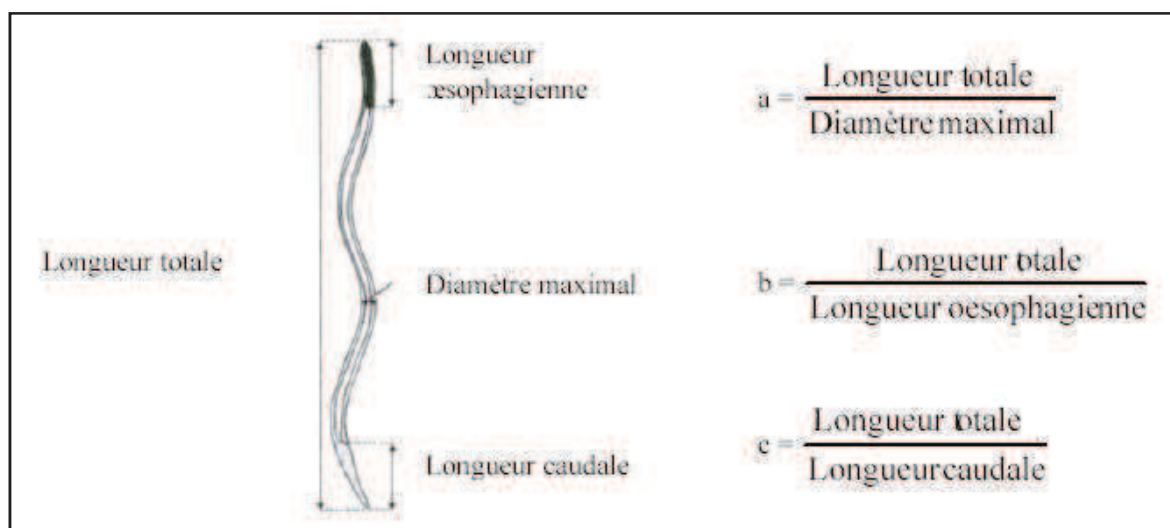


Fig. 4. Mesures nécessaires pour la détermination des indices a, b et c de De Man.

Les indices a, b et c de De Man (Fig. 4), la position du collier nerveux (exprimée en pourcentage de la longueur oesophagienne), la position de l'orifice excréteur ainsi que celle de la vulve (V %), exprimée en pourcentage de la longueur totale chez les femelles, permettent une meilleure détermination spécifique et une comparaison entre les spécimens de même espèce (Fig. 5, Tableau 3).

La détermination des espèces nématologiques a imposé le plus souvent le recours à plusieurs documents éparpillés dans la littérature scientifique : «check-list» de Gerlach et Riemann (1974; 1973) et plusieurs ouvrages (Platt et Warwick, 1983; Platt et Warwick, 1988; Warwick *et al.*, 1997).

Tableau 2: Principaux caractères morphologiques des nématodes et typologie permettant leur identification (Mouawad, 2005).

Caractères morphologiques	Typologie
Cuticule	- Lisse, striée, ponctuée - Ornementation homogène ou hétérogène
Proportion du corps	- Rapports a, b, c de De Man *
Soies sensorielles	- Nombre, longueur et arrangement
Amphides	- Forme (nombreuses variantes)
Cavité buccale	- Taille, présence ou absence de dents
Tube digestif	- Taille et forme du bulbe digestif
Système reproducteur	- Taille et forme des spicules et du gubernaculum - Présence ou absence des papilles précloacales

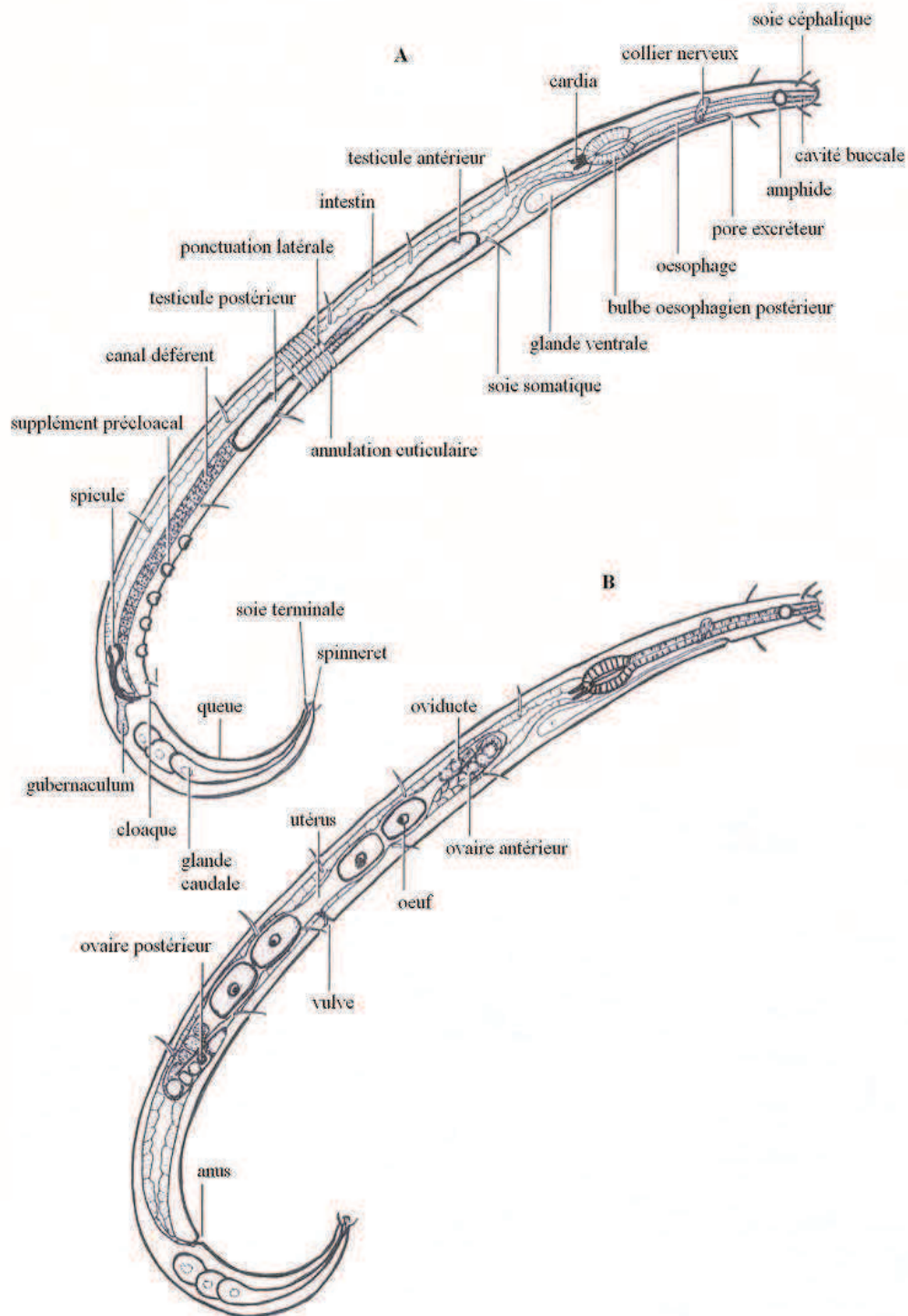


Fig. 5. Caractéristiques générales d'un nématode marin libre. A, vue latérale d'un mâle. B, vue latérale d'une femelle In Platt et Warwick (1983). A : mâle, B : Femelle.

Tableau 3: Mesures indispensables à la détermination d'une espèce de nématodes libres. * : mensurations indispensables (d'après Beyrem, 1999).

Sexe	Mâle	Femelle
Longueur totale (µm)	*	*
Diamètre maximal	*	*
Diamètre céphalique	*	*
Diamètre au niveau du cardia	*	*
Diamètre anal (A)	*	*
Longueur caudale (Q)	*	*
Longueur oesophagienne	*	*
Longueur du cardia	*	*
a : Longueur totale / Diamètre maximal	*	*
b : Longueur totale / Longueur oesophagienne	*	*
c : Longueur totale / Longueur caudale	*	*
Q / A : Longueur caudale / Diamètre anal	*	*
Longueur des spicules	*	
Longueur des spicules / Diamètre anal	*	
Longueur des spicules / Longueur caudale	*	
Nombre et position des papilles copulatrices	*	
Position de la vulve (%)		*
Position de l'amphide par rapport à l'extrémité antérieure	*	*
Largeur de l'amphide par rapport au diamètre correspondant	*	*
Largeur de l'amphide / Diamètre correspondant (%)	*	*
Nombre et disposition des soies céphaliques	*	*
Longueur des soies somatiques	*	*
Position du pore excréteur (%)	*	*
Position du collier nerveux	*	*

5.2.3. Indices de diversité et structure spécifique de la nématofaune

Plusieurs indices ont été utilisés pour évaluer la diversité spécifique des peuplements nématologiques :

- ✓ Dominance d'une espèce dans un microcosme donné :

$$D = \frac{\text{Nombre total d'individus de cette espèce dans un microcosme donné}}{\text{Nombre total de nématodes dans ce microcosme}}$$

- ✓ Richesse spécifique $d = \frac{S-1}{\text{Log}N}$ (Margaleff, 1957)

Avec :

S : Nombre total d'espèces recensées au sein du peuplement nématologique.

N : Nombre total d'individus présents dans l'échantillon.

- ✓ Indice de diversité de Shannon (H') (Shannon et Weaver, 1963) :

$$H' = - \sum \frac{n_i}{N} \text{Log}_2 \frac{n_i}{N} \text{ pour } i = 1 \text{ à } S$$

Avec :

S : nombre d'espèces

$\frac{n_i}{N}$: Abondance relative de l'espèce de rang i

n_i : effectif de l'espèce de rang i

N : effectif total

- ✓ Régularité ou équitabilité (Pielou, 1966) :

$$J' = \frac{H'}{\text{Log}_2 S}$$

Avec :

H' : indice de diversité de Shannon-Weaver

S : nombre total d'espèces de nématodes.

6. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES

6.1. Analyses univariées

La plupart des analyses statistiques des données suivent la méthode standard d'analyse des communautés décrites par Clarke (1993) et Clarke et Warwick (2001). Des indices d'analyses univariées ont été considérés : l'abondance nématologique totale (I), le nombre d'espèces (S), la diversité (indice de diversité de Shannon, H'), la richesse

spécifique (d) et l'équitabilité (J'). Ces indices ont été calculés pour chaque microcosme. Le test Anova à un critère de classification (Anova 1) ou le test de Kruskal-Wallis (en cas de non homogénéité des variances) ont été utilisés pour mettre en évidence une différence significative globale entre les différents microcosmes et ceci pour chacun des indices considérés. Les traitements montrant des différences significatives dans leurs indices par rapport au témoin ont été identifiés par le test de la différence significative de Tukey (Tukey HSD) utilisé dans des comparaisons multiples entre le microcosme témoin et ceux contaminés.

6.2. Analyses multivariées

Les analyses multivariées ont été effectuées avec le logiciel PRIMER (Clarke et Gorley, 2001). Le coefficient de similarité de Bray-Curtis (Bray et Curtis, 1957) a été utilisé pour construire la matrice de similarité entre les différents microcosmes. Le test d'analyse de similarités (ANOSIM) (Clarke, 1993) a été employé pour mettre en évidence l'existence d'éventuelles différences significatives entre les communautés dans les différents microcosmes traités. La procédure SIMPER (similarity percentages) a été utilisée pour déterminer la contribution de chaque espèce à la dissimilarité de Bray-Curtis moyenne entre le contrôle et les microcosmes traités. Pour l'analyse statistique de la structure des communautés de nématodes, les abondances relatives des nématodes ont été transformées avec $\arcsin(x^{0.5})$ pour obtenir une distribution normale des données (Legendre et Legendre, 1998). Les analyses multivariées des données ont été réalisées par le logiciel MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey Wales). Les analyses en composantes principales (ACP) ont permis de voir l'influence des HAPs et de différentes techniques de bioremédiation sur les communautés nématologiques.

Références bibliographiques

- Aïssa, P. (1991). Ecologie des nématodes libres de la lagune de Bizerte : dynamique et biocénotique, Vol. Thèse de doctorat d'état, Faculté des Sciences de Tunis, pp. 370.
- Aminot, A. et Chaussepied, M., (1983). Manuel des analyses chimiques en milieu marin, Centre National pour l'Exploitation des Océans. 395 p.
- Anras, L. & Guesdon, S. (2007). Hydrologie des marais littoraux – Mesures Physico-chimiques de Terrain. Collection "Marais Mode d'Emploi", Ed. *Forum des Marais Atlantiques*. 76.
- Baretta-Beakker, J. G., Duursma, E. K. & et Kuipers, B. R. (1992). *Encyclopodia of marine Science*. Springer.
- Ben Said, O., Goni-Urriza, M., El Bour, M., Aïssa, P. & Duran, R. (2010). Bacterial Community Structure of Sediments of the Bizerte Lagoon (Tunisia), a Southern Mediterranean Coastal Anthropized Lagoon. *Microbial Ecology*, **59**(3), 445-456.
- Ben Said, O., Goni-Urriza, M. S., El Bour, M., Dellali, M., Aïssa, P. & Duran, R. (2008). Characterization of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments, Tunisia. *Journal of Applied Microbiology*, **104**(4), 987-997.
- Bendschneider, K. & et Robinson R. J. (1965). A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res*, **23**(1), 57-96.
- Berg, P., Risgaard-Petersen, N. & Rysgaard, S. (1998). Interpretation of measured concentration profiles in sediment pore water. *Limnology and Oceanography*, **43**(7), 1500-1510.
- Beyers, S. C., E.L, M. & P.L., e. S. (1978). A comparaison of methods of determining organic carbon in marine sediments with suggestions for a standart method. *Hydrobiologia*, **58**(1), 43 -47.
- Beyrem, H. (1999). Ecologie des nématodes libres de deux milieux anthropiquement perturbés: la baie de Bizerte et le lac Ichkeul, Vol. Thèse doct. , Fac. Sci. Bizerte, pp. 297
- Bray, J. B. & Curtis, J. T. (1957). An ordination of the upland forest communities of Southern Wisconsin
Ecol. Monogr. , **27**, 325-349.
- Cheikh, M., Derouiche, A. & Driss, M. R. (2002). Détermination par (CPG-ECD) des résidus de pesticides organochlorés dans les sédiments de la lagune de Bizerte. *Bull. Inst.Natn. Sci. Tech. Mer.*, **7**, 160–163.
- Clarke, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, **18** 117-143.
- Clarke, K. R. & Gorley, R. N. (2001). *PRIMER v5 : User manual/tutorial*. PRIMER-E: Plymouth. UK.
- Clarke, K. R. & Warwick, R. M. (2001). *Changes in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*. . PRIMER-E: Plymouth, UK.

- De Bovee, F. (1981). Ecologie et dynamique des nématodes d'une vase sublittorale (Banyuls-Sur-Mer). Vol. Thèse doct. d'Etat., Univ. Pierre et Marie Curie. Paris pp. 302.
- De Man J. G., 1876. Contribution à la connaissance des nématodes marins du Golfe de Naples. Tijdschrift der Nederlandsche Dierkundige Vereeniging. Deel III: 88-118.
- De Man J. G., 1888. Sur quelques nématodes libres de la mer du Nord, nouveaux ou peu connus. Mém. Soc. zool. Fr., 1: 1-51.
- De Man J. G., 1890. Quatre note sur les nématodes libres de la mer du Nord et de la Manche.) Bull. Soc. Zool. Fr. 3: 169-194
- De Man J. G., 1907. Sur quelques espèces nouvelles ou peu connues de nématodes libres habitant les cotes de la Zélande Bull. Soc. Zool. Fr., 20: 33-90
- De Man J. G., 1922. Neue freilebende Nematoden aus der Zuidersee. Tijdschr. ned. dierk.Vereen. (2), 18: 124-134
- De Man J.G., 1888. Sur quelques nématodes libres de la mer du Nord, nouveaux ou peu connus. Bull. Soc. Zool. Fr., 1: 1-51
- Duhamel, S. & Jacquet, S. (2006). Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *Journal of Microbiological Methods*, **64**(3), 316-332.
- Espitalie, J., G., D. & et Marquis F. (1986). La pyrolyse Rock-Eval et ses applications. . Institut français du pétrole.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M. & Rossi, P. (2002). Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, **4**(11), 634-643.
- Gerlach, S. A. & et Riemann, F. (1974). The Bremerhaven Check-list of aquatic Nematodes. *Inst. Meeresforsch. Bremerh*, **4** (2), 405-734.
- Gerlach, S. A. & et Riemann, F. (1973). The Bremerhaven Check-list of aquatic Nematodes. *Inst. Meeresforsch. Bremerh*, **4** (1), 1-404.
- Guo, Y., Somerfield, P. J., M., W. R., et Zhang Z. & (2001). Large-scale patterns in the community structure and biodiversity of free living nematodes in the Bohai Sea, China. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **81** 755-763.
- Internet [1] : <http://fr.wikipedia.org/wiki/Meiofaune>.
- 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**(7), 2637-2643.
- Kotta, J. & Boucher, G. (2001). Interregional variation of free-living nematode assemblages in tropical coral sands. . *Cah. Biol. Mar.*, (42), 315-326.
- Louiz, I., Ben-Attia, M. & Ben-Hassine, O. K. (2009). Gonadosomatic index and gonad histopathology of *Gobius niger* (Gobiidea, Teleost) from Bizerta lagoon (Tunisia): Evidence of reproduction disturbance. *Fisheries Research*, **100**(3), 266-273.
- Louiz, I., Kinani, S., Gouze, M. E., Ben-Attia, M., Menif, D., Bouchonnet, S., Porcher, J. M., Ben-Hassine, O. K. & Ait-Aissa, S. (2008). Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays: Contribution of low concentrations of

- polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Science of the Total Environment*, **402**(2-3), 318-329.
- Mahmoudi, E., Essid, N., Beyrem, H., Hedfi, A., Boufahja, F., Vitiello, P. & Aïssa, P. (2005). Effects of hydrocarbon contamination on a free living marine nematode community: Results from microcosm experiments. *Marine Pollution Bulletin*, **50**(11), 1197-1204.
- Mouawad, R. (2005). Peuplements de nématodes de la zone littorale des côtes du Liban., Vol. Thèse de Doctorat Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II), pp. 234 p.
- Murphy, J. & et Riley, J. P. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water. *Anal. Chim. Acta*, **27**, 31-36.
- OMS. (1995). Recommandations pour la surveillance sanitaire des zones côtières à usage récréatif et des zones conchylicoles (Partie II & III). Programme à long terme de surveillance continue et de recherche en matière de pollution de la mer Méditerranée (MED/POL phase II & III).
- Platt, H. M. & Warwick, R. M. (1983). *Free living marine nematodes. Part I. British Enoplids. Synopses of the British Fauna no 28.* . Cambridge University Press, Cambridge.
- Platt, H. M. & Warwick, R. M. (1988). *Free living marine nematodes. Part II. British Chromadorids. Synopses of the British Fauna no 38.* E.J Brill, Leiden.
- Prasanna, D., Mohan, S. V., Reddy, B. P. & Sarma, P. N. (2008). Bioremediation of anthracene contaminated soil in bio-slurry phase reactor operated in periodic discontinuous batch mode. *Journal of Hazardous Materials*, **153**(1-2), 244-251.
- Ramade, F. (1982). *Eléments d'écologie, écologie appliquée « action de l'homme sur la biosphère »* Ed. Mc Graw-Hill.,. 452
- Rasmussen, H. & Jorgensen, B. B. (1992). Microelectrode Studies of Seasonal Oxygen-Uptake in a Coastal Sediment - Role of Molecular-Diffusion. *Marine Ecology-Progress Series*, **81**(3), 289-303.
- Revsbech, N. P. (2005). Analysis of microbial communities with electrochemical microsensors and microscale biosensors. In *Environmental Microbiology*, Vol. 397, Elsevier Academic Press Inc. San Diego, pp. 147-166.
- Schratzberger, M. & Warwick, R. M. (1998). Effects of intensity and frequency of organic enrichment on two estuarine nematode communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **164** 83 - 94.
- Internet [1] : www.earth.google.com/
- Strickland, J. D. H. & et Parson, S. (1965). A manual of sea water analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Canada*, **125**, 1-203.
- Trabelsi, S. & Driss, M. R. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons in superficial coastal sediments from Bizerte Lagoon, Tunisia. *Marine Pollution Bulletin*, **50**(3), 344-348.
- Vitiello, P. & Aïssa, P. (1985). Structure des peuplements de nématodes en milieu lagunaire pollué. *110 ème Congr. Natio. Socié. Savan*, Montpellier. Sciences 115 - 126.

- Vitiello, P. & Dinet, A. (1979). Définition et échantillonnage du méiobenthos. . *Rapp. Comm. int. Explr. Scient. Mer Méd.* 279-283.
- Walter, P., Harmut, H. & Bernhard, M. (1997). Suspended particulate matter budget for the German bight. *Marine Pollution Bulletin* **34**(6), 398-409.
- Warwick, R. M., Platt, H. M. & Somerfield, P. J. (1997). *Free-living marine nematodes. Part III. British monohysterids.* . Field Studies Council, Shrewsbury.
- Wood, E. D., Armstrong, F. A. J. et Richards, F. A., (1967). Determination of nitrates in sea water by cadmium-copper reduction of nitrites. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **47**, 23-31.
- Yoshida, M., Hamadi, K. & Ghrabi, A. (2002). Solid waste landfills and soil/sediment contamination around Bizerte lagoon: Possible pollution sources. In: Ghrabi A., Yoshida M. (eds) Study on Environmental Pollution of Bizerte Lagoon. *INRST-JICA Publishers*, 55 p.
- Yu, K. S. H., Wong, A. H. Y., Yau, K. W. Y., Wong, Y. S. & Tam, N. F. Y. (2005). Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Marine Pollution Bulletin*, **51**(8-12), 1071-1077.

CHAPITRE III

EFFETS D'UNE SEULE MOLECULE DE HAP

CHAPITRE III : EFFETS D'UNE SEULE MOLECULE DE HAP

Partie A : APPLICATION A DES SEDIMENTS CONTAMINES PAR UNE FAIBLE DOSE D'ANTHRACENE

I. INTRODUCTION

La présence dans les sédiments marins de micropolluants ubiquistes et persistants comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) pose de réels problèmes environnementaux (Choi et Oris, 2003). En effet, leur transformation et (ou) leur élimination dans le milieu marin apparaissent d'autant plus difficiles que ces derniers montrent une certaine résistance à la dégradation par les bactéries indigènes en raison de leur faible biodisponibilité et de leur toxicité vis-à-vis de nombreux microorganismes (Maciorowski *et al.*, 1980; El-Alawi *et al.*, 2002). Ainsi, depuis plusieurs années, de nombreux travaux se sont intéressés à évaluer la toxicité des HAPs sur les organismes benthiques et à proposer des méthodes efficaces de décontamination de sites pollués par des techniques de biorémediation (Miyasaka *et al.*, 2006). Cependant, très peu d'études se sont intéressées à la toxicité de l'anthracène sur les bactéries bien que ce composé soit omniprésent dans l'environnement aquatique et signalé comme premier HAP connu par sa photo-toxicité pour les bactéries luminescentes (Bowling *et al.*, 1983). Plusieurs travaux réalisés en Méditerranée ont montré que les sédiments y sont contaminés par les HAPs (Louati *et al.*, 2001; Ben Said *et al.*, 2010) mais aucun d'entre eux n'a été consacré au suivi de l'effet de l'anthracène sur les communautés des nématodes libres qui constituent un outil biologique pertinent dans la biosurveillance des écosystèmes côtiers (Mahmoudi *et al.*, 2005 ; Gyedu-Ababio et Baird, 2006).

La première partie de ce travail sera consacrée à l'impact d'une contamination sédimentaire par l'anthracène à faible dose (1ppm) sur l'activité à l'interface eau-sédiment (microélectrodes à oxygène), la biomasse (cytométrie en flux) et la diversité (T-RFLP) des communautés bactériennes de la lagune de Bizerte. La biorémediation a été réalisée par biostimulation par ajout d'éléments nutritifs (70 mg.kg⁻¹ NaNO₃ ; 35

mg.kg⁻¹ KH₂PO₄) et également par combinaison de la biostimulation à la bioaugmentation, en utilisant une souche bactérienne (*Acinetobacter* sp.) capable de dégrader les HAPs, isolée à partir des sédiments contaminés de la lagune de Bizerte (Ben Said *et al.*, 2008). Ces travaux ont conduit à la rédaction d'une publication (P1) intitulée «**Microbial community responses to bioremediation treatments for the mitigation of low-dose anthracene in marine coastal sediments of Bizerte lagoon (Tunisia)** » publiée par Environmental Science and Pollution Research (2013, 20 :300-310).

Ensuite, nous mettrons l'accent sur l'impact de l'anthracène à faible dose (1ppm) afin de comparer trois stratégies de bioremédiation : la biostimulation par ajout de sels nutritifs, la bioaugmentation par utilisation d'une souche bactérienne capable de dégrader les HAPs isolées de ces mêmes sédiments (Ben Said *et al.*, 2008) et la combinaison de la biostimulation et de la bioaugmentation. L'objectif de cette deuxième partie était d'évaluer les effets de la bioremédiation sur les nématodes libres marins en termes de densités et de composition spécifique. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article (P2) intitulé «**Impacts of bioremediation schemes for the mitigation of a low-dose anthracene contamination on free-living marine benthic nematodes**» qui a été soumis pour publication à la revue Ecotoxicology.

L'objectif de cette partie A était donc de simuler au mieux les conditions observées *in situ* pour la contamination des sédiments par cette molécule d'HAP afin d'appréhender les effets d'une faible dose d'anthracène sur les bactéries et les nématodes en termes de biomasse, densité et structure. Les sédiments de la lagune de Bizerte présentent une faible contamination par l'anthracène et ce même dans les zones polluées (Mzoughi *et al.*, 2002; Trabelsi et Driss 2005; Louiz *et al.*, 2008). Ils constituent donc une matrice de choix pour ce genre d'études.

Références bibliographiques

- Ben Said O, Goni-Urriza MS, El Bour M, Dellali M, Aissa P, Duran R (2008). Characterization of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments, Tunisia. *J Appl Microbiol*, **104**, 987-997.
- Ben Said O, Goni-Urriza M, El Bour M, Aissa P, Duran R (2010). Bacterial Community Structure of Sediments of the Bizerte Lagoon (Tunisia), a Southern Mediterranean Coastal Anthropized Lagoon. *Microb Ecol*, **59**, 445-456
- Bowling JW, Leversee GJ, Landrum PF, Giesy JP (1983). Acute Mortality of Anthracene-Contaminated Fish Exposed to Sunlight. *Aquat Toxicol*, **3**, 79-90.
- Choi, J., et Oris, J.T. (2003). Assessment of the toxicity of anthracene photo-modification products using the topminnow (*Poeciliopsis lucida*) hepatoma cell line (PLHC-1). *Aquatic Toxicology* (Amsterdam, Netherlands), **65**(3): 243-251. doi:10.1016/S0166-445X(03)00139-5. PMID: 13678844.
- Coulon F., Boyd oyd A. McKew, A. Mark Osborn, Terry erry J. McGenity McGenity and Kenneth N. Timmis. (2006). Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environ. Microbio*, **10**, 1462-2920.
- El-Alawi YS, McConkey BJ, Dixon DG, Greenberg BM. (2002). Measurement of short- and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria. *Ecotox Environ Safe*, **51**, 12-21.
- Gyedu-Ababio TK, Baird D (2006). Response of meiofauna and nematode communities to increased levels of contaminants in a laboratory microcosm experiment. *Ecotox Environ Safe*, **63**, 443-450.
- Maciorowski, A.G., Sims, J.L., Little, L.W., et Gerrard, V. (1980). Bioassays: Procedures and results. *Journal - Water Pollution Control Federation*, **53**, 974-993.
- Mahmoudi, E., Essid, N., Beyrem, H., Hedfi, A., Boufahja, F., Vitiello, P. & Aissa, P. (2005). Effects of hydrocarbon contamination on a free living marine nematode community: Results from microcosm experiments. *Marine Pollution Bulletin*, **50**(11), 1197-1204.
- Mills, M.A., Bonner, J.S., Page, C.A., Autenrieth, R.L. (2004). Evaluation of bioremediation strategies of a controlled oil release in a wetland. *Marine Pollution Bulletin*, **49**, 425-435.
- Miyasaka T, Asami H, Watanabe K. (2006). Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene-contaminated marine sediments. *Biodegradation*, **17**, 227-235
- Mzoughi N, Hellal F, Dachraoui M, Villeneuve J.P, Cattini C, Stephen J.M, El Abeda A. (2002). Méthodologie de l'extraction des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Application à des sédiments de la lagune de Bizerte (Tunisie). *Geoscience*, **334**, 893-901.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA Invitro - the polymerase chain-reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **51**, 263-273.

- Louati, A., Elleuch, B., Kallel, M., Saliot, A., Dagaut, J. & Oudot, J. (2001). Hydrocarbon contamination of coastal sediments from the Sfax area (Tunisia), Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*, **42**(6), 445-452.
- Louiz I, Kinani S, Gouze ME, Ben-Attia M, Menif D, Bouchonnet S, Porcher JM, Ben-Hassine OK, Ait-Aissa S (2008) Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays: Contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Sci Total Environ*, **402**, 318-329.
- Riser-Roberts, E. (1998). Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes. Lewis Publishers, Boca Raton. p. 5-313.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saito A, Iwabuchi T, Harayama S. (2000). A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioide* sp. strain KP7: expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **182**: 2134-41.
- Samanta, S. K., Singh, O. V. & Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, **20**(6), 243-248.
- Soclo, H. H., Garrigues, P. & Ewald, M. (2000). Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: Case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Marine Pollution Bulletin*, **40**(5), 387-396.
- Schizas NV, Street GT, Coull BC, Chandler GT, Quattro JM (1997) An efficient DNA extraction method for small metazoans. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* **6**: 381-383.
- Schäfer, H., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P., Pukall, R. (2001). Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiol Ecol.* **34**: 243-253.
- Trabelsi, S. & Driss, M. R. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons in superficial coastal sediments from Bizerte Lagoon, Tunisia. *Marine Pollution Bulletin*, **50**(3), 344-348.

I. PUBLICATION 1:

**MICROBIAL COMMUNITY RESPONSES TO BIOREMEDIATION
TREATMENTS FOR THE MITIGATION OF LOW-DOSE ANTHRACENE IN
MARINE COASTAL SEDIMENTS OF BIZERTE LAGOON (TUNISIA)**

Hela Louati^{a, c}, Olfa Ben Said^{a, b}, Patrice Got^c, Amel Soltani^{a, b}, Ezzeddine Mahmoudi ^a,
Cristiana Cravo-Laureau^b, Robert Duran^b, Patricia Aissa^a & Olivier Pringault^c

Published in: **ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH**

^a Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement, Faculté des Sciences de Bizerte-Tunisie.

^b Equipe Environnement et Microbiologie – UMR CNRS IPREM 5254- IBEAS- Université de Pau et des Pays de l'Adour - France.

^c Laboratoire Ecosystèmes Marins Côtiers, UMR 5119 CNRS-UM2-IFREMER- IRD-ECOSYM, Station Méditerranéenne de l'Environnement Littoral, 2, rue des chantiers, 34200 Sète, FRANCE.

Abstract

Purpose

The main goals of this study were to investigate i) the behavior of microbial communities in response to low dose bioavailable anthracene addition in lightly contaminated sediment from Bizerte Lagoon and ii) the effects of bioremediation treatments on microbial biomass, activity and community structure.

Methods

Sediment microcosms amended with 1 ppm anthracene were incubated in triplicate during 30 days. Biostimulation (addition of nitrogen and phosphorus fertilizer), and bioaugmentation (inoculation of a hydrocarbonoclastic bacterium) were used as bioremediation treatments. Bacterial biomass was estimated using flow cytometry. Sediment oxygen consumption was measured with oxygen microelectrodes. Bacterial community structure was assessed by molecular fingerprints (T-RFLP) analysis.

Results

Anthracene contamination resulted in a significant reduction of bacterial abundance with an impact on cell integrity. Concomitantly, sediment oxygen consumption was strongly inhibited. Correspondence analysis on T-RFLP data indicated that bacterial community structures from anthracene contaminated microcosms were different from that of the control. Interestingly, the changes observed in microbial biomass, structure and activities as a result of anthracene contamination were not alleviated even with the use of biostimulation and combination of biostimulation and bioaugmentation strategy for anthracene bioremediation. Nevertheless, both treatment methods resulted in different community structures relative to the contaminated and control microcosms with the appearance of distinct populations.

Conclusion

Anthracene spiking severely affected the microbial communities, suggesting dominance of non tolerant populations in this lightly contaminated sediment. Although biostimulation and/or bioaugmentation treatments did not alleviate the anthracene toxic effects, the changes observed in microbial population and structure suggest that the proposed treatments might be promising to promote bacterial growth. Further works are still required to propose a more efficient strategy to stimulate biodegradation that takes into account the complex interactions between species for resource access.

1. Introduction

Pollution of coastal marine ecosystems by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) is a ubiquitous environmental problem (Tam et al. 2001). Polycyclic aromatic hydrocarbons are present in petroleum and formed during the incomplete combustion of almost any organic material (Atagana 2006). These compounds are considered hazardous because of their cytotoxic, mutagenic, and carcinogenic effects (Samanta et al. 2002). Petroleum hydrocarbons have been shown to affect life-history parameters (Bridges et al. 1994) and immune systems (Tahir et al. 1993) of benthic organisms, as well as the structure of entire benthic communities (Nance 1991). Significant toxicological effects of PAHs on macrobenthic organisms have been observed at concentrations below 1 mg-PAH/kg dry sediment (e.g. Long 1992), while in polluted sediments meio- and microbenthic communities were not significantly influenced by the addition of sublethal concentration of PAHs (0.3- 3 mg kg⁻¹) (Carman et al. (1995). Similarly, PAHs have been found to exhibit rather low toxicity toward sediment microbial activity (Myers et al. 1994), even at high concentrations (Bauer and Capone 1985).

Anthracene belongs to anthropogenic pollutants recommended for investigations by the US Environmental Protection Agency (Dabestani and Ivanov 1999) because of its high toxicity and wide occurrence in the environment. Anthracene is a three fused aromatic rings PAH, present in terrestrial and aquatic ecosystems primarily as a result of run-off from former wood-treating operations and coal gasification plants, and as a result of other types of petrochemical pollution (Brenner et al. 2002, Mueller et al. 1989). Anthracene was the first PAH for which phototoxicity was reported in aquatic systems (Bowling et al. 1983) and anthracene has been used as a representative phototoxic PAH (Kochevar et al. 1982). This molecule is known to be phototoxic to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* (El-Alawi et al. 2001, McConkey et al. 1997). Nevertheless, growth and activities of the bacterium were not affected by addition of photomodified or intact anthracene for concentrations up to 4 mg L⁻¹ (El-Alawi et al. 2002).

Bioremediation has been recognized as an attractive decontamination strategy for a variety of polluted environments. The degradation of PAH by microorganisms depends to a large extent on their molecular weights among many other factors (Weissenfels et al. 1990). Two major bioremediation schemes have been proposed, biostimulation and bioaugmentation (Miyasaka et al. 2006). Biostimulation is defined as addition of various forms of rate limiting nutrients and electron acceptors such as phosphorus, nitrogen,

oxygen, or carbon in order to increase the population or activity of naturally occurring microorganisms available for bioremediation. Bioaugmentation is the addition, to the polluted environment, of microorganisms that can biotransform or biodegrade contaminants. The added microorganisms can be new for the environment or already observed on site. These techniques of bioremediation provided contrasting results in PAH biodegradation depending on the type of PAH and the sediment composition (Yu et al. 2005).

Polycyclic aromatic compounds are hydrophobic and readily adsorbed onto particulate matter, therefore, sediments represent the ultimate sinks and elevated concentrations have been recorded in coastal environments (Hughes et al. 1997, James 2002). As many Mediterranean coastal lagoons, the Bizerte lagoon (Tunisia) is a polluted ecosystem subject to both urbanization and industrialization (cement works, metallurgical industry, boatyard, tire production factories), as well as naval and commercial shipping harbors. Runoff and discharges of urban and industrial wastes lead to significant pollution of sediments by anthracene and others PAHs (Louiz et al. 2008, Trabelsi and Driss 2005), pollution that promotes to the co-selection of strains able to cope with multiple contaminants (Ben Said et al. 2010). The aim of the present study was firstly to investigate the behavior of microbial communities in response to low dose bioavailable anthracene addition (1ppm) in lightly contaminated (4ppm) sediment from Bizerte Lagoon. Secondly, the effect of bioremediation treatments on microbial biomass, activity and community structure was investigated. Bioremediation schemes tested included biostimulation and the combination of biostimulation and bioaugmentation by the inoculation of a marine PAH-degrading bacterium, *Acinetobacter* sp., previously isolated from Bizerte lagoon sediment.

2. Materials and methods

2.1. Site description and sampling

Bizerte lagoon, the third important lagoon in Tunisia, is located in an economically important area in the north Tunisia (Fig. 1). It is a 150 km² surface area depression known for its geostrategic position since it is connected to the Mediterranean Sea by a straight channel (Louiz et al. 2009). Sediment was collected by scuba diving from one site (Echaraà) located in the low contaminated part of the lagoon (Ben Said et al. 2010, Trabelsi and Driss 2005). Handcores of 10 cm² were used to a depth of 15 cm to transfer

sediment into a bucket. On return to the laboratory, sediments were homogenized by gentle hand stirring with a large spatula before microcosm setup and contamination. Buckets and spatula were all acid rinsed before use.

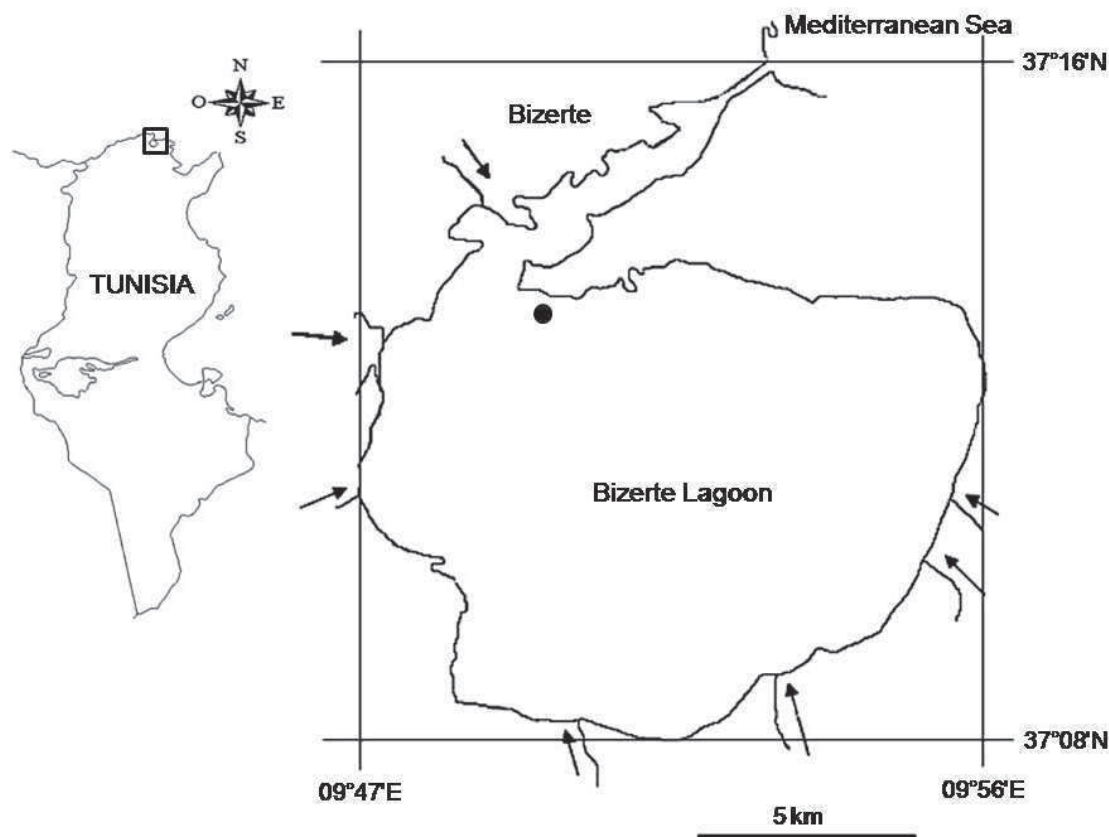


Fig.1. Map of the Bizerte lagoon (Northern Tunisia) with the (●) sampling site (Echaraà). Arrows indicate streams.

2.2. Microcosm set-up

Microcosms consisted of 1600 ml glass bottles. One control and three treatments were set up. Contaminated microcosms (C) were gently filled with 200 g (wt) of homogenized sediment (100 g of natural sediment and 100 g contaminated sediment) topped up with 1L of filtered (1 μ m) natural lagoon water at 30 PSU. Sediment used for contamination was first alternately frozen (-80°C) and thawed three times to defaunate it (Gyedu-Ababio and Baird 2006), and then it was wet sieved to remove the larger particles (>63 μ m). Stock solution of high purity anthracene (100 mg L⁻¹) (Sigma-Aldrich Chemical A8, 920-0), was dissolved in acetone. Next, 2 ml of the anthracene solution was added into the sediment slurry and shaken overnight to let the PAH adsorbed onto the sediments. Final concentration of anthracene in sediment was 1 ppm. Control consisted of uncontaminated and defaunated sediment (T). Each bottle was stoppered with a rubber

bung with two holes and aerated via an air stone diffuser. Air flux was filtered on 0.2 µm to prevent contamination. All microcosms were performed in triplicates and incubated for 30 days in laboratory at room temperature (20-22°C).

Bioremediation treatments were started one day after anthracene contamination. Biostimulation (**CBS**) was achieved by amending two types of slow-release particle fertilizers 70 mg kg⁻¹ of nitrogen fertilizer (NaNO₃) and 35 mg kg⁻¹ of phosphorus fertilizer (KH₂PO₄) using the protocol of Jacques et al (2008). Biostimulation-Bioaugmentation (**CBS + BA**): was achieved by adding the bacterium *Acinetobacter* sp strain isolated from Bizerte polluted sediments (Ben Said et al. 2008). The strain was previously grown in 50 ml of LB Broth. After 1-week cultivation, cells were harvested by centrifugation at 10,000 g for 15 min at 4°C. Cells were suspended in nutrient solution and introduced into the microcosms previously amended with nutrients (nitrogen and phosphorus fertilizer). The initial inoculum was 5.30 × 10⁸ cell ml⁻¹. After bacterium inoculation and nutrient addition, sediment was agitated for half an hour for homogenization.

2.3. Flow Cytometry measurements

The method of bacteria extraction from sediment was derived from the protocol of Duhamel and Jacquet (2006). Sediment samples (1 g wet wt) were fixed with formalin (2% final concentration) then 5 µl Tween 80 (10%) +1 ml sodium pyrophosphate solution (10 mM) + 4 ml MilliQ water were added. The samples were then sonicated 3 times for 1 min in a water bath and shaken manually after every minute. The samples were then centrifuged 1 min (800 ×g), filtrate supernatant on a 5 µm membrane and were diluted in TE-buffer 490 µl TE (pre-filtered across 0.02 µm). For the enumeration of heterotrophic bacteria, cells were stained with the nucleic acid stain SYBR Green I (Marie et al. 1997). Working stocks of SYBR Green I (10⁻³ of the commercial solution, Molecular Probes) were freshly prepared on the day of analysis and then 2.6% at final concentration of work solution was used to stain bacteria sample incubated at 4°C for 15 min before analysis. The stained bacterial cells, excited at 488 nm, were enumerated using side scatter (SSC) and green fluorescence (FL1) at 530 nm. Fluorescent beads (1µm and 2 µm, Polysciences, Inc., War- rington, PA, USA) were added to each sample as an external standard. True count beads (Becton Dickinson, San Jose, CA) were added to determine the volume analyzed. Samples were analyzed with a FACSCalibur flow

cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), equipped with a 15mW argon ion laser emitting at 488 nm for excitation. Data analyses were carried out with CellQuest Pro 5 software obtained from BD Biosciences (San Jose, CA, USA).

2.4. Oxygen microsensor measurements

2.4.1. Oxygen microsensor

Oxygen concentration was measured using a Clark type oxygen microelectrode (Revsbech 1989) manufactured by Unisense (Denmark). These Clark-type oxygen microsensors are largely used in microbial ecology studies and contain a guard electrode to prevent internal oxygen consumption (Revsbech 2005). The electrode had a 90% response time lower than one second and a stirring sensitivity of 1%. Oxygen microprofiles were performed with a depth resolution of 100 µm using a motor-driven micromanipulator. The oxygen microprobe was manually positioned at the sediment surface, profiling and data acquisition were then controlled by computer. Linear calibration of the microprobe was determined from the electrode readings in air-saturated water above the sediment and in the anoxic part of the sediment. Oxygen concentration in air-saturated water was calculated from the solubility equation according to Garcia and Gordon (1992).

2.4.2. Diffusive oxygen flux calculation

Diffusive oxygen fluxes (J) were calculated from the steady-state oxygen profiles using Fick's first law of one-dimensional diffusion, written as (Eq. 1):

$$J = -D_o \times \frac{\delta C(z)}{\delta z}$$

where D_o denotes the oxygen diffusion coefficient in water (Broecker and Peng 1974), C is the oxygen concentration, z is the depth and $\delta C(z) / \delta z$ the oxygen gradient in the diffusive boundary layer. Sediment oxygen consumption (SOC) was estimated from O_2 flux in the diffusive boundary layer according to Rasmussen and Jorgensen (1992). Depth profiles of SOC were estimated by using the software PROFILE (Berg et al. 1998). In this procedure the rate of net consumption as a function of depth was calculated from steady-state oxygen microprofiles. The procedure is based on a series of least square fits of the second Fick's law to the measured steady-state oxygen profiles, followed by comparisons of these fits through statistical F-testing. Thus, the simplest consumption

profiles are objectively selected, which reproduce the measured concentration profiles within the chosen statistical accuracy. More details of the procedure can be found in Berg et al. (1998).

Porosity (ϕ) in the top millimeters was assumed to be constant and equal to 0.8. Sedimentary diffusion coefficient (D_s) was estimated from the diffusion coefficient in water (D_o) according to the relation of Ullman and Aller (1982) (Eq.2):

$$D_s = \phi^2 \times D_o$$

For each microcosm, SOC vertical profiles were based on three oxygen microprofiles that were measured after 4 days and 30 days of incubation.

2.5. T-RFLP Analysis

Mixed community DNA was extracted directly from sediment microcosms using an Ultra Clean® Microbial DNA Isolation DNA Kit (MoBio Laboratories, CA) by following the manufacturer's protocol. Genes encoding 16S rRNA were PCR amplified from extracted samples using primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1489R (5'-TACCTTGTTACGACTTCA-3'). Primer 8F was fluorescently labeled with TET (5-Tetrachloro-fluorescein E.S.G.C.; Cybergene Group, France). PCR and T-RFLP analysis were carried out as described previously (Ben Said et al. 2010) using the Taq DNA polymerase (Eurobio). The fluorescent PCR products were cleaned using GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham-Pharmacia) and 10 μ L of purified product was digested separately with 3U of enzyme HaeIII and HinfI for 3 h at 37 °C (New England Biolabs). One microlitre of restriction digests were then mixed with 20 μ L of deionized formamide and 0.5 μ L of a TAMRA-labelled Gene scan 500 bp internal size standard (Applied Biosystems), denatured for 5 min at 95 °C and immediately transferred to ice. Samples were loaded onto an ABI PRISM 310 automated genetic analyser (Applied Biosystems). T-RFLP profiles (T-RFs) were aligned by identifying and grouping homologous fragments and normalized by calculating relative abundances of each terminal-restriction fragment (T-RFs) from height fluorescence intensity of each T-RF as described in Pringault et al. (2008). For statistical analysis, T-RF heights of the three microcosm replicates were averaged.

2.6. Statistical analysis

One-way analysis of variance (ANOVA or Kruskal-Wallis tests) was used to test for overall differences between controls and treatments and the Tukey HSD multiple comparisons test was used in pairwise comparisons of treatments and control. In all the above statistical significance, testing a significant difference was assumed when $p < 0.05$. For the statistical analysis of bacterial community structure, relative abundances of T-RFs have been transformed with $\arcsin(\sqrt{x})$ according to Legendre and Legendre (1998) to get a normal distribution of the data. Correspondence Analyses (CA) were then performed with MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey Wales).

3. Results

3.1. Bacterial abundance

Anthracene spiking resulted in significant differences in the benthic bacterial abundances relative to the control microcosms (Fig.2). After 30 days of incubation, bacterial abundance in T microcosms averaged $4.57 \pm 0.89 \times 10^7$ cells cm^{-3} . Anthracene contamination had a strong impact on bacterial biomass which was significantly reduced in all contaminated microcosms. In C microcosms, bacterial abundance ($1.56 \pm 0.31 \times 10^7$ cells cm^{-3}) was almost three times lower than in T microcosms. Similar strong reduction was observed for CBS and CBS+BA microcosms. Interestingly, biostimulation (CBS) and biostimulation coupled with bioaugmentation (CBS + BA) resulted in similar ($p < 0.05$) bacterial biomass relative to the C microcosms ($1.79 \pm 0.69 \times 10^7$ cells cm^{-3} and $1.89 \pm 0.73 \times 10^7$ cells cm^{-3} , respectively) (Fig.2).

The cytograms of the T microcosms clearly showed three distinct populations on the basis of Nucleic Acid content (NA) and the side scatter: NA1 ($82 \pm 4\%$), NA2 ($10 \pm 3\%$) and NA3 ($8 \pm 3\%$), with a positive growth (Fig. 3). Anthracene contamination resulted in the strong reduction of NA2 ($3 \pm 2\%$), indicating inhibition of the bacterial growth for this population. Interestingly, biostimulation as well as combination of biostimulation and bioaugmentation resulted in similar cytograms as those observed in C microcosms with dominance of two distinct populations (NA1 and NA3). Nevertheless, in CBS and CBS+BA microcosms two sub-populations were observed in NA1, suggesting the presence of different populations as compared with the C microcosms. In addition, in all

contaminated microcosms the cytograms revealed high concentration of organic matter, indicating cell lysis induced by anthracene addition.

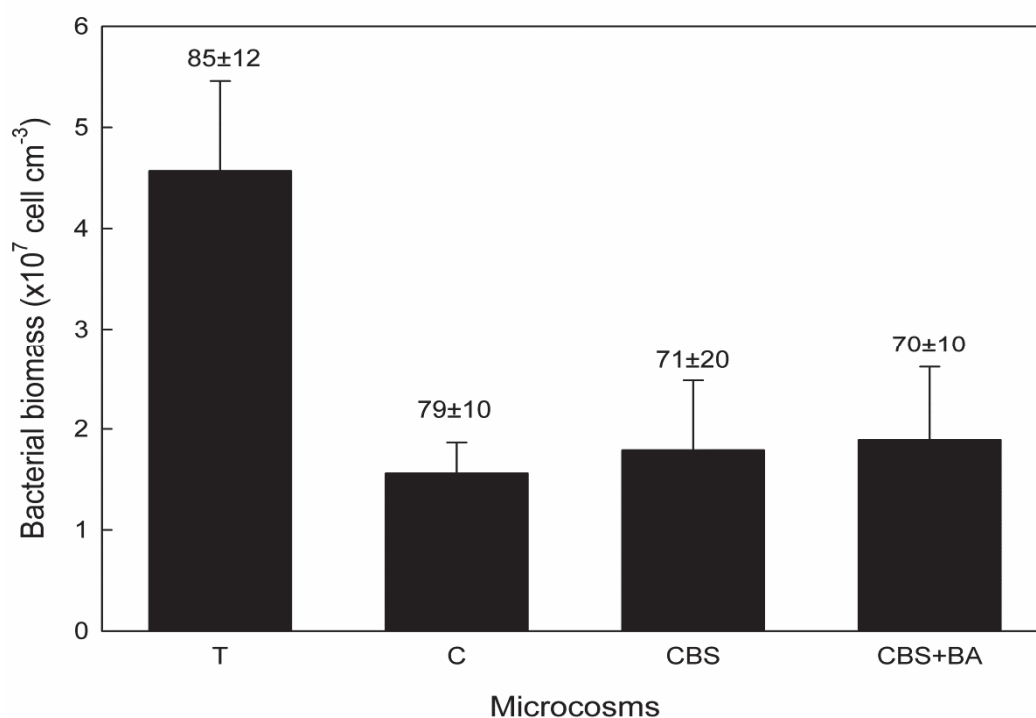


Fig. 2. Bacterial abundance (average $\pm$ standard deviation) counted by flow cytometry in the sediment of different microcosms (T: uncontaminated, C: contaminated, CBS: biostimulation, CBS + BA: biostimulation and bioaugmentation). Numbers indicate the average number ($\pm$ standard deviation) of T-RFs observed in each microcosm.

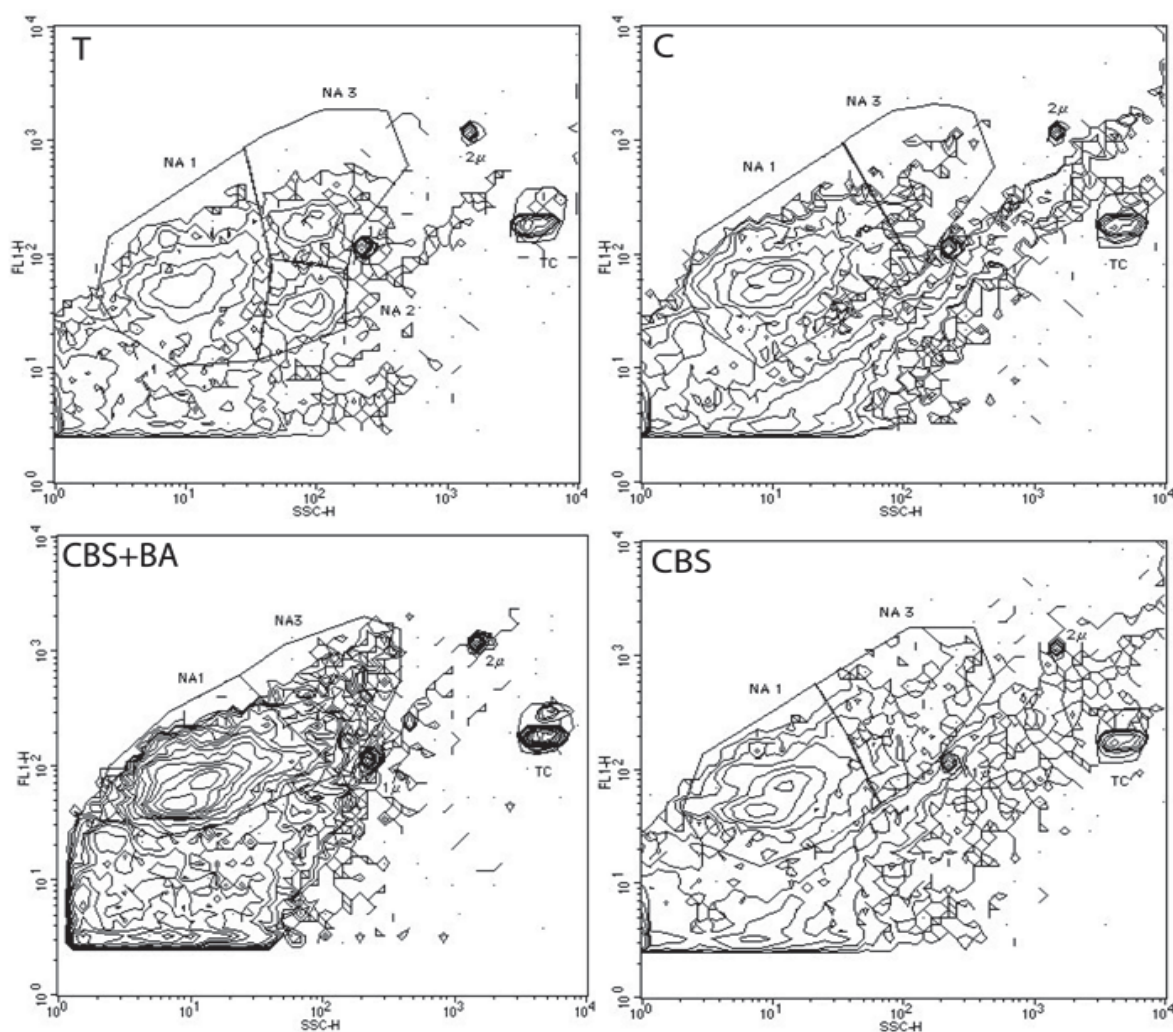


Fig. 3. Cytograms in contour plot of bacterial populations in the different treatments (T: uncontaminated, C: contaminated, CBS: biostimulation, CBS + BA: biostimulation and bioaugmentation). The abscissa indicates the fluorescence intensity (FL 1) of cells stained with SYBR Green I. The ordinate indicates the relative granularity (SSC) of cells. 1 and 2 μ m= calibration beads; TC = Trucounts; NA: Nucleic Acid.

3.2. Sediment Oxygen Consumption

Oxygen consumption was measured 4 days after the microcosm settlement and after 30 days of incubation. At the beginning of the experiment, maximum oxygen penetration ranged from 0.22 to 0.38 cm, maximum penetration was observed in CBS+BA microcosms whereas minimum were observed in T microcosms (Fig. 4). Sediment oxygen consumption profiles were relatively similar in all microcosms, with a maximum value observed at the sediment surface and a second peak at the maximum oxygen penetration corresponding to the oxygen demand for the oxidation of reduced compounds. Sediment oxygen consumption rates (Fig.5A) were similar in all microcosms with average rate of $1.25 \text{ nmol} \pm 0.28 \text{ O}_2 \text{ cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$. After 30 days of incubation, oxygen penetrated deeper in the sediment irrespective of the treatment. In T microcosms, the maximum oxygen penetration averaged 0.6 cm, while for all contaminated microcosms oxygen penetration was significantly ($p < 0.05$) higher reaching 0.8 cm (Fig. 4). No significant difference was observed between contaminated microcosms. Interestingly, anthracene spiking resulted to a total inhibition of oxygen consumption at the sediment surface while for T microcosms surface activity was roughly similar as initially observed ($0.14 \text{ nmol O}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ vs $0.12 \text{ nmol O}_2 \text{ cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$, respectively). The strong inhibition of oxygen consumption by anthracene resulted to a significant decrease of sediment oxygen consumption ($p < 0.05$) relative both to the control (T) and to the rate measured at the beginning of the incubation (Fig. 5A). On average, rates measured at the end of incubation in anthracene microcosms represented only 25-30% of the areal rates measured in T microcosms. As observed for bacterial biomass, both bioremediation treatments have no significant impact on oxygen consumption relative to the C microcosms; areal rates were not significantly different (Fig. 5A). Differences observed for sediment oxygen consumption between treatments were not explained by changes in total organic carbon since concentrations were roughly similar at the end of incubation in all microcosms (Fig. 5B).

