

Centre de Recherche Armand Frappier Santé Biotechnologie

## **Contribution des différents composants de la diversité du sol à la phytoremédiation du phénanthrène par les salicacées**

par

**Sara Correa-García**

Thèse présentée pour l'obtention  
Du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.) en biologie

### **Jury d'évaluation**

Président du jury et  
Examineur interne

Ph.D. Philippe Constant  
INRS – Armand Frappier Santé  
Biotechnologie

Examineur externe

Ph.D. Lyle Whyte  
Université McGill

Examineur externe

Ph.D. Pierre-Luc Chagnon  
Université de Montréal

Directeur de recherche

Ph.D. Etienne Yergeau  
INRS – Armand Frappier Santé  
Biotechnologie

Co-directeur de recherche

Ph.D. Armand Séguin  
Ressources Naturels Canada

Date du dépôt final : Le 27 juillet 2021

© Droits réservés à Sara Correa-García, 2021



## REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Etienne Yergeau, de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Merci pour tout le soutien et les encouragements au cours des années, pour toutes les discussions enrichissantes, et pour m'avoir poussé à me surpasser. Merci d'avoir cru en mes capacités et d'avoir travaillé avec moi chaque jour pour la réussite de cette thèse. Merci pour ta porte toujours ouverte, ta disponibilité, ta flexibilité, ta compréhension, ton écoute et tes bons conseils. Je n'oublierai jamais les conversations décontractées, les cafés, les blagues, les vendredis festifs de pizza, les soirées karaoke avec le groupe, les *Tabata Tuesdays*, les lancements des haches et les barbecues légendaires d'été. Ce fut un véritable plaisir de travailler à tes côtés et de grandir comme professionnel suivant ton exemple. J'en garderai toujours des merveilleux souvenirs. Pour tout ça, merci.

Merci également à mon codirecteur de recherche, Armand Séguin, de m'avoir épaulé tout au long de ce projet. Merci pour ton écoute et ta patience. Merci pour avoir toujours déployé toute l'infrastructure et ressources à ta disposition pour m'aider à réussir en ce projet. Merci d'avoir géré avec autant de diligence une grande partie de la logistique nécessaire pour bien aboutir cette belle expérience. Sans ton savoir-faire, tes conseils judicieux, et ton aide précieuse ce projet n'aurait pas été possible. Je garderai des précieux souvenir de nos échanges.

Un grand merci à Philippe Constant pour avoir été toujours disponible pour m'encadrer durant les examens de la thèse. Merci d'avoir toujours trouvé de temps pour discuter avec moi et partager tes excellents conseils, ta bonne humeur et tes ressources.

I would like to thank all my lab colleagues, past and present. You have been a key component of my success today. Without you, there would have been no Indian restaurants, no enlightening coffees, no rich conversations, no house parties, no karaoke nights, no gym at 7.15 (with Etienne as a coach), no crazy post-conference trips to Banff, no beers in Germany. In summary, no friends to share the best part of a Ph.D. program. Thank you for sharing yourselves so much. Thank you for all your teachings, in the lab or in life. These special thanks are for you: Hami, Robert, Ruth, Xiaobo, Anne, Asmâa, Itu, Lili, Numan, Pranav, Charlotte, Chary, Eugenie, Jessica, Simon, Vinnie. I will carry all of you with me forever.

J'aimerai aussi remercier les amitiés tissées avec des membres d'autres laboratoires. Un merci immense à Audrey-Anne, Narine et Judith, qui ont été des excellents mentors féminins

improvisées pour me soutenir depuis mon arrivée et qui ont toujours partagé des gâteaux (brownies...), des rigolades jusqu'aux larmes. Merci les filles.

Cómo no agradecer el apoyo de mis muy queridas amigas. Alicia, Andrea, Bea, Sara, Hugo, Guille, Cris, Aroa, Aitana, Adrián, sois lo mejor de lo mejor. Sois crema. Sois vanadio. Sin nuestros skypes haciendo malabares con los horarios, sin nuestros abrazos de Navidades, nuestros viajes de verano o de invierno, sin los pack de supervivencia inesperados, yo no habría sido capaz de mantenerme viva en los fríos inviernos canadienses durante el doctorado. No hay Canada Goose que se compare al calor de vuestra amistad. Gracias desde el corazón.

Un merci de plus spéciaux à Stepan, si j'ai pu passer à travers les moments les plus difficiles de ce projet c'est grâce à ton amour et ton soutien infini. Merci de toujours avoir cru en moi. Merci pour tout le support émotionnel, ton écoute et pour être ma boussole de ce côté de l'Atlantique. Je t'aime mon amour.

Gracias Raquel. Gracias Mamá. Sois los cimientos de acero que me anclan a la realidad. Un gracias infinito a vosotras por todo vuestro amor y apoyo incondicional en cada paso de este largo camino. No hay palabras suficientes para expresar mi eterno agradecimiento. Sin vuestra luz no hubiese encontrado el camino en los momentos más oscuros. Un millón de gracias.

Gracias Papá por tu amor y tu inadvertida presencia, si hoy estuvieras con nosotros serías el padre más orgulloso del planeta.

Merci d'avoir contribué à ma réussite.

## **AVANT-PROPOS**

Cette thèse est rédigée sur la base des lignes directrices fournies par l'INRS, mise à jour en février 2019 en suivant une structure de « thèse par articles », afin de répondre à l'avant-dernière exigence du programme de doctorat en biologie, donnée à l'INRS - Armand Frappier Centre de recherche Santé-Biotechnologie.

La thèse se compose des sections suivantes : un résumé (versions anglaise et française), une introduction, des articles révisés par les pairs, une discussion et conclusions et une bibliographie, tel que décrit ci-dessous.

Le premier chapitre constitue en une introduction générale, comprenant une revue de la littérature pertinente liée aux principales hypothèses. Ce chapitre décrit également en détail l'hypothèse et les objectifs de recherche poursuivis dans le programme de doctorat. Le chapitre deux consiste en la publication dérivée d'une revue de littérature étendue.

La section suivante compile les chapitres trois et quatre, correspondants aux publications où nous avons communiqué les résultats obtenus pour chaque objectif de ma thèse. Cette section comprend deux articles scientifiques révisés par des pairs et publiés ou soumis pour publication.

Le cinquième chapitre récapitule les résultats exposés dans la section précédente, d'une manière cohérente qui résume la contribution des résultats pour répondre à l'hypothèse principale et son objectif associé.

Enfin, le dernier chapitre fait état de la bibliographie citée dans la thèse, et est suivi par du matériel lié aux articles dans une série d'annexes.

## RÉSUMÉ

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés organiques polluants produits lors de la combustion incomplète de la matière organique. La phytoremédiation, et plus précisément la rhizoremédiation, peut décontaminer efficacement les HAP dans les sols grâce à la biostimulation dans la rhizosphère. Cependant, la littérature visant la rhizoremédiation montre des incohérences concernant son succès, parce que ce processus repose sur les interactions existantes entre les composants de l'interface plante-sol. La littérature scientifique a identifié l'espèce végétale, les caractéristiques du sol et la diversité microbienne comme étant les principaux facteurs qui façonnent la communauté microbienne de la rhizosphère. Néanmoins, il y a de plus en plus de preuves que la faune vivant dans le sol peut également altérer les communautés microbiennes dans la rhizosphère. Le but de ma thèse est de mieux comprendre les contributions des différentes composantes de la diversité de la rhizosphère dans l'efficacité de *Populus balsamifera* (peuplier) et *Salix purpurea* (saule) lors de la rhizoremédiation du phénanthrène (PHE). Au cours de ce projet, j'ai étudié les communautés microbiennes et le réseau trophique animal en tant que composantes clés de la diversité des sols, moteur du succès de la rhizoremédiation du PHE. Ainsi, l'hypothèse de ma thèse est qu'une grande diversité et complexité trophique dans le sol sont des facteurs clés permettant aux plantes de faire face au stress du PHE, car elles fournissent une redondance fonctionnelle au sein de la communauté microbienne de dégradeurs. Pour tester cette hypothèse, ma thèse est divisée en deux parties. Premièrement, la communauté microbienne rhizosphérique de peupliers poussant dans deux sols présentant des profils de diversité différents (forestier vs agricole) a été comparée pour évaluer les patrons fonctionnels et de diversité communs qui se démarquent lorsque les plantes sont soumises à une contamination par le PHE. Dans le sol agricole, la communauté bactérienne a montré une distribution microbienne plus homogène à travers l'influence de la contamination et du peuplier que dans le sol forestier. La deuxième partie cherchait à déterminer si une combinaison plus complexe d'invertébrés est plus efficace pour améliorer la rhizoremédiation du PHE et / ou favoriser le développement des arbres que des combinaisons d'invertébrés moins complexes. Les saules témoins contaminés sans animaux ont été affectés négativement par le PHE, mais pas les saules exposés aux traitements avec les animaux, où les nématodes, les collemboles et les vers de terre ont aidé les saules à atteindre des niveaux de biomasse comparables aux témoins non-contaminés. Ensemble, ces résultats aident à élucider quels aspects de la diversité des sols ont une influence plus forte sur le devenir du PHE dans le sol. À

l'avenir, cela nous aidera à concevoir de meilleures stratégies de phytoremédiation, en s'attaquant à la diversité autour du système végétal.

**Mots-clés** : phytoremédiation; phénanthrène ; peuplier ; saule ; biodégradation ; communauté microbienne ; diversité du sol

## ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are pollutant organic compounds produced during incomplete combustion of organic matter. Phytoremediation can effectively decontaminate PAHs in soils. More specifically, rhizoremediation performs most of the degradation through biostimulation in the rhizosphere. However, the literature shows inconsistent results regarding rhizoremediation success. Part of the inconsistency is due to the fact that rhizoremediation relies on the interactions occurring among different components of the plant-soil interface. There is a scientific consensus identifying the main drivers shaping the rhizosphere microbial community as the plant species, soil characteristics and microbial diversity. However, there is increasing evidence that soil dwelling fauna may also shift microbial communities in the rhizosphere. Considering this, the aim of my thesis is to understand the contributions of different components of the diversity of the rhizosphere involved in the survival of *Populus balsamifera* (poplar) and *Salix purpurea* (willow) during phenanthrene (PHE) rhizoremediation. During my thesis I focused on microbial species composition, functional redundancy, and food webs as key components of the soil diversity driving the success of rhizoremediation of PHE. Therefore, the general hypothesis of my research project is that high diversity and trophic complexity in soil are the most important factors allowing plants to cope with PHE stress because it provides functional redundancy within the microbial community of degraders. To test this, my research is divided in two parts. First, the rhizospheric microbial community of poplars growing in soils with different diversity profiles (forest soil vs. agricultural soil) was compared to assess the common functional and diversity patterns that stand out when plants are subjected to PHE contamination. In agricultural soil the bacterial community showed a more homogeneous microbial distribution across contamination and plant factors than in forest soil. The second part evaluated the effect of increasingly complex food web interactions occurring in the rhizosphere during PHE rhizoremediation. I aimed to determine whether the most complex (diverse) combination of invertebrates is more effective in enhancing rhizoremediation and/or promoting plant development under PHE contamination. Control contaminated willows were negatively impacted by PHE but not those exposed to the food web interaction treatments, where nematodes, springtails and earthworms helped the plant achieve biomass levels comparable to control uncontaminated treatments. Together, these results help elucidate which aspects of soil diversity have a stronger influence in PHE fate in soil. In the future, this will help us to design better phytoremediation strategies, by tackling the diversity around the plant system.