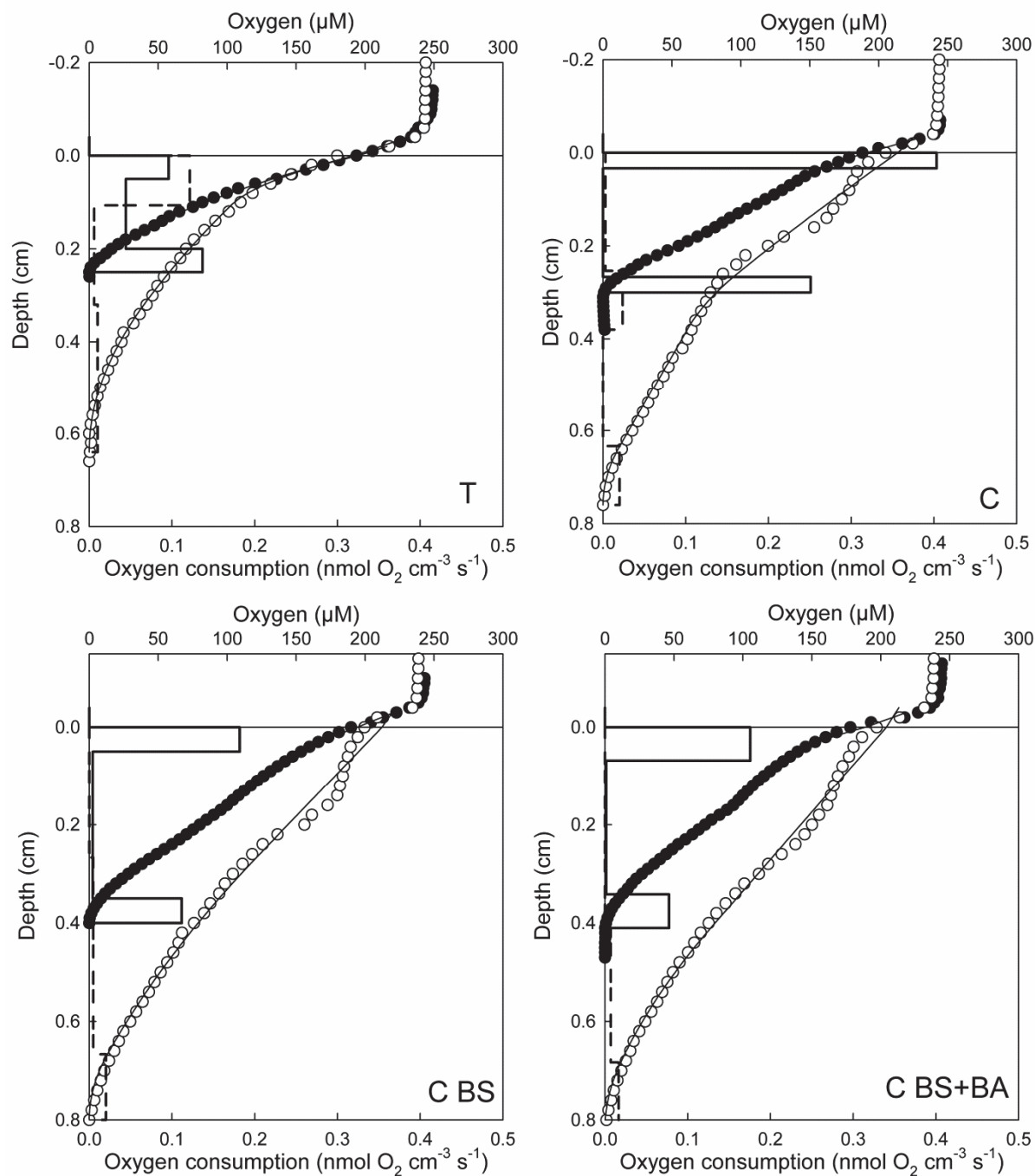


Fig. 4. Microprofiles oxygen (squares) and oxygen consumption (line) in the sediment of different treatments (T: uncontaminated, C: contaminated, CBS: biostimulation, CBS + BA: biostimulation and bioaugmentation). Solid squares and lines represent the oxygen concentration and oxygen consumption after 4 days, respectively. Open squares and dotted lines represent the oxygen concentration and oxygen consumption after 30 days incubation of microcosm, respectively.

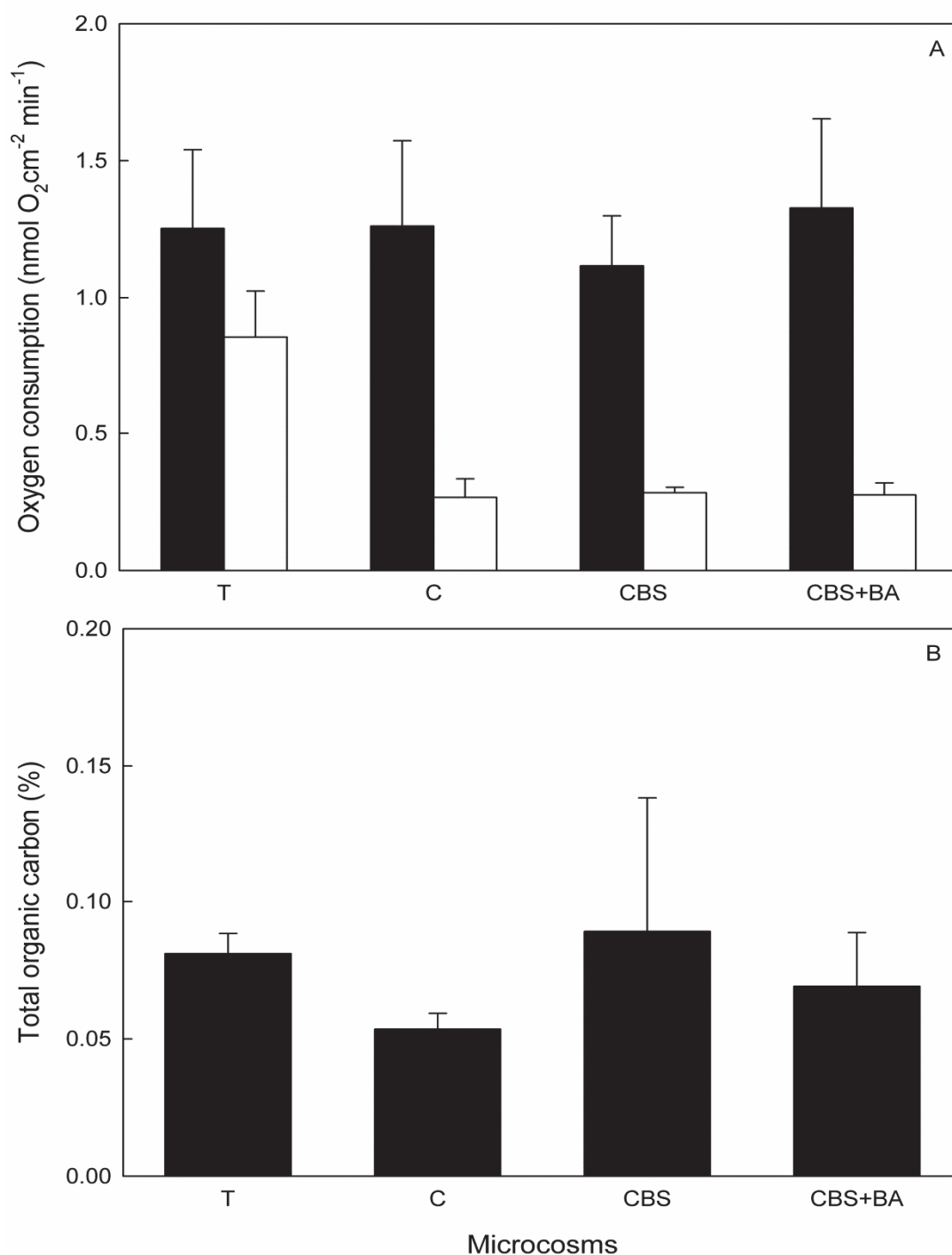


Fig. 5. Sediment oxygen consumption and total organic carbon as a function of the different treatments (T: uncontaminated, C: contaminated, CBS: biostimulation, CBS+BA: biostimulation and bioaugmentation). (A) Oxygen fluxes at the sediment/water interface after 4 days (white bars) and 30 days (black bars) of incubation (average $\pm$ standard deviation). (B) Percentages of total organic carbon after 30 days of incubation (average $\pm$ standard deviation).

3.3. Bacterial community structure

At the end of incubation, T-RFLP profiles showed an average species richness (S) between 70 ± 10 and 85 ± 12 T-RFs (Fig. 2), the lowest was observed in anthracene contaminated microcosms (C) while control microcosms (T) showed the highest (Fig.2). The correspondence analysis (CA), based on T-RFLP fingerprints (Fig. 6), explaining more than 80% of the distribution (53.3 and 27.5% for axis 1 and axis 2, respectively) showed that bacterial communities from anthracene contaminated microcosms were separated from the control according to axis 1 while the bacterial communities of the contaminated microcosms (C, CBS, CBS+BA) were distributed along axis 2.

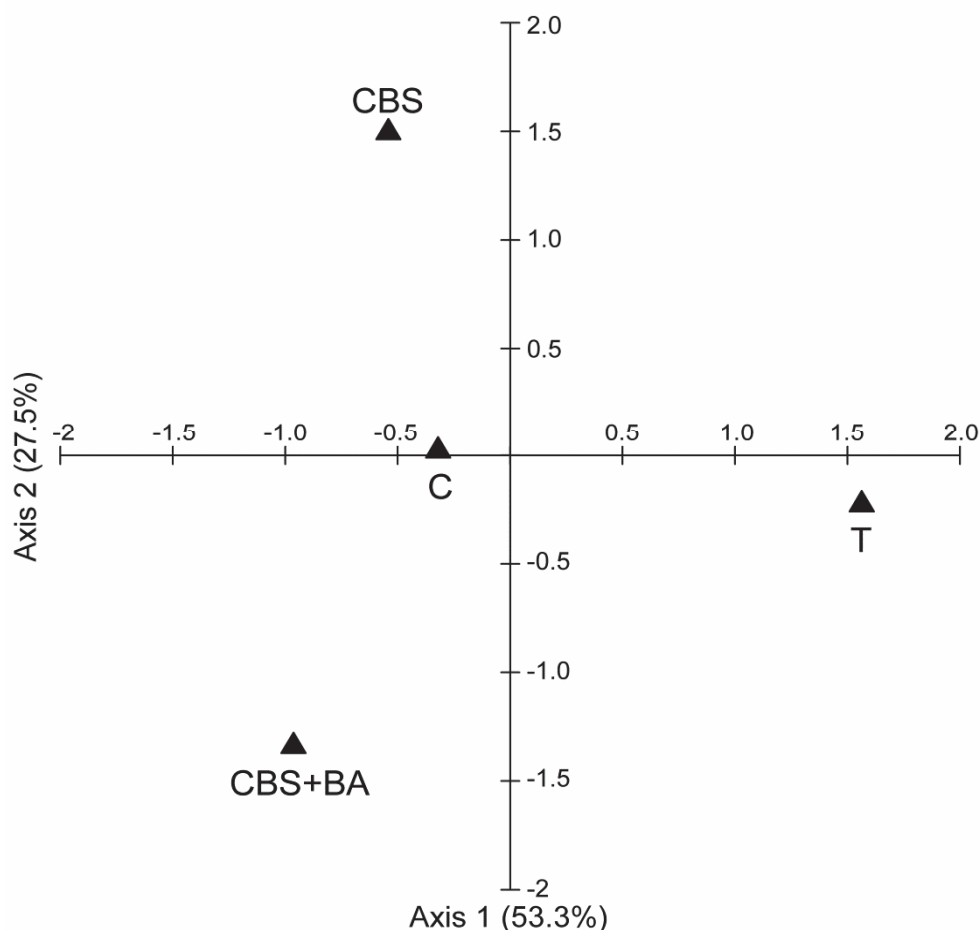


Fig. 6. Correspondence Analysis (CA) of the microbial communities based on T-RFLP data (16S rRNA genes) as a function of the different treatments after 30 days of incubation (T: uncontaminated, C: contaminated, CBS: biostimulation, CBS+BA: biostimulation and bioaugmentation). The data analyzed correspond to the average for triplicate samples of HaeIII and HinfI-digested 16S rRNA genes yielding 5-end T-RFLP patterns.

Among the different T-RFs observed, some T-RFs were detected in all microcosms with relative abundance >1%, 33, 177, 192, 274 bp (HaeIII) and 116, 307, 331, 340 bp (HinfI). In contrast, relative abundance of specific T-RFs was subjected to changes as a function of the microcosm treatment. For example, T-RF 194 (HaeIII) showed a relative abundance of 5 % in anthracene microcosms while in T microcosms, its relative abundance was <1%. In contrast T-RF 269 (HaeIII) and 232 (HinfI) had a relative abundance >5% in T microcosms and < 1% in anthracene microcosms, irrespective of the bioremediation treatment. Interestingly the T-RFs 255 (HaeIII) which could be related to members of the *Acinetobacter* genera, genera from which the strain added in the bioaugmentation treatment belongs, was found the most abundant in CBS+BA microcosms with a relative abundance of 2.1% while it represented 0.3, 0.2 and 0.1% in the C, CBS and T microcosms respectively.

4. Discussion

Using a microcosm approach, we observed significant effects of anthracene on microbial biomass, activity and community structure despite the relative low concentration of anthracene added (1 ppm). Anthracene concentration in the studied sediment was around 4 ppm (unpublished results). As a consequence, the spiked concentration represented a small enrichment of the *in situ* concentration. Nevertheless, effects of this low contamination were obvious for the microbial community suggesting that the *in situ* anthracene contamination of the studied sediment did not allow the dominance of tolerant anthracene populations as it can be observed in polluted environments (Carman et al. 1995, Paisse et al. 2010). Impact of pollutant on benthic organisms depends on its bioavailability. A pollutant can be in high concentration in a polluted system but moderately impact the microbial community because of strong adsorption onto particles decreasing its potential toxic effects (Talley et al. 2002). Anthracene is largely associated with organic particles in sediments decreasing its bioavailability (Talley et al. 2002). Nevertheless, our results suggest that the low anthracene concentration added was sufficient to induce significant changes in biomass and structure suggesting thus that the spiked anthracene was bioavailable for microorganisms in the experimental conditions imposed.

Analysis by flow cytometry showed that anthracene had a significant effect on bacterial abundance with inhibition of the population NA2 identified from acid nucleic content

(Fig. 3). The decrease in bacterial abundance can be explained by the inhibition of bacterial growth of non adapted populations. In addition, cytograms of contaminated microcosms showed that cell integrity was strongly impacted. Anthracene is considered toxic, but toxicology data specific to anthracene is uncommon, or somewhat conflicting. Dean-Ross et al. (2001) state that anthracene is neither genotoxic nor carcinogenic, but is a threat to the environment because of its toxicity to aquatic life, especially through photo-induced toxicity which was confirmed by El-Alawi et al. (2002) who showed that anthracene is very toxic in the presence of ultraviolet radiation for luminescent bacteria. In the present study, the photo toxicity of anthracene can be excluded because microcosms were incubated in laboratory conditions, under free UV and solar radiations. Therefore, we measured the direct toxicity of anthracene on indigenous bacteria in marine coastal sediments. Flores et al. (2010) observed growth inhibition upon anthracene contamination (IC₅₀ 6 ppm) of microbial consortium isolated from polluted sediments. They suggested that the toxic effects of anthracene is due to the accumulation and mutagenic activity of anthracene, similar to the effects induced by polycyclic aromatic hydrocarbons on *Salmonella* strain YG1041 (Kummrow et al. 2006). Anthracene has a high octanol-water partition coefficient ($\log K_{ow} = 4.1$), and therefore can readily adsorb onto organic phases such as the phospholipids of bacterial membranes (Flores et al. 2010). This interaction provokes a hydrophobic region inside the bacterial membrane, which can act as a reservoir for anthracene accumulation (Bugg et al. 2000) enhancing its potential toxic effects.

Impact of anthracene on microbial biomass can also strongly change the sediment oxygen consumption since heterotrophic bacteria play a key role in the mineralization of the organic matter. The use of oxygen microelectrodes offers the possibility to determine with high vertical resolution the sediment oxygen consumption, proxy of the organic matter mineralization under aerobic conditions (Viret et al. 2006). After 30 days of sediment contamination, anthracene had a strong impact on sediment oxygen consumption (Fig. 5) with a complete inhibition of the oxygen consumption in the first 5 mm (Fig. 4), the oxygen consumption observed around 8 mm depth corresponding to the oxygen demand (biotic and abiotic) for the oxidation of reduced compounds. Inhibition of sediment oxygen consumption was demonstrated for various pollutants such as atrazine (Laursen and Carlton 1999), metals (Viret et al. 2006) and uranium (Lagauzere et al. 2009). Interestingly, in the present study the specific activity

(activity/biomass) after 30 days of incubation was similar in all treatments (control and contaminated microcosms) although the biomass strongly decreased in contaminated microcosms concomitant with high reduction in bacterial population NA2 (Fig. 3). This suggests that the remaining microbial populations observed at the end of the incubations in the contaminated microcosms were in the same physiological state than those observed in the control. In contrast, Hjorth et al. (2007) observed an increase of the specific activity for the bacterio- and phytoplankton upon pyrene few day exposure. For both compartments, abundance strongly decreased while activity remained stable. They suggest a functional redundancy to explain this increase of the specific activity. Effect of pyrene was strong enough to eliminate sensitive groups, living space and resources to more tolerant and /or opportunistic groups, which responded with high specific activities (Hjorth et al. 2007). In our study, even so anthracene had a strong selective pressure by decreasing abundance of non tolerant population, it did not apparently alleviate the competition for space and resources since specific activities were the same in all microcosms (contaminated and control).

The toxic effects of anthracene observed on biomass and cell integrity is accompanied by strong changes in bacterial community structure (Fig. 6) and in moderate decrease of species richness (Fig. 2). T-RFLP profiles revealed an important bacterial diversity in all microcosms as previously reported in marine sediments (Ben Said et al. 2010). The correspondence analysis, based on T-RFLP fingerprints (Fig. 6) showed that bacterial communities from anthracene contaminated microcosms were separated from the control. Bacterial community structure changes as response to PAH addition have been often observed using a single molecule, e.g. anthracene (Zhang et al. 2011), phenanthrene (Muckian et al. 2009) or a complex mixture of PAH (Zhou et al. 2009). Changes in hydrocarbon content resulted in characteristic shifts of substrate utilization patterns which can correspond to similar changes in abundance of hydrocarbon-utilizing bacteria and the occurrence of specific bacterial groups (Wunsche et al. 1995). Interestingly, at the end of incubation, the T-RF 194 (HaeIII) was observed in abundance > 5% in the contaminated microcosms while its relative abundance was <1 % in the control. According to the Ribosomal Database Project (RDB), this T-RF may correspond to an uncultured *Proteobacterium* frequently observed in PAH contaminated environments (e.g. Paisse et al. 2010). It is likely that the dominance of this population could be attributed to the selective pressure exerted by anthracene and its degradation

metabolites. The selective pressure can also result to the diminution of non-tolerant populations as observed for the T-RFs 269 (HaeIII) and 232 (HinfI) for which a strong decrease of the relative abundance was observed in anthracene microcosms relative to the control.

Overall, the present study shows that addition of a low dose of anthracene strongly modified biomass, structure and function of the microbial community. Bioremediation using addition of fertilizers (biostimulation, BS) and/or addition of hydrocarbonoclast bacteria (bioaugmentation, BA) can be attractive solutions to enhance degradation of organic pollutants, decreasing thus their potential toxic effects. Irrespective of the bioremediation treatments, the toxic effects of anthracene could not be diminished for microbial biomass, structure and function. Unfortunately, anthracene concentration was not measured at the end of incubation, nevertheless, the observed patterns clearly suggest that its toxic effects were still present after 30 days of incubation in both CBS and CBS+BA microcosms. Yu et al. (2005) observed that biostimulation and bioaugmentation are not always efficient in PAH biodegradation which can be explained by the bioavailability of PAHs and the competition between species for organic and inorganic substrates. In our study, the enrichment in nutrients (N and P) followed the protocols of Jacques et al. (2008) and represented a N:P ratio of 4. The cytograms of the CBS microcosms observed at the end of the incubations showed the presence of two sub-populations in the NA1 population (Fig. 3). These sub-populations were not observed in the C and T microcosms. This stimulation of these sub-populations was followed by a moderate change of the microbial community structure relative to the contaminated sediment (Fig. 6). The Bizerte lagoon exhibits N:P ratio around 2.5 in winter and around 20 in summer, suggesting different nutrient limitation for each season, N limitation in winter and P limitation in summer (Hlaili et al. 2006). According to the Redfield ratio, the N/P ratio used for the biostimulation should alleviate a P limitation. The presence of two sub-populations in NA1 population specific to CBS and CBS+BA microcosms suggests that the nutrient amendment partly alleviated P limitation resulting to different microbial community structures (Fig. 6) as also observed in other bioaugmentation studies (Di Gennaro et al. 2009, Miyasaka et al. 2006). However, this nutrient stimulation did not compensate the toxic effects of anthracene since total biomass and sediment oxygen consumption were similar in CBS and C microcosms. This non-compensation of the anthracene toxic effects was also observed when a

hydrocarbonoclastic bacterium (*Acinetobacter* sp.) was inoculated together with the nutrients. The strain used for the bioaugmentation was isolated from contaminated sediments of Bizerte lagoon and was chosen for its capacities to degrade hydrocarbons (Ben Said et al. 2008). The analysis of microbial community by T-RFLP fingerprints indicated that the T-RF255 (HaeIII) corresponding to this bacterium species had a relative abundance >2% in the CBS+BA microcosms while in other microcosms its relative abundance was < 0.3%. This suggests that the experimental conditions imposed favored the growth of *Acinetobacter* sp., however its potential hydrocarbon degradation capacities did not alleviate the toxic effects of anthracene. This might be due to the competition for resources as suggested by Yu et al. (2005) to explain the absence of effective biodegradation with bioaugmentation treatments as it is often reported (e.g. Perele 2010). The fact that specific activities were similar in all treatments (see above) suggests that anthracene did not alleviate competition between microorganisms, which would support this hypothesis.

5. Conclusion

Using a microcosm approach, we showed that a low dose of anthracene (1ppm) severely affect the microbial community, biomass, structure and function in a sediment slightly contaminated by anthracene, suggesting the dominance of non tolerant microbial populations. The toxic effects of anthracene were not alleviated when bioremediation treatments, biostimulation and/or bioaugmentation were used even so changes in microbial populations and structures were observed, suggesting that the proposed treatments might be promising to promote bacterial growth but further works are still required to propose a more efficient strategy to stimulate biodegradation that takes into account the complex interactions between species for resource access.

6. Acknowledgments

This work was supported by a funding of the CMCU (n° 09G 0189), and PHC-Utique (20894TE) programs, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS/DGRST n°22629) and the Ministère Tunisien de la Recherche scientifique.

7. References

- Atagana HI (2006) Biodegradation of polyacyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil by biostimulation and bioaugmentation in the presence of copper(II) ions. *World J Microbiol Biotechnol* 22: 1145-1153
- Bauer JE, Capone DG (1985) Degradation and Mineralization of the Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons Anthracene and Naphthalene in Intertidal Marine-Sediments. *Appl Environ Microbiol* 50: 81-90
- Ben Said O, Goni-Urriza MS, El Bour M, Dellali M, Aissa P, Duran R (2008) Characterization of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments, Tunisia. *J Appl Microbiol* 104: 987-997
- Ben Said O, Goni-Urriza M, El Bour M, Aissa P, Duran R (2010) Bacterial Community Structure of Sediments of the Bizerte Lagoon (Tunisia), a Southern Mediterranean Coastal Anthropized Lagoon. *Microb Ecol* 59: 445-456
- Berg P, Risgaard-Petersen N, Rysgaard S (1998) Interpretation of measured concentration profiles in sediment pore water. *Limnol Oceanogr* 43: 1500-1510
- Bowling JW, Leversee GJ, Landrum PF, Giesy JP (1983) Acute Mortality of Anthracene-Contaminated Fish Exposed to Sunlight. *Aquat Toxicol* 3: 79-90
- Brenner RC, Magar VS, Ickes JA, Abbott JE, Stout SA, Crecelius EA, Bingler LS (2002) Characterization and FATE of PAH-contaminated sediments at the Wyckoff/Eagle Harbor superfund site. *Environ Sci Technol* 36: 2605-2613
- Bridges TS, Levin LA, Cabrera D, Plaia G (1994) Effects of Sediment Amended with Sewage, Algae, or Hydrocarbons on Growth and Reproduction in 2 Opportunistic Polychaetes. *J Exp Mar Biol Ecol* 177: 99-119
- Broecker WS, Peng TH (1974) Gas-Exchange Rates between Air and Sea. *Tellus* 26: 21-35
- Bugg T, Foght JM, Pickard MA, Gray MR (2000) Uptake and active efflux of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* LP6a. *Appl Environ Microbiol* 66: 5387-5392
- Carman KR, Fleeger JW, Means JC, Pomarico SM, McMillin DJ (1995) Experimental Investigation of the Effects of Polynuclear Aromatic-Hydrocarbons on an Estuarine Sediment Food-Web. *Mar Environ Res* 40: 289-318
- Dabestani R, Ivanov IN (1999) A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Photochem Photobiol* 70: 10-34
- Dean-Ross D, Moody JD, Freeman JP, Doerge DR, Cerniglia CE (2001) Metabolism of anthracene by a *Rhodococcus* species. *FEMS Microbiol Lett* 204: 205-211
- Di Gennaro P, Moreno B, Annoni E, Garcia-Rodriguez S, Bestetti G, Benitez E (2009) Dynamic changes in bacterial community structure and in naphthalene dioxygenase expression in vermicompost-amended PAH-contaminated soils. *J Hazard Mater* 172: 1464-1469
- Duhamel S, Jacquet S (2006) Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *J Microbiol Methods* 64: 316-332

- El-Alawi YS, Dixon DG, Greenberg BM (2001) Effects of a pre-incubation period on the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Environ Toxicol* 16: 277-286
- El-Alawi YS, McConkey BJ, Dixon DG, Greenberg BM (2002) Measurement of short- and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria. *Ecotox Environ Safe* 51: 12-21
- Flores GP, Badillo CM, Cortazar MH, Hipolito CN, Perez RS, Sanchez IG (2010) Toxic Effects of Linear Alkylbenzene Sulfonate, Anthracene and Their Mixture on Growth of a Microbial Consortium Isolated from Polluted Sediment. *Rev Int Contam Ambient* 26: 39-46
- Garcia HE, Gordon LI (1992) Oxygen Solubility in Seawater - Better Fitting Equations. *Limnol Oceanogr* 37: 1307-1312
- Gyedu-Ababio TK, Baird D (2006) Response of meiofauna and nematode communities to increased levels of contaminants in a laboratory microcosm experiment. *Ecotox Environ Safe* 63: 443-450
- Hjorth M, Vester J, Henriksen P, Forbes V, Dahlløf I (2007) Functional and structural responses of marine plankton food web to pyrene contamination. *Mar Ecol -Prog Ser* 338: 21-31
- Hlaili AS, Chikhaoui MA, El Grami B, Mabrouk HH (2006) Effects of n and p supply on phytoplankton in Bizerte Lagoon (western Mediterranean). *J Exp Mar Biol Ecol* 333: 79-96
- Hughes JB, Beckles DM, Chandra SD, Ward CH (1997) Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments. *J Ind Microbiol Biotechnol* 18: 152-160
- Jacques RJS, Okeke BC, Bento FM, Teixeira AS, Peralba MCR, Camargo FAO (2008) Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Biores Technol* 99: 2637-2643
- James ID (2002) Modelling pollution dispersion, the ecosystem and water quality in coastal waters: a review. *Environ Modell Softw* 17: 363-385
- Kochevar IE, Armstrong RB, Einbinder J, Walther RR, Harber LC (1982) Coal-Tar Photo-Toxicity - Active Compounds and Action Spectra. *Photochem Photobiol* 36: 65-69
- Kummrow F, Rech CM, Coimbra CA, Umbuzeiro GA (2006) Blue rayon-anchored technique/*Salmonella* microsome microsuspension assay as a tool to monitor for genotoxic polycyclic compounds in Santos estuary. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 609: 60-67
- Lagauzere S, Pischedda L, Cuny P, Gilbert F, Stora G, Bonzom JM (2009) Influence of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) and *Tubifex tubifex* (Annelida, Oligochaeta) on oxygen uptake by sediments. Consequences of uranium contamination. *Environ Pollut* 157: 1234-1242
- Laursen AE, Carlton RC (1999) Responses to atrazine of respiration, nitrification, and denitrification in stream sediments measured with oxygen and nitrate microelectrodes. *FEMS Microbiol Ecol* 29: 229-240
- Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical Ecology*. Elsevier, Amsterdam

- Long ER (1992) Ranges in Chemical Concentrations in Sediments Associated with Adverse Biological Effects. *Mar Pollut Bull* 24: 38-45
- Louiz I, Kinani S, Gouze ME, Ben-Attia M, Menif D, Bouchonnet S, Porcher JM, Ben-Hassine OK, Ait-Aissa S (2008) Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays: Contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Sci Total Environ* 402: 318-329
- Louiz I, Ben-Attia M, Ben-Hassine OK (2009) Gonadosomatic index and gonad histopathology of *Gobius niger* (Gobiidea, Teleost) from Bizerta lagoon (Tunisia): Evidence of reproduction disturbance. *Fish Res* 100: 266-273
- Marie D, Partensky F, Jacquet S, Vaulot D (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl Environ Microbiol* 63: 186-193
- McConkey BJ, Duxbury CL, Dixon DG, Greenberg BM (1997) Toxicity of a PAH photooxidation product to the bacteria *Photobacterium phosphoreum* and the duckweed *Lemna gibba*: Effects of phenanthrene and its primary photoproduct, phenanthrenequinone. *Environ Toxicol Chem* 16: 892-899
- Miyasaka T, Asami H, Watanabe K (2006) Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene-contaminated marine sediments. *Biodegradation* 17: 227-235
- Muckian LM, Grant RJ, Clipson NJW, Doyle EM (2009) Bacterial community dynamics during bioremediation of phenanthrene- and fluoranthene-amended soil. *Int Biodeterior Biodegrad* 63: 52-56
- Mueller JG, Chapman PJ, Pritchard PH (1989) Creosote-Contaminated Sites - Their Potential for Bioremediation. *Environ Sci Technol* 23: 1197-1201
- Myers CR, Alatalo LJ, Myers JM (1994) Microbial Potential for the Anaerobic Degradation of Simple Aromatic-Compounds in Sediments of the Milwaukee Harbor, Green Bay and Lake Erie. *Environ Toxicol Chem* 13: 461-471
- Nance JM (1991) Effects of Oil Gas-Field Produced Water on the Macrobenthic Community in a Small Gradient Estuary. *Hydrobiologia* 220: 189-204
- Paisse S, Goni-Urriza M, Coulon F, Duran R (2010) How a Bacterial Community Originating from a Contaminated Coastal Sediment Responds to an Oil Input. *Microb Ecol* 60: 394-405
- Perelo LW (2010) Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J Hazard Mater* 177: 81-89
- Pringault O, Duran R, Jacquet S, Torreton JP (2008) Temporal variations of microbial activity and diversity in marine tropical sediments (New Caledonia lagoon). *Microb Ecol* 55: 247-258
- Rasmussen H, Jorgensen BB (1992) Microelectrode Studies of Seasonal Oxygen-Uptake in a Coastal Sediment - Role of Molecular-Diffusion. *Mar Ecol -Prog Ser* 81: 289-303
- Revsbech NP (1989) An Oxygen Microsensor with a Guard Cathode. *Limnol Oceanogr* 34: 474-478

- Revsbech NP (2005): Analysis of microbial communities with electrochemical microsensors and microscale biosensors, *Environmental Microbiology. Methods in Enzymology*. Elsevier Academic Press Inc, San Diego, pp. 147-166
- Samanta SK, Singh OV, Jain RK (2002) Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol* 20: 243-248
- Tahir A, Fletcher TC, Houlihan DF, Secombes CJ (1993) Effect of Short-Term Exposure to Oil-Contaminated Sediments on the Immune-Response of Dab, *Limanda-Limanda* (L). *Aquat Toxicol* 27: 71-82
- Talley JW, Ghosh U, Tucker SG, Furey JS, Luthy RG (2002) Particle-scale understanding of the bioavailability of PAHs in sediment. *Environ Sci Technol* 36: 477-483
- Tam NFY, Ke L, Wang XH, Wong YS (2001) Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments of mangrove swamps. *Environ Pollut* 114: 255-263
- Trabelsi S, Driss MR (2005) Polycyclic aromatic hydrocarbons in superficial coastal sediments from Bizerte Lagoon, Tunisia. *Mar Pollut Bull* 50: 344-348
- Ullman WJ, Aller RC (1982) Diffusion-Coefficients in Nearshore Marine-Sediments. *Limnol Oceanogr* 27: 552-556
- Viret H, Pringault O, Duran R (2006) Impact of zinc and nickel on oxygen consumption of benthic microbial communities assessed with microsensors. *Sci Total Environ* 367: 302-311
- Weissenfels WD, Beyer M, Klein J (1990) Degradation of Phenanthrene, Fluorene and Fluoranthene by Pure Bacterial Cultures. *Appl Microbiol Biotechnol* 32: 479-484
- Wunsche L, Bruggemann L, Babel W (1995) Determination of Substrate Utilization Patterns of Soil Microbial Communities - an Approach to Assess Population-Changes after Hydrocarbon Pollution. *FEMS Microbiol Ecol* 17: 295-305
- Yu KSH, Wong AHY, Yau KWY, Wong YS, Tam NFY (2005) Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar Pollut Bull* 51: 1071-1077
- Zhang SY, Wang QF, Xie SG (2011) Microbial community changes in contaminated soils in response to phenanthrene amendment. *Int J Environ Sci Technol* 8: 321-330
- Zhou HW, Wong AHY, Yu RMK, Park YD, Wong YS, Tam NFY (2009) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Structural Shift of Bacterial Communities in Mangrove Sediment. *Microb Ecol* 58: 153-160

II. PUBLICATION 2:

**IMPACTS OF BIOREMEDIATION SCHEMES FOR THE MITIGATION
OF A LOW-DOSE ANTHRACENE CONTAMINATION ON
FREE-LIVING MARINE BENTHIC NEMATODES.**

Hela Louati^{a, c}, Olfa Ben Said^{a, b}, Amel Soltania^{a, b}, Cristiana Cravo-Laureau^b,
Hugues Preud'Homme^d, Robert Duran^b, Patricia Aissa^a,
Ezzeddine Mahmoudi^a & Olivier Pringault^{a, c}

Published in: **ECOTOXICOLOGY**

^a Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement, Faculté des Sciences de Bizerte, 7021, Zarzouna, Tunisie.

^b Equipe Environnement et Microbiologie, UMR CNRS IPREM 5254 IBEAS, Université de Pau et des Pays de l'Adour, Avenue des Facultés, 64000 Pau, France.

^c Laboratoire Ecosystèmes Marins Côtiers, UMR 5119 ECOSYM CNRS-IRD-UM2-IFREMER, Université Montpellier 2, Place Eugène Bataillon, Case 093, 34095 Montpellier Cedex, France.

^d Laboratoire de Chimie Analytique, Bio-inorganique et Environnement UMR CNRS IREM 5254, Université de Pau et des Pays de l'Adour, 2 avenue Angot, 64053 Pau Cedex, France

Abstract

A microcosm experiment was used to examine (1) the responses of nematode communities in response to addition of a low dose anthracene in lightly contaminated sediment from Bizerte lagoon and (2) the effects of different bioremediation schemes on degradation of anthracene and the structure of free-living marine nematodes. Sediments were contaminated with $1 \mu\text{g g}^{-1}$ anthracene and effects were examined after 40 days. The present study shows that addition of a low dose of anthracene strongly modified abundance and diversity of the nematode community. Total nematode abundance, species richness and number of species significantly decreased with anthracene addition. Multivariate analyses demonstrated that anthracene addition resulted in a strong modification of the nematode community with the elimination of specific species, such as *Mesacanthion diplochma* and the decrease of the dominant species *Oncholaimus campylocercoides*. In contrast, anthracene addition stimulated the abundance of "opportunistic" species. Bioremediation treatment using nutrient addition strongly enhanced anthracene biodegradation, leading to a decrease of its toxicity. As a consequence, nematode abundance strongly increased concomitantly with changes in the nematode community structure; *Prochromadorella neapolitana* became the most abundant species.

1. Introduction

Nematodes are the most dominant group among the meiofauna of marine environments (Chinnadurai and Fernando 2007). Free-living nematodes usually account for 70–90% of the meiobenthic metazoan abundance in marine sediments within which they play a fundamental ecological role (Austen 2004). As their free-living forms contribute significantly to the diet of many animals (Coull 1990) and facilitate the mineralization of organic material (Riera and Hubas 2003), they are functionally important fauna in nutrient cycles and energy flow patterns in coastal and estuarine environments (Giere 2009). Nematodes comprise both interstitial dwellers and burrowers from different trophic levels with species feeding on detritus, bacteria, algae, fungi, and higher plants, as well as omnivorous and predatory species (Traunspurger 1997). Furthermore, nematodes are often used in biomonitoring studies as they are considered to be suitable indicators of pollution induced disturbances of benthic ecosystems (Gyedu-Ababio and Baird 2006; Mahmoudi et al. 2005). Due to their high structural and functional diversity, these organisms offer a variety of possibilities for assessing changes in community structure. Species or genera level compositions are often most sensitive to disturbance (Warwick and Clarke 1991).

The contamination of coastal marine sediments by hydrocarbons represents a global concern due to the potential consequences on ecosystem and human health (Onwurah et al. 2007). Several field and laboratory studies have documented that meiobenthic nematodes are sensitive to petroleum contaminants (Carman et al. 2000; Mahmoudi et al. 2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are among the most widely studied organic pollutants. Sixteen individual PAH compounds have been classified as priority pollutants by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) due to their toxic, mutagenic and carcinogenic characteristics (Kayal and Connell 1995). PAHs released into the marine environment tend to adsorb rapidly on suspended materials and sediments and can be bioavailable to fish and other marine organisms through the food chain, as waterborne compounds and from contaminated sediments (Perugini et al. 2007). In the Mediterranean Sea such as in Bizerte lagoon, high concentrations of anthracene and other PAHs from human activities have been recorded (Ben Said et al. 2010). Through increasing the mortality of the most sensitive species (Beyrem and Aissa 2000), hydrocarbon contamination was found to be responsible for the decrease in nematode density, mean individual weight and diversity in Bizerte Bay (Tunisia).

Similarly, Mahmoudi et al. (2005) have experimentally demonstrated that nematode assemblage from Ghar El Melh lagoon (NE Tunisia) was particularly sensitive to diesel fuel with effects observed even at low concentrations (0.5-20 mg diesel kg⁻¹ (dw)). Due to their sensitivity to pollutants, nematodes can be considered as an effective bioindicator species of environmental pollution (Beyrem et al. 2007; Mahmoudi et al. 2007).

The main process involved in the decontamination of polluted environments by PAHs is microbial biodegradation (Juhasz and Naidu 2000). Attempts to stimulate natural biodegradation of hydrocarbons are referred to as bioremediation techniques, which consist of modifying the factors known to limit biodegradation rates. Numerous studies of sediment bioremediation have been carried out on contaminated beach sediments (e.g. Atlas and Bragg 2009; Miyasaka et al. 2006). Improvements to the *in situ* microbiological conditions can be achieved by i) the addition of electron donors, acceptors and nutrients (biostimulation; Roling et al. 2004) or ii) by the addition of bacteria (bioaugmentation; Abbondanzi et al. 2006). However, the biodegradation of PAHs in sediments is known to be influenced by physical, chemical and biological factors of toxic organic contaminants (Holmer et al. 1997). Some meiofaunal groups such as nematodes may also indirectly influence the activity and/or species composition of microbial communities (De Mesel et al. 2004; Moens et al. 2005), potentially changing the bioremediation capacities. Näslund et al. (2010) found that high meiofauna abundance inhibits degradation of naphthalene, presumably through grazing on PAH-degrading bacteria. In contrast, Nascimento et al. (2012) showed that meiofaunal interactions with the microbial community had a positive effect on the degradation of organic matter resulting of a diatom bloom. Grazing by meiofauna has been suggested to be an important regulating factor by keeping the bacterial community in an active growth phase and thus increasing its demand for nutrients, thereby speeding up organic matter decomposition (Moens et al. 2005; Nascimento et al. 2012). Nevertheless, Louati et al (submitted manuscript) have shown that presence of meiofauna has no effect on the biodegradation of phenanthrene, pyrene and fluoranthene in benthic sediment.

Among PAH compounds, anthracene a tricyclic aromatic hydrocarbon (C₁₄H₁₀) derived from coal tar, is a product of incomplete combustion. It is stable and persistent in the environment due to its low biodegradation rate (Cheung et al. 2008). Anthracene tends to bioaccumulate in aquatic life, and is highly toxic to wildlife (Nkansah et al. 2011). In water, anthracene tends to bind fairly strongly to sediments and any other solid matter

(Cornelissen et al. 1998), but a significant proportion can leach into groundwater, representing thus a potential environmental problem (Smolinski et al. 2013). Despite the ubiquity of this compound in the aquatic environment, very little information on its toxicity and bioremediation is available and nothing is known about its impact on benthic species. Anthracene ($0.2\text{--}2\text{ mg l}^{-1}$) is known to inhibit photosynthesis of freshwater phytoplankton in a concentration-dependent manner (Marwood et al. 1999) and Bonnet et al. (2005) reported inhibitory effects of anthracene (10 mg l^{-1}) on the cell proliferation rate of micromycete *Tetrahymena pyriformis*. The toxicity of anthracene has been studied on animals such as freshwater crustacean, fish mollusks and lubricious (Erickson et al. 1999; Mekenyan et al. 1994; Narbonne et al. 1999) but its toxicity on benthic marine organism assemblages is poorly understood.

In this study, we present the results of a microcosm experiment designed to evaluate the response of a meiobenthic nematode community to the addition of a low-dose of bioavailable anthracene ($1\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$) in a lightly contaminated sediment from a Mediterranean coastal lagoon (Bizerte lagoon, Tunisia). The investigation focused on the comparison of density, diversity and species composition of nematode assemblages in control microcosms and in bioremediation treatments used to enhance anthracene biodegradation. The bioremediation schemes tested included biostimulation, bioaugmentation and a combination of biostimulation and bioaugmentation by the inoculation of a marine hydrocarbon degrading bacterium, *Acinetobacter* sp., previously isolated from Bizerte lagoon sediment.

2. Materials and methods

2.1. Site description

Bizerte lagoon, the second largest lagoon in Tunisia, is located in an economically important area in northern Tunisia. It covers an area of 150 km^2 and has a mean depth of 7 m. It is connected to the Mediterranean Sea through a 6 km long inlet and to the Ichkeul Lake through the Tinja channel, which is approximately 5 km long and a few meters in depth (3 m in the overflow period). This ecosystem is affected by various anthropogenic activities, including urbanisation, industrial, agricultural and aquaculture activities as well as from naval and commercial shipping harbours. Thus, direct and indirect discharge of waste and runoff has resulted in the chemical contamination of the lagoon by various toxic compounds such as heavy metals (Yoshida et al. 2002), organo-chlorinated

pesticides, halogenated aromatic compounds like polychlorobiphenyls (PCBs) (Derouiche et al. 2004) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Ben Said et al. 2010).

2.2. Sampling and analysis of water and sediments

Sediments with their natural meiofaunal communities were collected from one site (Echaraà) (37° 13' N 9° 49' E) located in the low-contaminated part of the Bizerte lagoon (Ben Said et al. 2010). More details on the sampling site can be found in Louati et al. (2012). Hand-cores of 10 cm² were used to a depth of 15 cm to transfer sediment into a bucket. On the sampling day, the water depth was 1.20 m, salinity was 38 PSU, dissolved oxygen concentration was 7.67 mg l⁻¹ and pH was 8.06. Sediment had a median particle diameter of 43 µm, an organic carbon content of 0.79% and was largely composed of fine sand (70% < 63µm). Sediment total nitrogen content was 1.03%.

On return to the laboratory, sediments were homogenized by gentle hand stirring with a large spatula before microcosm setup and anthracene contamination. Buckets and spatula were all acid rinsed before use.

2.3. Stock solution and anthracene contamination of sediments

Sediment used for anthracene contamination was first alternately frozen and thawed three times to defaunate it following the recommendations of Gyedu-Ababio and Baird (2006). The sediment was then wet sieved to remove the larger particles (>63 µm). Stock solution of high purity anthracene (100 mg l⁻¹; Sigma-Aldrich Chemical A8, 920-0) was dissolved in acetone. Next, 2 ml of the anthracene solution was added into the sediment slurry and shaken overnight to allow the PAH to adsorb onto the sediment. The final added concentration of anthracene was 1 µg g⁻¹ (dw). Preliminary tests have shown that, after evaporation, acetone has no impact on nematode abundance and community structure.

2.4. Experimental set-up

Microcosms consisted of 1600 ml glass bottles. One control and seven treatments (Table 1) with three replicates each were set up. Contaminated microcosms were gently filled with 200 g (wt) of homogenized sediment (100 g of natural sediment and 100 g artificially "spiked" anthracene sediment) topped up with 1L of filtered (1 µm) natural lagoon water at 38 PSU. In control microcosm, the spiked sediment was replaced by 100 g of

defaunated sediment. Each bottle was closed with a rubber bung with two holes and the overlying water was aerated via an air stone diffuser. Air flux was filtered through an 0.2µm in-line filter to prevent contamination.

Bioremediation treatments were started one day after anthracene spiking. Biostimulation was achieved by addition of two slow-release particle fertilizers of 70 mg kg⁻¹ of nitrogen fertilizer (NaNO₃) and 35 mg kg⁻¹ of phosphorus fertilizer (KH₂PO₄) using the protocol of Jacques et al. (2008). Bioaugmentation was achieved by inoculating sediment with a marine PAH-degrading bacterium, *Acinetobacter* sp. strain isolated from Bizerte-polluted sediments (Ben Said et al. 2008). The strain was previously grown in 50 ml of Luria Bertani (LB) broth. After 1 week of cultivation, cells in growth phase were harvested by centrifugation at 10,000×g for 15 min at 4°C. The initial inoculum was 5.30×10⁸ cell ml⁻¹. For the combination of biostimulation and bioaugmentation, bacterial cells were suspended in nutrient solution and added to the microcosms previously amended with nutrients (nitrogen and phosphorus fertilizer). After bacterial inoculation and nutrient addition, sediment was agitated for half an hour for homogenization. All microcosms were performed in triplicates and incubated in laboratory at room temperature (22–24°C). After 40 days, the experiments were terminated and the whole sediment was fixed in 4% formalin.

Table 1: Codes used to identify microcosms.

<i>Experimental treatment</i>	<i>Name</i>
Unspiked sediment	T
Unspiked sediment + slow-release fertilizers	TBS
Unspiked sediment + bacteria	TBA
Unspiked sediment + slow-release fertilizers + bacteria	TBS+BA
Sediment artificially spiked with anthracene	C
Sediment artificially spiked with anthracene + slow-release fertilizers	CBS
Sediment artificially spiked with anthracene + bacteria	CBA
Sediment artificially spiked with anthracene + slow-release fertilizers + bacteria	CBS+BA

2.5. Anthracene analysis

Anthracene analyses in the sediments were conducted by gas chromatography coupled with atmospheric pressure ion source tandem mass spectrometry (APGC/MS-MS). Approximately 1 g (dry weight) of the samples was extracted with 40 ml of nonane (v/v) and with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane and naphthalene as internal standards (1ppm, ISTD), in an ultrasonic bath (15 min). The GC (7890, Agilent Technologies) was equipped with a capillary column DB5MS (30 m x 250 μ m x 0.25 μ m) and with a splitless injector (Splitless time: 1 min, pulse: 0.15 min). the setting parameters of the APGC Ion source (Waters) are : source temperature: 150°C, cones voltage: 25V, extractor: 2.3 V. The injector temperature was maintained at 290°C. The carrier gas (He) was maintained at 3 ml/min (constant flow mode). The oven temperature was programmed from 110°C (1 min) to 290°C (3 min) with a ramp of 35°C/min.

2.6. Sample processing

Meiofauna taxa, defined here as metazoans that pass through a 1 mm mesh sieve and are retained on a 40 μ m sieve, were sieved following the resuspension-decantation methodology (Wieser 1960) and stained with Rose-Bengal. At least the first 100 nematodes from each replicate were picked out using a fine pin, transferred from formalin to glycerol through a series of ethanol-glycerol solutions and mounted on slides in anhydrous glycerine following the procedure described in Heip et al.(1985). Nematodes were by far the most dominant taxon in terms of both densities and biomass. They were identified to genus or species using the pictorial keys of Platt and Warwick (1983; 1988) and Warwick et al. (1998).

2.7. Data analysis

The majority of data analysis followed standard community analysis methods described by Clarke and Warwick (2001) using the PRIMER (Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research) software package. One-way analysis of variance (ANOVA or Kruskal-Wallis tests) was used to test for overall differences in the indices between controls and treatments and the Tukey HSD multiple-comparison test was used in pair-wise comparisons of treatments and control. In all the above, a significant difference was assumed when $p < 0.05$. Univariate indices were computed: total nematode abundance (I),

number of species (S), diversity (Shannon-Wiener index H'), species richness (Margalef's d) and evenness (Pielou's J') were calculated for each microcosm.

Species abundance data were presented in k-dominance plots, in which species were ranked in decreasing order of dominance. The percentage cumulative abundance (k-dominance) was then plotted against the species rank k (Lambshead et al. 1983). Similarity (Whittaker index) was calculated between replicates and treatments. SIMPER (similarity percentages) was used to determine the contribution of individual species towards dissimilarity between treatments and control. For statistical analysis of nematode community structure, relative abundances of nematodes were transformed with $\arcsin(x^{0.5})$ to get a normal distribution of data (Legendre and Legendre 1998). Principal component analysis (PCA) was performed with MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey Wales).

3. Results

3.1. Anthracene degradation

Before artificial anthracene spiking, *in situ* anthracene concentration in sediment was around $4.5 \mu\text{g g}^{-1}$ (dw). After the 40 day incubation, anthracene concentration in contaminated microcosms (C) was maximal ($4.79 \pm 0.2 \mu\text{g g}^{-1}$) and not significantly different from the control microcosm (T) (Fig. 1). In contrast, biostimulation (nutrient supply), bioaugmentation (addition of a hydrocarbon-degrading bacterium) and the combination of biostimulation with bioaugmentation enhanced degradation of anthracene; the concentrations measured at the end of incubation were significantly ($p < 0.05$) lower than those measured in T and C microcosms. Interestingly, the concentration of anthracene in biodegradation treatments was lower than observed *in situ* before the artificial spiking. This indicates a significant biodegradation of the anthracene present *in situ* as well as of the anthracene artificially spiked. The lowest anthracene concentration ($1.52 \pm 0.09 \mu\text{g g}^{-1}$) was observed in combination of biostimulation with bioaugmentation of CBS+BA microcosms.

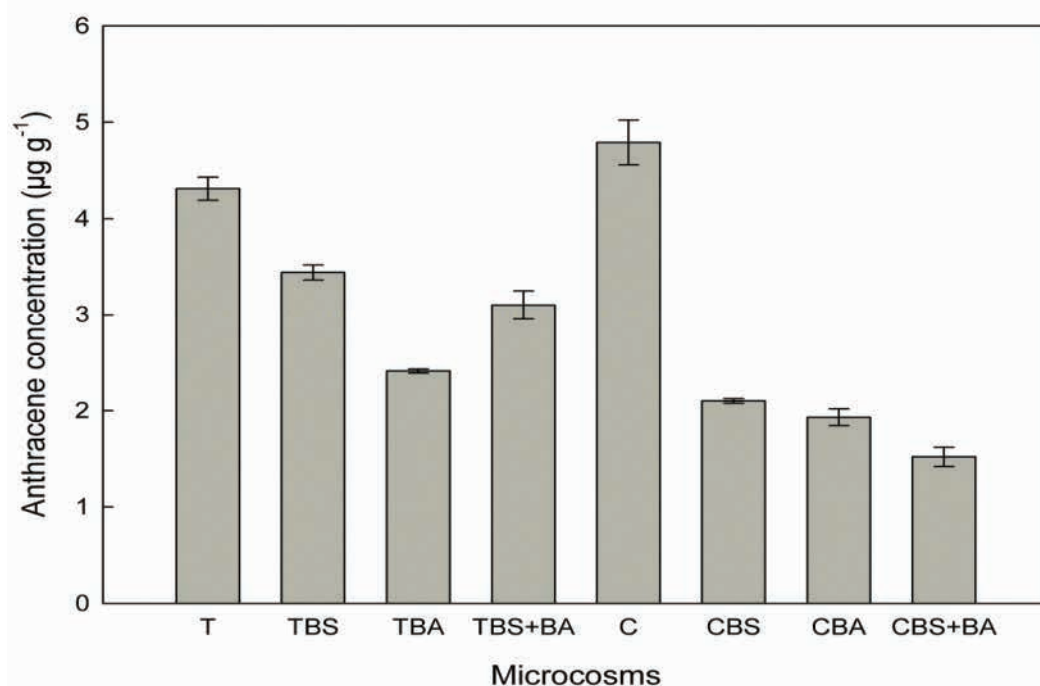


Fig.1. Anthracene concentration measured after 40 days of incubation (average $\pm$ standard deviation, $n=3$). (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, BS: biostimulation, BA: bioaugmentation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation)

3.2. Abundance and diversity of the nematode community

A total of 2537 individuals of nematofauna composed of 21 nematode species were identified in this study (Table 2). Nematofaunal abundance observed in T microcosms (166 ± 2.1 Ind/microcosm, corresponding to 20 ± 0.3 Ind. 10 cm^{-2}) after 40 days of incubation was similar to the initial abundance observed *in situ* (23 ± 0.3 Ind. 10 cm^{-2}). Nematode community structure in the sediment from Echaraà was mainly dominated by two species: *Oncholaimus campylocercoides* (23.4%) and *Odontophora n.sp.* (13.3%). After 40 days of incubation, T microcosms were mainly dominated by *Oncholaimus campylocercoides* (20.86 ± 1 %) and *Odontophora n.sp.* (12 ± 1 %). The third ranking dominant species was *Spirinia parasitifera* (9.1 ± 0.9 %). At the end of incubation, the repartition of dominant species in T microcosms was similar to what was observed *in situ*. C microcosms were mainly dominated by three species: *Spirinia parasitifera* (36.5 ± 3 %), *Oncholaimus campylocercoides* (14 ± 1 %) and *Odontophora n.sp.* (11 ± 1 %). Biostimulation microcosms (TBS) were marked by significantly ($p < 0.05$) higher numbers of *Prochromadorella neapolitana* (32.8 ± 1 %), *Oncholaimus campylocercoides* (11.8 ± 0.7 %).

%) and *Spirinia parasitifera* (9.4 ± 0.7 %) relative to T microcosms. TBA microcosms and CBS+BA microcosms were also dominated by *Oncholaimus campylocercoides* (17.5 ± 0.8 % and 10.2 ± 0.8 %, respectively), *Odontophora* n.sp. (14.6 ± 0.9 % and 12.5 ± 1.2 %, respectively), *Calomicrolaimus honestus* (8.8 ± 1 % and 11 ± 0.4 %, respectively) and *Spirinia parasitifera* (7.8 ± 1 % and 19 ± 1.5 %, respectively). The treatment TBS+BA was dominated by *Anticoma acuminata* (16 ± 1.3 %), *Spirinia parasitifera* (16 ± 1.2 %), *Oncholaimus campylocercoides* (16 ± 1.2 %) and *Odontophora* n.sp (15 ± 1 %). Bioaugmentation microcosm CBA was dominated by *Oncholaimus campylocercoides* (18 ± 0.9 %), *Odontophora* n.sp. (17 ± 0.5 %) and *Paramonohystera pilosa* (12 ± 0.5 %). Interestingly, only the biostimulation treatment with spiked anthracene (CBS) resulted in a similar community structure to the T microcosms with dominance of *Oncholaimus campylocercoides* (25 ± 0.8 %), *Odontophora* n.sp. (12 ± 0.8 %) and *Spirinia parasitifera* (11 ± 0.5 %).

The abundance and diversity indices of nematode assemblages for each treatment clearly showed the impact of anthracene spiking (Table 3). Total nematode abundance (I) (64 ± 1.4 vs 166 ± 2.8 Ind/microcosm, for C and T microcosms, respectively), species richness (d) (2.6 ± 0.2 vs 4.2 ± 0.1 , for C and T microcosms, respectively) and number of species (S) (13 ± 1.0 vs 20 ± 0.5 , for C and T microcosms, respectively) significantly decreased in anthracene spiked microcosms without nutrient addition (Table 4). In contrast, these univariate indices were not affected in all bioremediation microcosms. The abundance was significantly higher in biostimulation treatments (TBS and CBS) than in the control and contaminated microcosms. Biostimulation treatments (TBS and CBS) strongly enhanced the density of nematodes compared to T microcosms (275 ± 2.8 vs 166 ± 2.8 Ind/microcosm, for CBS and T microcosms, respectively). However, the Shannon-Wiener index (H') and Pielou's evenness (J') were not affected by the bioremediation treatment. The only exception was the TBSA+BA treatment where a slight but significant decrease of both indices was observed.

The k-dominance curves (Fig. 2) graphically illustrate a clear effect of anthracene on nematode communities. In T microcosms, the 9 most dominant species represented 75% of the total community whereas for C microcosms only 5 dominant species accounted for 75% of the total community. Bioremediation treatment also changed the number of dominant species, on average 7 species accounted for 75% of the total community.