**Keywords** : phytoremediation; phenanthrene; poplar; willow; biodegradation; microbial community; soil diversity

# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>IV</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>VI</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>XI</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>XV</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>XVII</b>
<b>1 INTRODUCTION</b> .....	<b>2</b>
1.1 CONTEXTE ET PROBLEMATIQUE : DE LA CONTAMINATION PAR HAP A LA PHYTOREMEDIATION .....	2
1.2 LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES .....	3
1.2.1 <i>Propriétés et structure</i> .....	4
1.2.2 <i>Sources et distribution dans l'environnement, voies d'exposition</i> .....	5
1.2.3 <i>Les effets nocifs des HAP sur la santé et l'environnement</i> .....	6
1.2.4 <i>Régulation et contrôle des HAP</i> .....	9
1.2.5 <i>Le HAP modèle sélectionné pour ce projet : le phénanthrène</i> .....	12
1.3 LES TECHNIQUES DE REMEDIATION .....	13
1.3.1 <i>Les techniques physico-chimiques et leurs limitations</i> .....	13
1.3.2 <i>Dégradation microbienne des HAP : Biodégradation</i> .....	14
1.3.3 <i>La phytoremédiation</i> .....	22
1.4 LE SOL COMME ECOSYSTEME COMPLEXE .....	27
1.4.1 <i>La plante et l'environnement de la rhizosphère</i> .....	28
1.4.2 <i>Microorganismes</i> .....	29
1.4.3 <i>Macroorganismes</i> .....	35
1.5 ASPECTS DE LA DIVERSITE DU SOL LIES AU FONCTIONNEMENT DE L'ECOSYSTEME :	
REDONDANCE FONCTIONNELLE, BIODIVERSITE ET COMPLEXITE DU RESEAU TROPHIQUE .....	38
1.6 HYPOTHESES ET OBJECTIFS .....	44
1.7 APPROCHE EXPERIMENTALE ET LIENS ENTRE LES OBJECTIFS ET LES CHAPITRES DE LA THESE .....	45
1.7.1 <i>Chapitre 2 : Déterminer quels facteurs influencent plus fortement la phytoremédiation (objectif spécifique 1)</i> .....	45
1.7.2 <i>Chapitre 3 : Analyser l'importance de la diversité microbienne initiale dans la réponse du peuplier face à la contamination par le phénanthrène (objectif spécifique 2)</i> .....	45
1.7.3 <i>Chapitre 4 : Analyser l'importance de la complexité du réseau trophique sur la performance du saule et sur la composition des communautés microbiennes face à la contamination par le phénanthrène (objectif spécifique 3)</i> .....	47

<b>2</b>	<b>RHIZOREMEDIATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS: A MODEL SYSTEM FOR PLANT MICROBIOME MANIPULATION .....</b>	<b>51</b>
2.1	ABSTRACT .....	52
2.2	INTRODUCTION .....	53
2.2.1	<i>Box 1: The holobiont and the hologenome</i> .....	56
2.3	SOIL ORGANISMS .....	56
2.3.1	<i>Microbes has plant-growth promoters</i> .....	56
2.3.2	<i>Microbes has plant-growth promoters</i> .....	59
2.3.3	<i>Other soil organisms</i> .....	61
2.4	PLANT ROOT EXUDATES .....	62
2.5	RHIZOREMEDIATION AS A MODEL FOR MICROBIOME MANIPULATION .....	63
2.5.1	<i>Choosing the right plant</i> .....	63
2.5.2	<i>Modify the microbiota</i> .....	64
2.5.3	<i>Predictive models</i> .....	67
2.6	PERSPECTIVES.....	68
2.7	CONFLICT OF INTEREST .....	68
2.8	ACKNOWLEDGMENTS.....	69
2.9	REFERENCES .....	69
<b>3</b>	<b>SOIL CHARACTERISTICS CONSTRAIN THE RESPONSE OF MICROBIAL COMMUNITIES AND ASSOCIATED HYDROCARBON DEGRADATION GENES DURING PHYTOREMEDIATION .....</b>	<b>72</b>
3.1	ABSTRACT .....	73
3.2	IMPORTANCE.....	73
3.3	INTRODUCTION.....	75
3.4	MATERIAL AND METHODS .....	78
3.4.1	<i>Experimental design</i> .....	78
3.4.2	<i>Soil and biological material</i> .....	78
3.4.3	<i>Sampling and plant trait measurements</i> .....	79
3.4.4	<i>Phenanthrene quantification</i> .....	80
3.4.5	<i>DNA isolation and amplicon library preparation</i> .....	81
3.4.6	<i>Quantification of PAH degrading bacteria (qPCR)</i> .....	82
3.4.7	<i>Bioinformatic analyses</i> .....	82
3.4.8	<i>Statistical analyses</i> .....	83
3.4.9	<i>Data availability</i> .....	84
3.5	RESULTS .....	85
3.5.1	<i>Plant morphological response and phenanthrene degradation</i> .....	85
3.5.2	<i>Fungal diversity</i> .....	87
3.5.3	<i>Fungal community structure</i> .....	87