Table 2: Relative abundance (%) and standard deviation of nematode species identified in microcosms (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, BS: biostimulation, BA: bioaugmentation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation).

	T	TBS	TBA	TBS+BA	C	CBS	CBA	CBS+BA
<i>Anticoma acuminata</i>	5.2 ± 0.4	4.2 ± 0.4	5.8 ± 0.9	16 ± 1.3	5.5 ± 0.7	7.6 ± 1.3	4.6 ± 0.4	5.0 ± 1.0
<i>Calomicrolaimus honestus</i>	1.9 ± 0.4	0.5 ± 0.1	8.8 ± 1.0	2.3 ± 0.5	2.7 ± 0.9	1.4 ± 0.4	4.6 ± 0.5	11 ± 0.4
<i>Cyatholaimus prinzi</i>	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.3	2.6 ± 0.5	1.3 ± 0.4	0.5 ± 0.0	1.1 ± 0.4	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
<i>Daptonema fallax</i>	3.6 ± 0.4	2.6 ± 0.3	2.2 ± 0.5	1.3 ± 0.4	0	3.8 ± 0.4	8.6 ± 0.5	3.8 ± 0.5
<i>Marylynnia stekhoveni</i>	2.2 ± 0.4	3.4 ± 0.4	1.6 ± 0.4	0.9 ± 0.0	0	2.3 ± 0.4	1.6 ± 0.4	1.3 ± 0.4
<i>Mesacanthion diplochma</i>	4.1 ± 0.6	1.3 ± 0.4	3.2 ± 0.5	1.3 ± 0.4	0	2.0 ± 0.4	1.6 ± 0.3	0.5 ± 0.0
<i>Metachromadora macroutera</i>	5.0 ± 0.8	3.9 ± 0.7	3.2 ± 0.4	2.9 ± 0.7	4.7 ± 0.2	2.6 ± 0.8	2.6 ± 0.5	4.1 ± 0.7
<i>Microlaimus cyatholaimoides</i>	2.2 ± 0.5	1.0 ± 0.0	1.9 ± 0.7	2.6 ± 0.4	5.7 ± 0.7	4.3 ± 0.7	1.3 ± 0.4	2.2 ± 0.4
<i>Monoposthia mirabilis</i>	1.4 ± 0.5	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.6 ± 0.5	3.7 ± 0.8	1.4 ± 0.4	0.6 ± 0.0	1.6 ± 0.7
<i>Neochromadora peocilosoma</i>	3.6 ± 0.4	4.4 ± 0.4	4.9 ± 0.9	1.6 ± 0.4	0	2.0 ± 0.5	0.6 ± 0.1	1.9 ± 0.4
<i>Odontophora</i> n.sp.	12 ± 1.4	8.4 ± 1.2	14 ± 0.9	15 ± 1.0	11 ± 1.1	12 ± 0.8	17 ± 0.5	12 ± 1.2
<i>Oncholaimus campylocercoides</i>	20 ± 1.2	11 ± 0.7	17 ± 0.8	16 ± 1.2	14 ± 1.2	25 ± 0.8	18 ± 0.9	10 ± 0.8
<i>Paracomesoma dubium</i>	8.3 ± 0.5	3.6 ± 0.4	4.8 ± 0.9	3.6 ± 0.6	5.2 ± 1.1	4.6 ± 0.4	4.3 ± 0.4	1.9 ± 0.4
<i>Paramonohystera pilosa</i>	8.3 ± 0.5	5.5 ± 0.4	5.2 ± 0.5	4.6 ± 0.5	1.0 ± 0.1	6.4 ± 0.4	12 ± 0.5	11 ± 0.1
<i>Prochromadorella neapolitana</i>	1.9 ± 0.4	32 ± 1.6	5.8 ± 0.9	3.6 ± 0.4	1.6 ± 0.1	2.9 ± 0.6	3.3 ± 0.4	5.8 ± 0.6
<i>Spirinia parasitifera</i>	9.1 ± 0.9	9.4 ± 0.7	7.8 ± 1.0	16 ± 1.2	36 ± 3.5	11 ± 0.5	9.3 ± 1.1	19 ± 1.5
<i>Synonchiella edax</i>	1.3 ± 0.2	0.5 ± 0.1	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.4	4.1 ± 0.7	0.5 ± 0.0	1.3 ± 0.5	1.1 ± 0.4
<i>Sabatieria punctata</i>	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0	0	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0
<i>Terschellingia longicaudata</i>	1.9 ± 0.4	0.7 ± 0.1	1.6 ± 0.4	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.1	2.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	0.5 ± 0.1
<i>Viscosia</i> sp.	3.0 ± 0.3	3.1 ± 0.4	3.5 ± 0.5	3.9 ± 0.9	0	2.9 ± 0.4	4.3 ± 0.5	3.0 ± 0.5
<i>Desmodora</i> n.sp.	1.4 ± 0.5	0.2 ± 0.0	0.9 ± 0.0	1.3 ± 0.5	1.0 ± 0.2	1.4 ± 0.5	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.4

Table 3: Univariate indices for nematode assemblages from each microcosm. (I = abundance, H' = Shannon-Weaver index, d = species richness, J' = evenness, S = number of species). (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, BS: biostimulation, BA: bioaugmentation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation)

Microcosm	I	H'	d	J'	S
T	166 ± 2.8	2.66 ± 0.04	4.27 ± 0.1	0.87 ± 0.012	21 ± 0.6
TBS	268 ± 2.1	2.34 ± 0.07	3.76 ± 0.2	0.81 ± 0.008	18 ± 1.2
TBA	149 ± 1.4	2.69 ± 0.02	4.27 ± 0.1	0.89 ± 0.014	21 ± 0.6
TBS+BA	150 ± 2.1	2.48 ± 0.06	4.05 ± 0.1	0.83 ± 0.013	20 ± 0.6
C	64 ± 1.4	2.07 ± 0.11	2.60 ± 0.2	0.81 ± 0.018	13 ± 1.0
CBS	275 ± 2.8	2.55 ± 0.04	4.19 ± 0.2	0.85 ± 0.007	20 ± 1.2
CBA	168 ± 1.1	2.50 ± 0.07	3.90 ± 0.3	0.85 ± 0.003	19 ± 1.7
CBS+BA	163 ± 0.5	2.53 ± 0.11	3.98 ± 0.4	0.86 ± 0.007	19 ± 2.1

Table 4: Multiple comparison tests for significant differences between nematode assemblages as a function of the treatment. The T microcosms were considered as reference. +: significant (p<0.05) increase in univariate indices; -: significant (p<0.05) decrease in univariate indices; ns: no significant difference. (I = abundance, H' = Shannon-Weaver index, d = species richness, J' = evenness, S = number of species). (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, BS: biostimulation, BA: bioaugmentation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation)

Microcosm	I	H'	d	J'	S
T vs TBS	+	-	ns	ns	ns
T vs TBA	-	+	ns	ns	ns
T vs TBS+BA	-	-	-	-	-
T vs C	-	-	-	-	-
T vs CBS	+	-	ns	ns	ns
T vs CBA	+	-	ns	ns	ns
T vs CBS+BA	ns	ns	ns	ns	ns

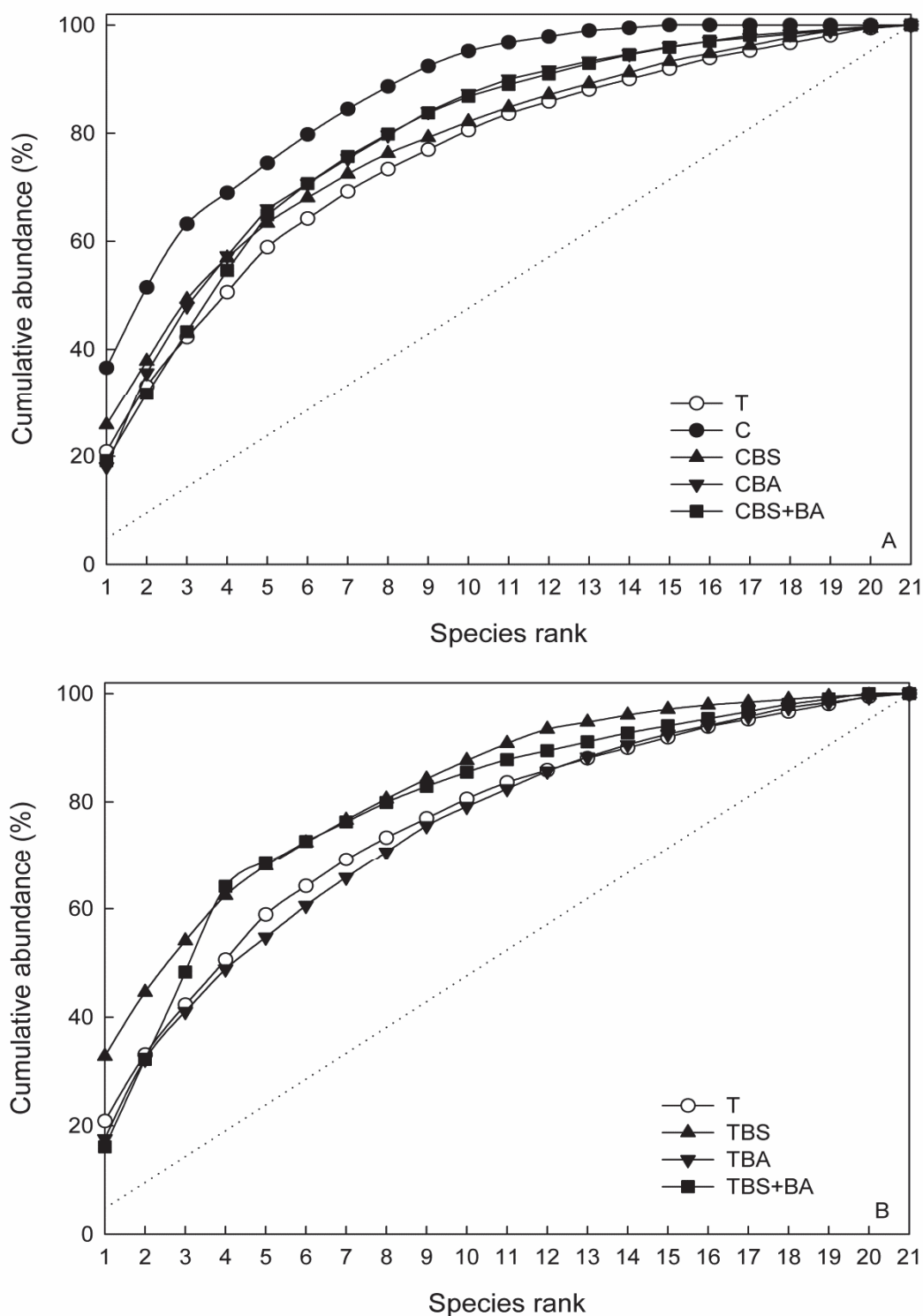


Fig. 2. k-dominance curves of nematode communities as a function of bioremediation treatment after 40 days of incubation. (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, BS: biostimulation, BA: bioaugmentation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation). The dotted line represents an equal distribution of abundance between species.

3.3. Impact of treatments on nematode structure

Similarity (Whittaker index) among replicates for the same treatment ranged from 90% to 94% with an average value of $92 \pm 1.9\%$, whereas similarity between treatments ranged from 58% to 88%. The principal component analysis (PCA), based on relative abundance of species (Fig. 3), showed that nematofauna communities from anthracene contaminated microcosms were separated from other microcosms with dominance and disappearance of specific species. More than 80% of the variance was explained by the two first axes of the PCA. The highest value of average similarity was recorded between T and TBA ($89 \pm 1\%$) and the lowest value was observed between T and C microcosms ($68 \pm 2\%$).

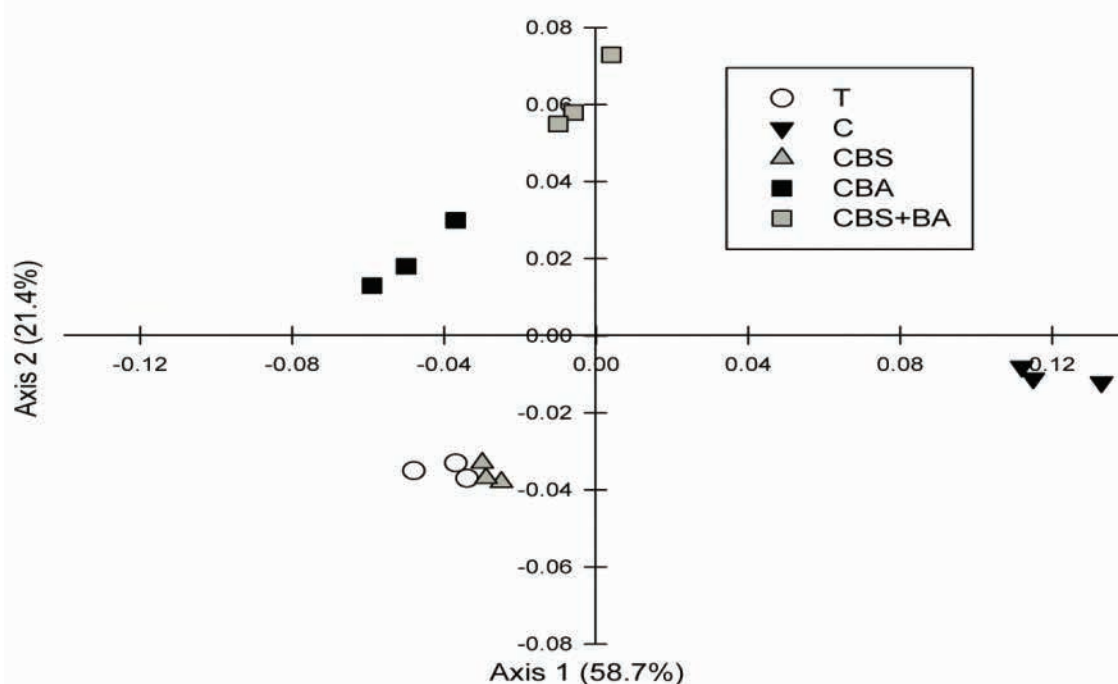


Fig. 3. Impact of artificially spiked anthracene on nematode community structure as a function of microcosm treatment. Principal component analysis (PCA) of the nematode communities as a function of anthracene and the presence or absence and bioremediation treatment after 40 days of incubation (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, CBS: biostimulation, CBA: bioaugmentation, CBS+BA: biostimulation and bioaugmentation).

Significant differences between T and C microcosms mainly resulted from changes in the abundances of the dominant species (Table 5). Elimination of *Mesacanthion diplochma*, *Daptonema fallax* and *Viscosia* sp., increasing numbers of *Spirinia parasitifera* and decreasing abundance of *Oncholaimus campylocercoides* were responsible for the

significant difference between T and C microcosms. Among bioremediation treatments, only biostimulation with anthracene spiking (CBS) resulted to a similar community structure as observed in T microcosms. Differences were observed for the other treatments. Decreasing abundances of *Oncholaimus campylocercoides* and *Paracomesoma dubium* and increasing number of *Spirinia parasitifera* were responsible for significant difference between the T and all other microcosms (TBA, TBS+BA, CBA and CBS+BA). Bioremediation treatments without artificial spiking of anthracene resulted in different community structures (Fig. 4). Both axes of the PCA explained more than 80% of the variations observed. Marked difference relative to T microcosms were especially observed for TBS treatment with dominance of *Prochromadorella neapolitana* which showed a very strong increase from $1 \pm 0.4 \%$ (T) to $32 \pm 1.6\%$ (TBS). In contrast, abundance decreases in *Oncholaimus campylocercoides* ($20 \pm 1\%$ à $11 \pm 0.7\%$) and *Paracomesoma dubium* ($8 \pm 0.5\%$ à $3 \pm 0.4\%$) were responsible for significant differences between (T) and biostimulation microcosms (TBS).

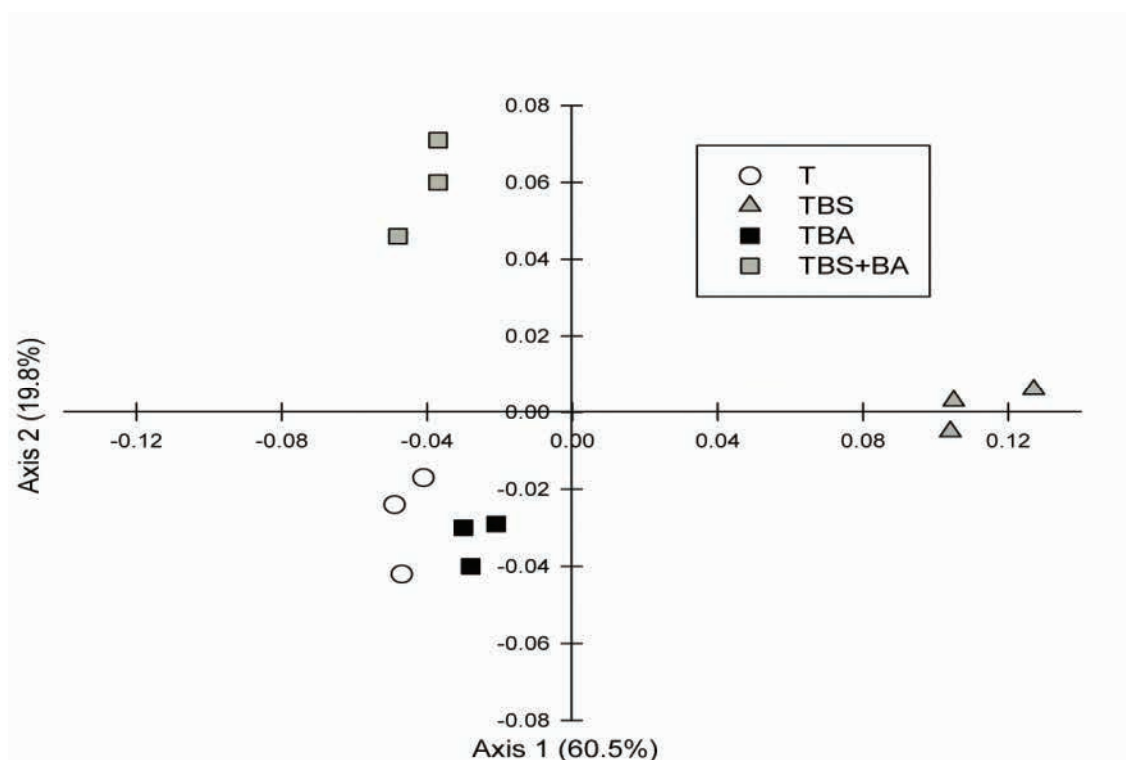


Fig. 4. Impact of bioremediation treatment on nematode community structure. Principal component analysis (PCA) of the nematode communities as a function of bioremediation treatment after 40 days of incubation (T: unspiked sediment, TBS: biostimulation, TBA: bioaugmentation, TBS+BA: biostimulation and bioaugmentation).

Table 5: Species responsible for differences between control and treated microcosms based on similarity percentages (SIMPER) analysis of square-root transformed data. (+): more abundant; (-): less abundant; (elim): elimination. The T microcosms were considered as reference. Species accounting for ~ 70% of overall dissimilarity between treatment groups are ranked in order of importance of their contribution to this dissimilarity (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, BS: biostimulation, BA: bioaugmentation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation)

C	CBS	CBA	CBS+BA	TBS	TBA	TBS+BA
<i>Spirinia parasitifera</i> (+)	<i>Oncholaimus campylocercoides</i> (+)	<i>Odontophora</i> n.sp. (+)	<i>Spirinia parasitifera</i> (+)	<i>Prochromadorella neapolitana</i> (+)	<i>Calomicrolaimus honestus</i> (+)	<i>Anticoma acuminata</i> (+)
<i>Paramonohystera pilosa</i> (-)	<i>Anticoma acuminata</i> (+)	<i>Daptonema fallax</i> (+)	<i>Calomicrolaimus honestus</i> (+)	<i>Oncholaimus campylocercoides</i> (-)	<i>Prochromadorella neapolitana</i> (+)	<i>Spirinia parasitifera</i> (+)
<i>Mesacanthion diplechma</i> (elim)	<i>Paracomesoma dubium</i> (-)	<i>Paracomesoma dubium</i> (-)	<i>Oncholaimus campylocercoides</i> (-)	<i>Paracomesoma dubium</i> (-)	<i>Paracomesoma dubium</i> (-)	<i>Oncholaimus campylocercoides</i> (-)

4. Discussion

Artificial spiking with a low dose of anthracene provoked severe effects on the benthic nematofauna sampled in Bizerte lagoon, although this sediment was slightly contaminated by anthracene with value around $4 \mu\text{g g}^{-1}$. Univariate descriptors of diversity showed that anthracene contamination led to significant effects on free-living nematode assemblages. Total nematode abundance, species richness and number of species significantly decreased with anthracene spiking (Tukey's HSD test, $p < 0.05$). A similar result was also observed with the k-dominance curves. The toxic effect of anthracene observed on abundance is accompanied by strong changes in nematode community structure (Fig. 3 and Table 2) and in moderate but significant decrease of species richness (Table 3). In the C microcosms, the degradation of anthracene was minimal suggesting that indigenous microorganisms have low anthracene degradation capacity. As a consequence, the changes observed in structure and abundance in the nematode community of contaminated microcosms can be associated with the anthracene toxicity. Nevertheless, it is possible that despite the low degradation, secondary metabolites produced during biological degradation of PAH might be also toxic for nematodes (Traczewska 2000). However, the abundance of nematofauna observed in microcosms when biodegradation was stimulated by nutrient addition and/or inoculation of a PAH-degrading bacterial strain, suggests that the degradation products are not toxic. Therefore, the observed toxicity is primarily due to the parent compound of anthracene rather than its degradation metabolites. Anthracene is a three-ring PAH with relatively serious toxicity and as all PAHs, it is stable and persistent in the environment due to its slow response to biodegradation (Cheung et al. 2008). Anthracene tends to bioaccumulate in aquatic life, and is highly toxic to wildlife (Nkansah et al. 2011). The toxicity of anthracene to different organisms has often been appraised in terms of the median lethal concentration (LC50) at 24 or 48h (Toxnet 2003). The values are 0.020 and 0.035 mg l^{-1} at 24 and 48 h, respectively, for *Daphnia magna*. Strong anthracene toxicity has also been noted for *Pimephales promelas* (freshwater fish) and *Artemia salina* (marine crustacean), with values lower than or equal to 0.36 mg l^{-1} . In contrast, Carman et al. (1995) observed that the addition of sublethal concentration of PAHs ($0.3\text{--}3 \mu\text{g g}^{-1}$) has no significant effect on meio- and microbenthic communities. Results from multivariate analyses of the species abundance data demonstrated that responses of nematodes to the anthracene spiking varied as a function of species:

Mesacanthion diplochma was eliminated in contaminated microcosms (C) and seemed to be intolerant to anthracene whereas *Odontophora* n.sp. was not affected by the low dose spiked. *Oncholaimus campylocercoides* and *Paramonohystera pilosa* decreased in contaminated microcosms. These species could be categorized as “sensitive” to anthracene contamination. Similarly, Mahmoudi et al. (2005) demonstrated that *Oncholaimus campylocercoides* was significantly affected by a diesel contamination and categorized as “diesel-sensitive” species in a non PAH contaminated lagoon (Ghar El Melh, Tunisia). In contrast, *Spirinia parasitifera* increased in contaminated microcosms and seemed to be “opportunistic” species at the low dose of anthracene tested (Table 2). Similarly, Beyrem et al., (2010) have also observed an increase of abundance of the genus *Spirinia* in response to lubricant contamination. Our study suggest that the low spiked anthracene concentration was sufficient to induce significant changes in nematode density and community structure suggesting thus that the spiked anthracene was bioavailable for meiobenthic organisms in the experimental conditions imposed. Impact of *in situ* anthracene on nematode community depends on its bioavailability.

It is worth noticing that nematode communities were different in contaminated microcosms than those observed in control microcosms whereas the structure of the latter was similar to the community observed *in situ*. This suggests that the anthracene present *in situ* does not seem to exert a selective pressure on the nematofaunal populations. Bioavailability and hence toxicity of pollutants depends on their partitioning between the sediment, pore water and overlying water (Austen and McEvoy 1997) and can also be dependent on sediment organic carbon content (Ditoro et al. 1991). Anthracene is preferentially bound onto fine particles with slow desorption rates relative to coarse particles (Cornelissen et al. 1998). The studied sediment was dominated by the fine fraction (70 % < 63µm), it is therefore likely that the anthracene present *in situ* was not sufficiently bioavailable to induce a selective pressure on the nematode structure. The variable responses observed at the species level to anthracene spiking suggest that the development of resistance mechanisms to face PAH contamination varies according to species. Nevertheless, even presence of tolerant species to anthracene were observed, effects of this low contamination were obvious at the community level with reduction of diversity and species richness, suggesting that the *in situ* anthracene contamination of the studied sediment did not allow the dominance of a tolerant PAH community as it can be observed in polluted environments (Carman et al. 1995). Carman et al. (2000)

confirmed that exposure to hydrocarbon contamination altered the response of benthic communities (diversity and function) to diesel contamination; nevertheless the benthic community from a contaminated area was more tolerant to hydrocarbon contamination than was a comparable community from a less contaminated environment. The observed changes in species composition upon anthracene contamination could significantly influence interactions between nematodes and interactions among major benthic taxa. In addition, many juvenile fish and crustaceans have meiobenthos, and particularly nematodes and copepods, as an obligate nutritional source (Coull 1990; Gee 1989). Therefore; response of free-living nematodes to anthracene contamination (elimination of some species, increase or decrease of others) could lead to food limitation for their predators, which ultimately could alter entire communities and ecosystems.

In this study, we choose anthracene as a model compound of the PAH family to study its biodegradation in sediment. Bioremediation using inoculation of hydrocarbonoclastic bacteria (CBA), addition of fertilizers (CBS) and combination (CBS+BA) can enhance degradation of "*in situ*" and "spiked" anthracene. In addition, our results suggest that bioavailability and biodegradation of experimentally spiked anthracene can favor the degradation of the "*in situ*" concentration ($1.5 \mu\text{g g}^{-1}$ (dw) CBS+BA vs $4 \mu\text{g g}^{-1}$ (dw) initial). As a consequence, the toxic effects of anthracene on the nematode community observed in C microcosms were removed. Indeed, nematofaunal abundances strongly increased in bioremediation treatments, with significantly higher densities than those observed C microcosms. Nevertheless, the present study clearly highlights the important role of bioremediation in reducing the role of anthracene as structuring factor of meiofaunal community diversity observed under low nutrient conditions. Previous studies have shown that bioremediation with the addition of nutrients and/or inoculation of bacterial consortiums to PAH-contaminated sediments enhanced their biodegradation rates (Guo et al. 2005; Miyasaka et al. 2006). Similarly, Agarry et al. (2011) observed that the addition of biostimulators (Tween 80, silicone oil, pig dung and NPK fertilizer, alone or in combination) increased the biodegradation of anthracene and naphthalene under anaerobic conditions. In our work, nematode abundances strongly increased in both bioremediation treatments, especially for biostimulation treatments (CBS and TBS, Table 2). This suggests that the addition of nutrients and the inoculation of a hydrocarbon degrading bacterium (*Acinetobacter* sp.) favored growth of hydrocarbon-degrading bacteria that were probably nutrient limited in the C microcosms. Therefore, nematodes

in bioremediation microcosms benefit from both i) the decrease in anthracene toxicity and ii) the nutrient addition that alleviated nutrient limitation. Nevertheless, no significant relationships (positive or negative) between anthracene biodegradation and nematofaunal abundance were observed. This is in agreement with the study of Louati et al (submitted manuscript)) showing that biodegradation of fluoranthene, pyrene and phenanthrene was similar irrespective of the presence or not of meiofauna in sediment. Bioremediation treatments without artificial anthracene spiking also impacted the structure of free-living nematodes concomitant with changes in the K dominance. *Calomicrolaimus honestus* species increased in TBA and CBA microcosms whereas *Anticoma acuminata* increased in the TBS+BA microcosms. *Prochromadorella neapolitana* increased only in biostimulation treatments (TBS) and seems to be a tolerant species to slow-release particle fertilizers. The dominance increase of *Prochromadorella neapolitana* specific to TBS microcosms suggests a P limitation of this species in the Bizerte sediment as the N:P ratio of the fertilizers added was 2:1. This species has been reported in eutrophicated Mediterranean sediments (Palacin et al. 1992) suggesting that *Prochromadorella neapolitana* might be considered as an efficient bioindicator of eutrophication. Nevertheless, this species appears to be intolerant to organic pollutants such as permethrin (Boufahja et al. 2011) but resistant to mercury (Hermi et al. 2009). Bioremediation using both addition of fertilizers and addition of hydrocarbonoclastic bacteria can be an attractive solution for enhancing the degradation of anthracene, decreasing thus their potential toxic effects. Nevertheless, only the biostimulation treatment (CBS) resulted in a similar community structure as observed in T microcosms. The combination of biostimulation and bioaugmentation methods resulted in different community structures in comparison to the control microcosms with the appearance of distinct species. However, this treatment was the most efficient at biodegrading anthracene although this is not always observed in PAH biodegradation (Lin et al. 2011), probably as a consequence of nutrient and carbon competition between the indigenous species and the exogenous inoculated bacterium.

5. Conclusion

The results from our study demonstrate a clear differential response of free-living nematode assemblages to a low dose of anthracene. Anthracene appears to have caused more important changes in nematode assemblage as compared to bioremediation treatments, suggesting the dominance of non-tolerant nematofauna populations despite the presence of back ground anthracene contamination in the studied sediment. All bioremediation treatments (biostimulation, bioaugmentation and combination) enhanced biodegradation of anthracene, thus alleviating its toxic effects on nematode abundance and structure. Further studies are planned to evaluate the potential impact of anthracene on the most sensitive species but also to elucidate the mechanisms of resistance of the most tolerant species living in the Bizerte lagoon.

6. Acknowledgments

This work was supported by funding from the CMCU program (PHC-UTIQUE, n° 09G 0189), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and the Faculté des Sciences de Bizerte (FSB). Dr. Emma Rochelle-Newall is gratefully acknowledged as native English speaker for her helpful criticisms on an early version of the manuscript and for English improvements.

7. References

- Abbondanzi F, Bruzzi L, Campisi T, Frezzati A, Guerra R, Lacondini A (2006). Biotreatability of polycyclic aromatic hydrocarbons in brackish sediments: Preliminary studies of an integrated monitoring. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 57(4): 214-221.
- Agarry S E, Owabor C N (2011). Anaerobic bioremediation of marine sediment artificially contaminated with anthracene and naphthalene. *Environ. Technol.* 32(12): 1375-1381.
- Atlas R, Bragg J (2009). Bioremediation of marine oil spills: when and when not - the Exxon Valdez experience. *Microb. Biotechnol.* 2(2): 213-221.
- Austen M C (2004). Natural nematode communities are useful tools to address ecological and applied questions. *Proceeding of the Fourth International Congress of Nematology*. Pa Leiden, E J Brill. 2: 775-791.
- Austen M C, McEvoy A J (1997). The use of offshore meiobenthic communities in laboratory microcosm experiments: Response to heavy metal contamination. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 211(2): 247-261.

- Ben Said O, Goni-Urriza M, El Bour M, Aissa P, Duran R (2010). Bacterial Community Structure of Sediments of the Bizerte Lagoon (Tunisia), a Southern Mediterranean Coastal Anthropized Lagoon. *Microb. Ecol.* 59(3): 445-456.
- Ben Said O, Goni-Urriza M S, El Bour M, Dellali M, Aissa P, Duran R (2008). Characterization of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments, Tunisia. *J. Appl. Microbiol.* 104(4): 987-997.
- Beyrem H, Aissa P (2000). Free-living nematodes, bio-indicators of the evolution of hydrocarbon concentrations in the bay of Bizerta (Tunisia). *Cah. Biol. Mar.* 41(3): 329-342.
- Beyrem H, Louati H, Essid N, Aissa P, Mahmoudi E (2010). Effects of two lubricant oils on marine nematode assemblages in a laboratory microcosm experiment. *Mar. Environ. Res.* 69(4): 248-253.
- Beyrem H, Mahmoudi E, Essid N, Hedfi A, Boufahja F, Aissa P (2007). Individual and combined effects of cadmium and diesel on a nematode community in a laboratory microcosm experiment. *Ecotox. Environ. Safe.* 68(3): 412-418.
- Bonnet J L, Guiraud P, Dusser M, Kadri M, Laffosse J, Steiman R, Bohatier J (2005). Assessment of anthracene toxicity toward environmental eukaryotic microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and selected micromycetes. *Ecotox. Environ. Safe.* 60(1): 87-100.
- Boufahja F, Sellami B, Dellali M, Aissa P, Mahmoudi E, Beyrem H (2011). A microcosm experiment on the effects of permethrin on a free-living nematode assemblage. *Nematology* 13: 901-909.
- Carman K R, Fleeger J W, Means J C, Pomarico S M, McMillin D J (1995). Experimental Investigation of the Effects of Polynuclear Aromatic-Hydrocarbons on an Estuarine Sediment Food-Web. *Mar. Environ. Res.* 40(3): 289-318.
- Carman K R, Fleeger J W, Pomarico S M (2000). Does historical exposure to hydrocarbon contamination alter the response of benthic communities to diesel contamination? *Mar. Environ. Res.* 49(3): 255-278.
- Cheung K C, Zhang J Y, Deng H H, Ou Y K, Leung H M, Wu S C, Wong M H (2008). Interaction of higher plant (jute), electrofused bacteria and mycorrhiza on anthracene biodegradation. *Bioresour. Technol.* 99(7): 2148-2155.
- Chinnadurai G, Fernando O J (2007). Meiofauna of mangroves of the southeast coast of India with special reference to the free-living marine nematode assemblage. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 72(1-2): 329-336.
- Clarke K R, Warwick R M (2001). Changes in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. . UK, PRIMER-E: Plymouth.
- Cornelissen G, Rigterink H, Ferdinandy M, P. V N (1998). Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 32: 966-970.
- Coull B C (1990). Are Members of the Meiofauna Food for Higher Trophic Levels. *Transac. American Microscop. Soc.* 109(3): 233-246.

- De Mesel I, Derycke S, Moens T, Van der Gucht K, Vincx M, Swings J (2004). Top-down impact of bacterivorous nematodes on the bacterial community structure: a microcosm study. *Environ. Microbiol.* 6(7): 733-744.
- Derouiche A, Sanda Y G, Driss M R (2004). Polychlorinated biphenyls in sediments from Bizerte Lagoon, Tunisia. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73(5): 810-817.
- Ditoro D M, Zarba C S, et al. (1991). Technical Basis for Establishing Sediment Quality Criteria for Nonionic Organic-Chemicals Using Equilibrium Partitioning. *Environ. Toxicol. Chem.* 10(12): 1541-1583.
- Erickson R J, Ankley G T, DeFoe D L, Kosian P A, Makynen E A (1999). Additive toxicity of binary mixtures of phototoxic polycyclic aromatic hydrocarbons to the oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 154(1): 97-105.
- Gee J M (1989). An Ecological and Economic-Review of Meiofauna as Food for Fish. *Zool. J. Linn. Soc.* 96(3): 243-261.
- Giere O (2009). *Meiobenthology, the microscopic fauna in aquatic sediments*. Berlin Heidelberg Springer Verlag
- Guo C L, Zhou H W, Wong Y S, Tam N F Y (2005). Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. *Mar. Pollut. Bull.* 51(8-12): 1054-1061.
- Gyedu-Ababio T K, Baird D (2006). Response of meiofauna and nematode communities to increased levels of contaminants in a laboratory microcosm experiment. *Ecotox. Environ. Safe.* 63(3): 443-450.
- Heip C, Vincx M, Vranken G (1985). The Ecology of Marine Nematodes. *Oceanogr. Mar. Biol.* 23: 399-489.
- Hermi M, Mahmoudi E, Beyrem H, Aissa P, Essid N (2009). Responses of a Free-Living Marine Nematode Community to Mercury Contamination: Results from Microcosm Experiments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56(3): 426-433.
- Holmer M, Forbes V E, Forbes T L (1997). Impact of the polychaete *Capitella* sp. I on microbial activity in an organic-rich marine sediment contaminated with the polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene. *Mar. Biol.* 128(4): 679-688.
- 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. *Bioresour. Technol.* 99(7): 2637-2643.
- Juhasz A L, Naidu R (2000). Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 45(1-2): 57-88.
- Kayal S, Connell D W (1995). Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons in Biota from the Brisbane River Estuary, Australia. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 40(5): 475-493.
- Lamshead P J D, Platt H M, Shaw K M (1983). The Detection of Differences among Assemblages of Marine Benthic Species Based on an Assessment of Dominance and Diversity. *J. Nat. Hist.* 17(6): 859-874.
- Legendre P, Legendre L (1998). *Numerical Ecology*. Amsterdam, Elsevier.

- Lin T C, Pan P T, Young C C, Chang J S, Chang T C, Cheng S S (2011). Evaluation of the optimal strategy for ex situ bioremediation of diesel oil-contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18(9): 1487-1496.
- Louati H, Ben Said O, Got P, Soltani A, Mahmoudi E, Cravo-Laureau C, Duran R, Aissa P, Pringault O (2012). Microbial community responses to bioremediation treatments for the mitigation of low-dose anthracene in marine coastal sediments of Bizerte lagoon (Tunisia). *Environ Sci Pollut Res* DOI 10.1007/s11356-012-0860-x.
- Mahmoudi E, Essid N, Beyrem H, Hedfi A, Boufahja F, Vitiello P, Aissa P (2005). Effects of hydrocarbon contamination on a free living marine nematode community: Results from microcosm experiments. *Mar. Pollut. Bull.* 50(11): 1197-1204.
- Mahmoudi E, Essid N, Beyrem H, Hedfi A, Boufahja F, Vitiello P, Aissa P (2007). Individual and combined effects of lead and zinc on a free-living marine nematode community: Results from microcosm experiments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 343(2): 217-226.
- Marwood C A, Smith R E H, Solomon K R, Charlton M N, Greenberg B M (1999). Intact and photomodified polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit photosynthesis in natural assemblages of Lake Erie phytoplankton exposed to solar radiation. *Ecotox. Environ. Safe.* 44(3): 322-327.
- Mekenyan O G, Ankley G T, Veith G D, Call D J (1994). Qsars for Photoinduced Toxicity .1. Acute Lethality of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons to *Daphnia-Magna*. *Chemosphere* 28(3): 567-582.
- Miyasaka T, Asami H, Watanabe K (2006). Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene-contaminated marine sediments. *Biodegradation* 17(3): 227-235.
- Moens T, dos Santos G A P, Thompson F, Swings J, Fonseca-Genevois V, Vincx M, De Mesel I (2005). Do nematode mucus secretions affect bacterial growth? *Aquat. Microb. Ecol.* 40(1): 77-83.
- Narbonne J F, Djomo J E, Ribera D, Ferrier V, Garrigues P (1999). Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusk *Corbicula fluminea*. *Ecotox. Environ. Safe.* 42(1): 1-8.
- Nascimento F J A, Naslund J, Elmgren R (2012). Meiofauna enhances organic matter mineralization in soft sediment ecosystems. *Limnol. Oceanogr.* 57(1): 338-346.
- Naslund J, Nascimento F J A, Gunnarsson J S (2010). Meiofauna reduces bacterial mineralization of naphthalene in marine sediment. *Isme J.* 4(11): 1421-1430.
- Nkansah M A, Christy A A, Barth T (2011). The use of anthracene as a model compound in a comparative study of hydrous pyrolysis methods for industrial waste remediation. *Chemosphere* 84(4): 403-408.
- Onwurah I N E, Ogugua V N, Onyike N B, Ochonogor A E, Otitoju O F (2007). Crude oil spills in the environment, effects and some innovative clean-up biotechnologies. *Int. J. Environ. Res.* 1(4): 307-320.
- Palacin C, Gili J M, Martin D (1992). Evidence for Coincidence of Meiofauna Spatial Heterogeneity with Eutrophication Processes in a Shallow-Water Mediterranean Bay. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 35(1): 1-16.

- Perugini M, Visciano P, Giammarino A, Manera M, Di Nardo W, Amorena M (2007). Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the Adriatic Sea, Italy. *Chemosphere* 66(10): 1904-1910.
- Platt H M, Warwick R M (1983). Free living marine nematodes. Part I. British Enoplids. *Synopses of the British Fauna* no 28. . Cambridge, Cambridge University Press.
- Platt H M, Warwick R M (1988). Free living marine nematodes. Part II. British Chromadorids. *Synopses of the British Fauna* no 38. Leiden, E.J Brill.
- Riera P, Hubas C (2003). Trophic ecology of nematodes from various microhabitats of the Roscoff Aber Bay (France): importance of stranded macroalgae evidenced through delta C-13 and delta N-15. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 260: 151-159.
- Roling W F M, Milner M G, Jones D M, Fratepietro F, Swannell R P J, Daniel F, Head I M (2004). Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(5): 2603-2613.
- Smolinski A, Stanczyk K, Kapusta K, Howaniec N (2013). Analysis of the organic contaminants in the condensate produced in the in situ underground coal gasification process. *Water Sci. Technol.* 67(3): 644-650.
- Toxnet. (2003). "Hazardous Substances Data Bank of Toxnet."
- Traczewska T M (2000). Changes of toxicological properties of biodegradation products of anthracene and phenanthrene. *Water Sci. Technol.* 41(12): 31-38.
- Traunspurger W (1997). Bathymetric, Seasonal and Vertical Distribution of Feeding-Types of Nematodes in an Oligotrophic Lake. *Vie et Milieu-Life and Environment* 47(1): 1-7.
- Warwick R M, Clarke K R (1991). A Comparison of Some Methods for Analyzing Changes in Benthic Community Structure. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 71(1): 225-244.
- Warwick R M, Platt H M, Somerfield P J (1998). Free-living marine nematodes. Part III. British monhysterids. *Synopses of the British Fauna (New Series)*. Shrewsbury, UK, Studies Council
- Wieser W (1960). Benthic Studies in Buzzards Bay .2. the Meiofauna. *Limnol. Oceanogr.* 5(2): 121-137.
- Yoshida M, Hamadi K, Ghrabi. A (2002). Solid waste landfills and soil/sediment contamination around Bizerte lagoon: Possible pollution sources.In: Ghrabi A., Yoshida M. (eds) *Study on Environmental Pollution of Bizerte Lagoon*. INRST-JICA Publishers: 55 p.

IV. PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION

Le premier article avait pour objectif d'estimer *in vitro* l'impact d'une contamination sédimentaire par l'anthracène à faible dose (1ppm) sur l'activité à l'interface eau-sédiment (microélectrodes à oxygène), la diversité (T-RFLP) et la biomasse (cytométrie en flux) des communautés bactériennes. L'effet de la bioremédiation (biostimulation seule ou associée à la bioaugmentation) sur les bactéries a été également testé. Plusieurs résultats majeurs peuvent être dégagés :

- ✓ A la fin de l'incubation (30 jours), l'anthracène a provoqué une très forte inhibition de l'activité dans le premier mm et même en cas d'addition des sels nutritifs et d'inoculation de la souche bactérienne ;
- ✓ Les résultats de cytométrie en flux ont montré que l'anthracène a eu un effet important sur la biomasse des bactéries indigènes. En effet, on a observé l'inhibition de la croissance d'une population bactérienne dans les microcosmes contaminés et ceux contaminés même après l'ajout des nutriments et de la souche bactérienne SFI 18 (*Acitenobacter* sp. ; AM490039) ;
- ✓ Les analyses de correspondance ont mis en évidence une structuration des communautés bactériennes selon la contamination sédimentaire par l'anthracène et le type de traitement utilisé (biostimulation seule ou associée à la bioaugmentation).

Le deuxième article a permis d'évaluer l'impact de la bioremédiation des sédiments contaminés par l'anthracène sur la structure spécifique des nématodes. Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

- ✓ L'effet négatif important de l'anthracène sur les densités nématologiques ;
- ✓ Une réponse différente selon les espèces de nématodes libres marins à une contamination par l'anthracène ;
- ✓ Des modifications profondes de la structure des peuplements de nématodes libres sous l'effet de l'anthracène en raison d'une différence du degré de sensibilité des espèces de nématodes libres à ce contaminant. Ainsi, l'espèce *Oncholaimus campylocercoides* peut être considérée comme "anthracène-sensible" alors que *Spirinia parasitifera* dont la densité s'accroît dans tous les microcosmes contaminés peut être considérée comme une espèce opportuniste ;
- ✓ La prédominance d'espèces de nématodes non tolérantes à l'anthracène malgré la présence d'une concentration d'anthracène (4ppm) dans les sédiments naturels de la station prospectée dans la lagune de Bizerte ;

- ✓ Tous les traitements de bioremédiation (biostimulation, bioaugmentation et combinaison) ont provoqué la dégradation de l'anthracène réduisant ainsi l'effet toxique de l'anthracène sur la nématofaune ;
- ✓ L'augmentation importante des densités des nématodes dans les microcosmes de bioremédiation surtout dans les tests de biostimulation avec ajout de sels nutritifs ;
- ✓ La bioremédiation a modifié aussi la composition spécifique des peuplements de nématodes par rapport au peuplement témoin. Ainsi, La densité de l'espèce *Prochromadorella neapolitana* a augmenté d'une manière importante dans les microcosmes de biostimulation sans l'ajout de l'anthracène. L'ajout des sels nutritifs a pu favoriser la croissance de microorganismes ingérés par cette espèce appartenant au groupe trophique 2A (brouteurs d'épistrates). Cette espèce a été observée dans les sédiments méditerranéens eutrophisés (Palacin *et al.*, 1992) suggérant que *Prochromadorella neapolitana* pourrait être considérée comme une espèce bioindicatrice de l'eutrophisation.

Ces deux études nous ont permis de tirer plusieurs conclusions majeures :

- ✓ La contamination artificielle des sédiments de la lagune de Bizerte par l'anthracène a eu un impact certain sur les peuplements bactériens et nématologiques. Cela conforte l'intérêt d'utiliser la bioremédiation comme une technologie viable pour réduire les effets toxiques de l'anthracène sur ces niveaux trophiques et accélérer la minéralisation de ce contaminant organique. Par contre, la première étude a montré que la bioremédiation n'a pas entraîné une augmentation de la biomasse bactérienne. Ceci pourrait s'expliquer par la compétition entre les espèces pour l'accès aux ressources (Yu *et al.*, 2005) mais également par l'absence de la méiofaune (les sédiments ayant été défauné). Cette dernière, qui favorise la dégradation de la matière organique, peut stimuler d'une manière indirecte la croissance des bactéries (Rysgaard *et al.*, 2000) .
- ✓ La deuxième étude a révélé une augmentation importante des densités des nématodes suite à l'ajout des sels nutritifs et/ou de la souche bactérienne. On a observé une réduction, par la suite, de l'effet toxique de l'anthracène sur la nématofaune. Ainsi, les différentes techniques de bioremédiation ont stimulé la dégradation de l'anthracène en particulier lorsque la biostimulation est combinée à la bioaugmentation. Cette évaluation préliminaire a montré que la bioremédiation est susceptible d'entraîner une atténuation de l'effet négatif de l'anthracène sur la nématofaune.

Pour mieux cerner l'impact écologique de la bioremédiation des sédiments contaminés par les HAPs sur les bactéries et les organismes méiobenthiques, les résultats issues de ces premières études ont permis de proposer des études complémentaires:

- ✓ Changer la molécule modèle utilisée précédemment par une autre molécule tricyclique plus répandue dans la lagune de Bizerte à savoir le phénanthrène. Le phénanthrène est présent dans l'huile d'anthracène, dans le filtrat de résidus d'anthracène cristallisé, ou dans la fraction légère de distillation de l'anthracène brut. L'huile est elle-même produite par distillation du goudron de houille ;
- ✓ Augmenter la dose du contaminant de 1ppm à 100ppm puisque la plupart des travaux antérieurs de bioremédiation utilisent de fortes doses de HAPs ;
- ✓ Varier la composition en éléments nutritifs et augmenter les doses en nutriments pour la technique de biostimulation ;
- ✓ Changer la souche bactérienne utilisée pour la technique de bioaugmentation.

CHAPITRE III : EFFETS D'UNE SEULE MOLECULE DE HAP

PARTIE B : APPLICATION A DES SEDIMENTS CONTAMINES PAR UNE FORTE DOSE DE PHENANTHRENE

I. INTRODUCTION

La biodépollution des eaux et des sédiments, tributaire de l'activité des populations bactériennes indigènes peut être limitée par la disponibilité des éléments nutritifs essentiels pour leurs croissances (Coulon *et al.*, 2006). Ainsi, la biostimulation est une technique de restauration couramment utilisée pour le traitement des sites contaminés par certains types de micropolluants dans le but d'accélérer leur dégradation (Riser-Roberts, 1998). En effet, le taux de dégradation des HAPs dans les sédiments varie largement en fonction de la quantité de nutriments ajoutés (Mills *et al.*, 2004). L'adaptation des microorganismes à la dégradation de ces composés récalcitrants a été par ailleurs démontrée par plusieurs travaux (Ben Said *et al.*, 2008; Bibiana *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2000). L'omniprésence des HAPs reste un problème fondamental pour les environnements aquatiques ce qui nécessite l'isolement des bactéries impliquées dans le processus de leur dégradation (Samanta *et al.*, 2002). Toutefois, s'il existe de nombreux travaux dans ce sens, l'impact de la bioremédiation des sédiments contaminés par le phénanthrène sur les communautés bactériennes et méiofaunistiques est relativement moins étudié (Schäfer *et al.*, 2001; Miyasaka *et al.*, 2006).

De ce fait, la partie B vise à étudier, d'une part, les réponses simultanées des bactéries et de la méiofaune suite à une contamination artificielle des sédiments par le phénanthrène et, d'autre part, à mesurer l'impact de la bioremédiation de ces mêmes sédiments. Deux stratégies de bioremédiation ont été comparées : la biostimulation par ajout de sels nutritifs et la combinaison de la biostimulation et de la bioaugmentation par utilisation d'une souche bactérienne *Bacillus megaterium* isolée des sédiments de la lagune de Bizerte et qui s'est montrée capable de dégrader les HAPs (Ben Said *et al.*,

2008). Deux compositions d'enrichissements nutritifs, utilisées seules et couplées à la bioaugmentation, ont été comparées dans le but de choisir la composition la plus favorable pour la croissance des bactéries indigènes.

✓ Une première étude a été consacrée aux réponses simultanées (biomasse et densité) d'une communauté bactérienne et d'une communauté de nématodes libres marins à une contamination artificielle des sédiments par le phénanthrène ainsi qu'à mesurer l'impact de la bioremédiation vis à vis de ces modèles biologiques. Cette étude a permis la rédaction d'une publication (P3) intitulée «**Intérêt de la bioremédiation dans la réduction de l'effet toxique du phénanthrène sur les communautés de bactéries et de nématodes libres benthiques**» qui a été publiée dans le Bulletin de la Société Zoologique de France.

✓ La seconde étude s'est intéressée quant à elle à l'effet de la biostimulation (seule ou associée à la bioaugmentation des sédiments artificiellement contaminés par le phénanthrène) sur les bactéries, la méiofaune et la structure spécifique des nématodes libres marins ainsi qu'à la mesure du pourcentage de dégradation du phénanthrène. Cette étude a fait l'objet d'un article (P4) intitulé «**Biostimulation as an attractive technique to reduce phenanthrene toxicity for meiofauna and bacteria in lagoon sediment**» qui a été soumis à la revue Environmental Science and Pollution Research.

Références bibliographiques

- Ben Said O, Goni-Urriza MS, El Bour M, Dellali M, Aissa P, Duran R (2008). Characterization of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments, Tunisia. *J Appl Microbiol*, **104**, 987-997.
- Bibiana M. Coppotelli & Agustin Ibarrolaza & Romina L. Dias & Maria T. Del Panno & Luise Berthe-Corti & Irma S. Morelli. (2010). Study of the Degradation Activity and the Strategies to Promote the Bioavailability of Phenanthrene by *Sphingomonas paucimobilis* Strain 20006FA. *Microb Ecol*, **59**, 266-276.
- Coulon F., Boyd oyd A. McKew, A. Mark Osborn, Terry erry J. McGenity McGenity and Kenneth N. Timmis. (2006). Effects of temperature and biostimulation on oil-degrading microbial communities in temperate estuarine waters. *Environ. Microbiol.* **10**: 1462-2920.
- Mills, M.A., Bonner, J.S., Page, C.A., Autenrieth, R.L. (2004). Evaluation of bioremediation strategies of a controlled oil release in a wetland. *Marine Pollution Bulletin*, **49**, 425-435.
- Miyasaka, T., Asami, H. & Watanabe, K. (2006). Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene-contaminated marine sediments. *Biodegradation*, **17**(3), 227-235.
- Riser-Roberts, E. (1998). Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes. Lewis Publishers, Boca Raton. p. 5-313.
- Saito A, Iwabuchi T, Harayama S. (2000). A novel phenanthrene dioxygenase from *Nocardioide* sp. strain KP7: expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **182**, 2134-41.
- Samanta, S. K., Singh, O. V. & Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, **20**(6), 243-248.
- Schäfer, H., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P., Pukall, R. (2001). Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiol Ecol*, **34**: 243-253.

II. PUBLICATION 3:

**INTÉRÊT DE LA BIOREMÉDIATION DANS LA RÉDUCTION DE L'EFFET
TOXIQUE DU PHÉNANTHRÈNE SUR LES COMMUNAUTÉS DE BACTÉRIES
ET DE NÉMATODES LIBRES BENTHIQUES**

Hela LOUATI¹, Olfa BEN SAID^{1*}, Amel SOLTANI¹, Ezzedine MAHMOUDI¹, Cristiana
CRAVO-LAUREAU², Robert DURAN², Olivier PRINGAULT³ & Patricia AISSA¹

Publié dans : **SOCIETE ZOOLOGIQUE DE FRANCE**

¹ Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement, Faculté des Sciences de Bizerte-
Université de Carthage- Tunisie.

² Laboratoire Ecosystèmes Lagunaires, UMR 5119 CNRS-UM2-IFREMER- IRD ECOLAG,
Station Méditerranéenne de l'environnement Littoral, Sète. Université de Montpellier II
– France.

³ Equipe Environnement et Microbiologie – IPREM UMR 5254 - IBEAS – Université de
Pau et des Pays de l'Adour - France.

Résumé

Une étude en microcosmes a été effectuée pour évaluer l'impact de la bioremédiation de sédiments marins artificiellement contaminés par un HAP « le phénanthrène » (100 ppm) sur une communauté de bactéries et de nématodes libres benthiques provenant de lagune de Bizerte (Tunisie). La bioremédiation a été réalisée par biostimulation seule (avec 2 compositions différentes) et couplée à la bioaugmentation par ajout de la souche bactérienne "*Bacillus* sp." isolée à partir de sédiments marins contaminés. Les analyses univariées ont montré des différences significatives ($p < 0,05$) entre les microcosmes témoins et contaminés. Ainsi, le phénanthrène a entraîné une diminution de la biomasse en bactéries indigènes dans la colonne d'eau, à l'interface et dans le sédiment et en parallèle une réduction hautement significative ($p < 0,001$) des densités moyennes de nématodes. Nos résultats ont également montré que la bioremédiation est susceptible d'entraîner une réduction de l'effet toxique du phénanthrène sur la microflore et la nématofaune marines. Ainsi, tous les essais de biostimulation seule ou associée à la bioaugmentation ont révélé une nette augmentation de la biomasse bactérienne totale et des effectifs moyens des nématodes par rapport aux microcosmes contaminés. Cette augmentation a été plus accentuée au niveau des microcosmes de biostimulation et de combinaison avec ajout d'une composition variée de nutriments.

1. Introduction

En milieu aquatique, une grande partie des composés d'origine anthropique s'accumule au niveau des sédiments qui deviennent ainsi d'importants réservoirs de xénobiotiques tels les hydrocarbures aromatiques polycycliques (SOCLO *et al.*, 2000). Ces composés ubiquistes sont connus pour être toxiques, génotoxiques, cancérigènes et facilement bioaccumulables (SAMANTA *et al.*, 2002). Les organismes benthiques sont directement exposés à ces contaminants, qu'ils soient adsorbés sur la phase particulaire, dissous dans l'eau interstitielle ou à l'interface eau-sédiment. Les communautés méiofaunistiques et en particulier les nématodes libres, taxon prédominant de la méiofaune, sont considérés comme bioindicateurs des conditions environnementales (MAHMOUDI *et al.*, 2005 ; URBAN-MALINGA *et al.*, 2006). En effet, toutes les espèces de nématodes, à l'exception des nématodes prédateurs, sont susceptibles de consommer des bactéries (MOENS & VINCX, 1997). Les populations bactériennes participent activement à la biodégradation des composés persistants (PENG *et al.*, 2008). Toutefois, cette atténuation naturelle de ces composés persistants demeure insuffisante surtout dans le cas de polluants récalcitrants comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Ainsi, l'isolement de plusieurs souches bactériennes capables de minéraliser les hydrocarbures a permis de les utiliser dans les essais de bioréhabilitation de sites pollués (MROZIK *et al.*, 2003).

En milieu océanique, plusieurs sites de Méditerranée ont été signalés contaminés par les HAPs (LOUATI *et al.*, 2001 ; BEN SAID *et al.*, 2010) mais les travaux consacrés à la bioremédiation des sédiments marins contaminés par ces contaminants et à la détermination de leurs effets sur les communautés benthiques restent peu nombreux (SCHRATZBERGER *et al.*, 2003 ; MIYASAKA *et al.*, 2006). Le présent travail vise donc à étudier, *in vitro*, les réponses simultanées d'une communauté bactérienne et d'une communauté de nématodes libres marins après contamination artificielle des sédiments par le phénanthrène ainsi qu'à mesurer l'impact de la bioremédiation de ces mêmes sédiments. Deux stratégies de bioremédiation ont été comparées : la biostimulation par ajout de sels nutritifs et la combinaison de la biostimulation et de la bioaugmentation par utilisation d'une souche bactérienne du genre *Bacillus* sp., laquelle a été précédemment isolée de sédiments de la lagune de Bizerte et s'est montrée capable de dégrader les HAPs (BEN SAID *et al.*, 2008).

2. Matériel et méthodes

2.1. Milieu d'étude et stratégie d'échantillonnage

Du sédiment avec sa méiofaune naturelle a été prélevé en mars 2010 au niveau de la station Echaâra, dans la lagune de Bizerte située au nord de la Tunisie (Fig. 1). Les échantillons de sédiment destinés à l'étude faunistique et bactériologique ont été extraits d'une façon stérile (OMS, 1995) à l'aide de carottiers en plexiglas de 10 cm² de section (Vitiello et Aïssa, 1985) qui sont introduits à une profondeur de 10 cm avant de transférer leur contenu dans des tubes en plexiglas préalablement autoclavés.

2.2. Expérimentation

Au laboratoire, le sédiment a été manuellement homogénéisé avec une large spatule avant d'être utilisé pour le remplissage des différents microcosmes.

2.2. 1. Contamination des sédiments par le phénanthrène

La contamination a été effectuée sur la fraction fine des sédiments (fraction < 63 µm). Une solution-mère de phénanthrène a été tout d'abord préparée par dissolution de phénanthrène dans l'acétone (5mg /ml) dans le but d'obtenir une concentration finale de ce contaminant correspondant à 100 ppm.

Après évaporation du solvant organique, des quantités de 100 g de sédiment humide ont été ajoutées dans tous les microcosmes et une première agitation a été réalisée pendant 2h à température ambiante à 128 tours/mn. Avant l'installation des microcosmes, le sédiment a ensuite été recouvert d'eau de mer filtrée (0,2 µm) puis laissé reposer pendant 24h pour stabilisation. Dans les microcosmes témoins, 100 g de sédiment dépourvu de méiofaune et non contaminé ont été ajoutés à 100 g de sédiment naturel. Pour les microcosmes contaminés, des quantités de 100 g de sédiment naturel ont été ajoutés aux microcosmes contenant les sédiments contaminés par le phénanthrène.

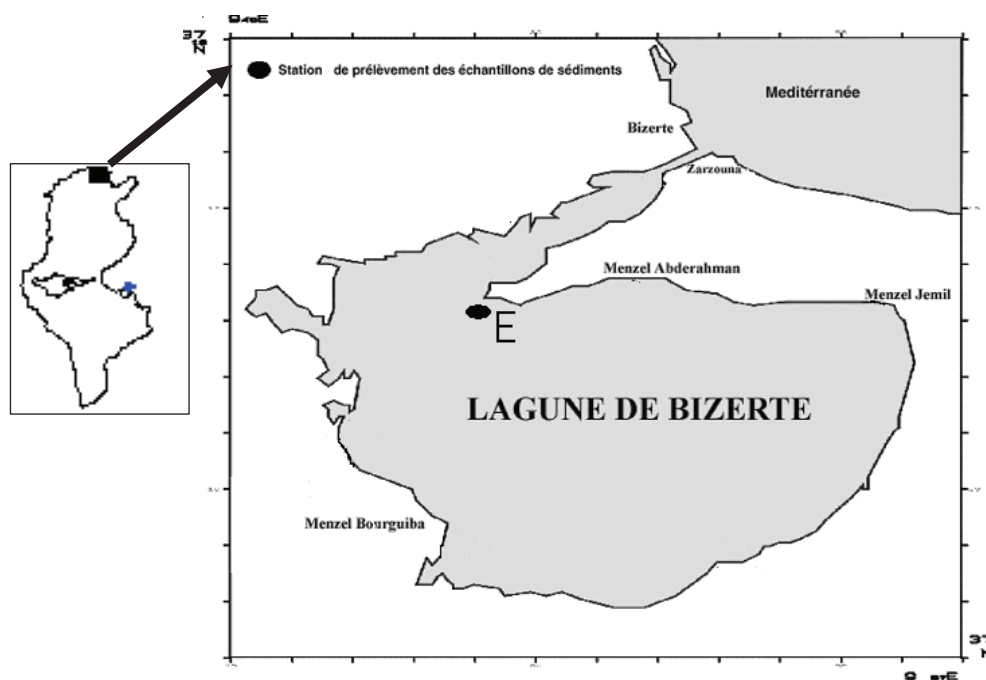


Fig. 1. Localisation géographique de la station prospectée dans la lagune de Bizerte (mars 2010). E : Echaraà.

2.2.2. Inoculation des sédiments et techniques de bioremédiation

Biostimulation : Deux compositions en sels nutritifs (CBS1 et CBS2) ont été préparées dans 100 ml d'eau de mer filtrée (0,2 μm) avant d'être ajoutées aux sédiments précédemment contaminés.

Elles sont respectivement de 100 g.L⁻¹ NaNO₃ et 22 g.L⁻¹ KH₂PO₄ (MIYASAKA *et al.*, 2006) pour (CBS1) et de 1000 mg.L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ ; 10,000 mg.L⁻¹ K₂HPO₄ ; 5000 mg.L⁻¹ KH₂PO₄ ; 200 mg.L⁻¹ MgSO₄, 7H₂O ; 100 mg.L⁻¹ CaCl₂, 2H₂O ; 200 mg.L⁻¹ Mg Cl₂, 6H₂O et des éléments traces: 5 mg.L⁻¹ FeSO₄, 7H₂O ; 3 mg.L⁻¹ MnSO₄, H₂O ; 0,015 mg.L⁻¹ CuSO₄, 5H₂O ; 1 mg.L⁻¹ (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 7H₂O ; 0,01 mg.L⁻¹ Na₂MoO₄, 2H₂O (YU *et al.*, 2005 ; JACQUES *et al.*, 2008) pour (CBS2).

Biostimulation-Bioaugmentation : Les deux compositions en sels nutritifs (CBS1 et CBS2) ainsi que le culot de la suspension bactérienne de DO 600 égale à 1 d'une souche «*Bacillus sp.*» ont été ajoutées aux sédiments précédemment contaminés. Une deuxième agitation a été effectuée dans tous les microcosmes pendant une demi-heure à température ambiante à 120 tours/min après l'ajout des sels nutritifs et du culot bactérien de la souche utilisée aux différents microcosmes de bioremédiation.

2.2.3. Démarrage de l'expérience

Les microcosmes consistent en des bouteilles en verre de 2 l. Chacun des microcosmes fonctionnant comme un système fermé avec une aération continue assurée par une pompe d'aquarium a été rempli d'eau de mer stérilisée et filtrée (volume final de 1 litre) (Fig. 2). La fiabilité de tels dispositifs expérimentaux a été vérifiée par plusieurs auteurs (Austen *et al.*, 1994 ; Mahmoudi *et al.*, 2005). Tous les traitements ont été réalisés en duplicata. Au début et à la fin des incubations (5 et 20 jours), 1g de sédiment et 1 ml d'eau (à la surface de l'eau et à l'interface eau-sédiment) ont été prélevés de chaque microcosme pour la quantification de la charge bactérienne. Les sédiments des microcosmes destinés à l'étude méiobenthique ont été conservés dans du formol à 4%.

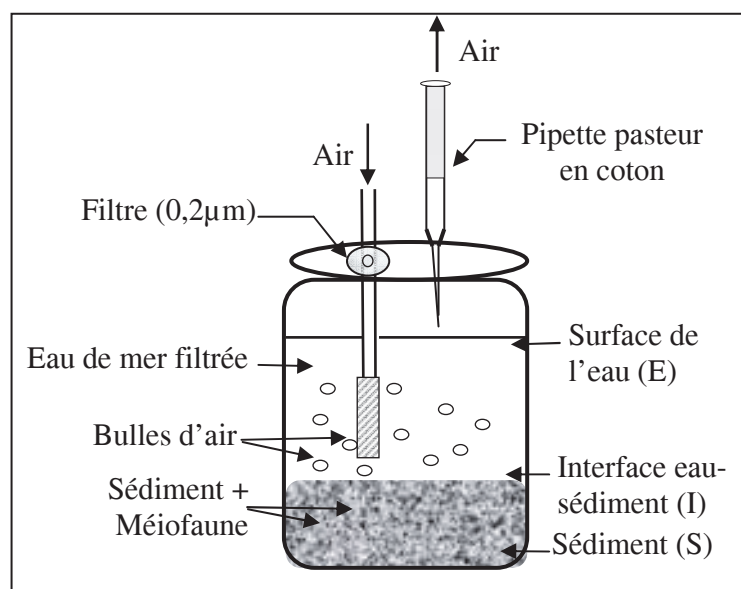


Fig.2. Schéma d'un microcosme.

2.2.4. Dénombrement des bactéries hétérotrophes aérobies

La quantification de la charge en bactéries hétérotrophes aérobies par la méthode de MPN (Most Probable Number) et le dénombrement des bactéries capables d'utiliser le phénanthrène comme source de carbone et d'énergie en utilisant la technique d'UFC (Unit Forming Colony) sur milieu sélectif ont été effectués pour les trois compartiments de chacun des microcosmes (à la surface de l'eau "E" (bactéries/ml d'eau), à l'interface eau-sédiment "I" (bactéries/ml d'eau) et au niveau du sédiment "S" (bactérie/gramme de sédiment humide)).

2.2.5. Techniques d'étude de la nématofaune

Les nématodes colorés au rose bengale ont été séparés par la méthode de lévigation-tamassage puis comptés sous loupe binoculaire afin de calculer la moyenne des densités nématologiques (individus/microcosme).

2.2.6. Traitement statistique des données

Toutes les données obtenues ont subi une transformation du type $y = \log(x+1)$ pour homogénéiser les variances pour l'étude bactériologique. La plupart des analyses statistiques des données suivent les méthodes standards d'analyse des communautés décrites par CLARKE & WARWICK (2001). Le test Anova à un critère de classification (Anova 1) ou le test de Kruskal-Wallis (en cas de non homogénéité des variances) ont été utilisés pour mettre en évidence une différence significative globale entre les différents traitements considérés. Le test de la différence significative de Tukey (Tukey HSD) a été utilisé afin de réaliser les comparaisons multiples entre microcosmes témoins et contaminés. Les traitements statistiques ont été réalisés grâce au logiciel Statistica version 6. Le seuil de signification retenu a été de 5%.

Dans le texte, les microcosmes sont référencés selon les codes présentés dans le tableau 1.

Tableau 1. Codes utilisés pour identifier les différents microcosmes.

Traitement	Code
Sédiment naturel témoin	T
Sédiment contaminé par le phénanthrène à une concentration finale égale à 100 ppm	C
Sédiment contaminé par le phénanthrène à une concentration finale égale à 100 ppm + composition 1 des sels nutritifs	CBS1
Sédiment contaminé par le phénanthrène à une concentration finale égale à 100 ppm + composition 2 des sels nutritifs	CBS2
Sédiment contaminé par le phénanthrène à une concentration finale égale à 100 ppm+ composition 1 des sels nutritifs + « <i>Bacillus sp.</i> »	CBS1+BA
Sédiment contaminé par le phénanthrène à une concentration finale égale à 100 ppm + composition 2 des sels nutritifs + « <i>Bacillus sp.</i> »	CBS2 +BA

3. Résultats

3.1. Etude bactériologique

3.1.1. Effets du phénanthrène sur les bactéries indigènes (Fig. 3 a et b)

La quantification des charges moyennes en bactéries aérobies hétérotrophes par *MPN* dans les microcosmes contaminés par le phénanthrène met en évidence leur nette réduction par rapport aux témoins et cela dans la colonne d'eau, à l'interface et dans le sédiment aussi bien au début qu'à la fin de la période d'incubation. Cependant, la charge en bactéries n'a pas diminué au début de l'expérimentation au niveau du compartiment sédimentaire (Fig.3 a). Cette diminution a été plus importante après 20 jours dans l'eau et le sédiment. Ainsi, le test HSD montre une diminution hautement significative ($p < 0,001$) de la charge bactérienne dans la colonne d'eau et à l'interface eau-sédiment et seulement significative ($p < 0,05$) dans le sédiment où la charge moyenne en bactéries viables est passée de $4,42 \pm 0,03$ bactéries/g de sédiment dans les microcosmes témoins (T) à $3,82 \pm 0,06$ bactéries/g de sédiment dans les microcosmes contaminés par le phénanthrène après 20 jours de l'incubation (Fig.3 b).

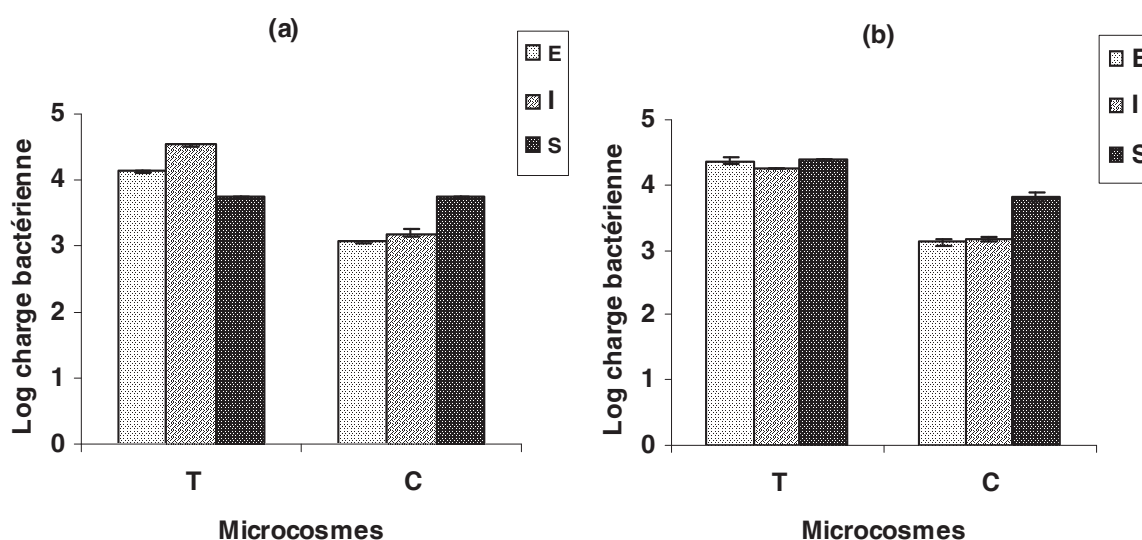


Fig. 3. Variation des charges bactériennes après 5 jours (a) et 20 jours (b) au niveau des différents compartiments (colonne d'eau (E), interface eau-sédiment (I) et sédiment (S)) des microcosmes témoins (T) et de ceux contaminés par le phénanthrène (C).

3.1.2. Effets de la biostimulation sur les bactéries indigènes (Fig. 4 a et b)

Au début de l'expérimentation, les deux compositions de biostimulation ont tendance à entraîner un accroissement significatif des charges bactériennes totales, surtout à

l'interface eau-sédiment et dans le compartiment sédimentaire (Fig.4 a). L'élévation de la charge en bactéries est plus nette 20 jours après ajout des sels nutritifs.

Cette augmentation est plus importante et hautement significative au niveau des microcosmes (CBS2) et surtout au sein des sédiments [$5,52 \pm 0,02$ bactéries/g de sédiment dans (CBS2) contre $3,82 \pm 0,06$ bactéries/g de sédiment dans (C)] (Fig.4 b).

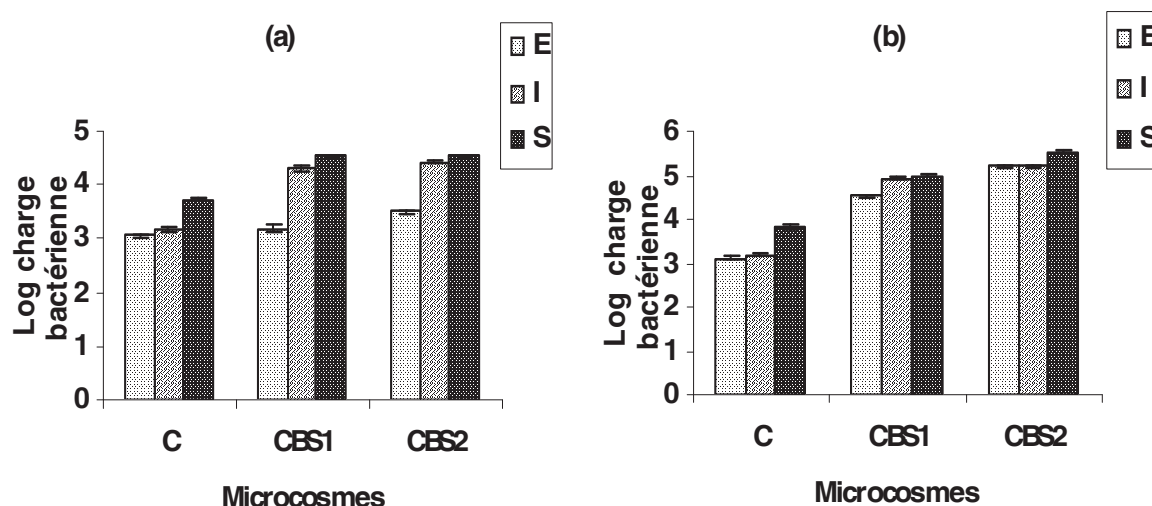


Fig. 4. Variation des charges bactériennes après 5 jours (a) et 20 jours (b) au niveau des différents compartiments (colonne d'eau (E), interface eau-sédiment (I) et sédiment (S)) des microcosmes contaminés par le phénanthrène (C) et de ceux contaminés avec ajout de solutions de sels nutritifs (CBS1 ou CBS2).

3.1.3. Effets de l'association biostimulation-bioaugmentation sur les bactéries indigènes (Fig. 5 a et b)

Après 5 ou 20 jours d'expérimentation, l'association de la biostimulation et de bioaugmentation a accru notablement et significativement les charges moyennes en bactéries hétérotrophes au niveau de tous les compartiments microcosmiques mais davantage au niveau des sédiments et à l'exception des microcosmes (CBS1+BA) et (CBS2+BA) où la charge en bactéries n'a pas augmenté à l'interface eau-sédiment au début de l'incubation (Fig.3 a). L'accroissement de la biomasse bactérienne dans la colonne d'eau, à l'interface eau/sédiment et dans le sédiment a été plus accentué à la fin de la période d'incubation et hautement significative ($p < 0,001$) au niveau des microcosmes (CBS2 +BA) en présence de la souche bactérienne *Bacillus* sp.. Ainsi, la charge sédimentaire en bactéries aérobies est passée de $3,82 \pm 0,06$ bactéries/g de sédiment humide dans les microcosmes contaminés (C) à $5,40 \pm 0,01$ bactéries/g de

sédiment humide dans ceux contaminés et inoculés par le culot bactérien de la souche S18 (CBS2 +BA) (Fig.3 b).

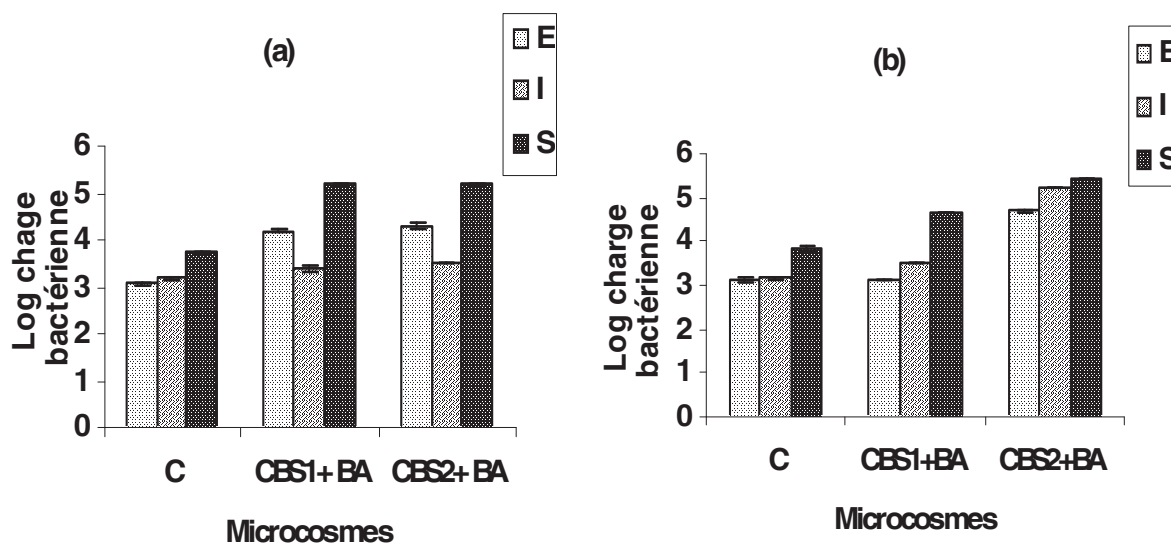


Fig.5. Variation des charges bactériennes après 5 jours (a) et 20 jours (b) au niveau des différents compartiments (colonne d'eau (E), interface eau-sédiment (I) et sédiment (S)) des microcosmes contaminés par le phénanthrène (C) et de ceux contaminés avec ajout de sels nutritifs et d'une souche de *Bacillus* sp. (CBS1+BA ; CBS2+BA).

3.1.4. Effets sur les bactéries capables d'utiliser le phénanthrène comme unique source de carbone et d'énergie (Fig. 6)

La quantification à la fin de la période d'incubation des bactéries capables d'utiliser le phénanthrène comme unique source de carbone et d'énergie exprimés en unités formant colonies (UFC) montre que la biostimulation seule et la combinaison des deux procédés de bioremédiation ont entraîné une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) de la charge en bactéries dégradant le phénanthrène au niveau de trois compartiments étudiés par rapport aux microcosmes témoins et à ceux contaminés. De plus, les densités les plus élevées de bactéries minéralisant le phénanthrène ont été dénombrées au niveau des microcosmes (CBS2) et (CBS2+BA) utilisant la souche S18.

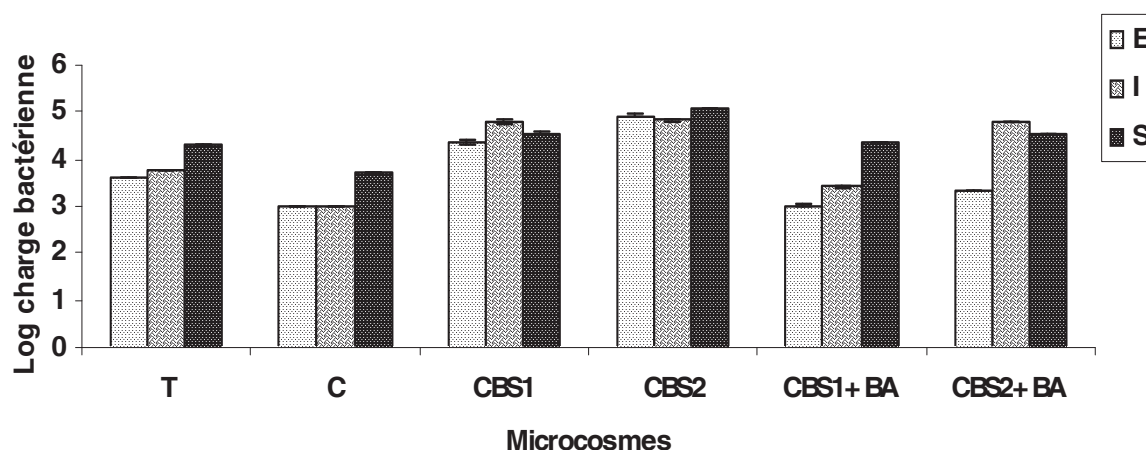


Fig. 6. Variation après 20 jours d'incubation des charges en bactéries capables d'utiliser le phénanthrène comme unique source de carbone et d'énergie au niveau des différents compartiments (colonne d'eau (E) (UFC/ml d'eau), interface eau-sédiment (I) (UFC/ml d'eau) et sédiment (S) (UFC/gramme de sédiment humide) dans les différents microcosmes [(T), (C), (CBS1), (CBS2), (CBS1+BA), (CBS2+ BA)].

3.2. Etude nématologique

3.2.1. Effets du phénanthrène sur les densités de nématodes libres marins

Les densités moyennes de nématodes ont été fortement réduites suite à la contamination artificielle des sédiments marins par le phénanthrène (Fig. 7). Ainsi, les effectifs moyens des nématodes ont chuté de $469 \pm 2,82$ ind.Mic.⁻¹ (Individus/Microcosme) dans les microcosmes témoins à $67 \pm 2,82$ ind.Mic.⁻¹ dans les microcosmes contaminés par le phénanthrène. Selon l'analyse statistique par le test Anova 1, la contamination par le phénanthrène a entraîné une diminution hautement significative des densités nématologiques ($p < 0,001$).

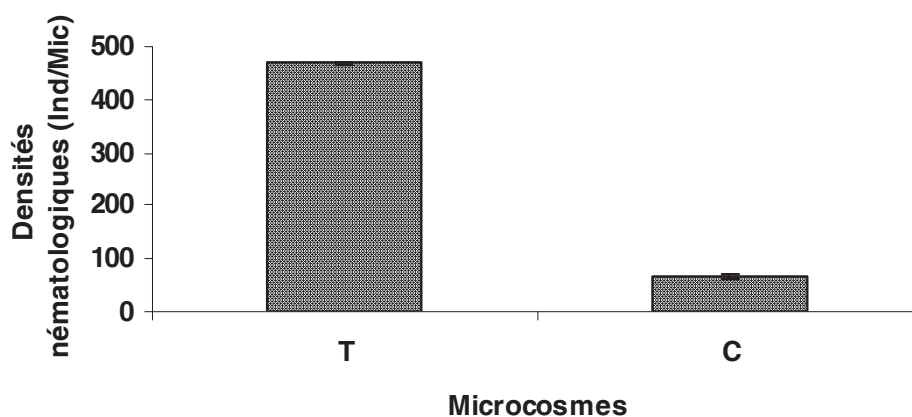


Fig.7. Densités moyennes (Individus/Microcosme) des nématodes libres dans les sédiments des microcosmes témoins (T) et dans ceux simplement contaminés par le phénanthrène (C).

3.2.2. Effets de la biostimulation sur les densités de nématodes libres marins

Les deux expériences de biostimulation par ajout aux microcosmes contaminés de l'une des deux compositions testées en sels nutritifs (CBS1 ; CBS2) ont permis de noter une augmentation hautement significative ($p < 0,001$) des densités moyennes de la nématofaune par rapport à celles relevées dans les enceintes simplement contaminées par le phénanthrène (Fig. 8a). Cette élévation a été plus marquée avec la composition (CBS2) puisque la moyenne des densités nématologiques est passée de $67 \pm 2,82$ ind.Mic.⁻¹ dans les microcosmes contaminés à $588 \pm 1,41$ ind.Mic.⁻¹ après biostimulation.

3.2.3. Effets de l'association biostimulation-bioaugmentation sur les nématodes libres marins

Tous les tests de combinaisons de la biostimulation et de la bioaugmentation en inoculant la souche « *Bacillus* sp. » ont montré une augmentation significative des effectifs moyens de nématodes libres par rapport aux microcosmes contaminés. Cette augmentation est apparue plus importante et hautement significative au niveau des microcosmes de combinaison avec l'ajout d'une composition variée des sels nutritifs (CBS2+BA) où les effectifs des nématodes enregistrés ont dépassé ceux des témoins. Ainsi, cette densité est passée de $67 \pm 2,82$ ind.Mic.⁻¹ dans les microcosmes contaminés à $721 \pm 1,41$ ind.Mic.⁻¹ dans les microcosmes où la biostimulation a été couplée à la bioaugmentation (Fig. 8b).

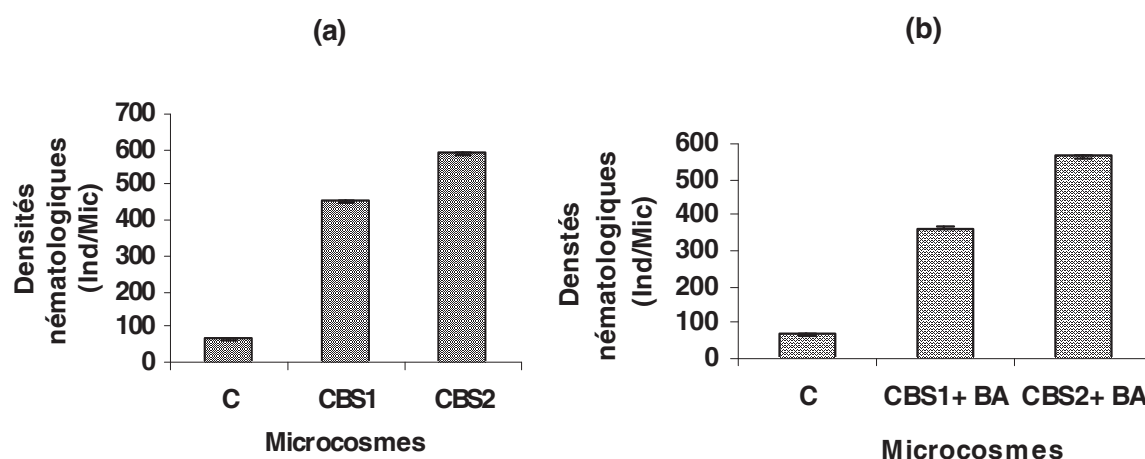


Fig.8. Comparaison de densités moyennes (Individus/Microcosme) de nématodes libres relevées dans les sédiments de microcosmes contaminés par le phénanthrène (C) et dans ceux contaminés mais traités avec (a) un simple ajout de sels nutritifs (CBS1 ou CBS2) et (b) l'association biostimulation-bioaugmentation par inoculation d'une souche de *Bacillus* sp. (CBS1+BA ; CBS2+BA).

D'après le test HSD, les densités relevées dans les microcosmes seulement contaminés (C) sont significativement inférieures à celles enregistrées dans les microcosmes témoins (T), dans les microcosmes de biostimulation (CBS1 ; CBS2) et dans les microcosmes de biostimulation-bioaugmentation (CB1+BA ; CB2+BA).

4. Discussion et conclusion

En contaminant de façon non négligeable les milieux côtiers, réceptacles des effluents domestiques, industriels et portuaires, les HAPs sont susceptibles d'exercer une action toxique sur les organismes présents (SCHWARZENBACH *et al.*, 2006), entre autres sur le benthos qui joue, en retour, un rôle important dans leur devenir. C'est ainsi que les bactéries participent à la minéralisation de la matière organique (AZAM *et al.*, 1993) et qu'elles constituent une source de nourriture pour la méiofaune et notamment pour de nombreux nématodes libres, qui interviennent doublement dans cette minéralisation. En effet, cette faunule agit indirectement en favorisant l'activité de la boucle bactérienne mais aussi directement par assimilation de la matière organique (AÏSSA, 1992).

De nombreux bio-essais permettent d'évaluer les effets des sédiments marins contaminés par divers types de polluants sur les organismes benthiques. Le phénanthrène figure parmi les micropolluants fréquemment retrouvés à des concentrations relativement élevées dans l'environnement aquatique (LAOR *et al.*, 1999). Il semblait donc primordial d'étudier d'une part l'effet du phénanthrène sur les communautés de bactéries et de nématodes benthiques et, d'autre part, les conditions favorables à sa dégradation. Les principaux résultats obtenus lors de notre étude ont mis en évidence la forte toxicité du phénanthrène vis-à-vis de nombreuses espèces bactériennes de la microflore indigène mais aussi de certaines espèces de la nématofaune. Nous avons observé une diminution de la biomasse en bactéries indigènes et des densités moyennes de nématodes dans tous les microcosmes contaminés par ce polluant. La toxicité du phénanthrène a été mise en évidence chez plusieurs espèces aquatiques, telles le cladocère *Daphnia magna* (EDSALL, 1991), le poisson *Gambusia affinis* (NEFF, 1979) ou l'amphipode *Rhepoxynuis abronuis* (SWARTZ *et al.*, 1997). Si la toxicité du phénanthrène est bien connue pour les diatomées, les gastéropodes, les crustacés et les poissons (ANA *et al.*, 2007), l'impact des HAPs sur le méiobenthos a été relativement peu étudié. LOTUFO (1997) a ainsi constaté que le phénanthrène causait

une mortalité plus importante du copépode benthique *Schizopera knabensis* par rapport au fluoranthène. Plusieurs études réalisées *in situ* s'accordent à constater que la contamination par les hydrocarbures influence négativement toutes les espèces du méiobenthos (CARMAN *et al.*, 1997; MAHMOUDI *et al.*, 2005). Ces divers résultats montrent l'intérêt de la mise au point de stratégies de décontamination des sédiments marins pollués par de tels xénobiotiques et, entre autre, l'intérêt de la bioremédiation. Certaines bactéries sont capables d'utiliser les HAPs, y compris le phénanthrène, en tant qu'unique source de carbone et d'énergie (NATALIA *et al.*, 1999). Nos résultats ont également montré que la bioremédiation est susceptible d'entraîner une réduction de l'effet toxique du phénanthrène sur la microflore et la nématofaune marines. De ce fait, les essais de biostimulation seule ou associée à la bioaugmentation ont révélé une nette augmentation de la biomasse bactérienne totale et des effectifs moyens des nématodes par rapport aux microcosmes contaminés. Cette augmentation a été plus accentuée au niveau des microcosmes de biostimulation (CBS2) et de combinaison (CBS2+BA) inoculés par *Bacillus* sp. où les densités des bactéries et des nématodes enregistrées ont dépassé celles des témoins par rapport aux microcosmes de biostimulation (CBS1) et de combinaison (CBS1+BA). Ce qui montre que la biostimulation dépend largement de la quantité de nutriments ajoutés. Plusieurs études ont montré que la biostimulation par ajout de nutriments et la bioaugmentation par inoculation de bactéries renforcent le taux de dégradation du pétrole brut et des HAPs dans les sites contaminés (VENOSA *et al.*, 1996 ; XIAO *et al.*, 2010). En outre, le rôle des bactéries dans les réseaux trophiques benthiques est influencé par la disponibilité des nutriments, les conditions environnementales, la biodisponibilité des HAPs et la nature du sédiment (SMITH *et al.*, 1998 ; GUO *et al.*, 2005).

Nos résultats soulignent que la bioremédiation semble être une alternative à la minéralisation du phénanthrène et à la prolifération de la nématofaune. Il est prévu de poursuivre ce travail en déterminant le pourcentage de dégradation de phénanthrène par *Bacillus* sp. et d'approfondir nos recherches par une étude comparative avec d'autres souches bactériennes.

5. Remerciements

Nous exprimons nos plus vifs remerciements aux PHC Utique, CMCU, CNRS et DGRT pour leurs soutiens financiers.

6. REFERENCES

- AÏSSA, P. (1992).- Importance des nématodes libres dans le milieu aquatique. *Rev. Fac. Sci.Tunis*, **5**, 115-128.
- ANA, D.C., RENATA, G., MARTIN, S., MARTA, F. & MARIA, A.R.H. (2007).- Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **347**, 109-122.
- AUSTEN M. C., MCEVOY A. J. ET WARWICK R. M. (1994). The Specificity of Meiobenthic Community Responses to Different Pollutants: Results from Microcosm Experiments. *Mar. Pollut. Bull.*, **28**, 557-563.
- AZAM, F., FENCHEL, T., FIELD, J.G., GRAY, J.S., MEYER-REIL, L.A. & THINGSTAD, F. (1983). - The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **10**, 257-263.
- BEN SAID, O., GOÑI-URRIZA, M.S., EL BOUR, M., DELLALI, M., AISSA, P. & DURAN, R. (2008). - Characterization of Aerobic Polyaromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria From Bizerte Lagoon Sediments, Tunisia. *J. Appl. Microbiol.*, **104**(4), 987-997.
- BEN SAID, O., GOÑI-URRIZA, M.S., EL BOUR, M., AISSA, P. & DURAN, R. (2010). -Bacterial community structure of sediments of the Bizerte lagoon (Tunisia), a southern Mediterranean coastal anthropized lagoon. *Microb. Ecol.*, **59**(3), 445-456.
- CARMAN, K.R., FLEEGER, J.W. & POMARICO, S.M. (1997). - Response of a benthic food web to hydrocarbon contamination. *Limnol. Oceanogr.*, **42**, 561-571.
- CLARKE, K.R. & WARWICK, R.M. (2001).- Changes in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. 2nd edition. PRIMER-E: Plymouth., UK.164 p.
- EDSALL C.C. (1991). - Acute toxicities to larval rainbow trout of representative compounds detected in great lakes fish. *Bull Environ Contam Toxicol.*, **46**(2), 173-178.
- GUO, C.L, ZHOU, H.W, WONG, Y.S & TAM, N.F.Y. (2005). - Isolation of PAH-degrading bacteria from mangrove sediments and their biodegradation potential. *Mar. Pollut. Bull.*, **51**, 1054-1061.
- JACQUES, R.J.S., OKEKE, B.C., BENTO, F.M., TEIXIERA, A.S., PERALBA, M.C.R. & CAMARGO, F.A.O. (2008).- Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresource Technol.*, **99**, 2637-2643.
- LAOR, Y., STROM, P.F. & FARMER, W.J. (1999). - Bioavailability of phenanthrene sorbed to mineral-associated humic acid. *Wat. Res.*, **33**, 1719-1729.
- LOTUFO, G.R. (1997).- Toxicity of Sediment-Associated PAHs to an Estuarine Copepod: Effects on Survival, Feeding, Reproduction and Behavior. *Mar. Environ. Res.*, **44**, 149-166.
- LOUATI, A., ELLEUCH, B., KALLEL, M., SALIOT, A., DAGAUT, J. & OUDOT, J. (2001).- Hydrocarbon contamination of coastal sediments from the Sfax area (Tunisia), Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.*, **42**, 445-452.

- MAHMOUDI, E., ESSID, N., BEYREM, H., HEDFI, A., BOUFAHJA, F., VITIELLO, P. & AISSA, P. (2005). - Effects of hydrocarbon contamination on a free-living marine nematode community: Results from Microcosm Experiments. *Mar. Pollut. Bull.*, **50**, 1197-1204.
- MOENS, T. & VINCX, M. (1997). Observations on the feeding ecology of estuarine nematodes. *J. Mar. Biol. Ass.*, **77**, 211-227.
- MIYASAKA, T., ASAMI, H. & WATANABE, K. (2006). - Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene-contaminated marine sediments. *Biodegradation*, **17**, 227-235.
- MROZIK, A., PIOTROWSKA-SEGET, Z. & LABU-ZEK, S. (2003). - Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Pol. J. Environ. Stud.*, **12**, 15-25.
- NATALIA V. BALASHOVA, IRINA A. KOSHELEVA, NICOLAI P. GOLOVCHENKO, ALEXANDER M. BORONIN. (1999). - Phenanthrene metabolism by *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains. *Process Biochemistry*, **35**, 291-296.
- NEFF J.M. (1979). - Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fates and biological effects. London, Applied Sciences Publishers.
- OMS/PNUE. (1995). - Recommandations pour la surveillance sanitaire des zones côtières à usage récréatif et des zones conchylicoles (Partie II & III). Programme à long terme de surveillance continue et de recherche en matière de pollution de la mer Méditerranée (MED/POL phase II & III) Danemark, 75 p.
- 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 Microbiol. Rev.*, **32**, 927-955.
- SAMANTA, S.K., SINGH, O.V. & JAIN, R.K. (2002). - Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.*, **20**, 243-248.
- SCHRATZBERGER, M., DANIEL, F., WALL, C.M., KILBRIDE, R., MACNAUGHTON, S.J., BOYD, E.S., REES, L.H., LEE, K. & SWANNELL, P.J.R. (2003).- Response of estuarine meio- and macrofauna to in situ bioremediation of oil-contaminated sediment. *Mar. Pollut. Bull.*, **46**, 430-443.
- SCHWARZENBACH, R.P., ESCHER, B.I., FENNER, K., HOFSTETTER, T.B., JOHNSON, C.A., VON GUNTEN, U. & WEHRLI, B. (2006).- The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. *Science*, **313**, 1072-1077.
- SMITH, V.H., GRAHAM, D.W., CLELAND, D.D. (1998). - Application of resource ratio theory to hydrocarbon biodegradation. *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 3386-3395.
- SOCLO, H.H., GARRIGUES, P., EWALD, M. (2000).- Origin of PAH in coastal marine sediments: Case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Mar. Pollut. Bull.*, **40**, 387-396.
- SWARTZ, R.C., FERRARO, S.P., LAMBERSON, J.O., COLE, F.A., OZRETICH, R.J., BOESE, B.L., SCHULTS, D.W., BEHRENFELD, M. & ANKLEY, G.T. (1997). - Photoactivation and toxicity of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in marine sediment. *Environ Toxicol Chem.*, **16**, 2151-2157.
- URBAN-MALINGA B., HEDTKAMP S. I. C., VAN BEUSEKOM J. E. E., WIKTOR J. ET

- WES1AWSKI J.M. (2006). - Comparison of nematode communities in Baltic and North Sea sublittoral, permeable sands-Diversity and environmental control. *Estuar. Coast. Shelf. S.*, **70**, 224-238.
- VENOSA AD, MT SUIDAN, BA WRENN, KL STROHMEIER, JR HAINES, BL EBERHART, D KING AND E HOLDER. (1996). - Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware Bay. *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 1764-1775.
- VITIELLO, P. ET AÏSSA, P. (1985). - Structure des peuplements de nématodes en milieu lagunaire pollué. 110^{ème} Congrès National des Sociétés Savantes, Montpellier. Sciences, **2**, 115-126.
- XIAO, J., GUO, L., WANG, S., LU, Y. (2010).- Comparative impact of cadmium on two phenanthrene-degrading bacteria isolated from cadmium and phenanthrene co-contaminated soil in China. *Journal of Hazardous Materials*, **174**, 818-823.
- YU, S.H., KE, L., WONG, Y.S., TAM, N.F.Y. (2005). - Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. *Environ. Int.*, **31**, 149-154.

III. PUBLICATION 4:

BIOSTIMULATION AS AN ATTRACTIVE TECHNIQUE TO REDUCE PHENANTHRENE TOXICITY FOR MEIOFAUNA AND BACTERIA IN LAGOON SEDIMENT

Hela Louati^{a, c}, Olfa Ben Said^{a, b}, Amel Soltani^{a, b a}, Patrice Got^c, Cristiana Cravo-Laureau^b,
Robert Duran^b, Patricia Aissa^a, Olivier Pringault^c & Ezzeddine Mahmoudi^a

Publisched in: **ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH**

^a Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement, Faculté des Sciences de Bizerte,
7021, Zarzouna, Tunisie.

^b Equipe Environnement et Microbiologie – UMR CNRS IPREM 5254- IBEAS- Université
de Pau et des Pays de l'Adour - France.

^c Laboratoire Ecosystèmes Marins Côtiers, UMR 5119 CNRS-UM2-IFREMER- IRD-
ECOSYM, Université Montpellier 2, France.

Abstract

Purpose

A microcosm experiment was setup to examine (1) the effect of phenanthrene contamination on meiofauna and bacteria communities and (2) the effects of different bioremediation strategies on phenanthrene degradation and on the community structure of free-living marine nematodes.

Methods

Sediments from Bizerte lagoon were contaminated with (100 mg kg⁻¹) phenanthrene and effects were examined after 20 days. Biostimulation (addition of nitrogen and phosphorus fertilizer or mineral salt medium) and bioaugmentation (inoculation of a hydrocarbonoclastic bacterium) were used as bioremediation treatments. Bacterial biomass was estimated using flow cytometry. Meiofauna was counted and identified at the higher taxon level using a stereomicroscope. Nematodes, comprising approximately two thirds of total meiofauna abundance, were identified to genus or species.

Results

Phenanthrene contamination had a severe impact on bacteria and meiofauna abundances with a strong decrease of nematodes with a complete disappearance of polychaetes and copepods. Bioremediation counter balanced the toxic effects of phenanthrene since meiofauna and bacteria abundances were significantly higher ($p < 0.01$) than those observed in phenanthrene contamination. Up to 98% of phenanthrene removal was observed. In response to phenanthrene contamination the nematode species had different behavior: *Daptonema fallax* was eliminated in contaminated microcosms suggesting that it is an intolerant species to phenanthrene; *Neochromadora peocilosoma*, *Spirinia parasitifera* and *Odontophora* n. sp., which significantly ($p < 0.05$) increased in contaminated microcosms, could be considered as "opportunistic" species to phenanthrene whereas *Anticoma acuminata* and *Calomicrolaimus honestus* increased in the treatment combining biostimulation and bioaugmentation.

Conclusion

Phenanthrene had a significant effect on meiofaunal and bacterial abundances ($p < 0.05$), with a strong reduction of density and change in the nematode communities. Biostimulation using mineral salt medium strongly enhanced phenanthrene removal, leading to a decrease of its toxicity. This finding opens exciting axes for the future use of

biostimulation to reduce toxic effects of PAHs for meiofauna and bacteria in lagoon sediment.

1. Introduction

Coastal marine ecosystems are often contaminated by PAHs (Louati et al. 2001, Soclo et al. 2000) and the biota is affected by this pollution. The toxicity and lethality of PAHs have been assessed for a variety of marine organisms such as fish, copepods and amphipods (Engraff et al. 2011, Lotufo 1997, Shailaja and D'Silva 2003). Some of these compounds (e.g. pyrene, anthracene, phenanthrene) are of major public concern due to their toxicity to organisms in carcinogenic and mutagenic potential. Phenanthrene, one of the most abundant PAHs in the environment (Cerniglia 1993), is included in the U.S. EPA list of priority pollutants (Keith and Telliard 1979). Since phenanthrene is the smallest tricyclic aromatic hydrocarbon to have a "bay-region" and a "K-region" (Ouyang 2006), i.e. highly reactive regions of PAH molecules where the main carcinogenic species can be formed, it is commonly used as a model substrate for studies on metabolism of carcinogenic PAHs (IARC 2010). Phenanthrene was chosen as the model compound since it exhibits intermediate toxicity, hydrophobicity, and environmental persistence (Stringer et al. 2012).

Once in aquatic systems, PAHs tend to adsorb on particles and accumulate in sediments, and undergo various degradation, transformations, and sequestration (Haritash and Kaushik 2009, Yang et al. 2010). Biodegradation under aerobic or anaerobic condition is a major process for PAHs removal (Hale et al. 2010, Ulanowicz et al. 2009). Nevertheless, natural attenuation cannot appreciably remove pollutants mostly because nutrient limitation is one of the major factors limiting biodegradation of PAHs in sediments (Smith et al. 1998). For this reason, an increasing attention has been directed toward the research of new strategies and environmental-friendly technologies to be applied for the remediation of sediments contaminated by hydrocarbons. Among these, biotechnological strategies based on the biostimulation of autochthonous microbial communities to speed up biodegradation processes of organic pollutants are of particular relevance (Beolchini et al. 2010). Generally, mineralization of organic matter is enhanced and bacterial production stimulated in the presence of meiofauna (Gerlach 1978). Meiofaunal assemblages are ideal for microcosm experiments. They have a short generation time, a high density, and continuous reproduction (Suderman and Thistle

2003). These small animals are also easily maintained and sensitive to many toxicants (Boufahja et al. 2011, Mahmoudi et al. 2007). Free-living nematodes, the most abundant taxa among the meiofauna (defined here as microscopic metazoan invertebrates passing through 1 mm mesh size and retained on 40 μm mesh size sieves), are relevant indicators of environmental perturbation (e.g., Beyrem and Aissa 2000, Burton et al. 2001). Field and laboratory studies have documented that the meiofaunal component of the benthos is sensitive to petroleum contaminants (Louati et al. in press, Mahmoudi et al. 2005), and that meiobenthic nematode are relatively more susceptible to petroleum hydrocarbons than other meiofaunal taxa, such as copepods (Beyrem and Aissa 2000, Lindgren et al. 2012, Mahmoudi et al. 2005).

Biological effects of phenanthrene have been examined on many taxa such as diatoms, gastropods, mussels and fish (Albers 2003, ANA et al. 2007, Einsporn and Koehler 2008), but the influence of this contaminant on benthic communities is poorly understood and no experimental study has assessed the impacts of phenanthrene contamination on Mediterranean benthic organism assemblages. In the present study, we present the results of a microcosm experiment designed to compare the response of Mediterranean benthic nematodes and bacteria facing contamination of phenanthrene as a function of the bioremediation treatments used for PAH biodegradation. The investigation focused on the comparison of densities, diversity and species composition of nematode assemblages from control microcosm and phenanthrene bioremediation treatments. Bioremediation schemes included biostimulation and the combination of biostimulation with bioaugmentation by the inoculation of a marine PAH degrading bacterium, *Bacillus megaterium*, previously isolated from Bizerte lagoon contaminated sediment (Ben Said et al. 2008).

2. Materials and methods

2.1. Field site

Natural meiobenthic communities were collected from Bizerte lagoon (Tunisia) on Mars 2010 (Fig. 1). Hand-cores of 10 cm^2 were used to a depth of 15 cm to transfer sediment into a bucket. The physical-chemical characteristics of the field site on the sampling day were: water depth 1.3 ± 0.2 m; salinity 36.2 ± 1.2 PSU; temperature 15.3 ± 0.2 °C; water pH 8.1 ± 0.3 ; dissolved oxygen content 8.3 ± 1.5 mg l^{-1} . The sediment had a median

particle diameter of 0.43 ± 0.12 mm, and an organic content of carbon 0.79 ± 0.02 %. Sediment total nitrogen content was 1.03 ± 0.01 %.

On return to the laboratory, sediments were homogenised by gentle hand stirring with a large spatula before they were used for phenanthrene contamination and bioremediation or microcosms filling.

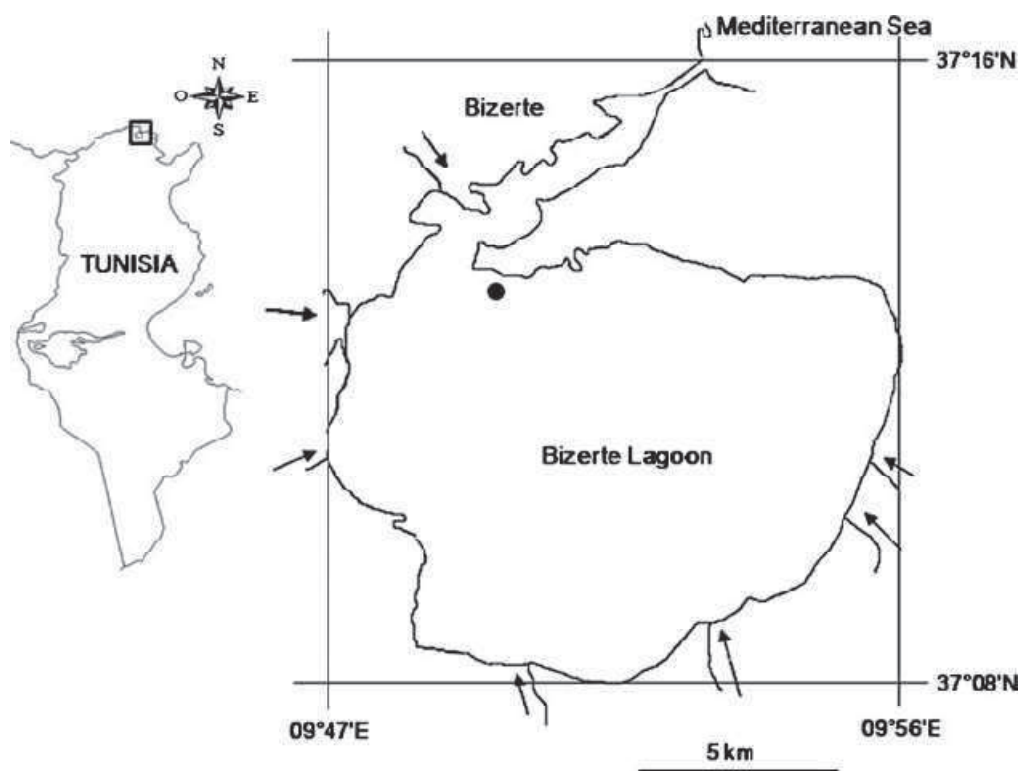


Fig. 1. Map of Bizerte lagoon showing the site from which sediment was collected (Echaraà)

2.2. Phenanthrene contamination of sediments

Stock solution of phenanthrene (Sigma–Aldrich Chemical A8, 920-0) was prepared in acetone (5 mg mL^{-1}). Next, phenanthrene solution was added into the sediment slurry and shaken overnight to let the PAH adsorbed onto the sediments. Final concentration of phenanthrene in sediment was 100 mg kg^{-1} of dry sediment. Sediment used for phenanthrene contamination was first alternately frozen and thawed three times to defaunate it (Gyedu-Ababio and Baird 2006), and then it was wet sieved to remove the larger particles ($>63 \mu\text{m}$).

2.3. Microcosm experiment

Microcosms consisted of 1,600 ml glass bottles. One control and three treatments (Table 1) with three replicates each were set up. Contaminated microcosms were gently filled with 200 g (wt) of homogenized sediment (100 g of natural sediment and 100 g contaminated sediment) topped up with 1L of filtered (1 μ m) natural lagoon water at 30 PSU. In control microcosm, the contaminated sediment was replaced by 100 g of the defaunated sediment. Each bottle was stoppered with a rubber bung with two holes and aerated via an air stone diffuser. Air flux was filtered on 0.2 μ m to prevent contamination. Bioremediation treatments were started one day after phenanthrene contamination. Biostimulation was achieved by amending two types of compositions: (1) slow-release particle fertilizers (70 mg kg⁻¹ of nitrogen fertilizer (NaNO₃) and 35 mg kg⁻¹ of phosphorus fertilizer (KH₂PO₄) and (2) mineral salt medium (MSM) using the protocols of Yu et al. (2005) and Jacques et al. (2008). The MSM has the following composition (mg l⁻¹): (NH₄)₂SO₄, 1000; K₂HPO₄, 10000; KH₂PO₄, 5000; MgSO₄ (H₂O)₇, 200; CaCl₂ (H₂O)₂, 100; and trace elements made up of FeSO₄ (H₂O)₇, 5; MnSO₄ (H₂O), 3; CuSO₄ (H₂O)₅, 0.015; (NH₄)₆ Mo₇O₂₄ (H₂O)₇, 1; Na₂MoO₄ (2H₂O)₂, 0.01. Bioaugmentation was achieved by inoculating with a marine PAH-degrading bacterium, *Bacillus megaterium* strain isolated from Bizerte-polluted sediments (Ben Said et al. 2008).

The strain was previously grown in 50 ml of LB broth. After 1 week cultivation, cells were harvested by centrifugation at 10,000×g for 15 min at 4°C. The initial inoculum was 6.34×10⁸ cell ml⁻¹. For the combination of biostimulation and bioaugmentation, cells of bacterial strain were suspended in the two types of biostimulation treatments (1: N+P; 2: MSM) and 2 ml of the culture were introduced into the microcosms previously amended with nutrients. After bacterium inoculation and nutrient addition, sediment was agitated for half an hour for homogenization. All microcosms were incubated in laboratory at room temperature (22–24°C). After 20 days of incubation, microcosm sediments were fixed in 4% formalin.

2.4. Phenanthrene analysis

Phenanthrene analysis in the sediments was conducted by gas chromatography (GC). At the end of incubation, sediment were homogenized and samples of 1 g (dry weight) of each microcosm was extracted with 40 ml of acetone/hexane (v/v) and with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane as internal standard, in an ultrasonic bath (15 min).

The GC (GC Agilent Technologies) was equipped with a flame-ionization detector (290°C) and a capillary column HP 5 (30 m x 320 µm x 0.25 µm, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). The injector temperature was maintained at 280°C. The carrier gas (He) was maintained at 1.7 ml/min. The oven temperature was programmed from 60°C (1 min) to 200°C (1 min) with a ramp of 15°C/min, and then to 300 °C (2 min) with a ramp of 5°C/min.

Table 1: Experimental treatments

Experimental treatment	Name
Uncontaminated sediment	T
Contaminated sediment with phenanthrene (100 ppm)	C
Contaminated sediment with phenanthrene + N+P	CBS1
Contaminated sediment with phenanthrene + MSM	CBS2
Contaminated sediment with phenanthrene + N+P + bacteria	CBS1+BA
Contaminated sediment with phenanthrene + MSM + bacteria	CBS2+BA

2.5. Flow Cytometry measurements

Bacteria were extracted from sediment following the protocol of Duhamel and Jacquet (2006) as detailed in Louati et al. (2012). For the enumeration of total bacteria, cells were stained with the nucleic acid stain SYBR Green I (Marie et al., 1997). Working stocks of SYBR Green I (10^{-3} of the commercial solution, Molecular Probes) were freshly prepared on the day of analysis. Bacterial samples were stained with a 2.6 % (final concentration of work solution) and incubated in the dark 4°C for 15 min before analysis. The stained bacterial cells, excited at 488 nm, were enumerated using side scatter and green fluorescence at 530 nm. Fluorescent beads (1 and 2 µm; Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) were added to each sample as an external standard. True count beads (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) were added to determine the volume analyzed. Samples were analyzed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson), equipped with a 15 mW argon ion laser emitting at 488 nm for excitation. Data analyses were carried out with CellQuest Pro 5 software obtained from BD Biosciences.

2.6. Sample processing

Meiofauna samples were rinsed with a gentle jet of freshwater over a 1 mm sieve to exclude macrofauna, decanted over a 40 µm sieve and stained with Rose Bengal. Meiofauna was counted and identified at the higher taxon level using a stereomicroscope. Nematodes, comprising approximately two thirds of total meiofauna abundance, were identified to genus or species using the pictorial keys of Platt and Warwick (1983, 1988) and Warwick et al. (1998).

2.7. Data processing

The majority of data analysis followed standard community analysis methods described by Clarke (1993) and Clarke & Warwick (2001) using the Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research (PRIMER) software package.

Univariate indices were computed: total nematode abundance (I, ind. microcosm⁻¹), number of species (S), diversity (Shannon-Wiener index $H = \log_e$), species richness (Margalef's d) and evenness (Pielou's J) were calculated for each microcosm. The One-way ANOVA was used to test for overall differences between these indices and the Tukey HSD multiple comparisons test were used in pair wise comparisons of treatments and control. A significant difference was assumed when $P < 0.05$. For statistical analysis of nematode community structure, relative abundances of nematodes were transformed with $\arcsin(x^{0.5})$ to get a normal distribution of data (Legendre and Legendre 1998). Principal component analysis (PCA) was performed with MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey Wales). Pairwise analysis of similarities (ANOSIM) was carried out to determine if there were any significant differences between nematode assemblages in different treatments. SIMPER (similarity percentages) was used to determine the contribution of individual species towards dissimilarity between treatments and control.

3. Results

3.1. Phenanthrene removal

During 20 days biodegradation experiment, the percentage of phenanthrene (Phe) removal in the contaminated microcosms C was very small ($20 \pm 4 \%$) (Fig. 2). In contrast, phenanthrene was significantly removed when bioremediation treatments were used, although the efficiency varied between treatments of biostimulation.

Biostimulation with mineral salt medium (CBS2) strongly enhanced phenanthrene removal, with up to $98 \pm 0.2\%$ whereas Phe removal was lower in CBS1 when nitrogen and phosphorus fertilizer were used ($76 \pm 0.4\%$) (Fig. 2). Combination of biostimulation and bioaugmentation did not significantly enhance PAH removal in comparison to the biostimulation protocols.