3.5.4	<i>Fungal community composition</i> .....	87
3.5.5	<i>Bacterial diversity</i> .....	88
3.5.6	<i>Bacterial community structure</i> .....	90
3.5.7	<i>Bacterial community composition</i> .....	90
3.5.8	<i>PAH-RHD<math>\alpha</math> GN gene diversity</i> .....	97
3.5.9	<i>PAH-RHD<math>\alpha</math> GN gene community structure</i> .....	97
3.5.10	<i>PAH-RHD<math>\alpha</math> GN gene community composition</i> .....	97
3.5.11	<i>PAH-RHD<math>\alpha</math> GN gene abundance</i> .....	101
3.5.12	<i>PAH-RHD<math>\alpha</math> GP gene diversity</i> .....	101
3.5.13	<i>PAH-RHD<math>\alpha</math> GP gene community structure</i> .....	101
	103	
3.5.14	<i>PAH-RHD<math>\alpha</math> GP gene community composition</i> .....	103
3.5.15	<i>PAH-RHD<math>\alpha</math> GP gene abundance</i> .....	103
3.6	DISCUSSION.....	104
3.7	FUNDING.....	108
3.8	CREDIT AUTHORSHIP CONTRIBUTION STATEMENTS .....	109
3.9	DECLARATION OF COMPETING INTERESTS .....	109
3.10	ACKNOWLEDGEMENTS .....	109
3.11	REFERENCES.....	109

**4 ANIMAL SOIL FOOD WEB COMPLEXITY TRIGGERS SHIFTS IN MICROBIAL COMMUNITIES, INCLUDING PAH DEGRADERS, BUT WITHOUT CLEAR EFFECTS ON PHENANTHRENE PHYTOREMEDIATION ..... 112**

4.1	ABSTRACT .....	115
4.2	INTRODUCTION.....	116
4.3	MATERIAL AND METHODS .....	119
4.3.1	<i>Soil and biological material</i> .....	119
4.3.2	<i>Experimental design</i> .....	121
4.3.3	<i>Sampling and plant trait measurements</i> .....	121
4.3.4	<i>Phenanthrene quantification</i> .....	122
4.3.5	<i>Microbial community composition: DNA isolation and library preparation</i> .....	123
4.3.6	<i>Real-time PCR quantification of PAH degrading genes</i> .....	124
4.3.7	<i>Bioinformatic analyses</i> .....	125
4.3.8	<i>Statistical analyses</i> .....	126
4.3.9	<i>Data deposition</i> .....	126
4.4	RESULTS .....	127
4.4.1	<i>Plant biomass and phenanthrene concentration</i> .....	127
4.4.2	<i>Microbial community diversity</i> .....	129
4.4.3	<i>Microbial community structure</i> .....	132

4.4.4	<i>Community composition</i> .....	134
4.4.5	<i>PAH-RHD<math>\alpha</math> GN and GP gene abundance</i> .....	138
4.5	DISCUSSION.....	141
4.6	CONCLUSION .....	145
4.7	FUNDING.....	145
4.8	ACKNOWLEDGMENTS.....	145
4.9	AUTHORS CONTRIBUTIONS.....	146
4.10	CONFLICTS OF INTERESTS .....	146
4.11	REFERENCES.....	146
<b>5</b>	<b>DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION.....</b>	<b>148</b>
5.1	DISCUSSION.....	148
5.2	CONCLUSION .....	152
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>155</b>
<b>7</b>	<b>ANNEXE I : MATERIEL SUPPLEMENTAIRE DE LA PUBLICATION DU CHAPITRE 3 .</b>	<b>192</b>
<b>8</b>	<b>ANNEXE II : MATERIEL SUPPLEMENTAIRE DE LA PUBLICATION DU CHAPITRE 4</b>	<b>204</b>

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1-1	Structure moléculaire du phénanthrène.	12
FIGURE 1-2	Schéma de la bioremédiation.	15
FIGURE 1-3	Représentation schématique des voies métaboliques de dégradation.	17
FIGURE 1-4	Voies de dégradation du naphthalène et du phénanthrène.	19
FIGURE 1-5	Schéma des processus impliqués dans la phytoremédiation.	24
FIGURE 1-6	Exemplaires des deux espèces de Salicacées utilisées dans ce projet.	26
FIGURE 1-7	Schéma sur la complexité du réseau trophique dans le sol.	41
FIGURE 2-1	Dégradation des hydrocarbures pétroliers avec des exsudats racinaires et PGPR.	54
FIGURE 2-2	Techniques biotechnologiques par l'ingénierie du microbiome.	66
FIGURE 3-1	Boîtes à moustaches de la biomasse du peuplier et de la présence de phénanthrène.	83
FIGURE 3-2	Sommaire de la diversité, structure et composition de la communauté fongique.	87
FIGURE 3-3	Sommaire de la diversité, structure et composition de la communauté bactérienne.	89
FIGURE 3-4	Sommaire de la diversité, structure et composition de la communauté de dégradeurs GN.	96
FIGURE 3-5	Sommaire de la diversité, structure et composition de la communauté de dégradeurs GP.	100
FIGURE 4-1	Quantification du phénanthrène après huit semaines de croissance du saule.	126
FIGURE 4-2	Taux d'évolution en pourcentage de l'indice de diversité de Shannon.	128
FIGURE 4-3	Représentation spatiale et analyses de la structure de la communauté microbienne.	133
FIGURE 4-3	Composition de la communauté microbienne basée sur l'abondance relative d'ASV.	136
FIGURE 4-4	Quantification du gène PAH-RHD $\alpha$ pour les dégradeurs bactériens GN et GP.	140
FIGURE SUPPL. 1	Abondance relative des phyla bactériens.	220



## LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1-1	Guides Canadiennes sur la Qualité du Sol pour la Protection de l'Environnement.	11
TABLEAU 1-2	Sommaire des propriétés physicochimiques du phénanthrène.	13
TABLEAU 3-1	Sommaire des PERMANOVA pour les champignons, les bactéries et les dégradeurs.	84
TABLEAU 3-2	Sommaire des ANOVA pour l'abondance relative des bactéries (genre).	91
TABLEAU 3-3	Sommaire des ANOVA pour l'abondance relative des dégradeurs GN et GP.	97
TABLEAU 4-1	Moyenne et écart type pour les traits morphologiques du saule.	125
TABLEAU 4-2	Médianes de la diversité de Shannon et le nombre d'ASVs.	130
TABLEAU 4-3	Sommaire des ANOVA pour la diversité de Shannon.	131
TABLEAU 4-4	Sommaire des ANOVA pour l'abondance absolue des dégradeurs GN et GP.	149
TABLEU SUPPL. 1	Caractéristiques physicochimiques des sols agricole et forestier Chp.3.	192
TABLEU SUPPL. 2	Sommaire des ANOVA pour l'abondance relative des champignons Chp. 3.	193
TABLEU SUPPL. 3	Coefficients de corrélation de Pearson - l'abondance d'OTU vs. Phénanthrène Chp. 3.	195
TABLEU SUPPL. 4	Sommaire des ANOVA pour l'abondance relative des bactéries (phylum) Chp. 3.	198
TABLEU SUPPL. 5	Rapport de comptage de lectures (read count report) Chp 3.	202
TABLEU SUPPL. 6	Rapport de comptage de lectures (read count report) Chp 4.	204
TABLEU SUPPL. 7	Sommaire des ANOVA pour la richesse spécifique (nombre d'ASV observés) Chp. 4.	205
TABLEU SUPPL. 8	Sommaire des ANOVA pour l'abondance relative des champignons Chp. 4.	207
TABLEU SUPPL. 9	Sommaire des ANOVA pour l'abondance relative des bactéries Chp. 4.	211
TABLEU SUPPL. 10	Sommaire des ANOVA pour l'abondance relative des dégradeurs GN Chp. 4.	214
TABLEU SUPPL. 11	Sommaire des ANOVA pour l'abondance relative des dégradereus GP Chp. 4.	218





# 1 INTRODUCTION

---

## 1.1 Contexte et problématique : de la contamination par HAP à la phytoremédiation

Ce n'est pas nouveau, les sociétés contemporaines l'ont entendu jusqu'à l'exténuation : les activités humaines contribuent de manière significative à la contamination de l'environnement. Des opérations les plus occasionnelles, telles que la conduite d'une voiture, aux tâches industrielles lourdes ou à la construction d'infrastructures : les activités humaines impliquent l'émission d'une pléthore de substances polluantes et potentiellement dangereuses pour la santé humaine et des écosystèmes. Parmi ces substances polluantes, on trouve des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), souvent trouvés dans des mélanges complexes avec d'autres composés polluants. Les HAP apparaissent à la suite de la combustion incomplète de la matière organique, et en tant que tels, ils sont présents dans pratiquement tous les environnements. Il fut un temps où les sources prédominantes d'HAP étaient les incendies de forêt naturels ou les éruptions volcaniques. De nos jours, les sociétés modernes dépendent de la combustion du charbon, du pétrole, du gaz ou du bois pour la création d'innombrables produits (p. ex. le bitume) et services (p. ex. l'énergie) qui sont responsables d'une grande partie de l'émission totale de HAP dans l'environnement. Cependant, les grandes industries ne sont pas les seules responsables pour les émissions d'HAP : toute activité anthropique impliquant des températures pyrolytiques élevées libérera ces composés. De nombreuses activités domestiques contribuent aux émissions d'HAP : dès la cuisson de nos aliments, au chauffage avec du bois pendant l'hiver, en passant par l'utilisation d'une voiture pour des déplacements courants. Depuis l'apparition de 16 HAPs dans la liste commune des 129 composés prioritaires publiée par l'*US Environmental Protection Agency* (EPA) en 1976, plusieurs techniques de remédiation ont vu le jour, la plupart d'entre elles incluant des activités physico-chimiques qui, à leur tour, dépendent de la consommation de grandes quantités d'énergie et de ressources pour être efficaces. En conséquence, des alternatives de décontamination propres, vertes et rentables sont de plus en plus demandées. Au cours des dernières décennies, la phytoremédiation et la bioremédiation, utilisant respectivement les plantes et les microbes pour décontaminer les hydrocarbures, se sont positionnées comme de meilleures alternatives aux approches physico-chimiques. Cependant, ces techniques présentent également des défauts importants, principalement en raison de la complexité des mécanismes inhérents aux êtres vivants, ce qui limite leur adoption et leur

utilisation à large échelle. Ainsi, il n'est pas surprenant que la communauté scientifique ait concentré son attention sur ces approches biologiques pour mieux en comprendre les mécanismes qui sous-tendent leur fonctionnement.

Dans ce contexte, de nombreuses études ont été réalisées pour déterminer les éléments bactériens et fongiques symbiotiques qui contribuent à la dégradation des polluants et à la survie de la plante dans des environnements contaminés par les HAP. Cependant, peu de travaux ont été effectués pour comprendre les influences concrètes d'éléments particuliers de la diversité des sols : diversité spécifique (richesse spécifique), redondance fonctionnelle et complexité du réseau trophique.

De plus, à mesure que nos connaissances sur le fonctionnement des écosystèmes évoluent, pavant la voie vers de nouveaux changements de paradigme, tels que l'apparition du concept de l'hobionte, l'application de ces découvertes dans les domaines de la phytoremédiation et de la bioremédiation a pris du retard. Dans cette thèse, mes objectifs seront de comprendre l'importance des différents aspects de la diversité qui caractérisent les écosystèmes où se déroulent la phytoremédiation sur l'efficacité de celle-ci. Plus précisément, j'ai d'abord voulu déterminer si les différentes compositions des communautés microbiennes des sols ont un impact sur la composition de la communauté microbienne de la rhizosphère des plantes lors de la phytoremédiation, et donc sur le succès de la dégradation du phénanthrène, un HAP modèle. Deuxièmement, je me suis demandé si un réseau trophique du sol plus complexe affecterait de manière significative la composition de la communauté microbienne rhizosphérique et l'efficacité de la phytoremédiation. Dans son ensemble, ma thèse permet de mieux comprendre les contributions individuelles des composantes de la diversité des sols sur le succès de la phytoremédiation, avec comme objectif final de guider les approches futures vers des techniques de remédiation vertes plus efficaces.