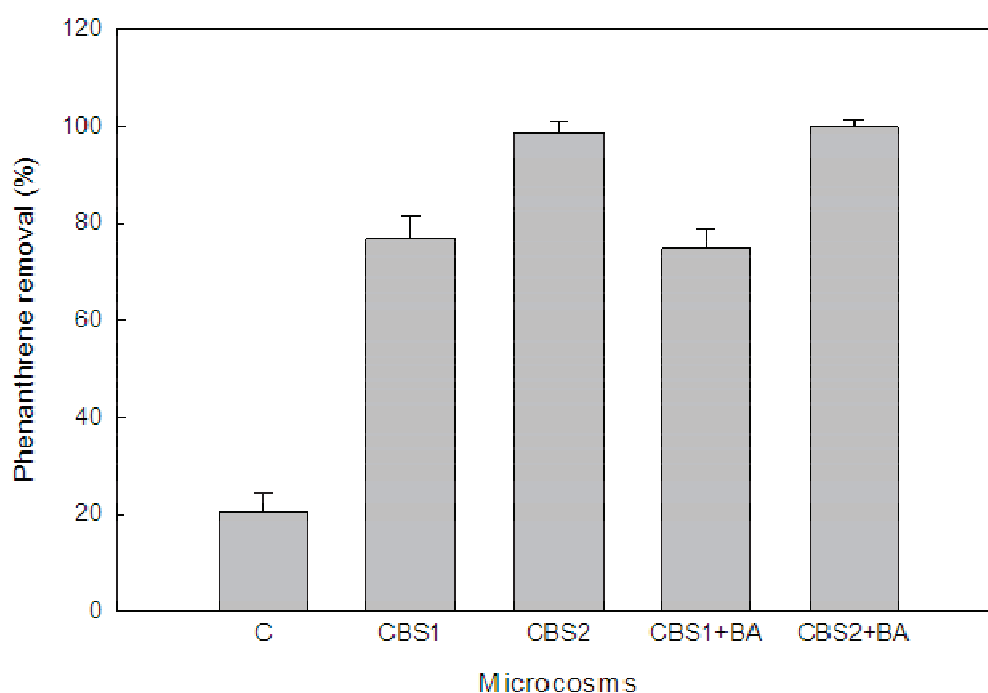


Fig. 2. Removal of phenanthrene (Phe) in the sediment according to different treatments (T uncontaminated, C contaminated, CBS biostimulation; CBS+BA: biostimulation and bioaugmentation) after 20 days of incubation (average $\pm$ SD, $n=3$).

3.2. Bacterial and meiofaunal abundance

After 20 days of incubation, phenanthrene contamination resulted in significant differences in the benthic bacterial abundances relative to the T microcosms (Fig. 3 upper panel). In T microcosms bacterial abundance averaged $3.84 \pm 0.29 \times 10^7$ cells cm^{-3} . Phenanthrene contamination had a significant effect on bacterial abundance which was reduced in C microcosms ($1.65 \pm 0.18 \times 10^7$ cells cm^{-3}) relative to T microcosms. Nevertheless, biostimulation CBS and biostimulation coupled with bioaugmentation (CBS+BA) resulted in a significant increase ($p < 0.001$) of indigenous bacterial abundance relative to C microcosms irrespective of the type of nutrients added. Interestingly, bacterial abundance in CBS1 was lower relative to CBS2 microcosms ($4.6 \pm 0.46 \times 10^7$ and $7.66 \pm 0.62 \times 10^7$ cells cm^{-3} , respectively; Fig. 3 upper panel). The highest

value of bacterial abundance was observed in combination of both treatments of bioremediation CBS2+BA ($8.81 \pm 0.57 \times 10^7$ cells cm^{-3}) corresponding to a two fold increase relative to the control microcosm.

In T microcosms, after 20 days of incubation, total meiofauna represented on average 513 ± 4 Ind./microcosm with the following repartition, 91 % nematodes, 7 % copepods and 2 % polychaetes (Fig. 3 lower panel). Contamination by the phenanthrene had a clear effect on meiofauna with a strong reduction of total density (72 ± 2 vs 513 ± 4 Ind./microcosm, for C and T microcosms, respectively) together with a complete disappearance of polychaetes and copepods. As a consequence, nematodes represented the single main taxon identified in C microcosm. In contrast, both biostimulation treatments strongly enhanced meiofaunal density compared to C microcosms. The biostimulation when mineral salt medium were used (CBS2) resulted in higher densities relative to the CBS1 treatment with nitrogen and phosphorus fertilizer (614 ± 0.7 vs 462 ± 3 Ind./microcosm, respectively). Nevertheless, this increase was observed for nematodes, the density of copepods and polychaetes remained similar to that of the T microcosms.

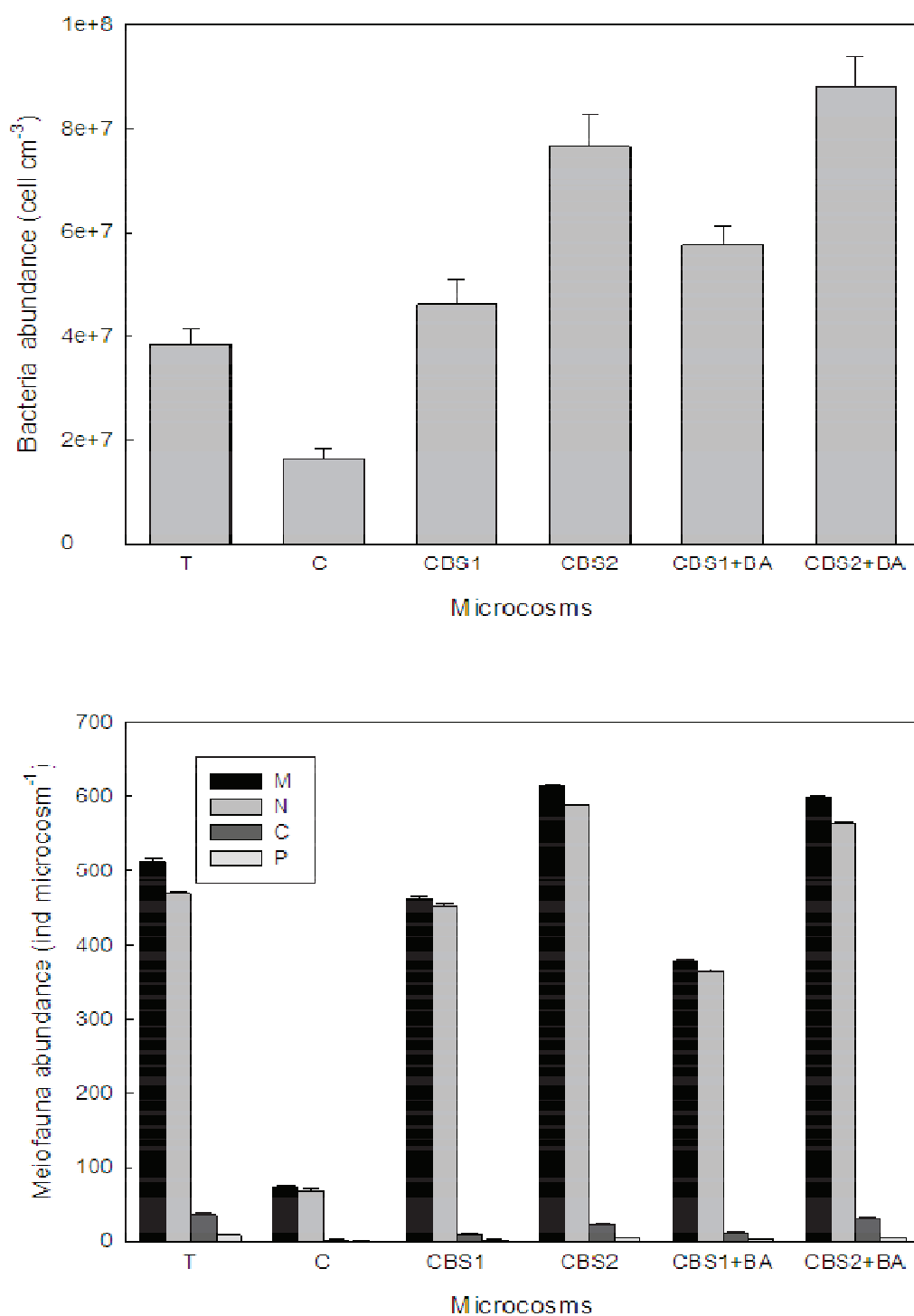


Fig. 3. Bacterial and meiofaunal abundances in the sediment of different microcosms (T uncontaminated, C contaminated, CBS biostimulation; CBS+BA: biostimulation and bioaugmentation) at the end of the 20 day incubation. Upper panel: Bacterial abundance determined by flow cytometry (average $\pm$ standard deviation). Lower panel: Absolute abundance (individuals per microcosm) and standard deviation of total meiofauna (M) and major groups: nematodes (N), copepods (C) and polychaetes (P).

3.3. Nematofauna diversity

✓ Diversity of the nematode community and univariate indices

A total of 20 nematode species were recorded in all the microcosms (Table 2). All microcosms except C replicates were dominated by *Oncholaimus campylocercoides*. Further in the control microcosm T *Daptonema fallax* (13%) and *Neochromadora peocilosoma* (9%) were the two next most frequent species besides *Oncholaimus campylocercoides* (40%). Significant differences between control (T) and contaminated microcosms (C) mainly resulted from changes in the abundances of the most dominant species (Table 3). Elimination of *Daptonema fallax*, decreasing abundance of *Oncholaimus campylocercoides* and increasing numbers of *Neochromadora peocilosoma*, *Spirinia parasitifera* and *Odontophora* n. sp. were responsible for the significant difference between T and C microcosms. Use of bioremediation treatment resulted in a decrease of the effects of phenanthrene contamination on free-living nematodes. Only biostimulation (CBS2) treatments resulted to a similar community structure observed in T microcosms. Differences were observed for the other treatments. Combination of both treatments resulted in different community structures, especially for CBS1+BA treatment with dominance of *Anticoma acuminata* which showed a very strong increase from 1 % (T) to 30 % (CBS1+BA). Increase in *Calomicrolaimus honestus* ($3 \pm 0.5\%$ to $12 \pm 1\%$) was responsible for significant differences between (T) and bioremediation microcosms (CBS2+BA).

Mean values of univariate indices for nematodes as a function of treatments are given in Table 4. Phenanthrene contamination resulted in significant changes of univariate measures for all indices except for the evenness. Total nematode abundance (I), species richness (d), diversity (H') and number of species (S) decreased significantly with phenanthrene contamination (Table 5). In contrast, these univariate indices were not affected in all bioremediation microcosms except the abundance that was significantly higher in biostimulation and combination treatments (CBS2 and CBS2+BA) than in the control and contaminated microcosms. Biostimulation treatments strongly enhanced the density of nematodes compared to the T microcosms (588 ± 1.4 vs 469 ± 2.8 Ind/microcosm, for CBS2 and T microcosms, respectively).

Table 2: Relative abundance ($\pm$ SD) for nematode species identified in microcosms (T: uncontaminated, C: contaminated, BS: biostimulation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation). Values of relative abundance are means of three replicates per treatment. Dominant species abundances ($>10\%$) are indicated in bold.

	T	C	CBS1	CBS2	CBS1+BA	CBS2+BA
<i>Anticoma acuminata</i>	1.1 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	30 $\pm$ 1.5	6.0 $\pm$ 1.1
<i>Calomicrolaimus honestus</i>	3.3 $\pm$ 0.5	6.9 $\pm$ 1.0	1.0 $\pm$ 0.0	2.3 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.1	11 $\pm$ 1.5
<i>Chromadora nudicapitata</i>	3.0 $\pm$ 0.8	0.3 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.4
<i>Daptonema fallax</i>	13 $\pm$ 2.0	0	1.0 $\pm$ 0.0	20 $\pm$ 1.5	2.0 $\pm$ 0.4	11 $\pm$ 1.4
<i>Desmodora n.sp</i>	1.6 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.0
<i>Enoplolaimus longispiculosus</i>	2.5 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.4	0	1.3 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.1
<i>Marylynia stekoveni</i>	0.9 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0
<i>Metachromadora macroutera</i>	3.0 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 0.3	3.9 $\pm$ 0.8	0	0
<i>Mesacanthion diplochma</i>	2.0 $\pm$ 0.3	0	2.8 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.5	0
<i>Odontophora n.sp</i>	4.8 $\pm$ 1.1	14 $\pm$ 1.5	4.0 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.0	5.6 $\pm$ 0.1
<i>Neochromadora peocilosoma</i>	9.3 $\pm$ 1.5	40 $\pm$ 2.5	2.0 $\pm$ 0.1	7.1 $\pm$ 1.1	3.6 $\pm$ 0.5	8.8 $\pm$ 1.0
<i>Oncholaimus campylocercoides</i>	39 $\pm$ 2.0	9.0 $\pm$ 1.5	67 $\pm$ 2.5	45 $\pm$ 2.5	53 $\pm$ 1.1	38 $\pm$ 3.0
<i>Paracomesoma dubium</i>	0.7 $\pm$ 0.0	0	0.8 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0	0
<i>Paramonohystera pilosa</i>	2.4 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1
<i>Prochromadorella neapolitana</i>	0.8 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.5	0.6 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.0
<i>Spirinia parasitifera</i>	5.3 $\pm$ 1.5	18 $\pm$ 1.0	3.6 $\pm$ 0.9	2.0 $\pm$ 0.4	0	5.7 $\pm$ 0.6
<i>Synonchiella edax</i>	0.9 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0
<i>Thalassironus britannicus</i>	1.3 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.0	0.3 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0
<i>Terschellingia longicaudata</i>	2.0 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.0
<i>Viscosia sp.</i>	1.5 $\pm$ 0.1	2.3 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.0	3.5 $\pm$ 0.9	0.6 $\pm$ 0.0	0.6 $\pm$ 0.0

Table 3: Species responsible for differences between control and treated microcosms based on similarity percentages (SIMPER) analysis of square-root transformed data. (+): more abundant; (-): less abundant; (elim): elimination. Species accounting for $\sim 70\%$ of overall dissimilarity between treatment groups are ranked in order of importance of their contribution to this dissimilarity.

C	CBS1	CBS2	CBS1+BA	CBS2+BA
<i>Neochromadora peocilosoma</i> (+)	<i>Oncholaimus campylocercoides</i> (+)	<i>Daptonema fallax</i> (+)	<i>Anticoma acuminata</i> (+)	<i>Calomicrolaimus honestus</i> (+)
<i>Oncholaimus campylocercoides</i> (-)	<i>Daptonema fallax</i> (-)	<i>Oncholaimus campylocercoides</i> (+)	<i>Oncholaimus campylocercoides</i> (+)	<i>Anticoma acuminata</i> (+)
<i>Daptonema fallax</i> (elim)	<i>Neochromadora peocilosoma</i> (-)	<i>Spirinia parasitifera</i> (-)	<i>Daptonema fallax</i> (-)	<i>Daptonema fallax</i> (-)

Table 4: Univariate indices for nematode assemblages from each microcosm. (I = abundance, H' = Shannon-Weaver index, d = species richness, J' = evenness, S = number of species).

Microcosm	Abundance	Shannon	Richness	Evenness	Nb Species
T	469 ± 2.8	2.17 ± 0.1	3.6 ± 0.3	0.75 ± 0.0	20 ± 1.5
C	67 ± 2.8	1.80 ± 0.1	2.3 ± 0.2	0.73 ± 0.0	11 ± 1.1
CBS1	452 ± 4.2	1.47 ± 0.0	3.4 ± 0.2	0.52 ± 0.0	17 ± 1.0
CBS2	588 ± 1.4	1.88 ± 0.0	3.4 ± 0.0	0.66 ± 0.1	19 ± 0.0
CBS1+BA	364 ± 2.1	1.39 ± 0.0	3.5 ± 0.4	0.52 ± 0.1	14 ± 0.5
CBS2+BA	563 ± 0.5	2.01 ± 0.1	3.3 ± 0.4	0.74 ± 0.0	15 ± 1.0

Table 5: Results from multiple comparison tests for significant differences between nematode assemblages as a function of the treatment. The T microcosms were considered as reference. +: increase in univariate measure; -: decrease in univariate measure; ns: no significant difference at $p < 0.05$

Microcosm	Effects of treatment on univariate indices for nematode assemblages				
T vs C	I: -	H': -	d: -	J': ns	S: -
T vs CBS1	I: -	H': -	d: ns	J': -	S: ns
T vs CBS2	I: +	H': -	d: ns	J': -	S: ns
T vs CBS1+BA	I: -	H': -	d: -	J': -	S: -
T vs CBS2+BA	I: +	H': -	d: ns	J': ns	S: ns

✓ *Distributional plots*

The k-dominance curves (Fig. 4) illustrate a clear effect of phenanthrene on nematode community. An increase of dominance concomitant with a decrease of diversity was obvious at this phenanthrene contamination level. Strong changes in K dominance were also observed in CBS1 and CBS1+BA where only 2 species accounted for more 75 % of the total community. In T microcosms, the 9 most dominant species represented 75% of the total community whereas for C microcosms only 5 dominant species accounted for 75% of the total community. Biostimulation treatment using a combination of different nutrient (CBS2) changed moderately, relative to the control, the number of dominant species, on average 8 species accounted for 75% of the total community.

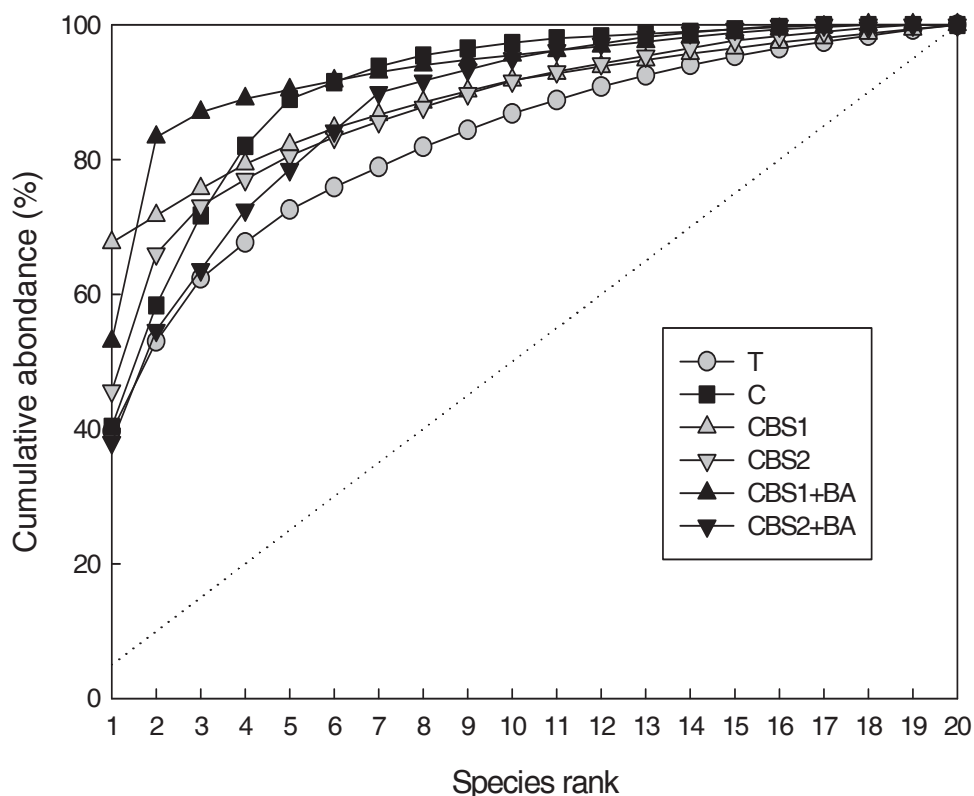


Fig.4. k-dominance curves of the nematode communities as a function of bioremediation treatment after 20 days of incubation. (T: uncontaminated, C: contaminated, CBS: biostimulation, CBS+BA: biostimulation and bioaugmentation). The dotted lines represents an equal distribution of each species.

✓ *Multivariate indices*

The PCA analysis, based on relative abundance of species (Fig. 5), illustrate a strong impact of phenanthrene contamination on nematode assemblages. Contaminated microcosms (C) are distinct from other microcosms with dominance and disappearance of specific species. The replicates of biostimulation treatments (CBS2) are grouped with the control T.

Additionally, the ANOSIM results showed a significant impact of phenanthrene contamination on nematode assemblages. All microcosms were significantly different from the control and from each other (R statistic = 1, significance level = 2.9%) except for T and CBS2 microcosms. Bray-Curtis similarity index reveal the lowest average similarity was recorded between C and T microcosms (Table 6). In contrast, the highest value of average similarity was observed between control and CBS2 microcosms (Table 6).

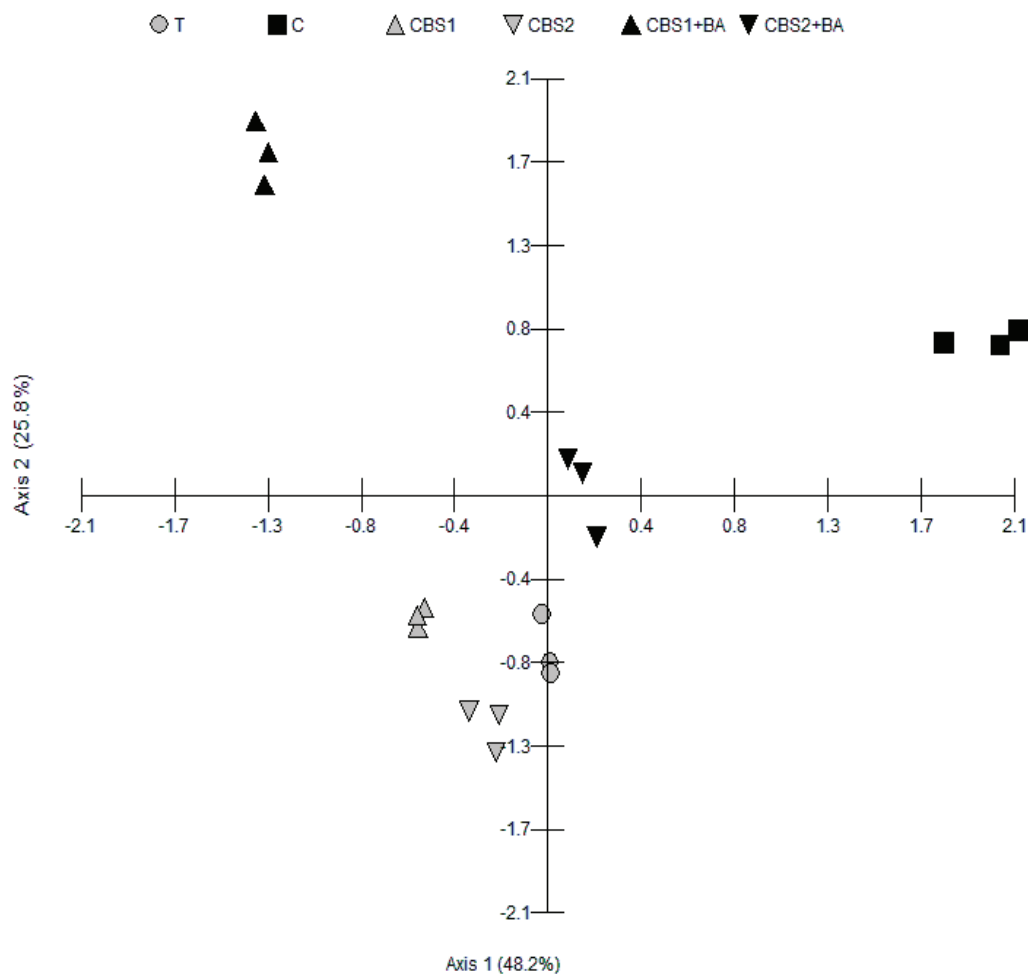


Fig. 5. Correspondence analysis (CA) of nematode species absolute abundance data from uncontaminated sediment control microcosms (T), contaminated microcosms (C) and bioremediation treatments (CBS1; CBS2; CBS1+BA; CBS2+BA).

Table 6: Average (standard deviation, n=3 replicates) similarity between microcosms.

Average Similarity (%)	T	C	CBS1	CBS2	CBS1+BA	CBS2+BA
T	84.7 (3.3)					
C	40.8 (3.8)	90.2 (2.2)				
CBS1	66.2 (1.9)	27.3 (3.3)	89.8 (2.3)			
CBS2	80.2 (3.2)	32.2 (2.9)	67.0 (2.6)	88.1 (1.0)		
CBS1+BA	56.0 (1.7)	20.8 (2.4)	66.0 (1.8)	60.3 (2.4)	93.2 (0.3)	
CBS2+BA	77.4 (3.2)	43.4 (2.0)	57.5 (1.6)	68.1 (1.0)	57.1 (3.3)	88.6 (1.2)

4. Discussion

This study has shown that phenanthrene is toxic for both meiofauna and bacteria in sediment from Bizerte lagoon. Field and laboratory studies have documented that the meiofaunal and bacterial component of the benthos is sensitive to petroleum contaminants (Mahmoudi et al. 2005, Sundback et al. 2010, Zhou et al. 2009). Bacterial abundance and community structure changes as response to PAH addition have been often observed using a single molecule, e.g., anthracene (Louati et al. 2013), phenanthrene (Muckian et al. 2009) or a complex mixture of PAH (phenanthrene, fluoranthene and benzo(K)fluoranthene) (Verrhiest et al. 2002). Similarly, in our study, we observed a strong decrease of meiofauna total density in contaminated microcosms concomitant with a high reduction in the abundance of nematodes and a complete disappearance of polychaetes and copepods. This variable response of meiobenthos to the phenanthrene contamination suggests that resistance mechanisms have been developed in nematodes to face PAH contamination. In this context, molecular studies are needed to isolate the resistance genes of marine nematodes to face pollutants, as it has been done with soils nematodes (Broeks et al. 1996, Cui et al. 2007). However, for the other groups of meiofauna (polychaetes and copepods), their complete disappearance suggests a non tolerance to the high dose of phenanthrene used in this study. As phenanthrene contamination severely affected the repartition of major meiofauna taxa, competition for space and resources might have favored phenanthrene tolerant species due to the disappearance of non tolerant species. Similarly, Lotufo (1997) also found that relatively high-level phenanthrene contamination may cause many ecologically important impacts on copepod community with modification of distribution and abundance of *Schizopera knabeni* in heavily contaminated sites.

Despite the nematode group was still observed in contaminated microcosms, the negative effect of phenanthrene contamination is obvious. The univariate descriptors of diversity in the contaminated microcosms as well as the k dominance were significantly reduced in comparison with controls (Tukey's HSD test, $p < 0.05$). The toxic effects of phenanthrene observed on abundance were also accompanied by strong changes in nematode community structure (Table 2). We selected phenanthrene as a reference PAH due to its relatively high solubility and high toxicity to benthic organisms. Our results confirm the observations made by Mahmoudi et al. (2005) who showed that exposure to a mixture of PAH (diesel) altered the response of nematode communities. Changes in

nematode abundance and diversity were accompanied by modification of the structure. Control microcosms were mainly dominated by three main species, *Oncholaimus campylocercoides*, *Daptonema fallax* and *Neochromadora peocilosoma* whereas in contaminated microcosms the dominant species were *Neochromadora peocilosoma*, *Spirinia parasitifera* and *Odontophora* n. sp. Such changes in the dominance repartition were followed by significant modifications of the nematode structure as revealed by the PCA analysis (Fig. 5). The differences observed between C and T microcosms were partly explained by the elimination of *Daptonema fallax* suggesting that this species might be sensitive to phenanthrene. This species has been reported as an opportunistic species upon a low diesel contamination (5 ppm) in Ghar El Melh lagoon (Tunisia) (Mahmoudi et al. 2005) but was eliminated for diesel concentrations above 5 ppm. Similarly, *Oncholaimus campylocercoides* was significantly affected by phenanthrene nevertheless it was not eliminated; therefore this species can be categorized as "phenanthrene-sensitive". In contrast, *Neochromadora peocilosoma*, *Spirinia parasitifera* and *Odontophora* n. sp. characterized by increased abundances in contaminated microcosms, appeared to be "opportunistic" species to phenanthrene. This variable response of different nematode species to phenanthrene suggests that the development of free-living nematodes in polluted environments is subject to very precise control mechanisms to face contamination. Due to their sensitivity to contaminants at environmentally relevant concentrations, the use of free-living nematodes as bioindicator organisms in ecological risk assessments is often proposed to evaluate the impacts of hydrocarbons, lubricants, metals and other xenobiotic contamination and their bioavailability in aquatic systems (Beyrem et al. 2010, Hedfi et al. 2007, Mahmoudi et al. 2007).

The present study showed that phenanthrene removal was minimal in C microcosms suggesting the low capacity of indigenous microorganisms to degrade phenanthrene in sediment in the experimental conditions imposed. However, biostimulation with addition of mineral salt medium (combination of different nutrient) and the combination of biostimulation and bioaugmentation (CBS2+BA) can efficiently remove phenanthrene (98%). This nutrient composition was more efficient to remove phenanthrene than the addition of nitrate and phosphate (CBS1 and CBS+BA). In biostimulation treatments, the toxic effects of phenanthrene on meiofauna and bacteria observed in C microcosms were removed. Indeed, bacterial and meiofauna abundances

strongly increased in both bioremediation treatments, with significantly higher densities than those observed in T and C microcosms. The effectiveness of these strategies of bioremediation varies from sediments to sediments and from contaminants to contaminants (Balba et al. 1998). Biostimulation has long been used as a strategy to enhance the biodegradation rate of contaminants in nutrient limited environments (Yu et al. 2005), especially in environments such as Bizerte sediments where nutrients are often limiting (Hlaili et al. 2006). Nevertheless, the changes observed in the K dominance indicate that biostimulation can affect nematode diversity even so the structure was relatively similar in T and biostimulation treatment (Fig. 4 and Table 4).

The addition of nutrients favored growth of hydrocarbon-degrading bacteria that were probably nutrient limited in C microcosms since little natural phenanthrene biodegradation was observed. Therefore, nematodes in bioremediation microcosms benefit from both the decrease in phenanthrene toxicity and the nutrient addition that alleviated nutrient limitation. In addition, significant correlation ($p < 0.05$) between phenanthrene removal and nematode abundance could suggest an effective direct or indirect participation of nematodes in phenanthrene degradation by the selective pressure exerted on bacteria involved the degradation of complex molecules (Louati et al. in press). Nevertheless, addition of nitrate and phosphate (CBS1 and CBS1+BA) modified the structure of free-living nematodes. In contrast, the biostimulation treatment with addition of mineral salt medium (CBS2) resulted to a similar abundance and community structure observed in T microcosms together the highest efficiency (up to 98% removal).

The efficiency of the inoculation of a marine PAH-degrading bacterium is not observed in phenanthrene biodegradation. It is likely that combination of both treatments has caused a competition between indigenous and introduced microorganisms. Similar results have been observed in mangrove sediments, where biodegradation of the mixed PAHs (fluorene, phenanthrene and pyrene) were low after bioaugmentation, suggesting some negative interaction occurred between inoculum and indigenous microbial community such as competition for resources (Yu et al. 2005).

5. Conclusion

The results from our study demonstrate that phenanthrene had a significant effect on meiofaunal and bacterial community with the selection of nematode species that could be proposed as bioindicators of PAH pollution such as *Spirinia parasitifera* or *Neochromadora peocilosoma*. Altered species composition could significantly influence interactions between nematodes and interactions among major benthic taxa. Response of free-living nematodes to phenanthrene contamination could lead to food limitation for their predators, which ultimately could alter entire communities and ecosystems. This finding opens exciting axes for the future use of the biostimulation with a complex mixture of nutrients to reduce toxic effects of PAHs for meiofauna and bacteria in polluted sediment. This bioremediation strategy has shown the highest efficiency in phenanthrene degradation but also for other PAH compounds.

6. Acknowledgments

This work was supported by a funding of the CMCU program (PHC-UTIQUE, n° 09G 0189), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and the Faculté des Sciences de Bizerte (FSB).

7. References

- Albers P (2003) Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA, Cairns J (eds.), Handbook of Ecotoxicology. Lewis Publishers, New York
- Ana DC, Renata G, Martin S, Marta F, Maria ARH (2007) Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. J Exp Mar Biol Ecol 347: 109-122
- Balba MT, Al-Awadhi N, Al-Daher R (1998) Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. J Microbiol Methods 32: 155-164
- Ben Said O, Goni-Urriza MS, El Bour M, Dellali M, Aissa P, Duran R (2008) Characterization of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments, Tunisia. J Appl Microbiol 104: 987-997
- Beolchini F, Rocchetti L, Regoli F, Dell'Anno A (2010) Bioremediation of marine sediments contaminated by hydrocarbons: Experimental analysis and kinetic modeling. J Hazard Mater 182: 403-407

- Beyrem H, Aissa P (2000) Free-living nematodes, bio-indicators of the evolution of hydrocarbon concentrations in the bay of Bizerta (Tunisia). *Cah Biol Mar* 41: 329-342
- Beyrem H, Louati H, Essid N, Aissa P, Mahmoudi E (2010) Effects of two lubricant oils on marine nematode assemblages in a laboratory microcosm experiment. *Mar Environ Res* 69: 248-253
- Boufahja F, Sellami B, Dellali M, Aissa P, Mahmoudi E, Beyrem H (2011) A microcosm experiment on the effects of permethrin on a free-living nematode assemblage. *Nematology* 13: 901-909
- Broeks A, Gerrard B, Allikmets R, Dean M, Plasterk RHA (1996) Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Embo J* 15: 6132-6143
- Burton SM, Rundle SD, Jones MB (2001) The relationship between trace metal contamination and stream meiofauna. *Environ Pollut* 111: 159-167
- Cerniglia CE (1993) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Curr Opin Biotechnol* 4: 331-338
- Clarke KR (1993) Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral J Ecol* 18 117-143
- Clarke KR, Warwick RM (2001) Changes in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. . PRIMER-E: Plymouth, UK
- Cui YX, McBride SJ, Boyd WA, Alper S, Freedman JH (2007) Toxicogenomic analysis of *Caenorhabditis elegans* reveals novel genes and pathways involved in the resistance to cadmium toxicity. *Genome Biol* 8
- Duhamel S, Jacquet S (2006) Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *J Microbiol Methods* 64: 316-332
- Einsporn S, Koehler A (2008) Immuno-localisations (GSSP) of subcellular accumulation sites of phenanthrene, aroclor 1254 and lead (Pb) in relation to cytopathologies in the gills and digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar Environ Res* 66: 185-186
- Engraff M, Solere C, Smith KEC, Mayer P, Dahllöf I (2011) Aquatic toxicity of PAHs and PAH mixtures at saturation to benthic amphipods: Linking toxic effects to chemical activity. *Aquat Toxicol* 102: 142-149
- Gerlach SA (1978) Food chain relationships in subtidal silty sand, marine sediments and the role of meiofauna in stimulating bacterial productivity. . *Oecologia (Berl.)* 33: 55-69
- Gyedu-Ababio TK, Baird D (2006) Response of meiofauna and nematode communities to increased levels of contaminants in a laboratory microcosm experiment. *Ecotox Environ Safe* 63: 443-450
- Hale SE, Meynet P, Davenport RJ, Jones DM, Werner D (2010) Changes in polycyclic aromatic hydrocarbon availability in River Tyne sediment following bioremediation treatments or activated carbon amendment. *Water Res* 44: 4529-4536

- Haritash AK, Kaushik CP (2009) Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J Hazard Mater* 169: 1-15
- Hedfi A, Mahmoudi E, Boufahja F, Beyrem H, Aissa P (2007) Effects of increasing levels of nickel contamination on structure of offshore nematode communities in experimental microcosms. *Bull Environ Contam Toxicol* 79: 345-349
- Hlaili AS, Chikhaoui MA, El Grami B, Mabrouk HH (2006) Effects of n and p supply on phytoplankton in Bizerte Lagoon (western Mediterranean). *J Exp Mar Biol Ecol* 333: 79-96
- IARC 2010: Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Related Industrial Exposures. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans,
- Jacques RJS, Okeke BC, Bento FM, Teixeira AS, Peralba MCR, Camargo FAO (2008) Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Biores Technol* 99: 2637-2643
- Keith LH, Telliard WA (1979) Priority pollutants—a perspective view. *Environ Sci Technol* 13: 416-423
- Lindgren JF, Hasselöv IM, Dahllöf I (2012) Meiofaunal and bacterial community response to diesel additions in a microcosm study. *Mar Pollut Bull* 64: 595-601
- Lotufo GR (1997) Toxicity of sediment-associated PAHs to an estuarine copepod: Effects on survival, feeding, reproduction and behavior. *Mar Environ Res* 44: 149-166
- Louati A, Elleuch B, Kallel M, Saliot A, Dagaut J, Oudot J (2001) Hydrocarbon contamination of coastal sediments from the Sfax area (Tunisia), Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull* 42: 445-452
- Louati H, Ben Said O, Got P, Soltani A, Mahmoudi E, Cravo-Laureau C, Duran R, Aissa P, Pringault O (2013) Microbial community responses to bioremediation treatments for the mitigation of low-dose anthracene in marine coastal sediments of Bizerte lagoon (Tunisia). *Environ Sci Pollut Res* 20: 300-310
- Louati H, Ben Said O, Soltani A, Got P, Mahmoudi E, Cravo-Laureau C, Duran R, Aissa P, Pringault O (in press) The roles of biological interactions and pollutant contamination in shaping microbial benthic community structure. *Chemosphere* 10.1016/j.chemosphere.2013.09.069
- Mahmoudi E, Essid N, Beyrem H, Hedfi A, Boufahja F, Vitiello P, Aissa P (2005) Effects of hydrocarbon contamination on a free living marine nematode community: Results from microcosm experiments. *Mar Pollut Bull* 50: 1197-1204
- Mahmoudi E, Essid N, Beyrem H, Hedfi A, Boufahja F, Vitiello P, Aissa P (2007) Individual and combined effects of lead and zinc on a free-living marine nematode community: Results from microcosm experiments. *J Exp Mar Biol Ecol* 343: 217-226
- Marie D, Partensky F, Jacquet S, Vault D (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl Environ Microbiol* 63: 186-193

- Muckian LM, Grant RJ, Clipson NJW, Doyle EM (2009) Bacterial community dynamics during bioremediation of phenanthrene- and fluoranthene-amended soil. *Int Biodeter Biodegr* 63: 52-56
- Ouyang Y (2006): Phenanthrene pathway map. http://umbbd.msi.umn.edu/pha/pha_map.html
- Platt HM, Warwick RM (1983) Free living marine nematodes. Part I. British Enoplids. *Synopses of the British Fauna* no 28. . Cambridge University Press, Cambridge
- Platt HM, Warwick RM (1988) Free living marine nematodes. Part II. British Chromadorids. *Synopses of the British Fauna* no 38. E.J Brill, Leiden
- Shailaja MS, D'Silva C (2003) Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere* 53: 835-41
- Smith VH, Graham DW, Cleland DD (1998) Application of resource-ratio theory to hydrocarbon biodegradation. *Environ Sci Technol* 32: 3386-3395
- Soclo HH, Garrigues P, Ewald M (2000) Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: Case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Mar Pollut Bull* 40: 387-396
- Stringer TJ, Glover CN, Keesing V, Northcott GL, Tremblay LA (2012) Development of a harpacticoid copepod bioassay: Selection of species and relative sensitivity to zinc, atrazine and phenanthrene. *Ecotox Environ Safe* 80: 363-371
- Suderman K, Thistle D (2003) Spills of fuel oil #6 and Orimulsion can have indistinguishable effects on the benthic meiofauna. *Mar Pollut Bull* 46: 49-55
- Sundback K, Alsterberg C, Larson F (2010) Effects of multiple stressors on marine shallow-water sediments: Response of microalgae and meiofauna to nutrient-toxicant exposure. *J Exp Mar Biol Ecol* 388: 39-50
- Ulanowicz RE, Goerner SJ, Lietaer B, Gomez R (2009) Quantifying sustainability: Resilience, efficiency and the return of information theory. *Ecological Complexity* 6: 27-36
- Verrhiest GJ, Clement B, Volat B, Montuelle B, Perrodin Y (2002) Interactions between a polycyclic aromatic hydrocarbon mixture and the microbial communities in a natural freshwater sediment. *Chemosphere* 46: 187-196
- Warwick RM, Platt HM, Somerfield PJ (1998) Free-living marine nematodes. Part III. British monhysterids. *Synopses of the British Fauna (New Series)*. 53. Studies Council Shrewsbury, UK
- Yang Y, Zhang N, Xue M, Tao S (2010) Impact of soil organic matter on the distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils. *Environ Pollut* 158: 2170-2174
- Yu KSH, Wong AHY, Yau KWY, Wong YS, Tam NFY (2005) Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar Pollut Bull* 51: 1071-1077
- Zhou HW, Wong AHY, Yu RMK, Park YD, Wong YS, Tam NFY (2009) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Structural Shift of Bacterial Communities in Mangrove Sediment. *Microb Ecol* 58: 153-160

IV. PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION

D'après les résultats des deux publications consacrées à l'étude de l'effet du phénanthrène, les conclusions suivantes peuvent être dégagées :

- ✓ La contamination par le phénanthrène entraîne une diminution de la biomasse en bactéries indigènes ainsi qu'une réduction hautement significative ($p < 0,001$) des densités moyennes de la méiofaune totale et en particulier des nématodes libres marins ;
- ✓ Nos analyses statistiques relatives à la structure des communautés nématologiques ont mis en évidence une altération de la composition spécifique des associations de nématodes en réponse à la contamination par le phénanthrène. Ces modifications profondes de la structure des peuplements nématologiques sont le résultat d'une différence du degré de sensibilité des espèces de nématodes libres au phénanthrène. Ainsi, l'espèce *Daptonema fallax* a été éliminée dans les microcosmes contaminés et peut être considérée comme "phénanthrène sensible". *Oncholaimus campylocercoides* bien représentée (>35%) dans les microcosmes témoins semble être sensible au phénanthrène alors que les espèces *Neochromadora peocilosoma*, *Spirinia parasitifera* et *Odontophora* n.sp dont la densité s'accroît et ceci dans les microcosmes contaminés peuvent être considérées comme des espèces opportunistes ;
- ✓ Une dégradation importante du phénanthrène a été observée dans tous les essais de bioremédiation surtout avec la composition variée de nutriments (biostimulation et combinaison) avec jusqu'à 98% de dégradation.
- ✓ Suite à l'ajout de deux compositions en sels nutritifs, il a été enregistré une augmentation significative de la biomasse des bactéries indigènes ainsi que des densités moyennes de la méiofaune totale en particulier celle des nématodes. Nos résultats ont également montré que la bioremédiation réduit l'effet toxique du phénanthrène sur la microflore et la nématofaune marines. Ainsi, tous les essais de biostimulation, seule ou associée à la bioaugmentation, ont révélé une nette augmentation de la biomasse bactérienne totale et des effectifs moyens des nématodes par rapport aux microcosmes contaminés. Cette augmentation (biomasse et densité) a été plus importante avec l'ajout d'une composition variée de nutriments (CBS2) au niveau des microcosmes de biostimulation et de combinaison.
- ✓ La structure des communautés de nématodes au niveau des microcosmes de biostimulation avec l'utilisation d'une composition variée de nutriments est apparue la

plus proche de celle observée dans les microcosmes témoins. C'est donc la technique qui permet une dégradation efficace du phénanthrène tout en préservant la structure nématofaunique présente naturellement ;

✓ L'ajout d'une composition variée de nutriments dans les microcosmes contaminés par le phénanthrène a été la plus efficace pour la dégradation du phénanthrène ainsi que pour la biomasse des bactéries et la structure spécifique des nématodes. Cette composition variée en nutriments sera retenue pour la suite de notre travail en passant d'une seule molécule (**phénanthrène**) à un cocktail comprenant trois molécules (**phénanthrène, fluoranthène et pyrène**) des HAPs les plus retrouvés dans la lagune de Bizerte.

CHAPITRE IV

EFFETS D'UN COCKTAIL DE HAP

CHAPITRE IV : EFFETS D'UN COCKTAIL DE HAP

I- INTRODUCTION

Les sédiments des écosystèmes aquatiques sont le plus souvent contaminés par divers polluants tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Bien que ces contaminants n'agissent pas séparément sur les communautés naturelles, peu de travaux se sont intéressés à l'étude de l'effet d'un mélange de HAPs sur les organismes benthiques (Millward *et al.*, 2004 ; Beyrem *et al.*, 2007). De plus, plusieurs interactions biologiques entre la microflore et la méiofaune peuvent jouer un rôle important dans la structuration de la chaîne trophique benthique dans les sédiments aquatiques (Montagna *et al.*, 1995; Nascimento *et al.*, 2012). Ces communautés sont structurées par des relations de compétition et de prédation. Or, les bactéries participent pour une large part à la biodégradation des hydrocarbures déversés dans le milieu marin par voie oxydative impliquant divers enzymes (Heitkamp et Cerniglia, 1989), ce qui explique le développement de techniques de bioremédiation pour dépolluer des sites contaminés. En ce qui concerne les risques environnementaux, plusieurs études touchant la dégradation des HAP ont été rapportées (Samanta *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2005), mais très peu d'informations sont disponibles sur la toxicité d'un mélange de HAPs sur les communautés benthiques en mesurant leur biodégradation dans les sédiments. Dans ce cadre, une étude en microcosmes a été réalisée dans le but de répondre aux questions suivantes:

- ✓ Quel est l'impact d'un mélange de HAPs (fluoranthène, pyrène et phénanthrène) sur les bactéries, la méiofaune et en particulier les nématodes en termes de densité et diversité ?
- ✓ Quelle est l'incidence des HAPs sur la consommation d'oxygène à l'interface eau-sédiment ?
- ✓ Quel est l'impact de la présence ou l'absence de la méiofaune sur la diversité des communautés bactériennes ?
- ✓ Quel est l'impact de la méiofaune sur la dégradation des HAPs ?
- ✓ Quels sont les effets de la bioremédiation sur les bactéries et la méiofaune ?

Notre étude se propose d'apporter des réponses aux problématiques mentionnées ci-dessus en abordant deux parties :

✓ Une première partie qui a été consacrée à l'importance des interactions entre la microflore bactérienne et la méiofaune vis-à-vis des HAPs. A cet effet, les différents microcosmes ont été installés en présence et en absence de la méiofaune. Ceci a été à l'origine d'une publication(P5) intitulée «**The roles of biological interactions and pollutant contamination in shaping microbial benthic community structure**» qui a été publiée par la revue Chemosphere.

✓ Une deuxième partie qui a déterminé l'impact de la bioremédiation des sédiments contaminés par un mélange de HAPs sur la diversité spécifique des nématodes libres marins. Cette partie a fait l'objet d'un article (P6) intitulé «**Responses of a free-living marine nematode community to bioremediation of mixture PAH in Bizerte lagoon** » et qui sera soumis prochainement à la revue Mediterranean Marine Science.

Références bibliographiques

- Beyrem, H. Mahmoudi E., Essid, N. Hedfi, A. Boufahja, F. Aïssa, P. (2007). Individual and combined effects of cadmium and diesel on a nematode community in a laboratory microcosm experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **68**, 412-418.
- Heitkamp, M.A., et Cerniglia, C.E. (1989). Polycyclic aromatic hydrocarbon degradation by a *Mycobacterium* sp. in microcosms containing sediment and water from a pristine ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, **55**(8), 1968-1973.
- Millward, R.N., Carman, K.R., Fleeger, J.W., Gambrell, R.P., Portier, R., (2004). Mixtures of metals hydrocarbons elicit complex responses by a benthic invertebrate community. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*, **310**, 115-130.
- Montagna, P.A., Blanchard, G.F., Dinert, A., (1995). Effect of Production and Biomass of Intertidal Microphytobenthos on Meiofaunal Grazing Rates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol*, **185**, 149-165.
- Nascimento, F.J.A., Naslund, J., Elmgren, R., (2012). Meiofauna enhances organic matter mineralization in soft sediment ecosystems. *Limnol. Oceanogr*, **57**, 338-346.
- Samanta, S. K., Singh, O. V. & Jain, R. K. (2002). Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in Biotechnology*, **20**(6), 243-248.
- Yu, K.S.H., Wong, A.H.Y., Yau, K.W.Y., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., (2005). Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar. Pollut. Bull*, **51**, 1071-1077.

II. PUBLICATION 5:

**THE ROLES OF BIOLOGICAL INTERACTIONS AND POLLUTANT CONTAMINATION IN
SHAPING MICROBIAL BENTHIC COMMUNITY STRUCTURE**

Hela Louati^{a, c}, Olfa Ben Said^{a, b}, Amel Soltania^{a, b}, Patrice Got^c, Ezzeddine Mahmoudi^a,
Cristiana Cravo-Laureau^b, Robert Duran^b, Patricia Aissa^a & Olivier Pringault^{a, c}

Published in: **Chemosphere**

^a Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement, Faculté des Sciences de Bizerte, 7021, Zarzouna, Tunisie.

^b Equipe Environnement et Microbiologie – UMR CNRS IPREM 5254- IBEAS- Université de Pau et des Pays de l'Adour - France.

^c Laboratoire Ecosystèmes Marins Côtiers, UMR 5119 CNRS-UM2-IFREMER- IRD- ECOSYM, Université Montpellier 2, France.

Abstract

Biological interactions between metazoans and the microbial community play a major role in structuring food webs in aquatic sediments. Pollutants can also strongly affect the structure of meiofauna and microbial communities. This study aims investigating, in a non-contaminated sediment, the impact of meiofauna on bacteria facing contamination by a mixture of three PAHs (fluoranthene, phenanthrene and pyrene). Sediment microcosms were incubated in the presence or absence of meiofauna during 30 days. Bioremediation treatments, nutrient amendment and addition of a hydrocarbon-degrading bacterium, were also tested to enhance PAH biodegradation. Results clearly show the important role of meiofauna as structuring factor for bacterial communities with significant changes observed in the molecular fingerprints. However, these structural changes were not concomitant with changes in biomass or function. PAH contamination had a severe impact on total meiofaunal abundance with a strong decrease of nematodes and the complete disappearance of polychaetes and copepods. In contrast, correspondence analysis, based on T-RFLP fingerprints, showed that contamination by PAH resulted in small shifts in microbial composition, with or without meiofauna, suggesting a relative tolerance of bacteria to the PAH cocktail. The PAH bioremediation treatments were highly efficient with more than 95% biodegradation. No significant difference was observed in presence or absence of meiofauna. Nutrient addition strongly enhanced bacterial and meiofaunal abundances as compared to control and contaminated microcosms, as well as inducing important changes in the bacterial community structure. Nutrients thus were the main structural factor in shaping bacterial community composition, while the role of meiofauna was less evident.

1. Introduction

The structure and species composition of benthic communities are controlled primarily by environmental and physical-chemical factors such as sediment particle size, solar radiation, organic matter content, temperature and salinity all of which shape the physical conditions in the sediment (First and Hollibaugh, 2010). In addition to these abiotic factors, contaminants can also impact the benthic community structure. Pollutants released to the environment, can settle and accumulate in bottom sediments of rivers, estuaries, lagoons, lakes and oceans. Thus, many coastal ecosystems are contaminated with high concentrations of anthropogenic pollutants such as organochlorines, heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs) compounds (Zaghden et al., 2005; Hack et al., 2007). PAHs introduced into the marine environment tightly adhere to sediments due to their low water solubility and hydrophobic nature. Consequently, very high concentrations of PAHs have been recorded in coastal sediments near urban and industrial environments. As many Mediterranean coastal lagoons, the Bizerte lagoon (Tunisia) is a polluted ecosystem subject to both urbanization and industrialization (cement works, metallurgical industry, boatyard, tire production factories), as well as naval and commercial shipping harbors. Runoff and discharges of urban and industrial wastes lead to significant pollution of sediments by PAHs, with concentration up to 876 ng.g⁻¹ dry wt sediment (Ben Said et al., 2008). Many PAHs are recalcitrant compounds with toxic properties (Samanta et al., 2002). Numerous studies indicate that one-, two- and three-ring compounds are acutely toxic, while higher molecular weights are considered to be genotoxic (Cheung and Kinkle, 2001). These toxicity characteristics underline the importance of investigating the effects of PAHs on benthic sediment organisms. In this context, meiofauna community structure has been recognized as a sensitive bioindicator of pollution in benthic environments (Guo et al., 2001; Mahmoudi et al., 2007). Meiofauna are benthic metazoans of small size (all metazoans between 40 µm and 1 mm), often associated to sediment particles (e.g. Kennedy and Jacoby, 1997). Meiofauna facilitate mineralization of organic matter, enhance nutrient regeneration and serve as food for a variety of higher trophic levels (Coull, 1999). Their small size, their high density and short generation times in addition to an easy laboratory maintenance encourage their use in biomonitoring experimental studies (Mahmoudi et al., 2007; Beyrem et al., 2010). Field and laboratory studies have documented that benthic meiofauna are sensitive to a wide

range of organic toxic compounds such as hydrocarbons (Mahmoudi et al., 2005; Lindgren et al., 2012), lubricants (Beyrem et al., 2010), and diesel (Petersen et al., 2009). Biological interactions between metazoans and the microbial community play a major role in structuring food webs in aquatic sediments (Montagna et al., 1995; Nascimento et al., 2012). Meiofaunal groups such as nematodes can influence directly (by predation) or indirectly the activity and/or species composition of microbial communities (De Mesel et al., 2004; Moens et al., 2005). Generally, mineralization of organic matter is enhanced and bacterial production is stimulated by the presence of meiofauna (Rysgaard et al., 2000). In deep-sea sediments, a significant positive correlation between bacterial biomass and meiofauna biomass was observed along a gradient of organic matter (Raghukumar et al., 2001), suggesting a tight coupling between both compartments. Recently, using a microcosm approach, Näslund et al. (2010) have observed that meiofauna can be an important regulating factor for the microbial mineralization of organic contaminants such as PAHs. Bioturbating meiofauna exert a top-down impact on bacterial community structure by changing the physicochemical conditions of sediment thus enhancing nutrient and carbon supplies (De Mesel et al., 2004; Cuny et al., 2007). Nevertheless, meiofauna and bacteria can also be in competition for food sources depending on the carbon supply conditions (Danovaro et al., 1999). Therefore, meiofauna has both positive and negative impacts on bacteria, which complicates the interactions between these two essential compartments of the benthic food web.

Microorganisms play an important role in the marine food chain as degraders of organic matter, and producers and recyclers of inorganic nutrients (Lindgren et al., 2012). Thus, bacterial degradation represents a potential route for the ultimate elimination of PAHs from sediments under both aerobic and anaerobic conditions (Yuan et al., 2000). Since natural degradation of PAHs is a slow process, bioremediation can represent a safer and more efficient approach to restore polluted sites as compared to conventional chemical and physical methods (Alexander, 1999). In order to enhance the biodegradation efficiency, two main remedial strategies, namely biostimulation and bioaugmentation, are used in bioremediation treatments (Goñi et al., 2013). Biostimulation, by adding nutrients and/or a terminal electron acceptor, enhances the low activity of indigenous microbial populations. Bioaugmentation involves the addition of microbial strains (indigenous or exogenous), which have the ability to degrade the target toxic molecules (Goñi et al., 2013). Bioremediation of PAHs in benthic sediments shows contrasted

results, with an efficient biodegradation, but also sometimes inefficient strategies due to competition for nutrients (Yu et al., 2005; Louati et al., 2012). This competition for nutrients within the microbial community is increased when microorganisms also have to compete with organisms from higher trophic levels such as meiofauna for nutrients and organic matter.

The aim of the present study was to investigate, in a non-contaminated sediment (Bizerta Lagoon), the impact of meiofauna on microorganisms facing contamination from a mixture of three PAHs (fluoranthene, phenanthrene and pyrene) as a function of the bioremediation treatment used for PAH biodegradation. For that purpose, sediment microcosms were settled in the presence or absence of meiofauna. Bioremediation schemes included biostimulation and the combination of biostimulation with bioaugmentation by the inoculation of a marine PAH degrading bacterium, *Bacillus megaterium*, previously isolated from Bizerta lagoon contaminated sediment (Ben Said et al., 2010).

2. Materials and methods

2.1. Collecting site

Natural sediment including the meiobenthos was collected from Echaraà in Bizerta lagoon (Tunisia) during April 2010. More details on the sampling site can be found in Louati et al. (Louati et al., 2012). On the sampling day, the water salinity was 35 PSU, the dissolved oxygen concentration was 6.7 mg l⁻¹ and the water pH was 8.1. The sediments had a median particle diameter of 43 µm, organic carbon content of 0.79% and were largely composed of fine sand (70% < 63µm). Sediment total nitrogen content was 1.03%.

Handcores of 10 cm² were used to a depth of 15 cm to transfer sediment into a bucket. On return to the laboratory, sediments were homogenized by gentle hand stirring with a large spatula before they were used for toxicant sediment spiking or microcosms filling. No detectable contamination (all concentrations < detection limit) of the sediment was observed for the three studied PAHs (fluoranthene, phenanthrene and pyrene). Buckets and spatula were all acid rinsed before use. Three sediment replicates were sampled to measure the *in situ* abundance of meiofauna and bacteria, determine the bacterial community structure, and for TOC and PAH analysis.

2.2. PAH contamination of sediments

Sediment used for the contamination experiments was frozen (-80°C) and thawed three times to defaunate it following the recommendations of Gyedu-Ababio and Baird (Gyedu-Ababio and Baird, 2006). It was then wet sieved to remove the larger particles ($>63\text{ }\mu\text{m}$). Fluoranthene, pyrene and phenanthrene were selected as PAH congeners as all three are found in relatively high concentration in contaminated marine sediments as well as for their apparent toxicity to sediment-dwelling invertebrates. Moreover, these PAHs are present in high concentrations in some areas of the Bizerte lagoon (Ben Said et al., 2010). Stock solutions of high purity (Sigma-Aldrich Chemical) fluoranthene (Fl), pyrene (Pyr) and phenanthrene (Phe) were dissolved in distilled acetone. PAH solution was added uniformly at the bottom of the microcosms. Then after acetone evaporation, sediment was added and the microcosm were shaken overnight to allow sufficient time for the PAH to adsorb onto the sediments. Final concentration of each PAH in sediment was 45 mg kg^{-1} , 30 mg kg^{-1} and 25 mg kg^{-1} of dry sediment for fluoranthene, pyrene and phenanthrene, respectively, which represent the concentration measured in the most contaminated sediment of the Bizerta lagoon for these PAHs (Ben Said et al., 2008).