## **1.2 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques**

Les HAP sont un sous-ensemble d'hydrocarbures partageant plusieurs caractéristiques communes : ce sont des composés organiques, neutres et apolaires, formés par deux anneaux benzéniques ou plus, liés par des arrangements linéaires, angulaires ou en coin. Ce sont des molécules généralement formées lors de la combustion incomplète de la matière organique.

Dans cette section, je considérerai les propriétés physicochimiques qui affectent les interactions des HAP avec l'environnement, les sources et voies d'exposition aux HAP, les effets nocifs des HAP chez différents organismes ainsi que la réglementation liée à la régulation et au contrôle des HAP dans l'environnement.

### 1.2.1 Propriétés et structure

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des hydrocarbures composés de plusieurs anneaux benzéniques. En tant qu'hydrocarbures, les HAP sont des molécules lipophiles apolaires, produites par la décomposition thermique de la matière organique (combustion incomplète de la matière organique), et on les trouve également couramment dans les gisements de charbon et de goudron.

Par définition, ces composés ont de multiples anneaux aromatiques. Le plus simple des HAP est le naphthalène, avec seulement deux anneaux aromatiques. Les anneaux, ou cycles, ne contiennent pas d'hétéroatomes (en chimie, un hétéroatome est un atome qui n'est pas ni du carbone ni de l'hydrogène). Ces cycles sont le plus souvent formés de 5-6 atomes de carbone en anneaux organisés en différentes structures plates qui, par conséquent, fournissent une large gamme de molécules de HAP.

En générale, les HAP sont des molécules hydrophobiques, et qui ne se vaporisent facilement (à exception des plus petites). Il s'agit des molécules qui sont également très stables chimiquement, avec une capacité d'adsorption à la matière organique très élevée. Cependant, ces propriétés physicochimiques varient de façon particulière en fonction du nombre d'anneaux benzéniques. Ainsi, les HAP formés par 2 ou 3 anneaux sont connus comme des HAP à bas poids moléculaire (LMW de l'anglais *Low Molecular Weight*) tandis que ceux à 4 anneaux ou plus sont connus comme des HAP à haut poids moléculaire (HMW de l'anglais *High Molecular Weight*). Les LMW sont moins lipophiles et plus solubles dans l'eau, ont une pression de vapeur plus élevée et possèdent des coefficients de partition  $\log K_{ow}$  plus bas que les HMW. Ces différences dans les propriétés physicochimiques des HAP définissent leur comportement dans l'environnement (Mackay et Callcott 1998).

Plus précisément, parce qu'ils sont moins hydrophobes, de faibles quantités de LMW comme le naphthalène, le fluorène, le phénanthrène ou l'anthracène peuvent être dissoutes dans l'eau (Mackay et Callcott 1998). Ils peuvent ainsi se mobiliser facilement dans différentes matrices et

être emportés par l'eau. Ainsi, lorsque la concentration de ces substances est plus élevée par rapport à la capacité d'adsorption du sol, elles peuvent se répandre à proximité suivant un gradient de concentration vers les zones moins saturées (Bouchard et al. 1990), augmentant en même temps leur biodisponibilité. Ces molécules peuvent donc être une source de contamination autant pour le sol que les aquifères.

En raison de leur hydrophobicité, les HAP, qu'il s'agisse des LMW ou des HMW, ont majoritairement tendance à s'accumuler dans le sol où ils sont adsorbés par des particules de matière organique, attribuable à la teneur en lipides de celle dernière (Kohl et Rice 1999; Ukalska-Jaruga et al. 2019).

### **1.2.2 Sources et distribution dans l'environnement, voies d'exposition**

La source principale des HAP est la combustion incomplète de la matière organique et la pyrolyse des combustibles fossiles. Les autres sources non négligeables sont les déversements occasionnels de pétrole, les infiltrations d'huile et la diagenèse de la matière organique dans les sédiments anoxiques (Howsam et Jones 1998), faisant en sorte que les HAP sont très répandus dans l'environnement.

Après un événement de combustion comme ceux mentionnés ci-dessus, les HAP peuvent être dispersés et adhérer à la matière organique. Plus précisément, les HAP de 5 anneaux ou plus se retrouvent en association avec des petites particules aériennes. ( $< 2.5 \mu\text{m}$ ), comme les cendres (volantes) et la suie. Les HAP de 2-3 anneaux se retrouvent quasi totalement en phase gazeuse, tandis que les HAP à 4 anneaux peuvent se retrouver dans différents états, dépendamment des facteurs environnementaux (Larsen et al. 2002). Conséquemment, les chutes atmosphériques (pluie, neiges) peuvent déposer des HAP-HMW à la surface des végétaux, et constituent ainsi une source de contamination pour des plantes à consommation humaine ou animale (Nielsen et al. 1996; Edwards 1983; Larsen et al. 2002). Quand les particules tombent dans un cours d'eau, les HAP sont dispersés en suspension jusqu'à ce qu'ils se déposent dans les sédiments des rivières, lacs, estuaires et océans, auxquels ils adhéreront compte tenu de leur haute teneur en matière organique. Les sédiments constituent ainsi des réservoirs à HAP qui pourraient être libérés sous certaines conditions. Ensuite, les HAP sont filtrés et potentiellement bioaccumulés par les mollusques et autres animaux à alimentation par filtrage demeurant dans les sédiments (Meador et al. 1995; Pérez-Cadahía et al. 2004; Sarkar et al. 2017).