2.3. Experimental setup

Microcosms consisted of 1.6 L glass bottles. Microcosms were incubated with (Meio +) or without meiofauna (Meio -). Meiofauna was removed by carefully sieving ($40\text{ }\mu\text{m}$) the sediment (Wieser, 1960). Sieving removed the finer sediment particles from the sediment; therefore, the settled clay particles left from the sieving water were then added to each experimental unit in order to minimize impact of sieving and restore as much as possible initial conditions. Contaminated microcosms (PAH) were gently filled with 400 g (wet weight) of homogenized sediment (200 g of natural sediment and 200 g contaminated sediment, see above) topped up with 1 L of filtered ($1\text{ }\mu\text{m}$) natural lagoon water at 30 PSU. Control consisted of uncontaminated sediment (C) with or without meiofauna. Each bottle was closed with a rubber bung with two holes and aerated via an air stone diffuser after filtration ($0.2\text{ }\mu\text{m}$) to prevent contamination. Microcosms (control and contaminated) were then vigorously mixed for several minutes in order to homogenize the sediment before starting incubation. Bioremediation treatments were started 1 day after PAH contamination. Biostimulation (PAH+BS) was achieved by amending a mineral salt medium (MSM) using the protocols of Yu et al. (2005) and

Jacques et al. (2008). The MSM has the following composition (mg L⁻¹): (NH₄)₂SO₄, 1000; K₂HPO₄, 10000; KH₂PO₄, 5000; MgSO₄ (H₂O)₇, 200; CaCl₂(H₂O)₂, 100; and trace elements made up of FeSO₄(H₂O)₇, 5; MnSO₄(H₂O), 3; CuSO₄(H₂O)₅, 0.015; (NH₄)₆Mo₇O₂₄(H₂O)₇, 1; Na₂MoO₄(2H₂O)₂, 0.01. Biostimulation–bioaugmentation (PAH+BS+BA) was achieved by adding the bacterium *Bacillus megaterium* strain isolated from Bizerta-polluted sediments (Ben Said et al., 2008). The strain was previously grown in 50 mL of Lysogeny Broth (LB). After 1 week cultivation, cells were harvested by centrifugation at 10,000×g for 15 min at 4°C. Cells were resuspended in nutrient solution and introduced into the microcosms previously amended with nutrients (mineral salt medium). The initial cell density in the inoculum (2 ml) 9.50×10⁸ cells mL⁻¹, the total number of added cells was 1.9 10⁹ cells for 400g of sediment (weight). After bacterial inoculation and nutrient addition, sediment was agitated for half an hour for homogenization. All microcosms were incubated in triplicates for 30 days in laboratory at room temperature (20–22°C).

2.4. PAH analysis

Polycyclic aromatic hydrocarbon analyses in the sediments were conducted by gas chromatography (GC). Approximately 1 g (dry weight) of the samples was extracted with 40 ml of acetone/hexane (v/v) and with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane as internal standard, in an ultrasonic bath (15 min), adapted from the procedure described by USEPA (2007). The GC (GC Agilent Technologies) was equipped with a flame-ionization detector (290 °C) and a capillary column HP 5 (30 m x 320 µm x 0.25 µm, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). The injector temperature was maintained at 280°C. The carrier gas (He) was maintained at 1.7 ml/min. The oven temperature was programmed from 60°C (1 min) to 200°C (1 min) with a ramp of 15°C/min, and then to 300 °C (2 min) with a ramp of 5°C/min. Calibration curves were established with single molecules and PAH mixtures. Recovery was > 85% (85 – 100 %), and limit of quantification ~2 ppm.

2.5. Bacterial counts by Flow Cytometry

Bacteria were extracted from sediment following the protocol of Duhamel and Jacquet (2006) as detailed in Louati et al. (2012). For the enumeration of total bacteria, cells were stained with the nucleic acid stain SYBR Green I (Marie et al., 1997). Working stocks of SYBR Green I (10⁻³ of the commercial solution, Molecular Probes) were freshly

prepared on the day of analysis. Bacterial samples were stained with a 2.6 % (final concentration of work solution) and incubated in the dark 4°C for 15 min before analysis. The stained bacterial cells, excited at 488 nm, were enumerated using side scatter and green fluorescence at 530 nm. Fluorescent beads (1 and 2 µm; Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA) were added to each sample as an external standard. True count beads (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) were added to determine the volume analyzed. Samples were analyzed with a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson), equipped with a 15 mW argon ion laser emitting at 488 nm for excitation. Data analyses were carried out with CellQuest Pro 5 software obtained from BD Biosciences.

2.6. Meiofauna extraction

At the end of the microcosm incubation, sediments were fixed in 4% neutralized formalin (Mahmoudi et al., 2005). Sediments were washed through nested 1 mm mesh sieves to separate macrofauna from meiofauna using the protocol described in Mahmoudi et al. (Mahmoudi et al., 2007). Meiofauna (M) were counted and identified at the higher taxon level: nematodes (N), copepods (C) and polychaetes (P) using a stereomicroscope.

2.7. Sediment oxygen consumption measurements

Concentration profiles of oxygen were measured at the sediment-water interface using oxygen microelectrodes (Unisense, Denmark). These Clark-type oxygen microsensors are generally used for microbial ecology studies and contain a guard electrode (Revsbech, 2005). The electrode had a 90% response time lower than one second and a stirring sensitivity of 1%. Oxygen microprofiles were measured with a depth resolution of 100 µm using a motor-driven micromanipulator, and the sensor current was measured with a picoamperemeter connected to an A/D converter that transferred the signals to a PC. Linear calibration of the microsensor was determined from the electrode readings in air-saturated water above the sediment and in the anoxic part of the sediment. Oxygen concentration in air-saturated water was calculated from the solubility equation according to Garcia and Gordon (1992). Sediment oxygen consumption (SOC) was estimated from O₂ flux in the diffusive boundary layer according to Jørgensen and Revsbech (1985). Oxygen consumption profiles were estimated from

steady-state O₂ microprofiles by a numerical procedure using PROFILE software as described in Berg et al. (1998). For each microcosm, three to four oxygen microprofiles were measured just after microcosm settlement, and after 15 and 30 days of incubation. More details of the procedure can be found in Louati et al. (2012).

2.8. T-RFLP bacterial community analysis

Mixed community DNA was extracted directly from sediment microcosms using an Ultra Clean® Microbial DNA Isolation DNA Kit (MoBio Laboratories, CA) by following the manufacturer's protocol. 16S rRNA gene was PCR amplified from extracted samples using primers 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and 1489R (5'-TACCTTGTTACGACTTCA-3'). Primer 8F was fluorescently labeled with TET (5-Tetrachloro-fluorescein E.S.G.C.; Cybergene Group, France). PCR and T-RFLP analysis were carried out as described previously (Ben Said et al., 2010) using the Taq DNA polymerase (Eurobio). The fluorescent PCR products were cleaned using GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (Amersham-Pharmacia) and 10 µL of purified product was digested separately with 3U of enzyme HaeIII and HinfI for 3 h at 37 °C (New England Biolabs). One microlitre of restriction digests were then mixed with 20 µL of deionizedformamide and 0.5 µL of a TAMRA-labelled Gene scan 500 bp internal size standard (Applied Biosystems), denatured for 5 min at 95 °C and immediately transferred to ice. Samples were loaded onto an ABI PRISM 310 automated genetic analyser (Applied Biosystems). T-RFLP profiles (T-RFs) were aligned by identifying and grouping homologous fragments and normalized by calculating relative abundances of each terminal-restriction fragment (T-RFs) from height fluorescence intensity of each T-RF as described in Pringault et al. (2008). For statistical analysis, T-RF heights of the three microcosm replicates were averaged.

2.9. Statistical analysis

Differences between controls and treatments were compared by parametric one-way ANOVA tests. A posteriori paired multiple-comparisons were performed using Tukey HSD test. Statistically significant differences were assumed when $p < 0.05$. For statistical analysis of bacterial community structure, relative abundances of T-RFs were transformed with arcsin ($x^{0.5}$) to get a normal distribution of data (1998). Correspondence Analyses (CA) were then performed with MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey Wales) to

assess the impact of PAH spiking on the bacterial community structure as a function of microcosm treatments.

3. Results

3.1. Degradation of mixed PAHs

During the 30 day incubation, the percentage of degradation (including biotic and abiotic processes) of fluoranthene (Fl), phenanthrene (Phe) and pyrene (Pyr) in the contaminated microcosms (PAH) in absence (Meio-) or presence of meiofauna (Meio+) was minimal in the sediment (Fig. 1). Presence of meiofauna had no significant effect on PAH degradation irrespective of the considered molecule. Biodegradation was the highest for Fl with $16 \pm 7 \%$ to $22 \pm 2 \%$ (Meio- and Meio+, respectively) whereas Phe and Pyr degradation was very low, $7 \pm 2\%$, $10 \pm 1 \%$ (Phe) and $2 \pm 1\%$, $3 \pm 2 \%$ (Pyr) respectively (Fig. 1). In contrast, most of the added PAHs were biodegraded when bioremediation treatments were used, although the efficiency varied between treatments and contaminant. Biostimulation strongly enhanced PAH degradation, with up to $96 \pm 0.6\%$ for Phe, $80 \pm 2\%$ for Fl and $63 \pm 7\%$ for Pyr. Combination of biostimulation with bioaugmentation did not significantly enhance PAH degradation compared to the biostimulation treatment.

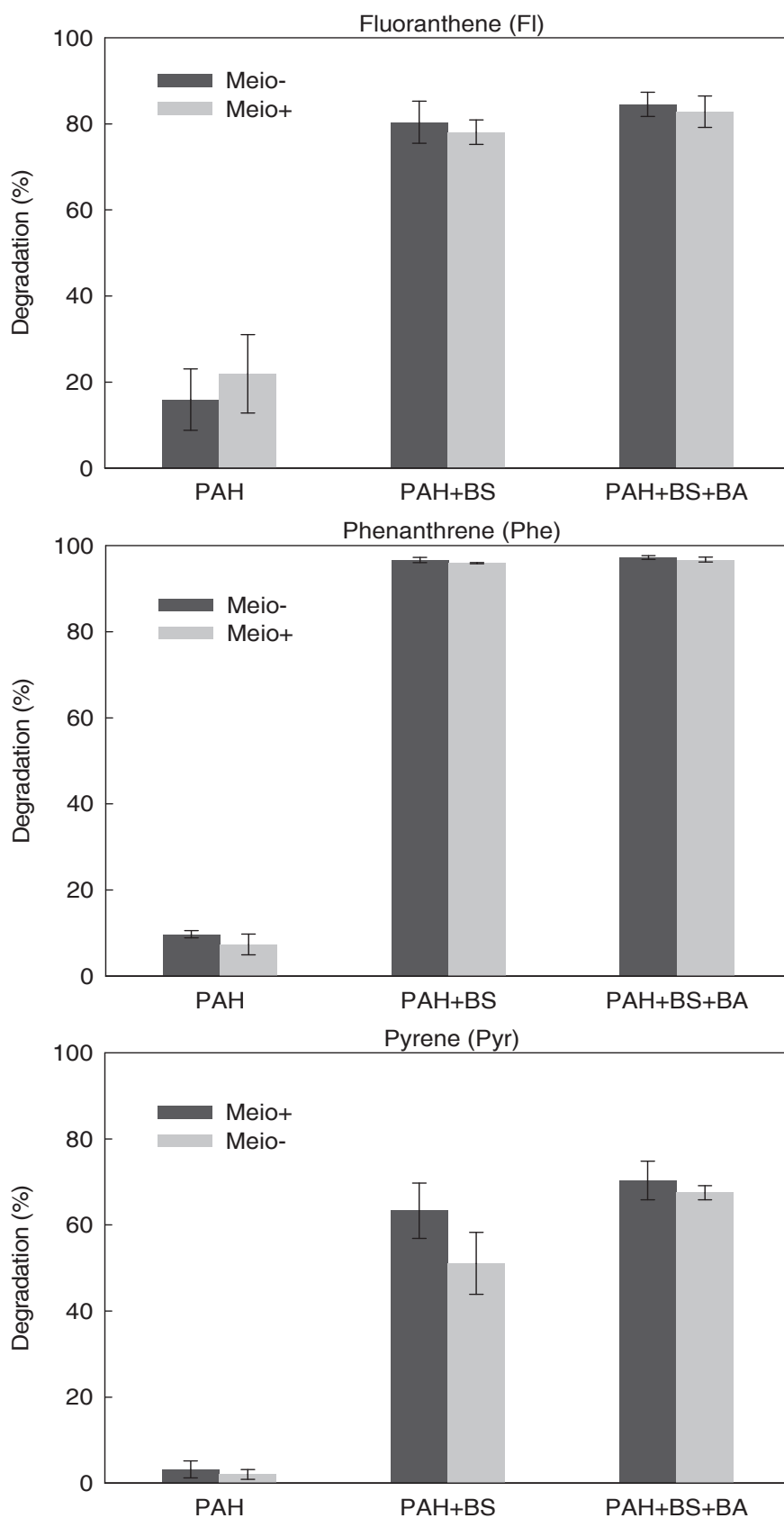


Fig.1. Biodegradation of fluoranthene (Fl), phenanthrene (Phe) and pyrene (Pyr) in the sediment of different treatments after 30 days of incubation (average $\pm$ standard deviation)

3.2. Percentage of total organic carbon

After 15 days of incubation, maximum concentration of total carbon was observed in biostimulation microcosms (0.65 and 0.69%, Meio- and Meio+, respectively; Table 1) whereas the minimum values (0.51%) were observed in C and PAH+BS+BA microcosms (Meio-). The concentrations of total organic carbon were roughly similar at the end of incubation in all microcosms (0.45 - 0.57%) in presence or absence of meiofauna irrespective of the PAH contamination except in C (Meio+) where the highest value was observed (0.66%).

Table 1: Total organic carbon (TOC) in the sediment as a function of the different treatments (C uncontaminated, PAH contaminated, PAH+BS biostimulation, PAH+BS+BA biostimulation and bioaugmentation) after 15 and 30 days of incubation (average $\pm$ standard deviation, n=3)

Microcosm	TOC (%)			
	15 days		30 days	
	Meio-	Meio+	Meio-	Meio+
C	0.50 $\pm$ 0.04	0.60 $\pm$ 0.02	0.45 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.01
PAH	0.56 $\pm$ 0.11	0.61 $\pm$ 0.08	0.50 $\pm$ 0.04	0.54 $\pm$ 0.03
PAH+BS	0.65 $\pm$ 0.30	0.69 $\pm$ 0.21	0.57 $\pm$ 0.08	0.50 $\pm$ 0.01
PAH+ BS+BA	0.50 $\pm$ 0.02	0.57 $\pm$ 0.04	0.48 $\pm$ 0.00	0.52 $\pm$ 0.05

3.3. Bacterial and meiofaunal abundance

Bacterial cells were counted by flow cytometry, initially, and after 15 and 30 days of incubation. Bacterial biomass observed in initial conditions was $5.32 \pm 0.33 \times 10^7$ cells cm⁻³. Interestingly, bacterial biomass in C and PAH microcosms after 15 days of incubation was roughly similar to the initial biomass observed *in situ* $5.14 \pm 0.23 \times 10^7$ cells cm⁻³. The highest values were observed in PAH+BS and PAH+BS+BA microcosms in presence of meiofauna ($8.45 \pm 0.42 \times 10^8$ and $8.28 \pm 0.51 \times 10^8$ cells cm⁻³, respectively; Fig. 2). After 30 days of incubation, PAHs spiking did not significantly change benthic bacterial abundances relative to the control microcosms (Fig. 2 upper panel). It is worth noticing that, bacterial biomasses in contaminated microcosms (PAH) and control microcosm (C) were similar, irrespective of the presence of meiofauna (around 5×10^7 cells cm⁻³ Fig. 2 upper panel). However, after 15 and 30 days of incubation, biostimulation (PAH+BS) and biostimulation coupled with bioaugmentation (PAH+BS+BA) resulted in a significant increase ($p < 0.001$) of

indigenous bacterial abundance ($7.27 \pm 0.95 \times 10^8$ and $7.55 \pm 1.45 \times 10^8$ cells cm^{-3} , respectively) relative to C and PAH microcosms, in presence or absence of meiofauna. The number of added cells was 1.9×10^9 cells for 1040 cm^3 of sediment (volume for 400g of sediment), therefore, the increase of cells in the bioaugmentation treatment relative to the initial cell density was around 3%. After 15 and 30 days of incubation, cytograms of PAH microcosms clearly showed two distinct populations (B1 and B2, Fig. 3) that were also observed in C microcosm irrespective of the presence or absence of meiofauna (Fig. 3). Interestingly, these two populations were also observed in PAH+BS and PAH+BS+BA microcosms as well as two other populations (B3 and B4) after 15 days of incubation. However, B3 and B4 populations were not detectable after 30 days in both remediation treatments.

At the end of the incubation, the whole sediment was removed from the microcosm for meiofauna enumeration in microcosms Meio+. In C microcosms, total meiofauna represented on average 485 ± 16 Ind/microcosm, i.e 60 ± 2 Ind. 10 cm^{-2} (considering a sediment microcosm surface of 80 cm^2) with the following repartition, 84 % nematodes, 11 % copepods, 5 % polychaetes. Interestingly, meiofauna abundance observed in C microcosms after 30 days of incubation was roughly similar to the initial abundance observed *in situ* 63 ± 2 Ind. 10 cm^{-2} , with a similar repartition between the major groups. Contamination by the PAH mixture had a clear effect ($p < 0.05$) on meiofauna with a strong reduction of total biomass (42 ± 7 vs 485 ± 16 Ind/microcosm, for PAH and C microcosms, respectively) together with a complete disappearance of polychaetes and copepods. As a consequence, nematodes represented the single main taxon identified in PAH microcosm. In contrast, biostimulation strongly enhanced by a factor of two meiofaunal density compared to the C microcosms (777 ± 9 vs 485 ± 16 Ind/microcosm). Nevertheless, this increase was only observed for nematodes, the density of copepods and polychaetes remained similar to that of the C microcosms. The combination of biostimulation with bioaugmentation resulted in higher densities ($p < 0.001$) relative to the PAH+BS treatment (975 ± 6 vs 777 ± 9 Ind/microcosm, respectively; Fig. 2 lower panel). As observed for the PAH+BS treatment, the increase in total density was explained by increase in nematode abundance, densities of polychaetes and copepods remaining unchanged.

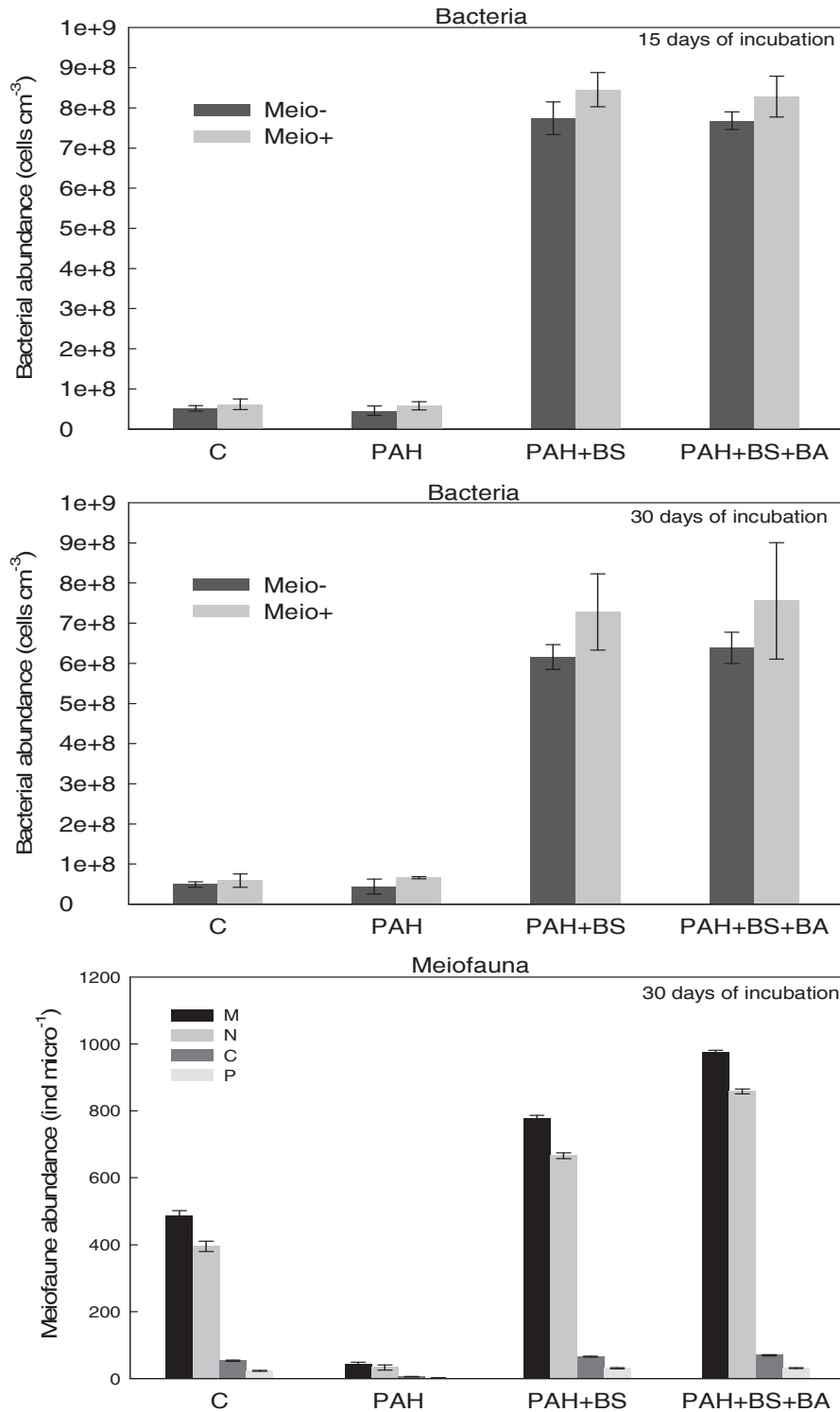


Fig.2. Bacterial and meiofaunal abundances in the sediment of different microcosms (C uncontaminated, PAH contaminated, PAH+BS biostimulation, PAH+BS+BA biostimulation and bioaugmentation) after 15 days and 30 days of incubation. Upper panel: Bacterial abundance determined by flow cytometry (average $\pm$ standard deviation). Lower panel Absolute abundance (individuals per microcosm) and standard deviation of total meiofauna (M) and major groups: nematodes (N), copepods (C) and polychaetes (P). As counting meiofauna required to remove all the sediment of the microcosm, abundance of meiofauna was determined only at the end of incubation.

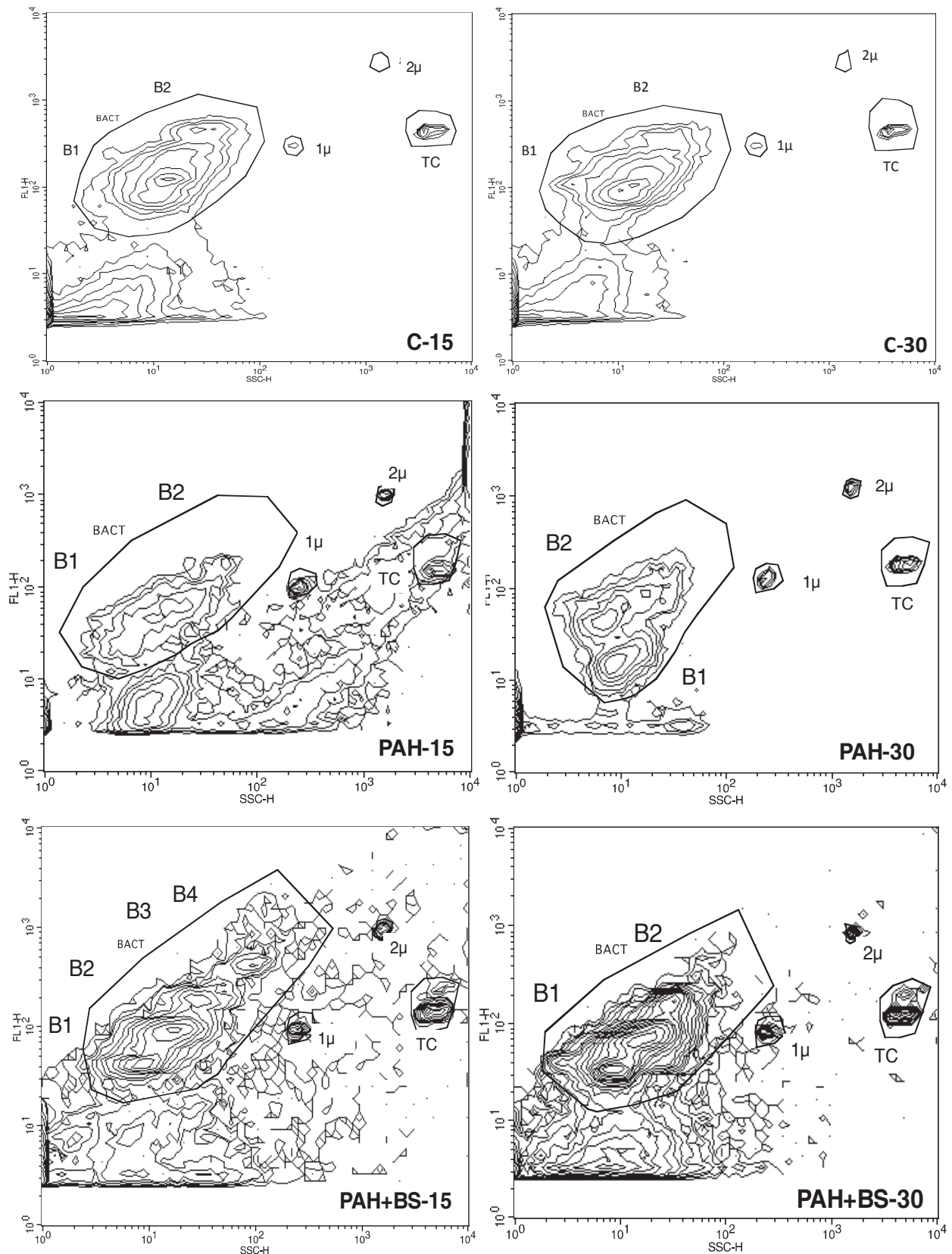


Fig.3. Examples of cytograms in contour plots of bacterial populations for C, PAH and PAH+BS microcosms after 15 days and 30 days of incubation. The abscissa indicates the fluorescence intensity (FL 1) of cells stained with SYBR Green I. The ordinate indicates the relative granularity (SSC) of cells. 1 and 2 μ m= calibration beads; TC = True counts; BACT = bacteria; B1, B2, B3 and B4 = subpopulations.

3.4. Sediment Oxygen Consumption

Oxygen consumption was measured just after microcosm settlement and after 15 and 30 days of incubation. At the beginning of the experiment, areal SOC (Fig. 4) was roughly similar in all microcosms ranging from 1.8 to 2.2 nmol O₂ cm⁻² min⁻¹ except in PAH (Meio -) where the highest value was observed (3.2 nmol ± 0.03). Maximum oxygen penetration was around 1 to 1.5 mm and no significant difference was observed between microcosms (data not shown). Sediment oxygen consumption decreased ($p < 0.05$) with the duration of incubation in all microcosms. At the end of incubation, maximum oxygen penetration ranged from 0.23 to 0.6 cm, maximum penetration was observed in PAH+BS+BA microcosms, whereas minimum values were observed in C microcosms (Fig. 5). Sediment oxygen consumption (SOC) profiles were relatively similar in control and contaminated microcosms, with maximum value observed at the sediment surface and a second peak at the maximum oxygen penetration corresponding to the oxygen demand for the oxidation of reduced compounds. Areal SOC (Fig. 4) were similar in C and PAH microcosms with average rate of 1.07 nmol ± 0.07 O₂ cm⁻² min⁻¹. No significant difference in areal SOC was observed between the presence and absence of meiofauna. However, oxygen profiles clearly showed that vertical oxygen distribution and vertical oxygen consumption were strongly influenced by the presence of meiofauna, which resulted to a lower oxygen penetration (Fig. 5). Bioremediation treatments resulted in a deeper oxygen penetration relative to the control and contaminated microcosms, and reached up to 6 mm depth in PAH+BS+BA. Sediment oxygen consumption profiles for bioremediation treatments were considerably different to those of PAH and C microcosms, with low or no consumption from sediment surface down to 5 mm depth and a peak of consumption at the maximum oxygen penetration level. This increase in oxygen penetration was due to a decrease in the oxygen demand as indicated by the areal SOC (Fig. 5). The lowest value was observed for PAH+BS microcosms (Meio+) and corresponded to a more than 50 % reduction relative to the control and contaminated microcosms. As observed under low nutrient conditions, no significant influence of meiofauna was observed for areal SOC (HSD tests). Under low and high nutrient conditions, no significant correlation was observed between areal SOC measured after 15 and 30 days of incubation and the corresponding total inorganic carbon concentration.

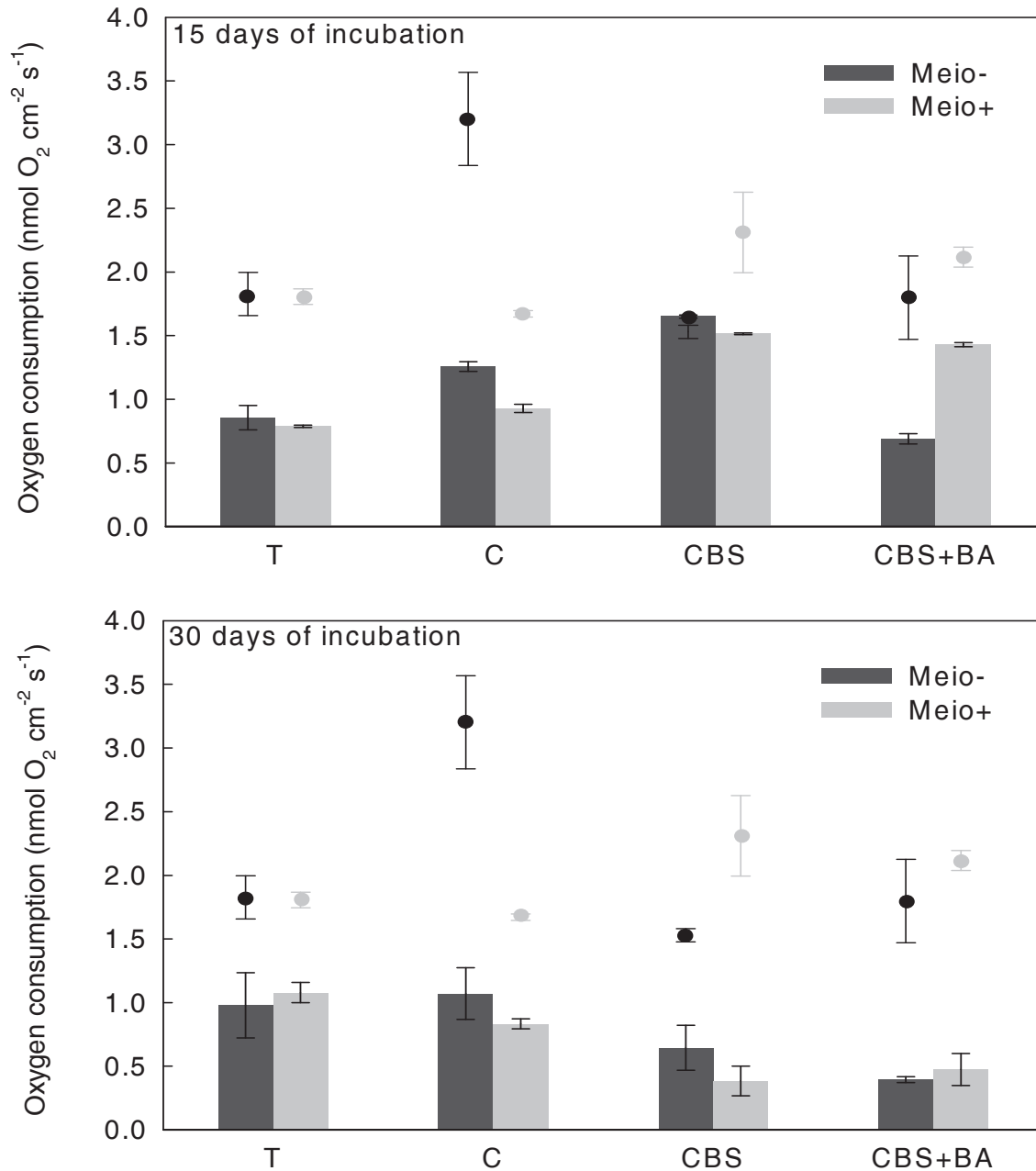


Fig.4. Sediment oxygen consumption at the sediment/water interface after 15 and 30 days of incubation (average $\pm$ standard deviation) as a function of treatment (C uncontaminated, PAH contaminated, PAH+BS biostimulation, PAH+BS+BA biostimulation and bioaugmentation). Values (average $\pm$ standard deviation) measured in the different microcosms at the beginning of the incubation are indicated by dark circles (Meio-) and grey circles (Meio+).

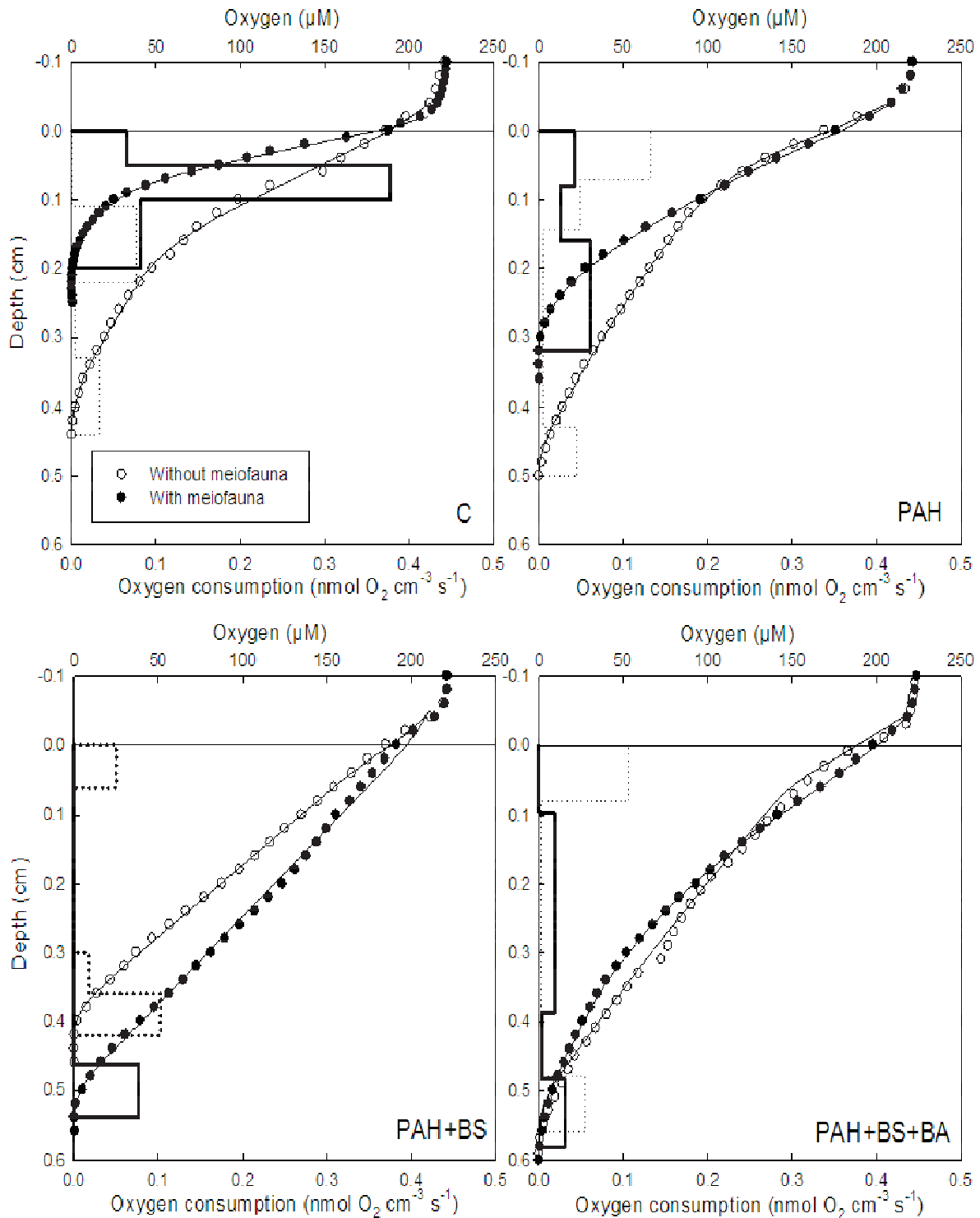


Fig.5. Microprofiles of oxygen (squares) and oxygen consumption (line) in the sediment as a function of treatment (C uncontaminated, PAH contaminated, PAH+BS biostimulation, PAH+BS+BA biostimulation and bioaugmentation). Open squares and dotted lines: oxygen concentration and oxygen consumption in the absence of meiofauna, respectively. Solid squares and lines: oxygen concentration and oxygen consumption in the presence of meiofauna, respectively.

3.5. Bacterial community structure

Molecular fingerprints (T-RFLP) of the bacterial benthic communities were analyzed after 15 and 30 days of microcosm incubation. Average number of TRFs ranged from 34 ± 13 (PAH+BS Meio-, 30 days) to 113 ± 24 (Control Meio+, 30 days). In all treatments, the absence of meiofauna decreased the number of TRFs with the disappearance of specific TRFs (e.g. HaeIII 202, 253, 272, 323, and HinfI 111, 248, 341) confirming the population modifications observed from flow cytometry counts. This suggests that meiofauna play a role in shaping bacterial communities. This hypothesis was confirmed by correspondence analysis performed on microbial community fingerprints from the initial samples and after 15 and 30 days of incubation for C and PAH microcosms (Fig. 6 upper panel). The two axes explained more than 50 % of the variance observed. The time of incubation (axis 1) has a great impact of microbial community structure in the presence or absence of meiofauna. Interestingly, after 15 days of incubation, bacterial community structure observed in C microcosms in the presence of meiofauna was similar to the initial structure observed *in situ*. Contamination by PAH resulted in a small shift in the microbial composition as also indicated by flow cytometry counts, however the absence of meiofauna strongly modified the microbial community structure relative to the initial structure with less than 50 % of similarity (C microcosm vs initial). Microcosms with meiofauna were clearly separated from the corresponding treatment without meiofauna along the axis 2. In addition, as observed for meiofauna microcosms, the PAH contamination did not result in a strong change in the bacterial composition relative to the corresponding control (Fig. 6 upper panel). All T-RFLP profiles observed after 30 days of incubation were clearly separated from those observed after 15 days indicating that incubation time and meiofauna were the main structural factors whereas PAH contamination had little effect. When bioremediation treatments were used to enhance PAH biodegradation (Fig. 6 lower panel), biostimulation and biostimulation combined with bioaugmentation did not result in distinct communities. Moreover, the structuring role of meiofauna on the bacterial community composition in these two treatments was no longer observed, as T-RFLP profiles, either with or without meiofauna, were not clearly separated (Fig. 6 lower panel).

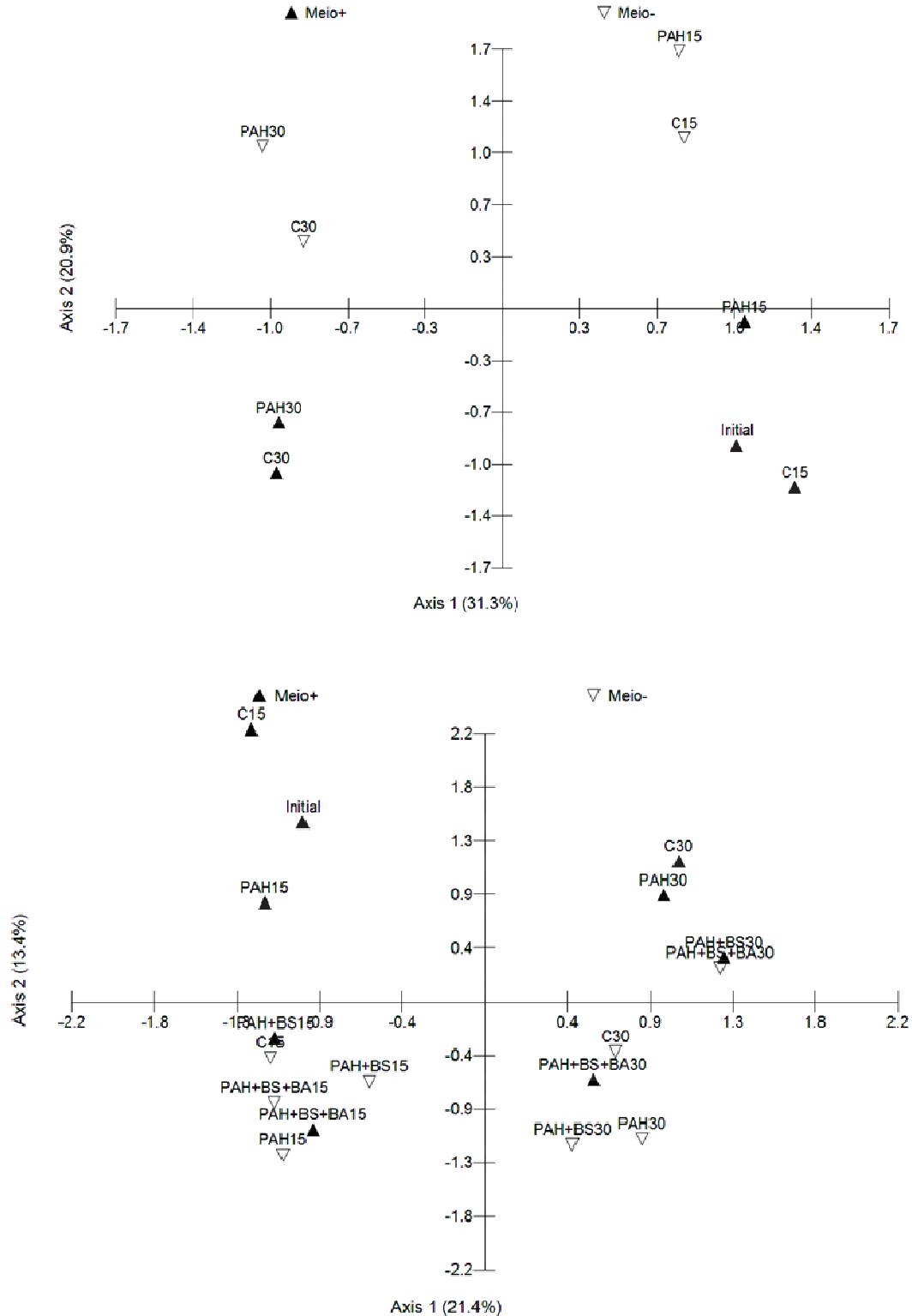


Fig.6. Correspondence Analysis (CA) of the microbial communities based on T-RFLP data (16S rRNA genes) as a function of treatment after 15 days (15) and 30 days (30) of incubation (C uncontaminated, PAH contaminated, PAH+BS biostimulation, PAH+BS+BA biostimulation and bioaugmentation). The data represent the average for triplicate samples of HaeIII and HinfI digested 16S rRNA genes yielding 5-end T-RFLP patterns. Upper panel: CA with Initial, C and PAH samples. Lower panel: CA with PAH, PAH+BS and PAH+BS+BA samples.

4. Discussion

4.1. Notes on the methodology employed

The aim of the study was to investigate the role of meiofauna in shaping bacterial community structure as a function of PAH contamination and the treatments used to enhance biodegradation of PAH. For that purpose, sediment was artificially defaunated by sieving sediment through a mesh of 40 microns. In order to decrease possible artifacts, the settled clay particles left from the sieving water were then added to each experimental microcosms, mimicking so as much as possible initial conditions. The impact of meiofauna on bacterial community is usually assessed i) by artificially increasing the density of meiofauna in laboratory experiments (Cuny et al., 2007) or ii) by comparing *in situ* bacterial composition over a range of meiofauna abundance (Van Gaever et al., 2009).). It is often difficult to find natural sediments harboring a range of meiofauna abundance from zero to high abundances with similar physicochemical conditions. Microcosm experiments that artificially manipulate densities can represent attractive tools allowing for the understanding the complex interactions between these two main actors of the benthic food web. Nevertheless, as for any laboratory experiments, the artificial density manipulation might be accompanied by artifacts that can preclude clear conclusions and *in situ* transposition of results. Consequently, in this study, efforts were made to minimize as much as possible these artifacts. Impact of meiofauna on microbial community was assessed by comparing abundance, function and structures in Meio+ and Meio– microcosms. Sediment oxygen consumption (Fig. 5) and oxygen distribution measured just after microcosm settlement (one day of incubation) was similar in the presence or absence of meiofauna for C microcosms suggesting thus that removing meiofauna provoked no effect on the functioning of the sediment. Nevertheless even artifacts caused by sieving have been minimized, possible role of a modification of sediment granulometry on microbial community (structure and function) cannot be totally ruled out.

4.2. Impact of meiofauna on microbial activity and structure

The abundance of meiofauna observed in C microcosms at the end of incubation was similar to natural abundance observed *in situ* in the sampling site with range around 60-70 Ind. 10 cm⁻². Density of meiofauna was similar to what is observed in other sediments of Bizerte lagoon exhibiting the same granulometry, organic content and pollutant concentration (Boufahja et al., 2007). The meiofauna did not affect bacterial abundance, as the biomass of indigenous bacteria was similar in all microcosms (after 15 and 30 days of incubation)

regardless of the presence or absence of meiofauna. In contrast, significant correlations between bacterial biomass and meiofauna biomass have been observed in deep-sea sediments emphasizing the role of bacteria in providing quality food to the meiofaunal population (Raghukumar et al., 2001). Nevertheless, the present study clearly highlights the important role of meiofauna as structuring factor for microbial community diversity under low nutrient conditions (Fig. 6 upper panel). A significantly different bacterial diversity was found in control microcosms in the absence of meiofauna compared with the initial structure with the appearance of specific TRFs (e.g. HaeIII 194, 302, 321 and HinfI 219, 329). This clearly indicates that meiofauna in sediments strongly influences bacterial community composition, and it has been observed elsewhere that nematodes can have a significant structuring top-down influence on bacterial diversity (De Mesel et al., 2004). Recently, using microcosm incubation and addition of meiofauna, Nascimento et al. (2012) observed significant difference in bacteria community species composition as a function of added meiofaunal biomass. These changes in microbial community structure were concomitant with an increase in organic matter mineralization. Similarly, Näslund et al. (2010) revealed a decrease in bacterial diversity due to the presence of higher meiofauna abundance. Overall, the present study shows that the removal of meiofauna causes the appearance of specific populations that were probably inhibited in the presence of meiofauna due to predation and/or competition for nutrients. Artificially removing meiofauna might have suppressed the negative effects exerted by meiofauna on these specific microbial populations, thus stimulating their growth. In addition, specific bacterial groups might also depend on the presence of meiofauna. Indeed, the absence of meiofauna decreased the number of TRFs with the disappearance of specific TRFs (e.g. HaeIII 202, 253 and HinfI 111, 248). According to the MICA data base, HinfI 248 could correspond to a clostridium species. Therefore, artificially removing meiofauna resulted to different bacterial communities with nevertheless similar densities than those measured in sediments where meiofauna were present.

Incubation time resulted in a decrease of areal sediment oxygen consumption in all microcosms. Under low nutrient contents, this decrease was not explained by changes in bacteria biomass, neither by a decrease in TOC concentration as no significant correlation between TOC and SOC was observed. As observed for bacterial density, meiofauna had no significant impact on areal sediment oxygen consumption for contaminated and control microcosms, as areal rates were not significantly different (Fig. 4). However, under low nutrient conditions, the presence of meiofauna severely affected vertical oxygen distribution, which resulted in a lower oxygen penetration (Fig. 5). The absence of meiofauna led to an

expansion of the oxic zone due to a lower oxygen demand, thus allowing oxygen access to deeper horizons; which finally increases the oxygen consumption layer and therefore the areal rate. Consequently, under low nutrient conditions, total activity (areal sediment oxygen consumption) was relatively similar in all microcosms regardless of the presence or absence of meiofauna. This suggests that oxygen flux did not depend on the presence of meiofauna, but the latter had an impact on the vertical repartition of oxygen consumption, with a significant increase at the top surface. Similar roles of meiofauna in the oxygen depth distribution and consumption were also observed in deep-sea sediments (Veit-Kohler et al., 2011) in response to the deposition of particulate organic matter after a phytoplankton bloom, with an increase in oxygen consumption volumetric rates due to an increase of meiofauna density at the sediment surface together with a decrease in oxygen penetration.

4.3. Impact of PAH on meiofauna and bacteria

After 30 days of incubation, degradation of PAHs was very low in the contaminated microcosms irrespective of the presence or absence of meiofauna. Therefore, meiofauna did not significantly enhance PAH degradation irrespective of the molecule considered. This is in contrast to Näslund et al. (2010) who found that high meiofauna abundance ($832 \pm 94 \text{ Ind. } 10^3 \text{ m}^{-2}$), representing ten times more than the density observed in the present study, inhibited the degradation of naphthalene, presumably through grazing on PAH-degrading bacteria. Other studies have also pointed towards the important role of meiofauna in organic matter degradation by maintaining the bacterial community in an active growth phase (Moens et al., 2005). This will increase the bacterial demand for nutrients, and probably speeds up the organic matter decomposition rates (Moens et al., 2005; Nascimento et al., 2012). This suggests that PAH degradation was nutrient limited in the sediment, a limitation that was alleviated when extra nutrients were supplied as in the bioremediation treatments, resulting in the complete biodegradation of the three PAH molecules. Total biomass of meiofauna strongly decreased in contaminated microcosms, with a high reduction in the abundance of nematodes and a complete disappearance of polychaetes and copepods indicating strong toxic effects of the PAH cocktail. Similar toxic effects were observed with a single PAH molecule (10-50 ppm pyrene) that provoked significant decreases in the abundance of nematodes, copepods, and the juveniles of polychaetes and oligochaetes, as well as the grazing rates (Petersen et al., 2009; Sundback et al., 2010). Nevertheless, in our work, the decrease in meiofauna abundance, due to PAHs toxicity, was not accompanied by changes in bacterial abundance, suggesting the presence of PAH tolerant populations in the non-contaminated

sediment (analysis of the sediment did not reveal any significant PAH contamination). Bacterial community structure changes as response to PAH addition have been often observed using a single molecule, e.g. 50 ppm of pyrene (Hjorth et al., 2007), 200 ppm of phenanthrene (Muckian et al., 2009) or a complex mixture of PAH (20 ppm each for phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene) (Zhou et al., 2009). Nevertheless, contamination with high PAH concentration simulating an oil spill can also provoke minor or no significant changes of the bacterial community structure (Paisse et al., 2010), suggesting the presence of PAH tolerant bacteria in the studied sediment. Indeed, in our study PAH addition led both to the appearance and the disappearance of specific bacteria (TRFs); which finally resulted in similar cell densities relative to the control. PAH contamination might have decreased competition for resources and space, allowing thus growth of less competitive PAH tolerant bacteria. Nevertheless, these changes in the bacterial community structure upon PAH addition were minor as revealed by the correspondence analysis which showed strong similarity between PAH and C microcosms. Degradation of PAH might result to the production of toxic compounds. Unfortunately, PAH metabolites were not measured at the end of incubation, nevertheless, the observed patterns clearly suggest that the toxic effects of the three PAH cocktail were removed after 30 days of incubation in bioremediation microcosms. Previous works have shown that the dead-end metabolites, obtained after biodegradation, of the three PAH used in this study were highly less toxic than the parent compound (Sepic et al., 2003; Pagnout et al., 2006).

Larger differences in the bacterial community structure were observed between microcosms with or without meiofauna, irrespective of the presence of PAH. This clearly shows that the top-down biotic factor was apparently more important in shaping microbial composition than the abiotic factors. Similarly, an important role of the polychaetes *Nereis diversicolor* in shaping microbial composition was observed in oil-contaminated sediments concomitant with an increase in oil biodegradation due to bioturbation (Cuny et al., 2007). Interestingly, in the present study, PAH spiking had no significant impact on oxygen consumption relative to the T microcosms; areal rates were not significantly different (Fig. 5), despite the strong reduction in meiofaunal abundance. Since, bacterial density remained unaffected by PAH contamination, this would suggest that in this sediment, oxygen consumption was mainly due to bacterial activity whereas meiofauna played a minor role.

4.4. Impact of bioremediation treatments on meiofauna and bacteria

In the present study, the biostimulation treatment resulted in high percentage degradation of Phe and Fl (95% and 78%, respectively) and to a lesser extent Pyr (63%) which is in agreement with the study of Yu et al. (2005) that showed biostimulation with the addition of mineral salt medium can efficiently biodegrade PAH with up to 97% degradation for fluorene, phenanthrene and pyrene. Nevertheless, the combination of biostimulation and bioaugmentation increased Pyr biodegradation whereas no significant increase was observed for Phe and Fl. Efficiency of PAH biodegradation by bioaugmentation is often lower than with biostimulation (e.g. Perelo, 2010) and combination of both techniques doesn't always result in an enhancement of biodegradation (Goni-Urriza et al., in press), presumably because of the competition for nutrients and resources between indigenous bacteria and allochthonous bacteria (Yu et al., 2005). As a consequence, the toxic effects of PAHs on meiofauna and bacteria observed in PAH microcosms were removed. Indeed, bacterial and meiofauna abundances strongly increased in both bioremediation treatments, with significantly higher densities than those observed in C or PAH microcosms. Addition of nutrients favored growth of hydrocarbon-degrading bacteria that were probably nutrient limited in PAH microcosms since little PAH biodegradation was observed. Therefore, bacteria and meiofauna in bioremediation microcosms benefit from both the decrease in PAHs toxicity and the nutrient addition that alleviated nutrient limitation. Despite the increase of bacteria and meiofauna density, sediment oxygen consumption, measured at the end of incubation, was lower in PAH+BS and PAH+BS+BA microcosms relative to the control. The differences observed were not explained by differences in organic carbon concentration as TOC concentrations were similar in all microcosms (Table 1). Oxygen profiles showed that diffusion was the main process governing oxygen distribution and that respiration was low, allowing a deep oxygen penetration up to 6 mm depth whereas oxygen penetrated to only 2 mm depth in the C microcosms. This suggests that the strong oxygen demand observed in T microcosms was used to degrade the remaining organic matter that was still present after 30 days of incubation, suggesting a low lability of the latter. Addition of nutrients strongly enhanced bacterial and meiofauna biomass favoring so biodegradation of recalcitrant organic matter by the so-called "priming effect" that is defined as an acceleration of OM mineralization through an input of a limiting factor (organic or mineral fertilizers) for microbial biomass (Kuzyakov et al., 2000). The absence of detectable respiration in the top 5 mm as indicated by the oxygen profiles, suggests the removal of this recalcitrant organic matter that was probably biodegraded through the addition of excess nutrients. The changes in densities were concomitant with a

strong modification of the bacterial community composition. Interestingly, the inoculation of the hydrocarbon-degrading bacterium (*Bacillus megaterium*) did not result in a shift in bacterial community structure, since microbial composition was roughly similar in both PAH+BS and PAH+BS+BA microcosms. It is worth noticing that, in both bioremediation treatments, the structural role of meiofauna as shaping factor for microbial structure was no longer observed, as none of the treatments were clearly separated in the correspondence analysis (Fig. 6 lower panel). This suggests that addition of nutrients was the main structural factors on bacterial community diversity in comparison to meiofauna that had little effect.

5. Conclusion

This study has shown that spiking with a PAH cocktail provoked little effects on bacterial community structure in non-contaminated sediments suggesting a relative resistance of the latter. In contrast, meiofauna played an important role in shaping bacterial diversity. The structural role of meiofauna on bacteria community structure was still evident even under PAH contamination despite the toxic effects on meiofauna. However, this structural role of meiofauna disappeared when nutrients were added to the sediment resulting in an almost complete removal of PAHs. Overall, these results suggest that under nutrient limitation, biological top down control by meiofauna was more effective in shaping bacterial community structure than was the selective pressure exerted by toxic pollutants.

6. Acknowledgments

This work was supported by a funding of the CMCU program (PHC-UTIQUE, n° 09G 0189), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and the Faculté des Sciences de Bizerte (FSB). Dr. Emma Rochelle-Newall is gratefully acknowledged as native English speaker for her helpful criticisms on an early version of the manuscript and for English improvements.

7. References

- Alexander, M., 1999. Biodegradation and bioremediation. Academic Press, London.
- Ben Said, O., Goñi, M.S., El Bour, M., Aissa, P., Duran, R., 2010. Bacterial Community Structure of Sediments of the Bizerte Lagoon (Tunisia), a Southern Mediterranean Coastal Anthropized Lagoon. *Microb. Ecol.* 59, 445-456.
- Ben Said, O., Goñi, M.S., El Bour, M., Dellali, M., Aissa, P., Duran, R., 2008. Characterization of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments, Tunisia. *J. Appl. Microbiol.* 104, 987-997.

- Berg, P., Risgaard-Petersen, N., Rysgaard, S., 1998. Interpretation of measured concentration profiles in sediment pore water. *Limnol. Oceanogr.* 43, 1500-1510.
- Beyrem, H., Louati, H., Essid, N., Aissa, P., Mahmoudi, E., 2010. Effects of two lubricant oils on marine nematode assemblages in a laboratory microcosm experiment. *Mar. Environ. Res.* 69, 248-253.
- Boufahja, F., Beyrem, H., Essid, N., Amorri, J., Mahmoudi, E., Aissa, P., 2007. Morphometry, energetics and diversity of free-living nematodes from coasts of Bizerte lagoon (Tunisia): an ecological meaning. *Cahiers De Biologie Marine* 48, 121-137.
- Cheung, P.Y., Kinkle, B.K., 2001. Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2222-2229.
- Coull, B.C., 1999. Role of meiofauna in estuarine soft-bottom habitats. *Aust. J. Ecol.* 24, 327-343.
- Cuny, P., Miralles, G., Cornet-Barthaux, V., Acquaviva, M., Stora, G., Grossi, V., Gilbert, F., 2007. Influence of bioturbation by the polychaete *Nereis diversicolor* on the structure of bacterial communities in oil contaminated coastal sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 452-459.
- Danovaro, R., Pusceddu, A., Mirto, S., Fabiano, M., 1999. Meiofaunal assemblages associated with scallop beds (*Adamussium colbecki*) in the coastal sediments of Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *Antarct. Sci.* 11, 415-418.
- De Mesel, I., Derycke, S., Moens, T., Van der Gucht, K., Vincx, M., Swings, J., 2004. Top-down impact of bacterivorous nematodes on the bacterial community structure: a microcosm study. *Environ. Microbiol.* 6, 733-744.
- Duhamel, S., Jacquet, S., 2006. Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *J. Microbiol. Methods* 64, 316-332.
- First, M.R., Hollibaugh, J.T., 2010. Environmental factors shaping microbial community structure in salt marsh sediments. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 399, 15-26.
- Garcia, H.E., Gordon, L.I., 1992. Oxygen solubility in seawater - better fitting equations. *Limnol. Oceanogr.* 37, 1307-1312.
- Goni-Urriza, M., Cravo-Laureau, C., Duran, R., in press. Microbial Bioremediation of Aquatic Environments. in: Férard, J.F., Blaise, C. (Eds.). *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Goñi, M.S., Cravo-Laureau, C., Duran, R., 2013. Microbial bioremediation of aquatic environments. in: Blaise, C., Férard, J. (Eds.). *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Springer, New York, p. in press.
- Guo, Y., Somerfield, P.J., Warwick, R.M., Zhang, Z., 2001. Large-scale patterns in the community structure and biodiversity of freeliving nematodes in the Bohai Sea, China. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 81, 755-763.
- Gyedu-Ababio, T.K., Baird, D., 2006. Response of meiofauna and nematode communities to increased levels of contaminants in a laboratory microcosm experiment. *Ecotox. Environ. Safe.* 63, 443-450.

- Hack, L.A., Tremblay, L.A., Wratten, S.D., Lister, A., Keesing, V., 2007. Benthic meiofauna community composition at polluted and non-polluted sites in New Zealand intertidal environments. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1801-1812.
- Hjorth, M., Vester, J., Henriksen, P., Forbes, V., Dahllof, I., 2007. Functional and structural responses of marine plankton food web to pyrene contamination. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 338, 21-31.
- 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. *Biores. Technol.* 99, 2637-2643.
- Jørgensen, B.B., Revsbech, N.P., 1985. Diffusive Boundary-Layers and the Oxygen-Uptake of Sediments and Detritus. *Limnol. Oceanogr.* 30, 111-122.
- Kennedy, A.D., Jacoby, C.A., 1997. Biological indicators of marine environmental health : meiofauna - a neglected benthic component. *Environ. Monit. Ass.* 54, 47-68.
- Kuzyakov, Y., Friedel, J.K., Stahr, K., 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1485-1498.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. *Numerical Ecology*. Elsevier, Amsterdam.
- Lindgren, J.F., Hasselov, I.M., Dahllof, I., 2012. Meiofaunal and bacterial community response to diesel additions in a microcosm study. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 595-601.
- Louati, H., Ben Said, O., Got, P., Soltani, A., Mahmoudi, E., Cravo-Laureau, C., Duran, R., Aissa, P., Pringault, O., 2012. Microbial community responses to bioremediation treatments for the mitigation of low-dose anthracene in marine coastal sediments of Bizerte lagoon (Tunisia). *Environ. Sc. Poll. Res.* DOI 10.1007/s11356-012-0860-x.
- Mahmoudi, E., Essid, N., Beyrem, H., Hedfi, A., Boufahja, F., Vitiello, P., Aissa, P., 2005. Effects of hydrocarbon contamination on a free living marine nematode community: Results from microcosm experiments. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1197-1204.
- Mahmoudi, E., Essid, N., Beyrem, H., Hedfi, A., Boufahja, F., Vitiello, P., Aissa, P., 2007. Individual and combined effects of lead and zinc on a free-living marine nematode community: Results from microcosm experiments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 343, 217-226.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., Vaulot, D., 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 186-193.
- Moens, T., dos Santos, G.A.P., Thompson, F., Swings, J., Fonseca-Genevois, V., Vincx, M., De Mesel, I., 2005. Do nematode mucus secretions affect bacterial growth? *Aquat. Microb. Ecol.* 40, 77-83.
- Montagna, P.A., Blanchard, G.F., Dinert, A., 1995. Effect of Production and Biomass of Intertidal Microphytobenthos on Meiofaunal Grazing Rates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 185, 149-165.
- Muckian, L.M., Grant, R.J., Clipson, N.J.W., Doyle, E.M., 2009. Bacterial community dynamics during bioremediation of phenanthrene- and fluoranthene-amended soil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 63, 52-56.

- Nascimento, F.J.A., Naslund, J., Elmgren, R., 2012. Meiofauna enhances organic matter mineralization in soft sediment ecosystems. *Limnol. Oceanogr.* 57, 338-346.
- Naslund, J., Nascimento, F.J.A., Gunnarsson, J.S., 2010. Meiofauna reduces bacterial mineralization of naphthalene in marine sediment. *Isme J.* 4, 1421-1430.
- Pagnout, C., Rast, C., Veber, A.M., Poupin, P., Ferard, J.F., 2006. Ecotoxicological assessment of PAHs and their dead-end metabolites after degradation by *Mycobacterium* sp strain SNP11. *Ecotox. Environ. Safe.* 65, 151-158.
- Paisse, S., Goni-Urriza, M., Coulon, F., Duran, R., 2010. How a Bacterial Community Originating from a Contaminated Coastal Sediment Responds to an Oil Input. *Microb. Ecol.* 60, 394-405.
- Perelo, L.W., 2010. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J. Hazard. Mater.* 177, 81-89.
- Petersen, D.G., Sundback, K., Larson, F., Dahllof, I., 2009. Pyrene toxicity is affected by the nutrient status of a marine sediment community: Implications for risk assessment. *Aquat. Toxicol.* 95, 37-43.
- Pringault, O., Duran, R., Jacquet, S., Torreton, J.P., 2008. Temporal variations of microbial activity and diversity in marine tropical sediments (New Caledonia lagoon). *Microb. Ecol.* 55, 247-258.
- Raghukumar, C., Bharathi, P.A.L., Ansari, Z.A., Nair, S., Ingole, B., Sheelu, G., Mohandass, C., Nath, B.N., Rodrigues, N., 2001. Bacterial standing stock, meiofauna and sediment-nutrient characteristics: indicators of benthic disturbance in the Central Indian Basin. *Deep-Sea Res. Part II-Top. Stud. Oceanogr.* 48, 3381-3399.
- Revsbech, N.P., 2005. Analysis of microbial communities with electrochemical microsensors and microscale biosensors. *Environ. Microbiol.* Elsevier Academic Press Inc, San Diego, pp. 147-166.
- Rysgaard, S., Christensen, P.B., Sorensen, M.V., Funch, P., Berg, P., 2000. Marine meiofauna, carbon and nitrogen mineralization in sandy and soft sediments of Disko Bay, West Greenland. *Aquat. Microb. Ecol.* 21, 59-71.
- Samanta, S.K., Singh, O.V., Jain, R.K., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20, 243-248.
- Sepic, E., Bricelj, M., Leskovsek, H., 2003. Toxicity of fluoranthene and its biodegradation metabolites to aquatic organisms. *Chemosphere* 52, 1125-1133.
- Sundback, K., Alsterberg, C., Larson, F., 2010. Effects of multiple stressors on marine shallow-water sediments: Response of microalgae and meiofauna to nutrient-toxicant exposure. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 388, 39-50.
- USEPA, 2007. United States Environmental Protection Agency: Test Methods for Evaluation of Solid Waste, SW-846, Method 3550C, Ultrasonic Extraction. . in: 6, R. (Ed.).
- Van Gaeve, S., Moodley, L., Pasotti, F., Houtekamer, M., Middelburg, J.J., Danovaro, R., Vanreusel, A., 2009. Trophic specialisation of metazoan meiofauna at the HAYENKON Mosby Mud Volcano: fatty acid biomarker isotope evidence. *Mar. Biol.* 156, 1289-1296.

- Veit-Kohler, G., Guilini, K., Peeken, I., Sachs, O., Sauter, E.J., Wurzburg, L., 2011. Antarctic deep-sea meiofauna and bacteria react to the deposition of particulate organic matter after a phytoplankton bloom. *Deep-Sea Res. Part II-Top. Stud. Oceanogr.* 58, 1983-1995.
- Wieser, W., 1960. Benthic studies in Buzzards Bay. II. The meiofauna. *Limnol. Oceanogr.* 5, 121-137.
- Yu, K.S.H., Wong, A.H.Y., Yau, K.W.Y., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 1071-1077.
- Yuan, S.Y., Wei, S.H., Chang, B.V., 2000. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by a mixed culture. *Chemosphere* 41, 1463-1468.
- Zaghden, H., Kallel, M., Louati, A., Elleuch, B., Oudot, J., Saliot, A., 2005. Hydrocarbons in surface sediments from the Sfax coastal zone, (Tunisia) Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1287-1294.
- Zhou, H.W., Wong, A.H.Y., Yu, R.M.K., Park, Y.D., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2009. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Structural Shift of Bacterial Communities in Mangrove Sediment. *Microb. Ecol.* 58, 153-160.

III. PUBLICATION 6:

**RESPONSES OF A FREE-LIVING MARINE NEMATODE COMMUNITY TO
BIOREMEDIATION OF A PAH MIXTURE IN BIZERTE LAGOON**

Hela Louati^{a, c}, Olfa Ben Said^{a, b}, Amel Soltani^{a, b}, Cristiana Cravo-Laureau^b, Robert Duran^b,
Patricia Aissa^a, Ezzeddine Mahmoudi^a & Olivier Pringault^{a, c}

To be submitted to: **MEDITERRANEAN MARINE SCIENCE**

^a Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement, Faculté des Sciences de Bizerte, 7021, Zarzouna, Tunisie.

^b Equipe Environnement et Microbiologie – UMR CNRS IPREM 5254- IBEAS- Université de Pau et des Pays de l'Adour - France.

^c Laboratoire Ecosystèmes Marins Côtiers, UMR 5119 CNRS-UM2-IFREMER- IRD- ECOSYM, Université Montpellier 2, France.

Abstract

The objective of this study was to test the hypotheses that (1) free-living marine nematodes respond in a differential way to a mixture of PAHs (phenanthrene, fluoranthene and pyrene) and that (2) the bioremediation can enhance the degradation of PAH and can decrease the effect of PAH on free-living nematodes. Nematofauna from Bizerte lagoon (Tunisia) were subjected for 30 days to high dose (100ppm) of PAH mixture using a microcosm approach. Results from univariate and multivariate analysis generally support our initial hypothesis that nematode assemblages exhibit various changes when exposed to PAH contamination; the high dose of mixture PAH caused severe specific changes in assemblage structure with strong reduction of diversity. For contaminated microcosms, *Spirinia parasitifera* was the best positive indicative species and appeared to be an “opportunistic” species to PAH contamination. *Oncholaimus campyloceroides*, *Neochromadora peocilosoma* and *Paramonohystera pilosa* were significantly affected by PAH contamination but, they were not eliminated. Biostimulation with addition of mineral salt medium and combination of biostimulation and bioaugmentation with inoculation of "*Bacillus megaterium*" strongly enhanced degradation all three PAHs, pyrene was more difficult to degrade than fluoranthene and phenanthrene. Bioremediation resulted in significant stimulation of nematode growth with abundance twice as much as observed in control microcosms. Nevertheless, both treatment methods provoked weak impact on the community structure relative to the control microcosms with the appearance of distinct species. The largest abundances in the bioremediation treatments were observed for *Oncholaimus campyloceroides*, *Anticoma acuminata* and *Ptycholaimellus ponticus*.

1. Introduction

Many aquatic environments are contaminated with high concentrations of anthropogenically introduced polycyclic aromatic hydrocarbons (Louati et al. 2011; Yu et al. 2005). Elevated concentrations of PAHs have been observed in the Bizerte lagoon due to anthropogenic inputs (Trabelsi and Driss, 2005). In the past decades, a variety of PAH-degrading bacteria have been isolated from Bizerte lagoon sediments (Ben said et al. 2008). Bacterial degradation is believed to be one of the major processes to clean up PAH-contaminated sediments (Hughes et al. 1997). Therefore, bioremediation has been considered as an attractive technology to clean up the marine environment contaminated by PAHs (Isaac et al. 2013). The most abundant of PAH compounds in the Bizerte lagoon are phenanthrene (Phn), fluoranthene (Fl) and pyrene (Pyr) (Louiz et al. 2008; Mzoughi et al. 2002). Phenanthrene, a simple PAH with three-fused rings in an angular fashion, was chosen as the model compound since it exhibits intermediate toxicity, hydrophobicity, and environmental persistence (Stringer et al. 2012). Fluoranthene is most ubiquitous and abundant pyrogenic PAH while pyrene is one of the common pyrolytic PAHs (Lei et al. 2007). These two 4-ring compounds are therefore frequently chosen as the model compound for ex situ biodegradation studies of high molecular weight PAHs (Sepic et al. 2003). PAH contamination rarely consists of single compounds, but rather of mixtures of 3 or more fused aromatic rings of PAH that can affect the environment (NEFF et al. 2005; Boitsov et al. 2009). However, the effect of PAH on marine organisms was mainly studied by considering a single compound (Petersen et al. 2009; Lindgren et al. 2012). The influence of contaminant mixtures on natural communities is poorly understood. Response to addition of contaminant mixture can occur as a summation of the responses observed for each individual compound. Swartz et al. (1995) determined that the toxic influence of individual PAHs are essentially additive when animals are exposed to PAH mixtures.

PAHs may exhibit a wide range of hazardous effects to aquatic organisms including acute toxicity, developmental and reproductive toxicity, photo-induced toxicity, mutagenicity and carcinogenicity, particularly for PAH of high molecular weight (Neff, 2002). As they enter the marine environment, PAHs bind tightly to suspended particles and consequently accumulate in bottom sediments due to their low water solubility and hydrophobic properties (Soclo et al. 2000). Because of their intimate contact with sediments, their relative abundance, their ubiquity and sedentary nature, benthic

organisms appear to be good bio-indicators of the long-term environmental health of sediments contaminated by hydrophobic organic micro-pollutants as PAHs (Gewurtz et al. 2000; Leonardo et al. 2007). This is the case of the free-living nematodes (metazoans between 40 μm and 1 mm according to Vitiello and Dinert, 1979). Moreover, within meiofaunal taxa, nematodes offer a variety of possibilities for assessing changes in community structure, due to their high structural and functional diversity. Species or genus composition often reacts most sensitively to any disturbance (Warwick and Clarke, 1991). The small size and short generation times of these worms and the ease with which they can be maintained in laboratory conditions greatly encourages their use in biomonitoring experimental studies (Guo et al. 2001; Mahmoudi et al. 2007; Beyrem et al. 2010; Hedfi et al. 2013). In addition, recent studies have shown (Miyasaka et al. 2005) that they can favor organic matter degradation by exerting a selective pressure on benthic bacteria, which can offer interesting perspectives in the bioremediation of contaminated sediments. Although meiobenthic nematodes have been shown to be sensitive to many classes of pollutants, including diesel, metals, lubricants and pesticides, no published work has examined the effect of a PAH mixture on these organisms.

The present study aimed to assess changes in abundance, diversity descriptors and species composition of a nematode assemblage from Bizerte lagoon in Tunisia when exposed to mixture of PAH. Biostimulation (addition of nitrogen and phosphorus fertilizer) and bioaugmentation (inoculation of a hydrocarbonoclastic bacterium, *Bacillus megaterium*) were used as bioremediation treatments.

2. Materials and methods

2.1. Sediment Sampling

Sediments with their natural meiofaunal communities were collected from the station Echaràa of the Bizerte lagoon bordering the Mediterranean Sea on Mai 2010 (Louati et al. 2012). Hand-cores of 10 cm^2 were used to a depth of 15 cm to transfer sediment into a bucket. The sampling was restricted to the first 10 cm because in most coastal ecosystems over than 90% of nematodes are found in the surface 1–2 cm (Coull and Chandler, 1992). At the prospected site (37° 13' N 9° 49' E), depth was 1.3 m and salinity was 36 PSU. Lower concentrations of NO_2^- (0.57 μM), NH_4^+ (0.35 μM), PO_4^{3-} (0.09 μM) and Chl a (0.09 $\mu\text{g l}^{-1}$) were recorded at Echaràa station. On return to the laboratory,

sediments were homogenized by gentle hand stirring with a large spatula before they were used for PAH contamination or microcosms filling. Buckets and spatula were all acid rinsed before use.

2.2. PAH sediment spiking

Sediment used for contamination was first alternately frozen (-80°C) and thawed three times to defaunate it following the recommendations of Gyedu- Ababio and Baird (2006), and then it was wet sieved to remove the larger particles ($>63\ \mu\text{m}$). A PAH contamination consisted of a mixture of fluoranthene (Fl), pyrene (Pyr) and phenanthrene (Phe). Stocks solutions of high purity (Sigma-Aldrich Chemical) fluoranthene (Fl), pyrene (Pyr) and phenanthrene (Phe) was dissolved in distilled acetone. Next, 3 ml of each PAH solution was added into the sediment slurry and shaken overnight to let the PAH adsorbed onto the sediments. Final concentration of each PAH in sediment was $45\ \mu\text{g g}^{-1}$, $30\ \mu\text{g g}^{-1}$ and $25\ \mu\text{g g}^{-1}$ (dw) for fluoranthene, pyrene and phenanthrene, respectively, which represent the concentration measured in the most contaminated sediment of the Bizerte lagoon for these three PAHs.

2.3. Experimental design

The microcosms in this experiment were based on the original design of Austen et al. (1994) and Schratzberger and Warwick (1998) and successfully used by Mahmoudi et al. (2007), Beyrem et al. (2010), Louati et al. (2012) and Hedfi et al. (2013). Microcosms consisted of 1,600 ml glass bottles. Each microcosm bottle was stopped with a rubber bung with two holes, aerated via an air stone diffuser and finally run as closed system.

✓ Control (**T**): consisted of uncontaminated sediment containing 200 g of natural sediment and 200 g defaunated sediment.

✓ Contaminated microcosms (**C**) were gently filled with 200 g (wt) of homogenized sediment (200 g of natural sediment and 200 g contaminated sediment) topped up with 1L of filtered ($1\ \mu\text{m}$) natural lagoon water at 30 PSU.

Bioremediation treatments were started one day after PAH contamination.

✓ Biostimulation treatments (**CBS**): was achieved by amending a mineral salt medium (MSM) using the protocols of Yu et al. (2005) and Jacques et al. (2008). The MSM has the following composition (mg l^{-1}): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1000; K_2HPO_4 , 10,000; K_2HPO_4 , 5000; MgSO_4

7H₂O, 200; CaCl₂ 2H₂O, 100; and trace elements made up of FeSO₄ 7H₂O, 5; MnSO₄ H₂O, 3; CuSO₄ 5H₂O, 0,015; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 7H₂O, 1; Na₂MoO₄ 2H₂O, 0, 01.

✓ Biostimulation-Bioaugmentation treatments (**CBS+BA**): was achieved by adding the bacterium *Bacillus megaterium* strain isolated from Bizerte-polluted sediments (Ben Said et al. 2008). Cells were suspended in nutrient solution and introduced into the microcosms previously amended with nutrients (mineral salt medium). The initial inoculum was 9.50×10⁸ cell ml⁻¹. After bacterium inoculation and nutrient addition, sediment was agitated for half an hour for homogenization. All microcosms were incubated in triplicates for 30 days in laboratory at room temperature (20–22°C). After 30 days, the experiments were terminated and the sediments were fixed in 4% formalin.

2.4. Processing of samples

The content of each microcosm was sieved over a 40 µm mesh sieve using filtered water. Meiofauna was sorted from sediment by resuspension-decantation methodology (Wieser, 1960). Sorted meiofauna were counted under a stereo-dissecting microscope after being stained with Rose–Bengal (0.2 g.l⁻¹), and 100 nematodes (when available) from each sample were removed for identification. Nematodes were mounted on microscope slides after the procedure by Vincx (1996) and identified to species level by using the pictorial keys by Platt and Warwick (1983, 1988).

2.5. PAH analysis

Polycyclic aromatic hydrocarbon analyses in the sediments were conducted by gas chromatography (GC). Approximately 1 g (dry weight) of the samples was extracted with 40 ml of acetone/hexane (v/v) and with 2,2,4,4,6,8,8-heptamethylnonane as internal standard, in an ultrasonic bath (15 min). The GC (GC Agilent Technologies) was equipped with a flame-ionization detector (290 °C) and a capillary column HP 5 (30 m x 320 µm x 0,25µm, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA). The injector temperature was maintained at 280°C. The carrier gas (He) was maintained at 1.7 ml/min. The oven temperature was programmed from 60°C (1 min) to 200°C (1 min) with a ramp of 15°C/min, and then to 300 °C (2 min) with a ramp of 5°C/min. The reliability of the quantitative measurements was checked by analyzing the Standard Reference Material 1941b “Organics in Marine Sediment” (NIST, Gaithersburg, Maryland, USA). Perdeuterated PAHs were obtained from LGC Standards (Molsheim, France). Calibration

curves were established from n-alkane and PAH mixtures obtained from LGC Standards (Molsheim, France).

2.6. Data Analysis

The majority of data analysis followed standard community analysis methods described by Clarke (1993) and Clarke and Warwick (2001) using the Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research (PRIMER) software package. Abundance (I), diversity (Shannon–Wiener Index H'), species number (S), species richness (Margalef's d) and evenness (Pielou's J') were calculated. One-way analysis of variance (ANOVA) was applied to test the null hypothesis that there was no significant effect of the experimental treatments on nematode assemblages. The Tukey's HSD test, adjusted for multiple comparisons, was used to test for significant differences between the treatments and control. One-way ANOVA and Tukey's HSD test were carried out with the level of significance set at $P < 0.05$.

Species abundance data were presented in k-dominance plots, in which species were ranked in decreasing order of dominance. The percentage cumulative abundance (k-dominance) was then plotted against the species rank k (Lambshead et al. 1983). For statistical analysis of nematode community structure, relative abundances of nematodes were transformed with $\arcsin(x^{0.5})$ to get a normal distribution of data (Legendre and Legendre 1998). Principal component analysis (PCA) was performed with MVSP v3.12d software (Kovach Computing Service, Anglesey Wales). Pairwise analysis of similarities (ANOSIM) was carried out to determine if there were any significant differences between nematode assemblages in different treatments. Similarity percentage (SIMPER) was used to determine the contribution of individual species towards dissimilarity between treatments and control.

3. Results

3.1. PAH degradation

After the 20 day incubation, concentration of fluoranthene (Fl), pyrene (Pyr) and phenanthrene (Phe) in contaminated microcosms (C) was maximal (41.7 ± 2.5 ; 29.3 ± 1.1 ; $21.8 \pm 2.2 \mu\text{g g}^{-1}$, respectively) (Fig. 1), representing 93, 98 and 87% of the initial concentration added, respectively. In contrast, biostimulation with nutrient supply and the combination of biostimulation with bioaugmentation enhanced degradation of

mixture PAH; concentration measured at the end of incubation were significantly ($p < 0.05$) lower than those measured in C microcosms (1.4 ± 0.3 ; 1.8 ± 0.4 ; $\mu\text{g g}^{-1}$, Fl in CBS and CBS+BA respectively). The highest value of PAH concentration ($14.67 \pm 0.4 \mu\text{g g}^{-1}$) was observed for pyrene in CBS+BA microcosms.

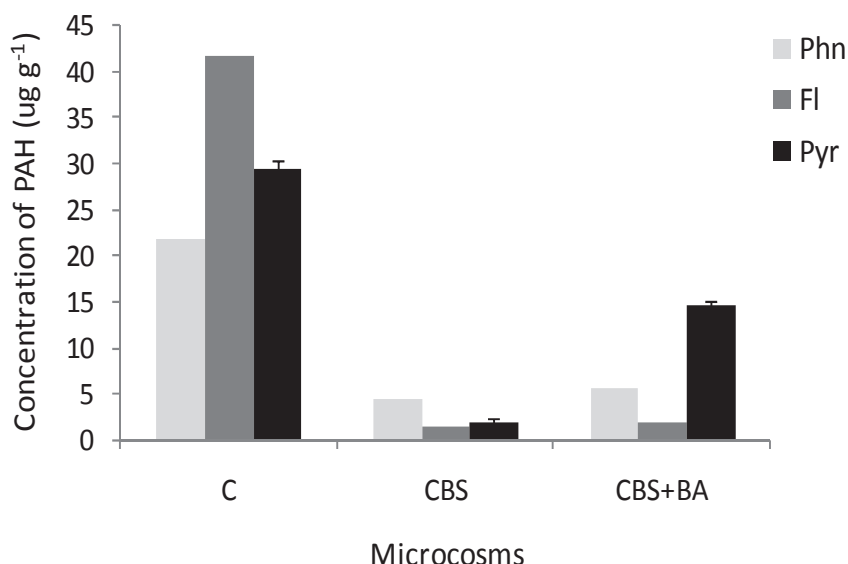


Fig.1. PAH concentration measured at the end of the 30 days of incubation in the different microcosms (average $\pm$ stdev, $n=3$)

3.2. Univariate metrics of assemblages

A total of 22 nematode species were recorded in all microcosms (Table 1). The summary of univariate indices for nematode assemblages from each microcosm (Table 2) clearly illustrates the treatment effects according to the sediment PAH contamination. The results of significance testing using the one-way ANOVA for overall differences between univariate indices indicate that PAH mixture contamination resulted in significant changes of univariate community attributes. Results from the multiple comparisons tests show significant differences between nematode assemblages from undisturbed controls and those from PAH treatments (Table 3). Total nematode abundance (I), Shannon-Weaver index (H'), species richness (d), evenness (J') and number of species (S) decreased significantly with PAH contamination. By contrast, the abundance (I) and species richness (d) were significantly higher in biostimulation and combination treatments (CBS and CBS+BA) than in the control and

contaminated microcosms. Combination treatments strongly enhanced the density of nematodes compared to T microcosms (858 ± 7.2 vs 395 ± 15.3 Ind/microcosm, for CBS+BA and T microcosms, respectively) (Fig. 2). Planned comparisons using Tukey's HSD test showed no difference between number of species (S) in T and bioremediation microcosms (CBS; CBS+BA). When the nutrients and/or bacteria were added to contaminated microcosms, no discernible effect was observed.

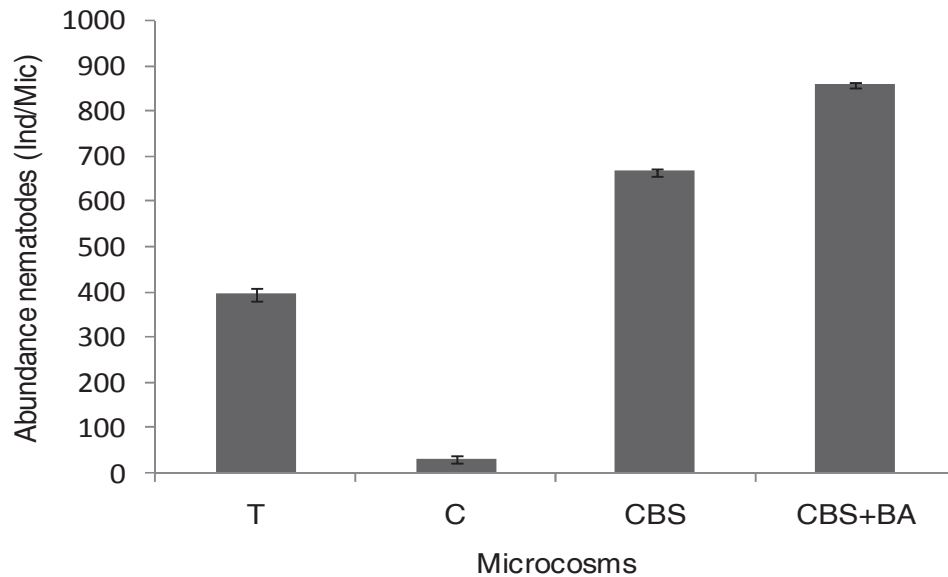


Fig.2. Abundance of nematodes (average $\pm$ stdev, $n=3$) after 30 days of incubation. (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, CBS: biostimulation, CBS+BA: biostimulation and bioaugmentation).

Table 1: Relative abundance ($\pm$ SD) and SIMPER analysis (cumulative contribution $\approx$ 90%) for nematode species identified in microcosms (T: uncontaminated, C: contaminated, BS: biostimulation, BA: bioaugmentation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation). Rel. Ab. = relative abundance; Av. Diss. = average species dissimilarity; Contrib. = contribution of species to dissimilarity between control and treatments. Values of relative abundance are means of three replicates per treatment. *Dominant species abundances ($>10\%$).

Species	T	C			CBS			CBS+BA		
	Rel Abon (%)	Rel Abon (%)	Aver Diss (%)	Contrib (%)	Rel Abon (%)	Aver Diss (%)	Contrib (%)	Rel Abon (%)	Aver Diss (%)	Contrib (%)
<i>Anticoma acuminata</i>	0.9 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0			0.5 $\pm$ 0.0		1.4	14 $\pm$ 1.3*	6.5	17.6
<i>Calomicrolaimus honestus</i>	0.6 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0			0.5 $\pm$ 0.0			2.6 $\pm$ 1.0	0.9	2.6
<i>Cyatholaimus prinzi</i>	0.9 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.0			0.5 $\pm$ 0.0	0.3	1.4	0.2 $\pm$ 0.0		
<i>Daptonema fallax</i>	3.4 $\pm$ 0.4	0.0 $\pm$ 0.0	1.7	2.4	1.2 $\pm$ 0.3	1	3.9	0.8 $\pm$ 0.9	1.3	3.4
<i>Maryllynna stekhoveni</i>	0.6 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0			0.5 $\pm$ 0.0			1.1 $\pm$ 0.2		
<i>Mesacanthion diplochma</i>	1.8 $\pm$ 0.3	0.0 $\pm$ 0.0			1.2 $\pm$ 0.0	0.5	1.8	2.3 $\pm$ 0.8		
<i>Metachromadora macroutera</i>	0.3 $\pm$ 0.5	3.8 $\pm$ 0.7	1.7	2.5	1.0 $\pm$ 0.0			0.0 $\pm$ 0.0		
<i>Microlaimus cyatholaimoides</i>	0.6 $\pm$ 0.2	0.0 $\pm$ 0.0			0.5 $\pm$ 0.0			0.5 $\pm$ 0.0		
<i>Monoposthia mirabilis</i>	0.9 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0			1.2 $\pm$ 0.0			0.0 $\pm$ 0.0		
<i>Neochromadora peocilosoma</i>	18 $\pm$ 0.2*	5.0 $\pm$ 0.2	6.9	9.9	9.0 $\pm$ 1.0	4.9	17.6	4.3 $\pm$ 0.4	7.3	19.3
<i>Odontophora n.sp.</i>	2.2 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.2	1.1	1.5	0.7 $\pm$ 0.1	0.8	3	2.6 $\pm$ 1.0	0.9	2.4
<i>Oncholaimus campylocercoides</i>	38 $\pm$ 3.7*	10 $\pm$ 1.6	14.3	20.6	56 $\pm$ 2.6*	8.5	30.7	42 $\pm$ 2.5*	2.2	5.8
<i>Paracomesoma dibium</i>	2.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.0	1.4	0.7 $\pm$ 0.0	0.7	2.5	0.5 $\pm$ 0.0	0.8	2.1
<i>Paramonohystera pilosa</i>	10 $\pm$ 2.3*	3.8 $\pm$ 0.2	3.2	4.6	3.5 $\pm$ 0.4	3.3	12.1	1.7 $\pm$ 0.0	4.2	11.3
<i>Prochromadorella neapolitana</i>	2.8 $\pm$ 0.3	0.0 $\pm$ 0.0	1.4	2.0	1.2 $\pm$ 0.0	0.8	3	0.5 $\pm$ 0.0	1.1	3
<i>Promonohystera tricuspidata</i>	1.2 $\pm$ 0.3	0.0 $\pm$ 0.0			0.5 $\pm$ 0.0			0.5 $\pm$ 0.0		
<i>Ptycholaimellus ponticus</i>	0.3 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0			1.5 $\pm$ 0.1	0.6	2.2	14 $\pm$ 1.8*	7	18.7
<i>Spirinia parasitifera</i>	8.8 $\pm$ 1.5	70 $\pm$ 6.7*	30.9	44.4	14 $\pm$ 4.0*	2.9	10.6	7.2 $\pm$ 2.3	1.2	3.2
<i>Synonchiella edax</i>	0.3 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0			0.5 $\pm$ 0.0			1.4 $\pm$ 0.0	1.7	1.4
<i>Sabatieria punctata</i>	0.9 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.1			0.2 $\pm$ 0.0			0.5 $\pm$ 0.0		
<i>Trefusia longicauda</i>	1.2 $\pm$ 0.0	1.3 $\pm$ 0.1			1.0 $\pm$ 0.0			0.5 $\pm$ 0.0		
<i>Viscosia sp.</i>	2.2 $\pm$ 0.6	0.0 $\pm$ 0.0	1.1	1.6	2.5 $\pm$ 0.4			1.2 $\pm$ 0.1		

Table 2: Univariate indices for nematode assemblages from each microcosm. (H' = Shannon-Weaver index, d = species richness, J' = evenness, S = number of species).

Microcosm	Shannon	Richness	Evenness	Nb Species
T	2.02 ± 0.0	3.6 ± 0.1	0.70 ± 0.0	18 ± 0.5
C	1.08 ± 0.2	1.2 ± 0.2	0.56 ± 0.0	7 ± 1.0
CBS	1.66 ± 0.0	3.8 ± 0.5	0.56 ± 0.0	18 ± 2.5
CBS+BA	1.95 ± 0.1	3.4 ± 0.5	0.69 ± 0.0	17 ± 2.6

3.3. Distributional plots

The k-dominance curves (Fig. 3) graphically illustrate a distinct picture of increasing dominance and decreasing diversity with PAH contamination. Contaminated microcosms were less diverse and had greater dominance than the control. The free living nematode communities from the bioremediation microcosms (CBS and CBS+BA) are more diverse than those treated with mixture PAH (Fig. 3).

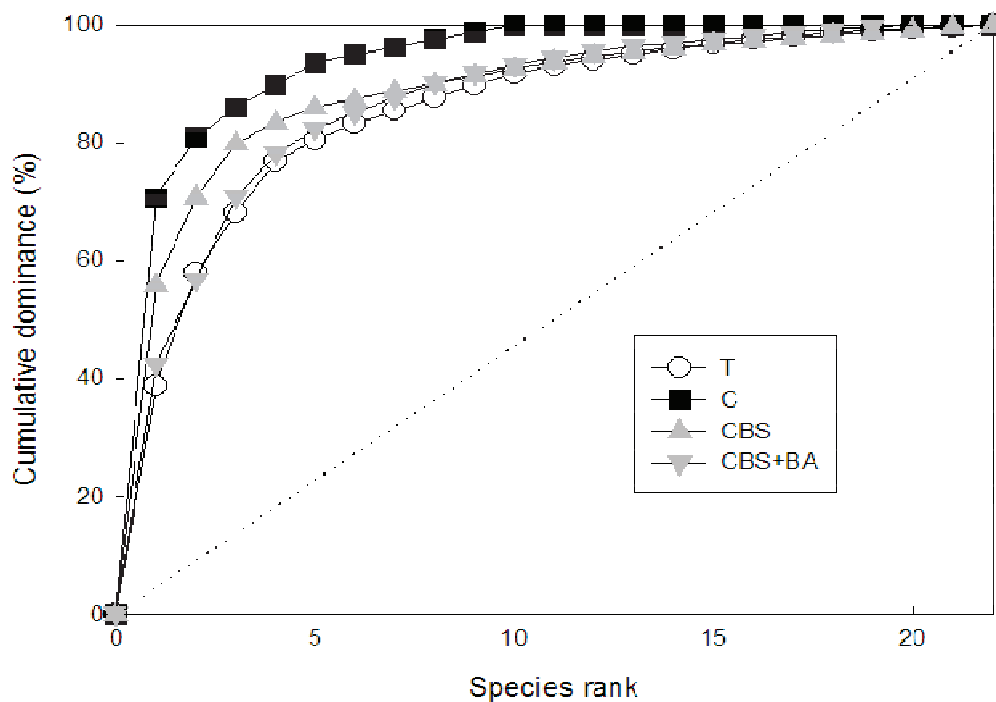


Fig. 3. K-dominance curves of nematode communities as a function of bioremediation treatment after 30 days of incubation. (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, CBS: biostimulation, CBS+BA: biostimulation and bioaugmentation). The dotted line represents an equal distribution of the 22 species observed.

Table 3: Results from multiple comparison tests for significant differences between nematode assemblages as a function of the treatment. T microcosms were considered as reference. +: increase in univariate measure; -: decrease in univariate measure; ns: no significant difference at $p < 0.05$

Microcosm	Effects of treatment on univariate indices for nematode assemblages				
T vs C	I: -	H': -	d: -	J': -	S: -
T vs CBS	I: +	H': -	d: +	J': -	S: ns
T vs CBS+BA	I: +	H': -	d: -	J': -	S: ns

3.4. Taxonomic composition and multivariate analyses

Results from the Principal Component Analysis (Fig. 4) indicated a clear effect of PAH contamination on nematode assemblages. Both axes explained more than 80% of the variance observed. Contaminated microcosms (C) are distinct from the control and bioremediation treatments. The replicates of biostimulation treatments (CBS2) are grouped with the control T. Similarly, combination of biostimulation and bioaugmentation (CBS+BA) are placed to the right-hand side of the controls. ANOSIM results showed a significant impact of phenanthrene, fluoranthene and pyrene contamination on nematode assemblages. All treatments were significantly different ($p < 0.05$) from controls and a significant difference between all treatments was also detected except T and CBS microcosms. SIMPER results reveal the lowest average similarity was recorded between C and CBS microcosms (26.6 %) (Table 4). The highest value of average similarity was observed between T and CBS microcosms (72.3%).

Table 4: Average (standard deviation) similarity (%) between microcosms.

	T		C		CBS		CBS+BA	
T	86.0	(1.6)						
C	30.5	(5.5)	87.2	(5.6)				
CBS	72.3	(3.8)	35.8	(6.1)	89.3	(1.4)		
CBS+BA	66.2	(3.8)	26.6	(3.8)	70.0	(3.8)	87.3	(2.5)

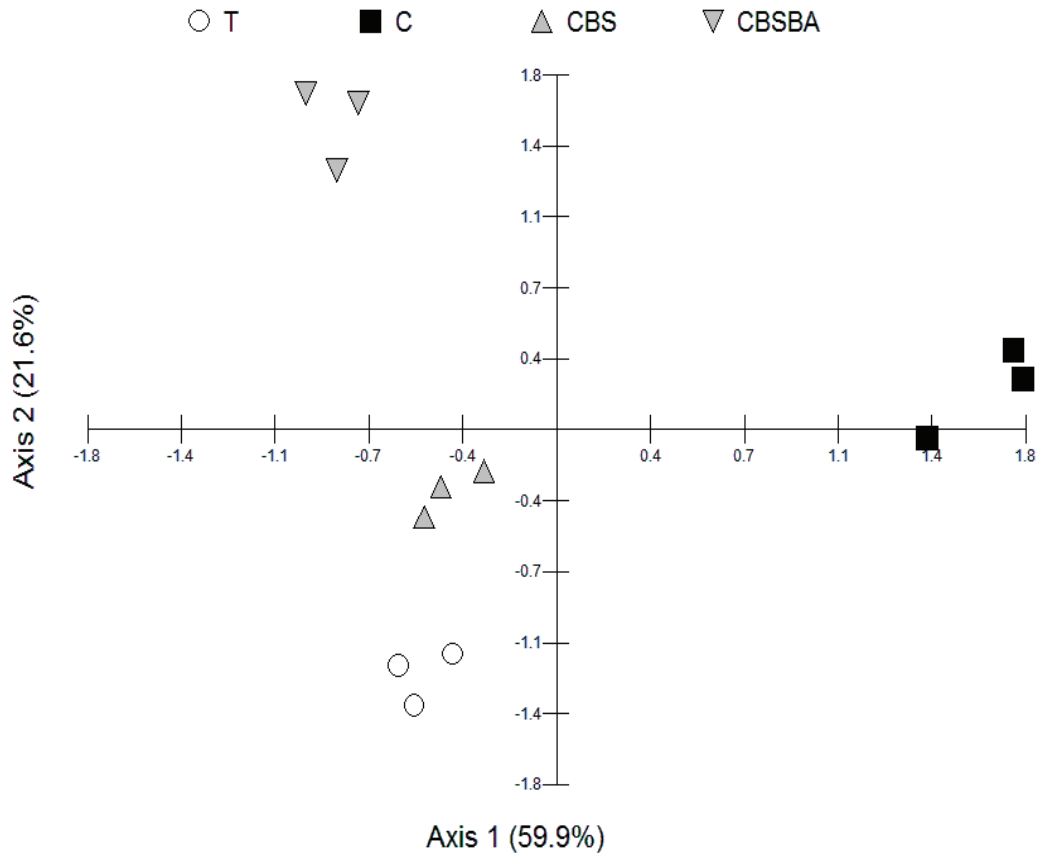


Fig. 4. Impact of mixture PAH and bioremediation on nematode community structure as a function of microcosm treatment. Principal component analysis (PCA) of the nematode communities as a function of PAH and bioremediation treatment after 30 days of incubation (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, CBS: biostimulation, CBS+BA: biostimulation and bioaugmentation).

All microcosms except C microcosms were dominated by *Oncholaimus campylocercoides*. In all microcosms except C microcosms, the most widespread nematode specie was *Oncholaimus campylocercoides*. Further in the control microcosm *Neochromadora peocilosoma* (18%) and *Paramonohystera pilosa* (10%) were the two next most frequent species besides *Oncholaimus campylocercoides* (38%). Significant differences between control and contaminated microcosms mainly resulted from changes in the abundances of the most dominant species (Table 1). Decreasing abundance of *Oncholaimus campylocercoides*, *Paramonohystera pilosa*, *Neochromadora peocilosoma* and increasing number of *Spirinia parasitifera* were responsible for the significant difference between T and C microcosms. *Spirinia*

parasitifera reached up 70% of relative abundance in C microcosms. The use of bioremediation treatment resulted in a decrease of the effects of PAH contamination on free-living nematodes. Use of bioremediation treatment resulted in a decrease of the effects of PAH contamination on free-living nematodes. Only biostimulation (CBS) treatments resulted to a similar community structure observed in T microcosms. Differences were observed for the other treatments. Significant differences between control and bioremediation microcosms (CBS+BA) mainly resulted from appearance of specific species. *Ptycholaimellus ponticus* which showed a strong increase from 0.3 % (T) to 14 % (CBS+BA). Similarly, increase in *Anticoma acuminata* (0.9% to 14%) was responsible for significant differences between control and combination of biostimulation and bioaugmentation (CBS+BA).

4. Discussion

Until now the effects of PAH contamination on nematodes were totally unknown and only Moreno et al. (2009) had determined the response of nematodes to metal, PAHs and organic enrichment in tourist marinas of the Mediterranean Sea. Therefore, experimental studies were required, especially those to evaluate the impact of pollutant on species composition of free-living nematodes. The first objective of this research was to evaluate the impact of mixture PAH on densities and diversity of meiobenthic nematodes simulating PAH exposure observed in the most contaminated area of Bizerte lagoon. Overall the results of the present study clearly indicated significant effects of PAH contamination on nematofauna. The univariate descriptors of diversity in the contaminated microcosms were significantly reduced in comparison with controls (Tukey's HSD test, $P < 0.05$). A similar result was clearly established by using the k-dominance curves. The multivariate species-dependent MDS was sensitive in discriminating the communities (stress = 0.01), suggesting significant differences between the control and contaminated microcosms, and this was confirmed by ANOSIM analysis. In the MDS plot for the nematode assemblages, all contaminated replicates were clearly separated from all the other microcosms (Fig. 3) indicating a significant change in community composition in sediment contaminated with mixture PAH. In a microcosm study of the effects of metals and diesel mixture on a benthic community, Millward et al. (2004) analysed meiofauna assemblages in microcosm experimental bioassays and found that nematodes were not sensitive to these

pollutants. However using a microcosm approach, Beyrem et al. (2007) demonstrated significant differences between nematode assemblages from uncontaminated sediments (control) and those from sediment contaminated with a cadmium–diesel mixture. Many factors can contribute to these seemingly conflicting results. Bioavailability and hence toxicity of contaminants depends on their partitioning between the sediment, pore water and overlying water (Austen and McEvoy, 1997). Organic contaminants, such as PAHs, are taken up by benthic organisms by direct adsorption of freely dissolved chemicals from the overlying and pore water, and also by direct contact and ingestion of sediment particles (Landrum et al. 1992).

The addition of PAH mixture caused a strong decrease of all quantitative and qualitative community indices and also significant changes in the community structure. It was clear from Table 3 that *Spirinia parasitifera* has a high tolerance for mixture PAH, which showed an increase in abundance from $8 \pm 1.5 \%$ (T) to $70 \pm 6.7\%$ (C) and appeared to be an “opportunistic” species at the high dose tested. Similarly, *Metachromadora macroutera* slightly increased in contaminated microcosms. These species benefited from the reduction in abundance of PAH sensitive species which alleviate competition for space and resources, allowing thus the dominance of opportunistic species that naturally observed in low abundance in non contaminated sediments. By contrast, three taxa (*Daptonema fallax*, *Prochromadorella neapolitana* and *Viscosia* sp.) appear to be very sensitive as they are present in the control treatments but are eliminated at the PAH mixture. Dominant species in control (*Oncholaimus campylocercoides*, *Neochromadora peocilosoma* and *Paramonohystera pilosa*) decreased in contaminated microcosms. This variable response of different nematode species to the phenanthrene, fluoranthene and pyrene suggests that the development of free-living nematodes is subject to very precise control mechanisms and exposure to contaminants may vary according to species. Thus, declines in total nematode abundance were coincident with a reduction of species richness (Table.1). Phenanthrene, fluoranthene and pyrene have been shown to be toxic to a wide range of marine organisms, like copepods, mussels, microalgae and fish (Hjorth et al. 2007; Ana et al. 2007). Sediment-associated PAHs were toxic to harpacticoid copepods, causing both mortality and sublethal effects such as impaired reproduction and feeding (Lotufo and Fleeger, 1997). By increasing mortality of the most sensitive species (Beyrem and Aïssa, 2000; Carman et al. 2000, Mahmoudi et al. 2005), hydrocarbon contamination

was responsible for the decrease in nematode densities, mean individual weight and diversity. Our results demonstrated that *Spirinia parasitifera* may be considered as useful indices to biomonitor hydrocarbon pollution in marine ecosystems. For these reasons, nematodes have already been employed in biomonitoring studies and turned out to be suitable indicators for pollution- induced disturbances of benthic ecosystems (Coull and Chandler, 1992; Guo et al. 2001 ; Beyrem et al. 2010).

Our study suggest that addition of fertilizers (CBS) and combination of biostimulation and bioaugmentation (CBS+BA) can enhance degradation of the PAH mixture concentration. Indeed, nematofaunal abundances strongly increased in bioremediation treatments, with significantly higher densities than those observed C microcosms. As a consequence, the toxic effects of mixture PAH on observed in C microcosms were attenuated. Similarly, Yu et al. (2005) demonstrated that application of biostimulation showed positive influence on the rate of degradation of PAH mixture, namely fluorene, phenanthrene and pyrene in mangrove sediment. Biodegradation of PAHs is catalyzed by multicomponent enzymes from microbes. A key enzyme for attacking the aromatic ring structure of PAHs under aerobic condition is the initial dioxygenase which is substrate specific (Cerniglia, 1992; Juhasz and Naidu, 2000). Nevertheless, bioremediation treatments have also slightly impacted the structure of free-living nematodes. *Anticoma acuminata* and *Ptycholaimellus ponticus* increased in combination of biostimulation and bioaugmentation (CBS+BA) whereas *Oncholaimus campylocercoides* which increased strongly in biostimulation treatments (CBS). This is agreement with the study of Schratzberger et al. (2003), who observed that the addition of oil and fertilizer to beach sediment resulted in short-term shifts in abundance of dominant nematode and macrofauna species and the absence of other low-abundance species in the oiled sediments compared to the un-oiled controls.

5. Conclusion

The results from our study demonstrate that community responses may vary in species composition and function depending on the nature of the treatment. The mixture PAH appears to have caused significant changes in nematode assemblage composition. It has been shown in past studies that low-level addition of nutrients can be an effective clean-up strategy for treating petroleum contamination of marine environment. Similarly, the bioremediation treatments used in this study might be

suitable schemas in biorestauration perspective of contaminated sediments because its application can be conducted with relatively little impact on the nematofauna community and can stimulate the degradation of mixture PAH. Although these findings are promising, additional studies are needed to gain a better understanding of the mechanisms of resistance of the most tolerant nematode species.

6. Acknowledgments

This work was supported by a funding of the CMCU program (PHC-UTIQUE, n° 09G 0189), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and the Faculté des Sciences de Bizerte (FSB).

7. References

- Ana, D.C., Renata, G., Martin, S., Marta, F. & Maria, A.R.H. (2007). Biochemical and behavioral responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to phenanthrene. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 347, 109-122.
- Austen M. C. et McEvoy A. J., 1997. The use of offshore meiobenthic communities in laboratory microcosm experiments: response to heavy metal contamination. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 211 : 247-261.
- Austen M C. 2004. Natural nematode communities are useful tools to address ecological and applied questions. *Proceeding of the Fourth International Congress of Nematology*. Pa Leiden, E J Brill. 2: 775-791.
- Ben Said, O., Goni-Urriza, M.S., El Bour, M., Dellali, M., Aissa, P., Duran, R., 2008. Characterization of aerobic polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Bizerte lagoon sediments, Tunisia. *Journal of Applied Microbiology* 104, 987-997.
- Beyrem, H., Aissa, P., 2000. Free-living nematodes, bio-indicators of the evolution of hydrocarbon concentrations in the bay of Bizerta (Tunisia). *Cah. Biol. Mar.* 41, 329-342.
- Beyrem, H., Louati, H., Essid, N., Aissa, P., Mahmoudi, E., 2010. Effects of two lubricant oils on marine nematode assemblages in a laboratory microcosm experiment. *Mar. Environ. Res.* 69, 248-253.

- Boitsov, S., Jensen, H.K.B., Klungsoyr, J., 2009. Natural background and anthropogenic inputs of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in sediments of South-Western Barents Sea. *Marine Environmental Research* 68, 236-245.
- Clarke, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18 117-143.
- Clarke, K. R. & Warwick, R. M. (2001). Changes in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation. . PRIMER-E: Plymouth, UK.
- Coull, B.C., Chandler, G.T., 1992. Pollution and Meiofauna - Field, Laboratory, and Mesocosm Studies. *Oceanogr. Mar. Biol.* 30, 191-271.
- Gewurtz, R. Lazar, G.D. Haffner. 2000. Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon and polychlorinated dynamics in benthic invertebrates of Lake Erie, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19, pp. 2943–2950
- Guo, Y., Somerfield, P.J., M., W.R., et Zhang Z., , 2001. Large-scale patterns in the community structure and biodiversity of free living nematodes in the Bohai Sea, China. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 81 755-763.
- Gyedu-Ababio, T. K. & Baird, D. 2006. Response of meiofauna and nematode communities to increased levels of contaminants in a laboratory microcosm experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3), 443-450.
- Hedfi, A., Boufahja, F., Ben Ali, M., Aïssa, P., Mahmoudi, E. & Beyrem, H. 2013. Do trace metals (chromium, copper, and nickel) influence toxicity of diesel fuel for free-living marine nematodes?. *Environ Sci Pollut Res.* DOI 10.1007/s11356-012-1305-2
- Hjorth, M. Vester, J. Henriksen, P. Forbes, V. Dahllöf, I.. Functional and structural responses of marine plankton food web to pyrene contamination. *Marine Ecology Progress Series*, 338 (2007), pp. 21–31
- Hughes, J.B., Beckles, D.M., Chandra, S.D., Ward, C.H., 1997. Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH-contaminated sediments. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 18, 152-160.
- Isaac, P., Sanchez, L.A., Bourguignon, N.e.a., 2013. Indigenous PAH-degrading bacteria from oil-polluted sediments in Caleta Cordova, Patagonia Argentina. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 82, 207-214.

- Jacques RJS, Okeke BC, Bento FM, Teixeira AS, Peralba MCR, Camargo FAO.2008. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Biores Technol* 99: 2637-2643.
- Lambshead P J D, Platt H M, Shaw K M. 1983. The Detection of Differences among Assemblages of Marine Benthic Species Based on an Assessment of Dominance and Diversity. *J. Nat. Hist.* 17(6): 859-874.
- Lei, A.P., Hu, Z.-L., Wong, Y.-S.e.a., 2007. Removal of fluoranthene and pyrene by different microalgal species. *Bioresour. Technol.* 98, 273-280.
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. *Numerical Ecology*. Elsevier, Amsterdam.
- Lindgren, J.F., Hasselov, I.M., Dahllöf, I., 2012. Meiofaunal and bacterial community response to diesel additions in a microcosm study. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 595-601.
- Lotufo G. R. et Fleeger J. W., 1997. Effects of sediment-associated phenanthrene on survival, development and reproduction of two species of meiobenthic copepods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 151 : 91-102.
- Louati, A., Elleuch, B., Kallel, M., Saliot, A., Dagaut, J., Oudot, J., 2001. Hydrocarbon contamination of coastal sediments from the Sfax area (Tunisia), Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 445-452.
- Louati H, Ben Said O, Got P, Soltani A, Mahmoudi E, Cravo-Laureau C, Duran R, Aissa P, Pringault O. 2012. Microbial community responses to bioremediation treatments for the mitigation of low-dose anthracene in marine coastal sediments of Bizerte lagoon (Tunisia). *Environ Sci Pollut Res* DOI 10.1007/s11356-012-0860-x.
- Louiz, I., Kinani, S., Gouze, M.E., Ben-Attia, M., Menif, D., Bouchonnet, S., Porcher, J.M., Ben-Hassine, O.K., Ait-Aissa, S., 2008. Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays: Contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Science of the Total Environment* 402, 318-329.
- Mahmoudi, E., Essid, N., Beyrem, H., Hedfi, A., Boufahja, F., Vitiello, P., Aissa, P., 2005. Effects of hydrocarbon contamination on a free living marine nematode community: Results from microcosm experiments. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1197-1204.

- Mahmoudi, E., Essid, N., Beyrem, H., Hedfi, A., Boufahja, F., Vitiello, P. & Aissa, P. 2007. Individual and combined effects of lead and zinc on a free-living marine nematode community: Results from microcosm experiments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 343(2), 217-226.
- Millward R. N., Carman K. R., Fleeger J. W., Gambrell R. P. et Portier R., 2004. Mixtures of metals hydrocarbons elicit complex responses by a benthic invertebrate community. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 310 : 115-130.
- Mzoughi, N., Hellal, F., Dachraoui, M., Villeneuve, J.P., Cattini, C., de Mora, S.J., El Abed, A., 2002. Methodology of extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. Application to sediment from the Bizerte Lagoon (Tunisia). *Comptes Rendus Geoscience* 334, 893-901.
- Neff JM. 2002. Bioaccumulation in marine organisms. Effects of contaminants from oil well produced water. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier. 452 p.
- Neff JM., Scott A. S., Donald G. G. 2005. Ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: Identifying sources and ecological hazard. *Integrated Environmental Assessment and Management* 1(1), 22-33.
- Petersen, D. G., Sundback, K., Larson, F. & Dahllof, I. 2009. Pyrene toxicity is affected by the nutrient status of a marine sediment community: Implications for risk assessment. *Aquatic Toxicology*, 95(1), 37-43.
- Platt H M, Warwick R M. 1983. Free living marine nematodes. Part I. British Enoplids. *Synopses of the British Fauna* no 28. . Cambridge, Cambridge University Press.
- Platt H M, Warwick R M. 1988. Free living marine nematodes. Part II. British Chromadorids. *Synopses of the British Fauna* no 38. Leiden, E.J Brill.
- Trabelsi, S. & Driss, M. R. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons in superficial coastal sediments from Bizerte Lagoon, Tunisia. *Marine Pollution Bulletin*, 50(3), 344-348.
- Sepic, E. Bricelj, M. Leskovsek, H. 2003. Toxicity of fluoranthene and its biodegradation metabolites to aquatic organisms. *Chemosphere* 52, pp. 1125-1133.
- Soclo, H. H., Garrigues, P. & Ewald, M. (2000). Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: Case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Marine Pollution Bulletin*, 40(5), 387-396.

- Schratzberger, M. & Warwick, R. M. 1998. Effects of intensity and frequency of organic enrichment on two estuarine nematode communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 164 83 - 94.
- Stringer, T.J., Glover, C.N., Keesing, V.e.a., 2012. Development of a harpacticoid copepod bioassay: Selection of species and relative sensitivity to zinc, atrazine and phenanthrene. *Ecotoxicolog and Environmental Safety* 80, 363-371.
- Swartz, R. C., Schults, D. W., Ozretich, R. J., Lambertson, J. O., Cole, F. A., DeWitt, T. H., Redmond, M. S. and Ferraro, S.P. 1995. PAH: A model to predict the toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures in field-collected samples. *Environmental Science Technology* 14, 1977–1988.
- Vitiello, P. & Dinét, A. 1979. Définition et échantillonnage du méiobenthos. . *Rapp. Comm. int. Explr. Scient. Mer Méd.* 279-283.
- Wieser W. 1960. Benthic Studies in Buzzards Bay .2. the Meiofauna. *Limnol. Oceanogr.* 5(2): 121-137.
- Yu, K.S.H., Wong, A.H.Y., Yau, K.W.Y., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2005. Natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mangrove sediments. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 1071-1077.