Une fois dans l'eau, les HAP sont stables et difficilement dégradables par hydrolyse, considérant leur hydrophobicité. Par contre, ces molécules sont susceptibles d'être dégradées par photo-oxydation et oxydation dans l'eau, l'air et le sol (Larsen et al. 2002; Howsam et Jones 1998). Dans les sols, les HAP peuvent être aussi métabolisés par des microorganismes, dans un processus de biodégradation complexe (les sections suivantes décrivent en détail la biodégradation des HAP). Dans tous les cas, ces processus peuvent affecter la toxicité des HAP. Par exemple, la photo-oxydation accroît leur toxicité quand ces molécules sont exposées à la lumière ultraviolette, et la dégradation par les microorganismes peut créer des composés issus des réactions d'oxydation métabolique qui ont une tendance à réagir plus fortement avec les autres organismes (Larsen et al. 2002). Ainsi, même si on ne peut plus détecter les composés parents, les produits intermédiaires peuvent être présents dans le milieu.

En conséquence, les HAP peuvent se retrouver dans les aliments que les humains consomment. De façon anecdotique, les niveaux des HAP trouvés dans les végétaux poussant autour des régions urbaines ou industrielles peuvent être jusqu'à dix fois plus élevés comparés aux niveaux trouvés dans les régions rurales, spécialement aux alentours des autoroutes (Larsson 1985). Malgré les sources de contamination dérivées des déversements accidentels et des activités industrielles, les sources d'exposition aux HAP majoritaires dans notre société actuelle dérivent principalement des activités domestiques (Larsen et al. 2002). Notamment, la préparation et la cuisson des aliments (séchage à la fumée, grillades, rôties, fritures) sont des sources non négligeables d'exposition hebdomadaire aux HAP (Guillen et al. 1997; Phillips 1999). Comme valeurs de référence, on trouve entre 0.01-1  $\mu\text{g kg}^{-1}$  HAP dans les aliments crus (potentiellement exposés aux sources naturelles et industrielles d'HAP). Comparativement, jusqu'à 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de HAP ont été retrouvés dans la viande et poisson fumés, et jusqu'à 130  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dans la viande cuite au barbecue.

### **1.2.3 Les effets nocifs des HAP sur la santé et l'environnement**

On a vu que les HAP se trouvent dans l'atmosphère, l'eau et le sol. Les écosystèmes plus à risque d'être exposés aux HAP sont les zones urbaines et industrielles. Mais les zones plus éloignées peuvent aussi se voir contaminées par des déversements accidentels, mais potentiellement désastreux, notamment le long des voies de transport maritimes et terrestres du pétrole, comme ce fut le cas lors du déversement de pétrole brut suite au naufrage du pétrolier

Prestige en 2002 près des côtes espagnoles ou encore l'accident ferroviaire de Lac-Mégantic, Québec, en 2013.

Malgré la nature « de terrain » de la pollution par les HAP, la plupart des études pour déterminer les effets des HAP dans l'environnement ont été menées sous des conditions contrôlées, *in vitro* ou *in vivo*. Plus précisément, dans le contexte canadien, les études de terrain se sont souvent concentrées sur les invertébrés, les poissons et les oiseaux, avec peu d'études sur les amphibiens et mammifères en milieu naturel (Wallace et al. 2020).

Dans les sols, les effets de la présence d'HAP sur les invertébrés, tout en étant non-négligeables, sont moins néfastes en comparaison avec leur effet dans les sédiments des milieux aquatiques (Erstfeld et Snow-Ashbrook 1999; Larsen et al. 2002). Les invertébrés sont un grand groupe d'animaux, et les effets des HAP sur les différents clades ne sont pas toujours cohérents. Les invertébrés terrestres peuvent être exposés aux HAP par différentes voies : l'eau interstitielle, l'ingestion de nourriture et de particules de sol et l'inhalation d'air présent dans les pores du sol. L'importance relative de chacune de ces voies dépend de différents facteurs : la morphologie, la physiologie et le comportement de l'animal. Ainsi, on différencie généralement les invertébrés à corps mou (nématodes, vers de terre, *Enchytraeidae*, larves) et les invertébrés à corps dur (arthropodes, isopodes, certains crustacés). Pour les organismes à corps mou, l'absorption de l'eau et de l'air a lieu à travers la peau, ce qui a des implications importantes pour l'exposition aux HAP (Peijnenburg et al. 2012). Ainsi, on trouve que des résultats contrastants ont été publiés. De faibles concentrations d'HAP ( $<100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) étaient corrélées positivement avec l'abondance des nématodes et des collemboles dans le sol, ainsi qu'avec le poids des vers de terre (Erstfeld et Snow-Ashbrook 1999). D'autres études, montrent des effets très nocifs de telles concentrations pour la reproduction des collemboles (Nota et al. 2009) et des *Enchytraeidae* (Roelofs et al. 2016). Si le sol est fortement contaminé, les effets adverses décrits pour la faune incluent des problèmes de reproduction, de développement et l'apparition de tumeurs (Peijnenburg et al. 2012).