IV- PRINCIPAUX RESULTATS ET DISCUSSION

D'après les résultats de la première partie consacrée aux effets d'un cocktail de trois HAPs sur la méiofaune et les bactéries benthiques, les conclusions suivantes peuvent être dégagées :

- ✓ Le mélange de HAPs a un effet avéré sur la méiofaune et les principaux taxons (nématodes, copépodes et polychètes). Par contre, cette contamination sédimentaire n'a pas eu d'impact sur la biomasse des bactéries ;
- ✓ Quel que soit le traitement considéré, bioremédiation et/ou contamination, la présence de la méiofaune n'a pas entraîné une modification significative de la biomasse des bactéries et de la respiration à l'interface eau-sédiment.
- ✓ L'impact des HAPs sur la diversité des bactéries a été moins prononcé en présence de la méiofaune ;
- ✓ Une bioremédiation très importante des HAPs avec jusqu'à 95% de dégradation pour le phénanthrène ;
- ✓ Des effets positifs de la bioremédiation sur l'abondance des bactéries et de la méiofaune ce qui entraîne une réduction de l'effet toxique des HAPs en particulier pour les organismes méiobenthiques ;
- ✓ La méiofaune a joué un rôle important dans le maintien d'une communauté microbienne relativement peu sensible aux effets des HAPs ;
- ✓ Le rôle structurant de la méiofaune vis-à-vis des communautés bactériennes a été moins prononcé lorsque des sels nutritifs étaient ajoutés (biostimulation) qui ont par ailleurs, permis une minéralisation efficace des HAPs et a également favorisé la prolifération des organismes meiobenthiques ;
- ✓ L'ajout de la souche bactérienne *Bacillus megaterium* (SFI 13; AM494452) par la technique de combinaison de la bioaugmentation à la biostimulation n'a pas entraîné un effet supplémentaire par rapport à la biostimulation.

Les résultats de la deuxième étude visant à estimer l'impact de la bioremédiation des sédiments contaminés par un cocktail de trois HAPs sur la structure spécifique des peuplements de nématodes permettent de dégager les conclusions suivantes :

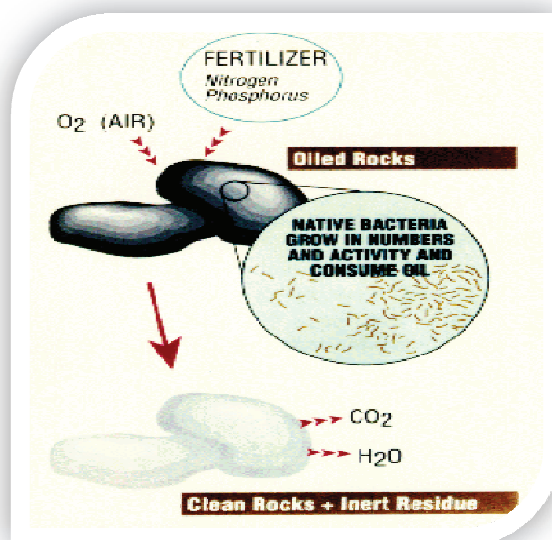
- ✓ Un effet négatif du cocktail de HAPs sur les densités des nématodes libres marins ;
- ✓ Une modification significative de la composition spécifique des communautés nématologiques avec une réduction de la diversité et de l'équitabilité ;
- ✓ Une augmentation importante et significative des densités des nématodes dans les microcosmes de bioremédiation ;
- ✓ Pas d'effet significatif de la biostimulation sur la diversité spécifique des nématodes ;
- ✓ La détermination de la composition spécifique du peuplement nématologique a montré des modifications profondes de la structure communautaire en fonction des traitements utilisés. Ainsi, l'espèce *Oncholaimus campylocercoides*, fortement dominante dans le microcosme témoin, a été affectée dans les microcosmes contaminés. Cependant, *Spirinia parasitifera* dont la densité s'accroît et ceci dans tous les microcosmes contaminés par les HAPs paraît être une espèce "opportuniste" en cas de pollution par les HAPs.

CHAPITRE V

CONCLUSION

GENERALE ET

PERSPECTIVES



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

I. SYNTHÈSE DES RESULTATS/ PRINCIPALES CONCLUSIONS

Nos travaux ont été consacrés à l'étude, d'une part, des réponses des bactéries et de la méiofaune et en particulier de la nématofaune à la contamination artificielle par les hydrocarbures aromatiques polycycliques, et d'autre part, à l'impact écologique de différentes techniques de bioremédiation sur ces organismes benthiques ainsi qu'à la mesure du taux de dégradation des HAPs testés. Dans ce contexte, deux parties ont été abordées. La première partie a été consacrée à l'effet d'une seule molécule de HAP et celui de la bioremédiation sur les bactéries et les nématodes en termes de biomasse, de densités et de diversité. Dans la seconde partie, un mélange de trois molécules de HAPs a été utilisé et l'impact de ce cocktail sur la microflore et la méiofaune a été suivi en mettant l'accent sur les interactions existant entre ces deux niveaux trophiques.

Ces deux volets de l'étude nous ont permis de conclure que :

- ✓ La contamination artificielle des sédiments de la lagune de Bizerte par les HAPs a eu un impact certain sur les peuplements bactériens et méiofaunistiques avec une réduction drastique de la densité et de la diversité méiofaunique ;
- ✓ La diversité bactérienne est moins affectée, la toxicité des HAPs entraîne l'élimination d'espèces non tolérantes qui sont remplacées par d'autres espèces, maintenant ainsi un niveau de diversité équivalent mais avec des structurations de communautés différentes ;
- ✓ La contamination par une molécule d'HAP ou par un mélange de trois molécules a inhibé la respiration à l'interface eau-sédiment entraînant une pénétration plus importante de l'oxygène ;
- ✓ Les HAPs testés ont eu un effet important sur la structure spécifique des nématodes. Ces modifications profondes de la structure des peuplements de nématodes libres sous l'effet des HAPs sont le résultat d'une différence du degré de sensibilité des espèces de nématodes à ces contaminants. Selon le traitement considéré, des espèces bioindicatrices peuvent être sélectionnées (Tableau 1). Ainsi, l'espèce *Spirinia parasitifera* dont la densité s'accroît et ceci

dans tous les microcosmes contaminés par les HAPs (anthracène, phénanthrène, fluoranthène et pyrène) paraît être une espèce “opportuniste” à la pollution par les HAPs. Par contre, la densité d'*Oncholaimus campylocercoïdes* fortement dominante dans tous les microcosmes témoins, a diminué dans tous les microcosmes contaminés et paraît être considérée comme “HAP-sensible”. De même, Mahmoudi *et al.* (2005) ont démontré que l'espèce *Oncholaimus campylocercoïdes* a été affectée par l'ajout de diesel. Dans notre étude, cette dernière espèce a toujours été dominante dans tous les microcosmes de bioremédiation avec une seule molécule (anthracène, phénanthrène) ou un cocktail de HAPs (phénanthrène, fluoranthène, pyrène). *Daptonema fallax* et *Mesacanthion diplochma* qui ont diminué de densité suite à la contamination par les HAPs testés semblent être des espèces intolérantes aux HAPs.

✓ La structure des peuplements de nématodes a été aussi modifiée suite aux différentes techniques de bioremédiation. Ainsi, *Prochromadorella neapolitana* a augmenté d'abondance d'une manière significative en réponse à l'ajout de sels nutritifs dans les microcosmes témoins ce qui suggère une limitation en sels nutritifs pour cette espèce comme cela a pu être observé pour les phosphates notamment pour le compartiment phytoplanctonique de la lagune de Bizerte (Hlaili *et al.*, 2006). *Prochromadorella neapolitana* a été observée dans les sédiments méditerranéens eutrophisés (Palacin *et al.*, 1992) suggérant que cette espèce pourrait être considérée comme une espèce indicatrice d'une eutrophisation. Néanmoins, *Prochromadorella neapolitana* semble être intolérante aux polluants organiques tels que la perméthrine (Boufahja *et al.*, 2011) mais résistante au mercure (Hermi *et al.*, 2009). La combinaison des deux techniques de bioremédiation (biostimulation et bioaugmentation) a provoqué une modification des structures communautaires par comparaison avec les microcosmes témoins avec l'apparition d'espèces distinctes. Ainsi, *Anticoma acuminata* et *Calomicrolaimus honestus* ont augmenté de densité dans les microcosmes de bioaugmentation (TBA) et les microcosmes de combinaison de la biostimulation à la bioaugmentation (TBS+BA ; CBS+BA) ce qui suggère que l'ajout d'une souche bactérienne hydrocarbonoclaste et de sels nutritifs ont stimulé l'abondance de ces espèces nématologiques. De fait, plusieurs interactions s'exercent entre les populations bactériennes et nématologiques (prédation, compétition, stimulation...). Des corrélations significatives entre biomasse bactérienne et biomasse méiofaunistique ont été observées dans notre étude en microcosmes confirmant les observations faites dans les sédiments océaniques (Raghukumar *et al.*, 2001), montrant ainsi un couplage étroit entre ces deux compartiments biologiques.

Tableau 1. Liste des espèces de nématodes identifiées dans les différents microcosmes contaminés (Anthracène ; Phénanthrène ; cocktail : Phnanthrène/Fluoranthène/Pyrène) et ceux contaminés avec l'ajout des sels nutritifs et/ou d'une souche bactérienne hydrocarbonoclaste (BS ; BA ; BS+BA). Ant : anthracène ; Phn : phénanthrène ; Fl : fluoranthène ; Pyr : pyrène ; TBS : témoin de biostimulation (sédiment naturel + sels nutritifs); CBS : biostimulation (sédiment contaminé + sels nutritifs); TBA : témoin de bioaugmentation; CBA : bioaugmentation ; TBS+BA : témoin de combinaison ; CBS+BA : combinaison.

Espèces/HAP	Ant	Phn	Phn/Fl/Pyr
Sensibles (diminution de densité)	<i>Oncholaimus campylocercoïdes</i>	<i>Oncholaimus campylocercoïdes</i>	<i>Oncholaimus campylocercoïdes</i> <i>Neochromadora peocilosoma</i> <i>Paramonohystera pilosa</i>
Intolérantes (élimination de l'espèce)	<i>Daptonema fallax</i> <i>Mesacanthion diplochma</i> <i>Neochromadora peocilosoma</i>	<i>Daptonema fallax</i> <i>Mesacanthion diplochma</i>	<i>Daptonema fallax</i> <i>Mesacanthion diplochma</i>
Résistantes (augmentation de densité)	<i>Odontophora</i> n.sp.	<i>Calomicrolaimus honestus</i>	<i>Metachromadora macroutera</i>
Opportunistes (augmentation importante de densité par rapport au témoin et par rapport aux autres espèces)	<i>Spirinia parasitifera</i>	<i>Spirinia parasitifera</i> <i>Neochromadora peocilosoma</i> <i>Odontophora</i> n.sp.	<i>Spirinia parasitifera</i>
Bioremédiation	TBS/CBS	TBA/CBA	TBS+BA/CBS+BA
Opportunistes	TBS : <i>Prochromadorella neapolitana</i>	TBA : <i>Calomicrolaimus honestus</i>	TBS+BA : <i>Anticoma acuminata</i> <i>Calomicrolaimus honestus</i> CBS+BA : <i>Anticoma acuminata</i> <i>Ptycholaimellus ponticus</i>
Tolérantes (densité stable)	CBS: <i>Oncholaimus campylocercoïdes</i> <i>Daptonema fallax</i>	TBA : <i>Anticoma acuminata</i> CBA : <i>Oncholaimus campylocercoïdes</i> <i>Odontophora</i> n.sp.	CBS+BA : <i>Oncholaimus campylocercoïdes</i> <i>Odontophora</i> n.sp. <i>Daptonema fallax</i>

- ✓ La méiofaune a un rôle majeur dans la structuration des communautés microbiennes benthiques, rôle qui peut être plus important que celui des HAPs. Ce rôle structurant permet le maintien d'une communauté microbienne relativement peu sensible aux effets des HAPs. Ce rôle biotique a été moins prononcé suite à l'ajout de sels nutritifs par la technique de biostimulation qui conduit à une dégradation efficace des HAPs entraînant ainsi une stimulation de la croissance à la fois de la méiofaune et de la microfaune et une réduction des effets toxiques des contaminants ;
- ✓ La présence de la méiofaune n'a pas eu d'influence significative sur la dégradation des HAPs dans le sédiment même si généralement la densité des nématodes augmentait dans les traitements de bioremédiation, les taux de biodégradation mesurés n'étaient pas significativement corrélés à la densité méiofaunique ;
- ✓ Le pourcentage de dégradation du pyrène était plus faible par rapport au phénanthrène et au fluoranthène dans les traitements combinant la biostimulation à la bioaugmentation. Ces différences pourraient s'expliquer par la structure chimique des composés, le pyrène étant un hydrocarbure à quatre cycles benzéniques ce qui augmente sa stabilité par rapport aux composés à trois cycles comme le phénanthrène ;
- ✓ La bioremédiation par la technique de biostimulation semble être la méthode la plus efficace pour la dégradation des HAPs et celle présentant un impact écologique minime vis-à-vis des communautés nématologiques et bactériennes.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse peuvent être synthétisés selon le schéma suivant (Fig.1):

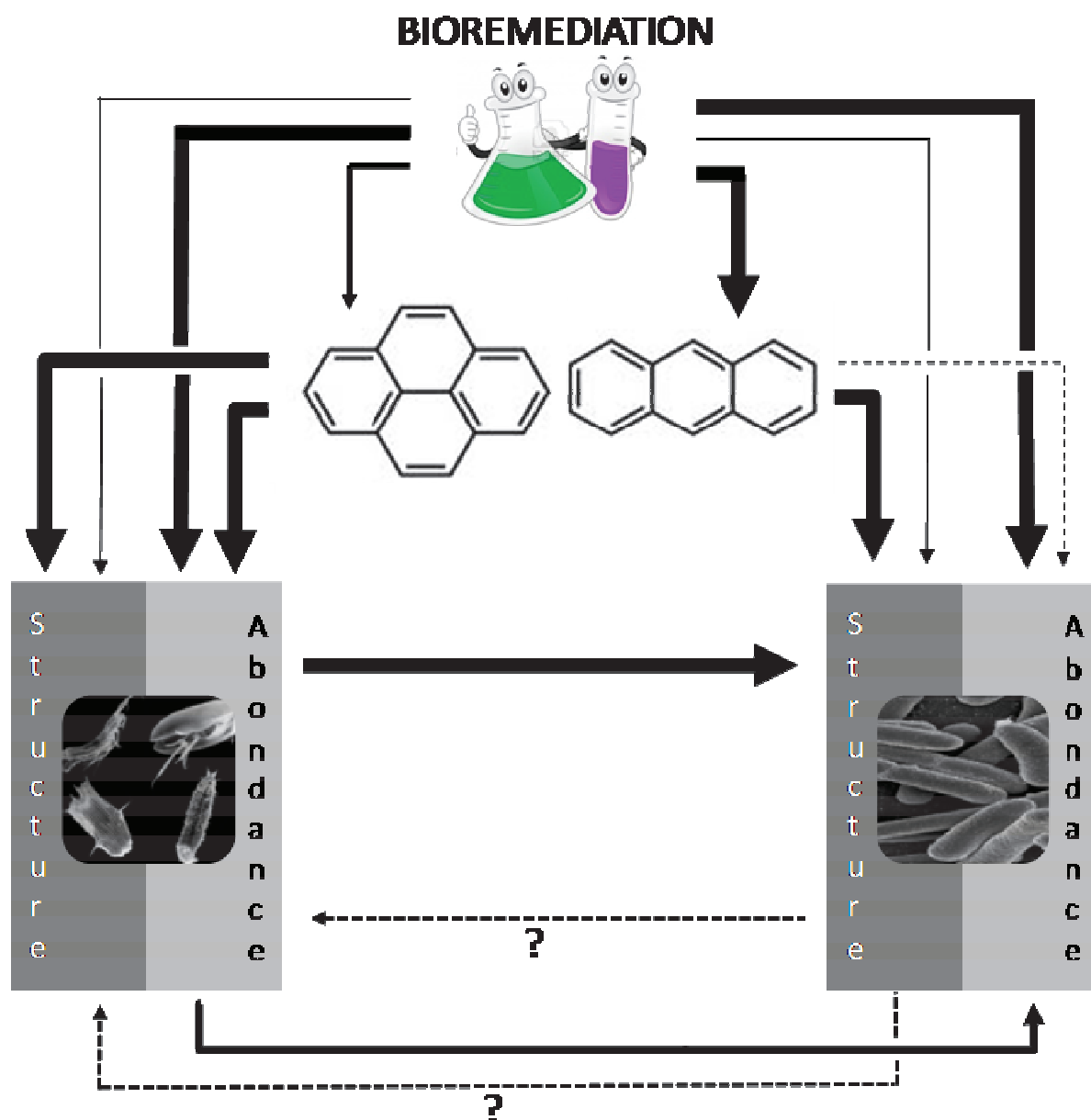


Fig.1. Représentation schématique des différents impacts sur la structure et l'abondance de la méiofaune (à gauche) et des bactéries (à droite). L'épaisseur du trait est proportionnelle à l'importance de l'effet. Les points d'interrogation indiquent que l'effet n'a pas pu être identifié au cours de cette étude.

II. PERSPECTIVES

Au regard de l'ensemble des résultats obtenus, les principales perspectives de recherche qui pourraient être mises en œuvre à ce stade, seraient de plusieurs types:

✓ Les résultats obtenus dans cette étude ont montré l'efficacité des techniques de bioremédiation, en particulier la biostimulation. Cependant, pour tester l'efficacité de ces techniques, des sédiments faiblement contaminés en HAPs prélevés dans un site relativement éloigné des sources de pollution ont été artificiellement contaminés par une molécule ou un mélange de trois molécules d'HAPs. Afin de tester l'efficacité des techniques de bioremédiation identifiées comme efficaces pour biodégrader des HAPs ajoutés artificiellement, il serait pertinent de tester ces traitements pour la bioremédiation de sédiments contaminés en HAPs situés dans des zones polluées. De nombreuses études (Soclo *et al.*, 2000) ont montré que les HAPs pouvaient être étroitement associés aux particules sédimentaires, réduisant ainsi leur biodisponibilité et donc leur potentiel de dégradabilité par les bactéries. Ainsi, même si les techniques de bioremédiation ont montré leur efficacité pour dégrader des HAPs ajoutés artificiellement, leur efficacité reste à démontrer pour des sédiments présentant un historique de contamination important ;

✓ Les travaux menés ont étudié l'impact d'une ou de trois molécules d'HAPs dans des conditions simulant au mieux l'*in situ* grâce à l'utilisation de microcosmes. Cependant, une pollution n'est rarement le fait d'une seule ou de quelques molécules, un polluant est souvent accompagné d'un cortège d'autres polluants parfois à l'état de traces qui peuvent avoir des effets importants sur la structure et la fonction des communautés benthiques. Il serait judicieux de simuler au mieux les conditions d'exposition aux polluants en utilisant par exemple des éluutriats de sédiments obtenus après remise en suspension de sédiments contaminés. Les éluutriats de sédiments contaminés contiennent différents polluants (métaux, contaminants organiques) stockés dans les sédiments qui peuvent être remis en suspension dans la colonne d'eau lors par exemple d'un épisode de tempête. La remobilisation de ces polluants peut avoir des conséquences importantes pour les organismes benthiques tant sur leur structure que sur leur fonction. De plus lors de ces phénomènes de remise en suspension, les nutriments stockés dans le sédiment peuvent être relargués dans la colonne d'eau à des concentrations importantes simulant ainsi une « biostimulation » naturelle qui pourrait favoriser la biodégradation des polluants libérés lors de la remise en suspension ;

✓ Tous les résultats de la présente étude confortent l'idée que les nématodes libres constituent d'excellents outils de biosurveillance dans les écosystèmes littoraux. En effet, nous avons pu identifier par des expériences en microcosmes des espèces indicatrices de pollution par les HAPs. Le second type d'investigations à mettre en œuvre porterait essentiellement sur une meilleure compréhension des nombreux mécanismes impliqués dans la résistance des espèces de nématodes aux HAPs. Au cours des 10 dernières années, les nouvelles technologies de l'ADN offre des approches efficaces pour non seulement identifier les espèces mais aussi pour isoler des gènes qui pourraient être directement touchés par les contraintes environnementales. L'amplification génique ou réaction en chaîne par polymérase (PCR) (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988) permet l'isolement des marqueurs génétiques des individus, même de petites organismes du méiobenthos comme les nématodes (Schizas *et al.*, 1997). Les projets dans ce sens portant sur les modèles d'invertébrés ont considérablement augmenté les connaissances sur le nombre et la variété des gènes chez les métazoaires. Parmi ceux-ci, le projet du génome du nématode du sol *Caenorhabditis elegans* représente le seule métazoaire dont le génome nucléaire a été bien étudié (Chervitz *et al.*, 1998). Comme de nombreux nématodes, à certains stades de son développement, ce ver peut produire des *larves dauer* (un stade de développement alternatif des vers nématodes, plus résistant aux conditions dégradées de l'environnement) plus résistantes et capables de survivre durant plusieurs mois en diapause (phase génétiquement déterminée dans le développement d'un organisme où il diminue l'intensité de ses activités métaboliques). Dans ce cadre, des études moléculaires seront nécessaires pour isoler les gènes de résistance des nématodes marins face aux conditions environnementales en s'appuyant sur les avancées obtenues sur les nématodes des sols.

✓ Nos perspectives de recherche sont donc déjà définies, même si d'autres points essentiels comme l'utilisation de la macrofaune, qui est un des compartiments importants du benthos, dans des études d'écotoxicologie et de bioremédiation, méritent d'être abordés. Des études récentes ont d'ailleurs montré que les interactions entre la macrofaune et le compartiment microbien étaient relativement complexes notamment en cas de pollution par hydrocarbures (Stauffert *et al.*, 2013).

Références bibliographiques

- Chervitz SA, Aravind L, Sherlock G, Ball CA, Koonin EV, Dwight SS, Harris MA, Dolinski K, Mohr S, Smith T, Weng S, Cherry JM, Botstein D (1998). Comparison of the complete protein sets of worm and yeast: Orthology and divergence. *Science*, **282**, 2022-2028.
- Boufahja F, Sellami B, Dellali M, Aissa P, Mahmoudi E, Beyrem H (2011). A microcosm experiment on the effects of permethrin on a free-living nematode assemblage. *Nematology*, **13**, 901-909.
- Hermi M, Mahmoudi E, Beyrem H, Aissa P, Essid N (2009). Responses of a Free-Living Marine Nematode Community to Mercury Contamination: Results from Microcosm Experiments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, **56**(3): 426-433.
- Hlaili, A. S., Chikhaoui, M. A., El Grami, B. & Mabrouk, H. H. (2006). Effects of n and p supply on phytoplankton in Bizerte Lagoon (western Mediterranean). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **333**(1), 79-96.
- Mahmoudi, E., Essid, N., Beyrem, H., Hedfi, A., Boufahja, F., Vitiello, P. & Aissa, P. (2005). Effects of hydrocarbon contamination on a free living marine nematode community: Results from microcosm experiments. *Marine Pollution Bulletin*, **50**(11), 1197-1204.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA Invitro - the polymerase chain-reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51**, 263-273.
- Palacin C, Gili J M, Martin D (1992). Evidence for Coincidence of Meiofauna Spatial Heterogeneity with Eutrophication Processes in a Shallow-Water Mediterranean Bay. *Estuar. Coast. Shelf Sci*, **35**(1), 1-16.
- Raghukumar, C., Bharathi, P. A. L., Ansari, Z. A., Nair, S., Ingole, B., Sheelu, G., Mohandass, C., Nath, B. N. & Rodrigues, N. (2001). Bacterial standing stock, meiofauna and sediment-nutrient characteristics: indicators of benthic disturbance in the Central Indian Basin. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography*, **48**(16), 3381-3399.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA-polymerase. *Science*, **239**, 487-491.

- Soclo, H. H., Garrigues, P. & Ewald, M. (2000). Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments: Case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Marine Pollution Bulletin*, **40**(5), 387-396.
- Schizas NV, Street GT, Coull BC, Chandler GT, Quattro JM (1997). An efficient DNA extraction method for small metazoans. *Mol. Mar. Biol. Biotech*, **6**, 381-383.
- Stauffert M, Cravo-Laureau C, Jézéquel R, Barantal S, Cuny P, et al. (2013). Impact of Oil on Bacterial Community Structure in Bioturbated Sediments. *Plos One* **8**(6), e65347. doi:10.1371/journal.pone.0065347

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

ANT: Anthracene

ARN: Acide ribonucléique

BS : Biostimulation

BA: Bioaugmentation

BS+BA : Combinaison Biostimulation-Bioaugmentation

COT : Carbone Organique Total

CMF : Cytométrie en Flux

FL: Fluoranthene

GC : Chromatographie en Phase Gazeuse

HAP : Hydrocarbure Aromatique polycyclique

MES : Matière En Suspension

MVSP : Multi-Variante Statistical Package

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

SOC : Sediment Oxygen Consumption

TC : Trucount

T-RFLP: Terminal restriction fragment Length Polymorphism

PCR: Polymerase Chain Reaction

PHN: Phenanthrene

PYR: Pyrene

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

- Fig. 1.** Ecosystème benthique et principaux interactions. 11
- Fig. 2.** Structures des 16 HAPs de la liste US-EPA. 16
- Fig. 3.** La voie aérobie de dégradation bactérienne de l'anthracène par *Pseudomonas aeruginosa*. 28

CHAPITRE II : Procédures Expérimentales

- Fig. 1.** Localisation géographique de la station prospectée dans la lagune de Bizerte. 48
- Fig. 2.** Schéma d'un microcosme. 54
- Fig. 3.** Représentation schématique du protocole expérimental utilisé 55
- Fig. 4.** Mesures nécessaires pour la détermination des indices a, b et c de Warwick. 63
- Fig. 5.** Caractéristiques générales d'un nématode marin libre. A, vue latérale d'un mâle. B, vue latérale d'une femelle d'après Platt et Warwick (1983). A : mâle, B : Femelle. 65

CHAPITRE III : Effets d'une seule molécule de HAP

PARTIE A

Publication n°1

- Fig. 1.** Map of the Bizerte lagoon (Northern Tunisia) with the (shaded dot) sampling site (Echaraà). 82

- Fig. 2.** Bacterial abundance (average $\pm$ standard deviation) counted by flow cytometry in the sediment of different microcosms (T uncontaminated, C contaminated, CBS biostimulation, CBS+BA biostimulation and bioaugmentation). Numbers indicate the average number ($\pm$ SD) of T-RFs observed in each microcosm. **87**
- Fig. 3.** Cytograms in contour plot of bacterial populations in the different treatments (T uncontaminated, C contaminated, CBS biostimulation, CBS+BA biostimulation and bioaugmentation). The abscissa indicates the fluorescence intensity (FL 1) of cells stained with SYBR Green I. The ordinate indicates the relative granularity (side scatter) of cells. 1 and 2 μ m calibration beads, TC Trucounts, NA nucleic acid. **88**
- Fig. 4.** Microprofiles oxygen (squares) and oxygen consumption (line) in the sediment of different treatments (T uncontaminated, C contaminated, CBS biostimulation, CBS+BA biostimulation and bioaugmentation). Solid squares and lines oxygen concentration and oxygen consumption after 4 days, respectively. Open squares and dotted lines oxygen concentration and oxygen consumption after 30 days incubation of microcosm, respectively. **90**
- Fig. 5.** Sediment oxygen consumption and total organic carbon as a function of the different treatments (T uncontaminated, C contaminated, CBS biostimulation, CBS+BA biostimulation and bioaugmentation). a Oxygen fluxes at the sediment/water interface after 4 days (white bars) and 30 days (black bars) of incubation (average $\pm$ standard deviation). b Percentages of total organic carbon after 30 days of incubation (average $\pm$ standard deviation). **91**

Fig. 6. Correspondence analysis (CA) of the microbial communities based on T-RFLP data (16S rRNA genes) as a function of the different treatments after 30 days of incubation (T uncontaminated, C contaminated, CBS biostimulation, CBS+BA biostimulation and bioaugmentation). The data analyzed correspond to the average for triplicate samples of HaeIII and HinfI-digested 16S rRNA genes yielding 5-end T-RFLP patterns. **92**

Publication n°2

Fig. 1. Anthracene concentration measured after 40 days 682 of incubation (average $\pm$ standard deviation, n=3). (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, BS: biostimulation, BA: bioaugmentation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation). **111**

Fig. 2. k-dominance curves of nematode communities as a function of bioremediation treatment after 40 days of incubation. (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, BS: biostimulation, BA: bioaugmentation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation). The dotted line represents an equal distribution of abundance between species. **115**

Fig. 3. Impact of artificially spiked anthracene on nematode community structure as a function of microcosm treatment. Principal component analysis (PCA) of the nematode communities as a function of anthracene and the presence or absence and bioremediation treatment after 40 days of incubation (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, CBS: biostimulation, CBA: bioaugmentation, CBS+BA: biostimulation and bioaugmentation). **116**

Fig. 4. Impact of bioremediation treatment on nematode community structure. Principal component analysis (PCA) of the nematode communities as a function of bioremediation treatment after 40 days of incubation (T: unspiked sediment, TBS: biostimulation, TBA: bioaugmentation, TBS+BA: biostimulation and bioaugmentation). **117**

PARTIE B

Publication n°1

Fig. 1. Localisation géographique de la station prospectée dans la lagune de Bizerte (mars 2010). E : Echaraà. **138**

Fig. 2. Schéma d'un microcosme. **139**

Fig. 3. Charges bactériennes après 5 (a) et 20 jours (b) au niveau des différents compartiments [colonne d'eau (E), interface eau-sédiment (I) et sédiment (S)] des microcosmes témoins (T) et de ceux contaminés par le phénanthrène (C). **141**

Fig. 4. Charges bactériennes après 5 (a) et 20 jours (b) au niveau des différents compartiments [colonne d'eau (E), interface eau-sédiment (I) et sédiment (S)] des microcosmes contaminés par le phénanthrène (C) et de ceux contaminés avec ajout de solutions de sels nutritifs (CBS1 ou CBS2). **142**

Fig. 5. Charges bactériennes après 5 (a) et 20 jours (b) au niveau des différents compartiments [colonne d'eau (E), interface eau-sédiment (I) et sédiment (S)] des microcosmes contaminés par le phénanthrène (C) et de ceux contaminés avec ajout de sels nutritifs et d'une souche de *Bacillus* sp. (CBS1+BA ; CBS2+BA). **143**

Fig. 6. Variation des charges en bactéries capables d'utiliser le phénanthrène comme unique source de carbone et d'énergie après 20 jours d'incubation au niveau des différents compartiments [colonne d'eau (E) (UFC/ml d'eau), interface eau-sédiment (I) (UFC/ml d'eau) et sédiment (S) (UFC/gramme de sédiment humide)] dans les différents microcosmes [(T), (C), (CBS1), (CBS2), (CBS1+BA), (CBS2+ BA)]. **144**

Fig. 7. Densités moyennes (Individus/Microcosme) des nématodes libres dans les sédiments des microcosmes témoins (T) et dans ceux contaminés par le phénanthrène (C). **144**

Fig. 8. Comparaison de densités moyennes (Individus/Microcosme) de nématodes libres relevées dans les sédiments de microcosmes contaminés par le phénanthrène (C) et dans ceux contaminés mais traités avec (a) un simple ajout de sels nutritifs (CBS1 ou CBS2) et (b) l'association biostimulation-bioaugmentation par inoculation d'une souche de *Bacillus* sp. (CBS1+BA; CBS2+BA). **145**

Publication n°2

Fig. 1. Map of Bizerte lagoon showing the site from which sediment was collected (Echaraà). **155**

Fig. 2. Biodegradation of phenanthrene (Phe) in the sediment of different treatments after 20 days of incubation (average $\pm$ stdev, n=3). **159**

Fig. 3. Bacterial and meiofaunal abundances in the sediment of different microcosms (T uncontaminated, C contaminated, CBS biostimulation; CBS+BA: biostimulation and bioaugmentation) at the end of the 20 day incubation. **161**

Fig.4. k-dominance curves of the nematode communities as a function of bioremediation treatment after 20 days of incubation. **165**

Fig.5. Impact of phenanthrene and bioremediation treatment on nematode community structure as a function of microcosm treatment. Principal component analysis (PCA) of the nematode communities from uncontaminated sediment control microcosms (T), contaminated microcosms (C) and bioremediation treatments (CBS1; CBS2; CBS1+BA; CBS2+BA). **166**

CHAPITRE IV : Effets d'un cocktail de HAP

Publication n°1

Fig.1. Biodegradation of fluoranthene (Fl), phenanthrene (Phe) and pyrene (Pyr) in the sediment of different treatments after 30 days of incubation. **190**

Fig.2. Bacterial and meiofaunal abundances in the sediment of different microcosms (T uncontaminated, C contaminated, CBS biostimulation, CBSBA biostimulation and bioaugmentation) after 15 days and 30 days of incubation. Upper panel: Bacterial abundance determined by flow cytometry (average $\pm$ standard deviation). Lower panel Absolute abundance (individuals per microcosm) and standard deviation of total meiofauna (M) and major groups: nematodes (N), copepods (C) and polychaetes (P). As counting meiofauna required to remove all the sediment of the microcosm, abundance of meiofauna was determined only at the end of incubation. **193**

Fig. 3. Examples of cytograms in contour plots of bacterial populations for C and CBS microcosms after 15 days and 30 days of incubation. The abscissa indicates the fluorescence intensity (FL 1) of cells stained with SYBR Green I. The ordinate indicates the relative granularity (SSC) of cells. 1 and 2 μ m= calibration beads; TC = True counts; BACT = bacteria; B1, B2, B3 and B4 = subpopulations. **194**

Fig. 4. Microprofiles of oxygen (squares) and oxygen consumption (line) in the sediment as a function of treatment (T uncontaminated, C contaminated, CBS biostimulation, CBSBA biostimulation and bioaugmentation). Open squares and dotted lines: oxygen concentration and oxygen consumption in the absence of meiofauna, respectively. Solid squares and lines: oxygen concentration and oxygen consumption the presence of meiofauna, respectively. **196**

Fig. 5. Sediment oxygen consumption at the sediment/water interface after 15 and 30 days of incubation (average $\pm$ standard deviation) as a function of treatment (T uncontaminated, C contaminated, CBS biostimulation, CBS+BA biostimulation and bioaugmentation). Values (average $\pm$ standard deviation) measured in the different microcosms at the beginning of the incubation are indicated by dark circles (Meio-) and grey circles (Meio+). **197**

Fig. 6. Correspondence Analysis (CA) of the microbial communities based on T-RFLP data (16S rRNA genes) as a function of treatment after 15 days (15) and 30 days (30) of incubation (T: uncontaminated, C: contaminated, CBS: biostimulation, CBSBA: biostimulation and bioaugmentation). The data represent the average for triplicate samples of HaeIII and HinfI-digested 16S rRNA genes yielding 5-end T-RFLP patterns. Upper panel: CA with Initial, T and C samples. Lower panel: CA with C, CBS and CBSBA samples. **199**

Publication n°2

Fig.1. PAH concentration measured at the end of the 30 days of incubation in the different microcosms (average $\pm$ stdev, n=3). **217**

Fig.2. Abundance of nematodes (average $\pm$ stdev, n=3) after 30 days of incubation. (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, CBS: biostimulation, CBS+BA: biostimulation and bioaugmentation). **218**

Fig.3. k-dominance curves of nematode communities as a function of bioremediation treatment after 30 days of incubation. (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, CBS: biostimulation, CBS+BA: biostimulation and bioaugmentation). **220**

Fig.4. Impact of artificially spiked anthracene on nematode community structure as a function of microcosm treatment. Principal component analysis (PCA) of the nematode communities as a function of PAH and bioremediation treatment after 30 days of incubation (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, CBS: biostimulation, CBS+BA: biostimulation and bioaugmentation). **222**

CHAPITRE V : Conclusion générale et perspectives

Fig.1. Représentation schématique des différents impacts sur la structure et l'abondance de la méiofaune (à gauche) et des bactéries (à droite). L'épaisseur du trait est proportionnelle à l'importance de l'effet. Les points d'interrogation indiquent que l'effet n'a pas pu être identifié au cours de cette étude. **238**

LISTE DES PLANCHES

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

Planche 1. Les quatre groupes trophiques (1A, 1B, 2A et 2B) correspondant aux quatre types de cavités buccales des nématodes libres. **13**

CHAPITRE II : Procédures Expérimentales

Planche 1. Image satellitaire montrant la situation géographique de la lagune de Bizerte. **48**

Planche 2. Procédure de mesure de la consommation d'oxygène. **57**

Planche 3. Les trois principaux taxons de la méiofaune (N : nématodes ; C : copépodes ; P : polychètes). **57**

LISTE DES TABLEAUX ET TABLES

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de 16 HAPs.	18
---	-----------

CHAPITRE II : Procédures Expérimentales

Tableau 1: Protocole d'analyse des échantillons de cytométrie en flux.	59
---	-----------

Tableau 2: Principaux caractères morphologiques des nématodes et typologie pour leur identification.	64
---	-----------

Tableau 3: Mesures indispensables à la détermination d'une espèce de nématodes libres.	66
---	-----------

CHAPITRE III : Effets d'une seule molécule de HAP

PARTIE A

Publication n°2

Table 1: Codes used to identify microcosms.	108
--	------------

Table 2: Relative abundance (%) and standard deviation of nematode species identified in microcosms (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, BS: biostimulation, BA: bioaugmentation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation).	113
--	------------

Table 3: Univariate indices for nematode assemblages from each microcosm. (I = abundance, H' = Shannon-Weaver index, d = species richness, J' = evenness, S = number of species). (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, BS: biostimulation, BA: bioaugmentation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation).	114
--	------------

Table 4: Multiple comparison tests for significant differences between nematode assemblages as a function of the treatment. The T microcosms were considered as reference. +: significant ($p < 0.05$) increase in univariate indice; -: significant ($p < 0.05$) decrease in univariate indice; ns: no significant difference. (I = abundance, H' = Shannon-Weaver index, d = species richness, J' = evenness, S = number of species). (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, BS: biostimulation, BA: bioaugmentation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation).	114
--	------------

Table 5: Species responsible for differences between control and treated microcosms based on similarity percentages (SIMPER) analysis of square-root transformed data. (+): more abundant; (-): less abundant; (elim): elimination. Species accounting for ~ 70% of overall dissimilarity between treatment groups are ranked in order of importance of their contribution to this dissimilarity. (T: unspiked sediment, C: artificially contaminated, BS: biostimulation, BA: bioaugmentation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation).	118
--	------------

PARTIE B

Publication n°1

Tableau 1: Codes utilisés pour identifier les différents microcosmes.	140
--	------------

Publication n°2

Table 1: Experimental treatments.	157
--	------------

Table 2: Relative abundance ($\pm$ SD) for nematode species identified in microcosms (T: uncontaminated, C: contaminated, BS: biostimulation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation).	163
---	------------

Table 3: Species responsible for differences between control and treated microcosms based on similarity percentages (SIMPER) analysis of square-root transformed data. (+): more abundant; (-): less abundant; (elim): elimination.	163
--	------------

Table 4: Univariate indices for nematode assemblages from each microcosm. **164**

Table 5: Results from multiple comparison tests for significant differences between nematode assemblages as a function of the treatment. **164**

Table 6: Average (standard deviation, n=3 replicates) similarity between microcosms. **166**

CHAPITRE IV : Effets d'un cocktail de HAP

Publication n°1

Table 1: Total organic carbon (TOC) in the sediment as a function of the different treatments (T uncontaminated, C contaminated, CBS biostimulation, CBS+BA biostimulation and bioaugmentation) after 15 and 30 days of incubation (average $\pm$ standard deviation, n=3). **191**

Publication n°2

Table 1: Relative abundance ($\pm$ SD) and SIMPER analysis (cumulative contribution $\approx$ 90%) for nematode species identified in microcosms (T: uncontaminated, C: contaminated, BS: biostimulation, BA: bioaugmentation, BS+BA: biostimulation and bioaugmentation). **219**

Table 2: Univariate indices for nematode assemblages from each microcosm. (I = abundance, H' = Shannon-Weaver index, d = species richness, J' = evenness, S = number of species). **220**

Table 3: Results from multiple comparison tests for significant differences between nematode assemblages as a function of the treatment. The T microcosms were considered as reference. +: increase in univariate measure; -: decrease in univariate measure; ns: no significant difference at $p < 0.05$. **221**

Table 4: Average dissimilarity between microcosms. **221**

CHAPITRE V : Conclusion générale et perspectives

Table 1: Liste des espèces de nématodes identifiées dans les différents microcosmes contaminés (Anthracène ; Phénanthrène ; cocktail : Phnanthrène/Fluoranthène/Pyrène) et ceux contaminés avec l'ajout des sels nutritifs et/ou d'une souche bactérienne hydrocarbonoclaste (BS ; BA ; BS+BA). Ant : anthracène ; Phn : phénanthrène ; Fl : fluoranthène ; Pyr : pyrène ; TBS : témoin de biostimulation (sédiment naturel + sels nutritifs); CBS : biostimulation (sédiment contaminé + sels nutritifs) ; TBA : témoin de bioaugmentation; CBA : bioaugmentation ; TBS+BA : témoin de combinaison ; CBS+BA : combinaison. 236

PARTICIPATIONS A DES MANIFESTATIONS SCIENTIFIQUES





Les Troisièmes Journées Nationales de Cytométrie en Flux (JNCF). Première rencontre Méditerranéenne de Cytométrie. Monastir (Tunisie) : 11-13 Février 2010.

LA CYTOMÉTRIE EN FLUX POUR L'ESTIMATION DE LA BIOMASSE DES COMMUNAUTÉS BACTÉRIENNES SUITE À UNE BIOREMÉDIATION DES SÉDIMENTS LAGUNAIRES CONTAMINÉS PAR L'ANTHRACÈNE

HELA LOUATI¹, OLFA BEN SAID¹, AMEL SOLTANI¹, EZZEDINE MAHMOUDI¹, PATRICE GOT², OLIVIER PRINGAULT², ROBERT DURAN³ & PATRICIA AISSA¹

(1) : Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement (LBE), Faculté des Sciences de Bizerte, Tunisie,

(2) : Laboratoire Ecosystèmes Lagunaires, ECOSYM, Université de Montpellier II, France.

(3) : Equipe Environnement et Microbiologie - Université de Pau et des Pays de l'Adour, France.

La bioremédiation, réalisée par le compartiment bactérien, est aujourd'hui reconnue comme une stratégie complémentaire indispensable aux voies chimiques et physiques pour la dégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) dans l'environnement aquatique. L'estimation de la biomasse des bactéries par une technique très prometteuse, la cytométrie en flux, permettant de caractériser et énumérer les cellules ou les particules à partir de populations hétérogènes s'avère importante pour étudier l'effet de la bioremédiation sur la microflore indigène.

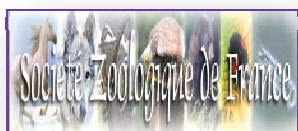
Cette étude a été mise au point pour déterminer l'impact sur les communautés bactériennes de la biostimulation (ajout de sels nutritifs : **70 ppm NaNO₃**; **35 ppm KH₂PO₄**) et de la biostimulation associée à la bioaugmentation (ajout des sels nutritifs et d'une souche bactérienne « *Shewanella oneidensis* » montrée capable de dégrader les HAPs et isolée à partir des sédiments de la lagune de Bizerte) des sédiments lagunaires artificiellement contaminés par l'anthracène (**1 ppm**). L'analyse des échantillons a été effectuée par cytométrie en flux dans deux compartiments du microcosme (à la surface de l'eau "E" et à l'interface eau-sédiment "IE"). Le traitement des échantillons de l'acquisition a été réalisé sur le Facs Calibur à l'exploitation des données sur le logiciel CellQuest. Le comptage des bactéries a été effectué sur cellules vivantes en utilisant des colorants vitaux spécifiques des acides nucléiques tels le SYBR Green-I (SYBR-I) ayant une forte affinité pour l'ADN. Tous les traitements ont été réalisés en triplicata.

L'analyse et le traitement des données par cytométrie en flux ont montré que les populations bactériennes présentent un taux de croissance positif au niveau des microcosmes témoins dans la colonne d'eau et à l'interface eau-sédiment. Cependant, ces taux de croissance ont été plus faibles au niveau des microcosmes contaminés par l'anthracène. Il semble donc que ce contaminant possède un effet inhibiteur sur la croissance des communautés bactériennes.

Par rapport au témoin, l'ajout des nitrates et des phosphates dans les microcosmes contaminés a entraîné une élévation de la biomasse bactérienne à l'interface eau-sédiment. En contrepartie, elle a engendré une nette diminution de taux de croissance des bactéries dans la colonne d'eau du microcosme.

L'ajout des éléments nutritifs et de la souche bactérienne a provoqué une augmentation plus importante de la biomasse de ces microorganismes par rapport aux microcosmes témoins et contaminés dans les deux compartiments de microcosme.

La combinaison de deux techniques de bioremédiation pourrait entraîner une réduction de l'effet toxique de l'anthracène sur la biomasse de la microflore indigène et semble donc favoriser la dégradation de l'anthracène.



Le 2^{ème} congrès franco-maghrébin de zoologie et les
4^{èmes} Journées Franco-Tunisiennes de Zoologie.
Zarzis (Tunisie) : 4-9 Novembre 2010.

INTERET DE LA BIOREMEDIATION DANS LA REDUCTION DE L'EFFET TOXIQUE DE PHENANTHRENE SUR LES MICROORGANISMES BENTHIQUES

Hela Louati¹, Olfa Ben Said¹, Amel Soltani¹, Ezzedine Mahmoudi¹, Cristiana Cravo-Laureau³, Robert Duran³, Olivier Pringault² & Patricia Aissa¹

(¹) : Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement, LBE

(²) : ECOSYM, SMEL, UM2. (³) : Equipe Environnement et Microbiologie- UPPA.

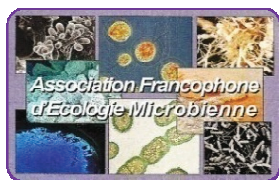
La bioremédiation, basée sur l'ajout de sels nutritifs (biostimulation) et/ou de microorganismes (bioaugmentation), vise à accélérer la dégradation des contaminants récalcitrants. Cette dernière, largement employée, particulièrement dans le cas de dépollution de sédiments contaminés par des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), est-elle sans effets sur les microorganismes benthiques?

Le présent travail consiste à évaluer l'impact, *in vitro*, de la biostimulation de sédiments contaminés par le phénanthrène (100 ppm) seule d'une part, et couplée avec la bioaugmentation par ajout d'une souche bactérienne d'autre part, sur deux échelons de la chaîne trophique marine : la microflore et la méiofaune marine.

Les sédiments utilisés pour l'étude en microcosmes proviennent de la lagune de Bizerte. Pour la biostimulation, deux compositions différentes en sels nutritifs ont été étudiées (**CBS1** ; **CBS2**). Pour la bioaugmentation, une souche bactérienne du genre *Bacillus* sp capable de dégrader les HAPs a été utilisée. Le dénombrement des organismes méiobenthiques a été réalisé. La quantification de la microflore aérobie totale (*Most Probable Number*, MPN) et des bactéries capables de dégrader le phénanthrène (*Unit Forming Colony*, UFC) ont été entamées dans trois compartiments du microcosme (à la surface de l'eau, à l'interface eau-sédiment et au niveau du sédiment). Dans les microcosmes contaminés, le phénanthrène a provoqué une diminution de la charge bactérienne totale dans la colonne d'eau, à l'interface et au niveau des sédiments. De même, les densités moyennes de la nématofaune ont été réduites significativement. La biostimulation avec la 2^{ème} composition en sels nutritif (**CBS2**) seule et couplée avec la bioaugmentation (**CBS2+BA**) a montré un accroissement important des charges bactériennes totales au niveau des trois compartiments considérés et principalement au sein des sédiments. De plus, au niveau de ces mêmes microcosmes ont été dénombrées les charges les plus élevées de bactéries minéralisant ce contaminant surtout à l'interface eau-sédiment.

Tous les tests de biostimulation (**CBS1** ; **CBS2**) et de combinaisons entre biostimulation/bioaugmentation (**CBS1+BA** ; **CBS2+BA**) ont provoqué une nette augmentation significative ($p < 0,05$) des effectifs moyens des nématodes. Cette augmentation a été plus accentuée au niveau des microcosmes de biostimulation de type 2 (**CBS2**) et de la combinaison (**CBS2+BA**) où les densités nématologiques enregistrées ont dépassées celles de témoins.

Nos résultats soulignent l'intérêt de la bioremédiation (la biostimulation et la combinaison de la biostimulation avec la bioaugmentation) dans la diminution de l'effet toxique de phénanthrène sur les microorganismes benthiques. Nos recherches futures vont se focaliser sur la biorestauration des sédiments contaminés par un mélange des HAPs.



**Cinquième colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne (AFEM). Hammamet (Tunisie) :
14 -16 Novembre 2011.**

**IMPACT DE L'ANTHRACENE SUR L'ACTIVITE ET LA DIVERSITE BACTERIENNE :
INFLUENCE DE L'APPORT DE NUTRIMENTS ET
L'INOCULATION DE *ACINETOBACTER* SP.**

Hela LOUATI^{1,3}, Olfa BEN SAID^{1,2}, Amel SOLTANI^{1,2}, Patrice GOT², Cristiana CRAVO-LAUREAU³, Robert DURAN³, Patricia AISSA¹ et Olivier PRINGAULT²

(1) : Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement (LBE), Faculté des Sciences de Bizerte, Tunisie, hela.louati@yahoo.fr.

(2) : Laboratoire Ecosystèmes Lagunaires, ECOSYM, Université de Montpellier II, France.

(3) : Equipe Environnement et Microbiologie -Université de Pau et des Pays de l'Adour, France.

Depuis plusieurs années, de nombreux travaux s'intéressent à évaluer la toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sur les microorganismes benthiques et de proposer des méthodes efficaces dans le but de décontaminer les sites pollués par des techniques de biorémediation (Miyasaka *et al.*, 2006). Très peu d'études se sont intéressées à la toxicité de l'anthracène sur les bactéries (Bonnet *et al.*, 2005) bien que ce composé soit omniprésent dans l'environnement aquatique. La présente étude vise à estimer *in vitro* l'impact d'une contamination sédimentaire par l'anthracène avec une faible concentration (1ppm) sur l'activité à l'interface eau-sédiment (microélectrodes à oxygène), la diversité (T-RFLP) et la biomasse (cytométrie en flux) des communautés bactériennes. La biorémediation a été réalisée par biostimulation par ajout d'éléments nutritifs (70 mg.kg⁻¹ NaNO₃ ; 35 mg.kg⁻¹ KH₂PO₄) et par la combinaison de la biostimulation à la bioaugmentation, en utilisant une souche bactérienne (*Acinetobacter* sp.) capable de dégrader les HAPs, isolée à partir des sédiments contaminés de la lagune de Bizerte. A la fin de l'incubation (30 jours), l'anthracène a provoqué une très forte inhibition de l'activité dans le premier mm et même par l'addition des sels nutritifs et l'inoculation de la souche bactérienne. Les analyses canoniques des correspondances montrent une structuration des communautés bactériennes selon la contamination sédimentaire par l'anthracène et le type de traitement utilisé (biostimulation seule ou associé à la bioaugmentation).

Bonnet, J. L., Guiraud, P., Dusser, M., Kadri, M., Laffosse, J., Steiman, R. & Bohatier, J. (2005). Assessment of anthracene toxicity toward environmental eukaryotic microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and selected micromycetes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **60**(1), 87-100.

Miyasaka, T., Asami, H. & Watanabe, K. (2006). Impacts of bioremediation schemes on bacterial population in naphthalene-contaminated marine sediments. *Biodegradation*, **17**(3), 227-235.



Les lagunes de Thau et Bizerte, entre pressions environnementales et gestion durable. Workshop organisé à Bizerte (Tunisie): 3 -4 Mai 2012.

ETUDE MICROCOSMIQUE DE LA REPONSE DE MEIOBENTHOS DE LA LAGUNE DE BIZERTE A UNE BIOSTIMULATION DES SEDIMENTS CONTAMINÉS PAR UN MELANGE DE HAPs

Hela LOUATI^{1,3}, Olfa BEN SAID^{1,2}, Amel SOLTANI^{1,2}, Patrice GOT², Cristiana CRAVO-LAUREAU³, Robert DURAN³, Patricia AISSA¹ et Olivier PRINGAULT²

(1) : Laboratoire de Biosurveillance de l'Environnement (LBE), Faculté des Sciences de Bizerte, Tunisie, hela.louati@yahoo.fr.

(2) : Laboratoire Ecosystèmes Lagunaires, ECOSYM, Université de Montpellier II, France. (3) : Equipe Environnement et Microbiologie -Université de Pau et des Pays de l'Adour, France.

Les sédiments des écosystèmes aquatiques sont le plus souvent contaminés par des divers polluants tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Bien que ces contaminants n'agissent pas séparément sur les communautés naturelles, peu de travaux se sont intéressés à l'étude de l'effet d'un mélange de HAPs sur le méiobenthos constituant un outil pertinent dans la biosurveillance des écosystèmes côtiers. Pour accélérer le processus de dégradation des HAPs, il existe plusieurs stratégies telles que la biostimulation qui consiste à stimuler l'activité de populations microbiennes par l'ajout de nutriments nécessaires à la croissance des bactéries autochtones.

Dans ce but, une étude microcosmique de la réponse de la méiofaune à une biostimulation (ajout d'une composition variée de sels nutritifs) des sédiments contaminés par un mélange de HAPs [fluoranthène (45ppm), pyrène (30ppm), phénanthrène (25ppm)] a été effectuée. Les sédiments marins utilisés pour l'étude en microcosmes ont été prélevés au niveau de la station Echaràa (lagune de Bizerte).

Les résultats de l'analyse statistique par le test HSD indiquent d'une part que la contamination par le mélange de HAPs a provoqué une diminution significative des densités moyennes de la méiofaune en particulier la nématofaune associée par rapport à celle recensée au niveau du témoin. Par rapport au témoin, l'ajout des sels nutritifs aux microcosmes contaminés a entraîné une augmentation significative ($p < 0,05$) des densités moyennes de la méiofaune totale et des principaux taxons de méiobenthos (nématodes, copépodes et polychètes). La détermination de la composition spécifique du peuplement nématologique a montré des modifications profondes de la structure communautaire en fonction des traitements utilisés. Ainsi, l'espèce *Oncholaimus campylocercoides*, fortement dominante dans le microcosme témoin, a été affectée dans les microcosmes contaminés alors que *Spirinia parasitefera* dont la densité s'accroît et ceci dans tous les microcosmes contaminés par les HAPs.

Mots clés : méiofaune, nématodes libres marins, microcosmes, HAPs, biostimulation.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE : PUBLICATIONS



Résumé

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) sont des polluants organiques persistants (POP) émis essentiellement par les activités humaines suite à la combustion incomplète de la matière organique (industrie, chauffage, trafic routier...). En raison de leur faible taux de dégradation, de leur toxicité et de leur bioaccumulation, les HAPs font l'objet de plusieurs études en écotoxicologie. La présente thèse entreprise dans ce contexte par le biais d'expérimentations en microcosmes se propose d'évaluer l'impact des HAPs sur la microflore et la méiofaune benthique et d'appliquer différentes techniques de bioremédiation (biostimulation, bioaugmentation et combinaison des deux techniques) dans le but d'évaluer ces stratégies pour la dégradation des HAPs.

Nos résultats ont montré que les HAPs sont toxiques aussi bien pour la microflore que pour la méiofaune de la lagune de Bizerte. Sur la microflore, l'effet toxique de ces contaminants s'est manifesté par l'inhibition de l'activité bactérienne à l'interface eau-sédiment et par la modification profonde de la structure des communautés bactériennes. En ce qui concerne la méiofaune, les HAPs ont entraîné une altération de la structure des communautés nématologiques, avec l'apparition d'espèces indicatrices de pollution par les HAPs. Ainsi, l'espèce *Spirinia parasitifera* dont la densité s'accroît dans tous les microcosmes contaminés par les HAPs paraît être une espèce "opportuniste" à la pollution par les HAPs. Cependant, *Oncholaimus campylocercoïdes*, fortement dominante dans tous les microcosmes témoins, a diminué de densité dans tous les microcosmes contaminés et a été considérée comme HAP-sensible.

En analysant la structure des communautés microbiennes et méiofaunistiques, nous avons observé que la méiofaune joue un rôle structurant dans le maintien d'une communauté microbienne peu sensible aux effets des HAPs. Ce rôle structurant a été moins prononcé dans le cas d'ajout des sels nutritifs par la technique de biostimulation. Cette technique a montré des effets non significatifs vis-à-vis des communautés nématologiques et a semblé plus efficace dans la minéralisation des HAPs et par conséquent à la réduction de leur effet toxique sur les organismes benthiques. L'ensemble des résultats suggèrent que la bioremédiation à l'aide de l'enrichissement en sels nutritifs serait une alternative prometteuse à la dégradation des HAPs dans les environnements côtiers pollués.

Mots clés: HAPs, Contamination sédimentaire, Méiofaune, Bactéries, Interactions, Bioremédiation, Dégradation, Diversité, Activité, Microcosmes.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are persistent organic pollutants (POP) emitted mainly by human activities due to the incomplete combustion of organic matter (industry, heating, traffic ...). Because of their low rate of degradation, their toxicity and their bioaccumulation, PAHs are main of concern in ecological studies. In this context, the objectives of this thesis were to assess the impact of PAHs on the benthic microflora and meiofauna and apply different techniques of bioremediation (biostimulation, bioaugmentation and combination of both treatments) in order to degrade PAHs, using experimental approach with microcosms.

Our results showed that PAHs are toxic for microflora but also for meiofauna of Bizerta lagoon. The toxic effects of these contaminants were demonstrated by the inhibition of bacterial activity in the sediment/water interface and by profound changes in the structure of bacterial communities. PAHs provoked significant changes on meiofaunal community with the selection of nematode species that could be proposed as bioindicators of PAH pollution. Thus, *Spirinia parasitifera* which significantly ($p < 0.05$) increased in PAH contaminated microcosms, suggesting that it is an "opportunistic" species to PAH pollution. In contrast, *Oncholaimus campylocercoïdes*, strongly dominant in control microcosms, decreased in PAH contaminated microcosms and seemed to be a "PAH-sensitive" species.

By analyzing the structure of microbial and meiofaunal community, we observed that the structural role of meiofauna on bacteria community structure was still evident even under PAH contamination despite the toxic effects on meiofauna. However, this structural role of meiofauna disappeared when nutrients were added to the sediment resulting in an almost complete removal of PAHs. Biostimulation seemed to be the most effective bioremediation strategy in the reduction of PAH toxic effects on benthic organisms. Overall, these results suggest that bioremediation using nutrient addition is a promising alternative technique for the degradation of PAHs in coastal polluted environments.

Keywords: PAHs, Sediment contamination, Meiofauna, Bacteria, Interactions, Bioremediation, Degradation, Diversity, Activity, Microcosms.