Les plantes peuvent, en théorie, absorber une faible quantité d'HAP du sol à travers leurs racines et les déplacer aux parts aériennes (Watts et al. 2006), mais les quantités absorbées restent assez réduites dû à l'hydrophobicité des HAP. Les HAP en suspension atmosphérique peuvent aussi être absorbés par les feuilles par les stomates, tandis que la translocation ultérieure vers les racines a aussi été observée (Lin et al. 2007; Desalme, Binet et Chiapusio 2013). Les ratios d'absorbance dépendent notamment de la concentration, la solubilité des molécules impliquées et des caractéristiques physicochimiques du sol. Suite à l'absorption, la distribution à l'intérieur de la plante dépend principalement de la distribution des lipides (Lin et al. 2007). Néanmoins,

comme la solubilité des HAP dans l'eau est généralement très réduite, ceux-ci adhèrent fortement à la matière organique présente dans le sol (Ukalska-Jaruga et al. 2019), et leur transfert aux plantes sera très limité, spécialement pour les plantes avec une forte teneur en eau. Aussi, leur forte adhérence à la matière organique préviendra le lessivage dans des couches plus profondes du sol (Weissenfels et al. 1992; Ukalska-Jaruga et al. 2019). Une fois dans la plante, les HAP peuvent avoir des effets sur la morphologie de la plante, notamment sur l'élongation des racines et des parties aériennes de la plante (Thygesen et Trapp 2002). Aussi, la germination des graines peut être retardée, comme cela a été démontré pour le riz ou le maïs (Somtrakoon et Chouychai 2013) ou être inhibée (Hamdi et al. 2007; Anyanwu et Semple 2015). Une fois dans la plante, les HAP peuvent s'accumuler dans les tissus riches en lipides. Ensuite les HAP peuvent passer dans le réseaux trophique lorsque les plantes sont consommées par les animaux, leur causant directement des problèmes et, par extension, perturbant potentiellement le cours de certains services écosystémiques (Ball et Truskewycz 2013).

Beaucoup d'études ont été menées pour élucider les effets des HAP sur la santé des mammifères, *in vitro*, *in vivo*, ainsi que lors d'enquêtes de terrain. Les mammifères sont susceptibles à l'exposition aux HAP par différentes voies : inhalation, contact avec la peau et ingestion.

Les HAP peuvent être absorbés durant la digestion et sont détectables dans le sang après quelques heures. Par exemple, Laurent et al. (2001) étudia l'absorption de benzo[a]pyrène et de phénanthrène radioactifs par les cochons suite à une administration orale. La radioactivité atteignait son pic au bout de 5-6h, avant de revenir au niveau de base au bout de 24h. La présence de bile augmente aussi l'absorption intestinale des HAP par les rats (Rahman et al 1986). Aussi, une diète riche en composants lipidiques favorise l'absorption des HAP (Kawamura et al. 1988). Également, des quantités variables de HAP et de leurs métabolites ont été détectées dans l'urine, la bile et les fèces. Le microbiote intestinal est aussi capable d'hydrolyser les conjugués biliaires des métabolites des HAP (Chipman et al. 1981, 1982).

Aussi, la distribution des HAP dans le corps humain a été étudiée. Les HAP se trouvent dans tous les organes et prédominent dans les tissus adipeux. Il a été démontré que les HAP sont capables de traverser le placenta vers le fœtus, autant chez des modèles animaux (Withey et al. 1992) que chez l'humain (Zhang et al. 2017). Reste à savoir quelles sont les conséquences concrètes de l'exposition aux HAP durant le développement embryonnaire, mais certaines études montrent des effets neuronaux, e.g. des troubles déficitaires de l'attention avec ou sans hyperactivité (TDAH) (Perera et al. 2018).



La plupart des effets nocifs liés à l'exposition aux HAP sont de nature cytotoxique (Seemayer et Manojlovic 1980; Wallace et al. 2020), mais il existe de plus en plus de preuves liant l'exposition aux HAP avec le cancer (Sen et Field 2013; Harvey 1982). Leur toxicité est notamment due à leur biotransformation en métabolites toxiques, qui peuvent se lier de façon covalente aux macromolécules cellulaires spécialement sensibles, telles que les protéines, l'ADN ou l'ARN. Ces liaisons peuvent causer des dommages au niveau cellulaire, des mutations ou le cancer (Baird et al. 2005).

Les mécanismes de mutagénèse sont connus principalement suite à des études réalisées sur le benzo[a]pyrène et le benzo[a]pyrène-7,8-dio-9,10-époxyde (BaPDE). Le BaPDE provoque des transversions G>T chez les bactéries (Eisenstadt et al. 1982) et chez les cellules de mammifère *in vitro* (Miller et al. 2000; Yang et al. 1999). Aussi, ces transversions G>T ont été observées dans les cellules tumorales des patients atteintes de cancer du poumon, ce qui semble confirmer la contribution des HAP à la carcinogénèse produit par la fumée de tabac (Hainaut et Pfeifer 2001; Kucab et al. 2019). Un autre mécanisme lié au pouvoir carcinogène des HAP est l'encombrement stérique causé par la liaison des HAP à l'ADN, ce qui peut induire des mutations de décalage de cadre (*frameshift mutations*), délétions, arrêt de la phase S, rupture du brin d'ADN et d'autres altérations chromosomiques (Larsen et al. 2002).

Donc, les HAP impactent de façon non négligeables les écosystèmes par le biais de leurs interactions avec les organismes : des changements métaboliques ou troubles reproductifs, jusqu'à l'extinction de certaines espèces au niveau local, sans oublier les graves problèmes de santé qui peuvent être occasionnés aux humains exposés à ces composés. Ensemble, tous ces effets justifient la recherche de façons plus efficaces pour remédier les HAP.

#### **1.2.4 Régulation et contrôle des HAP**

Les réglementations pour le contrôle des HAP et autres polluants organiques sont relativement récentes. La fameuse liste de seize HAP publiée par l'EPA aux États-Unis est le produit du contexte de son époque. Il est important de comprendre que l'EPA avait été créée par le président Nixon en 1970, à un moment où les capacités analytiques étaient beaucoup plus limitées qu'aujourd'hui. Il n'y avait pas d'ordinateurs personnels et il fallait investir une quantité extraordinaire de temps et de ressources humaines pour préparer des échantillons analytiques pour la chromatographie gazeuse (analogique). Ainsi, les projets analytiques de l'époque étaient centrés à résoudre des problèmes majeurs, habituellement liés à la qualité de l'eau, et

l'identification et la quantification des contaminants pouvaient prendre des semaines jusqu'à plusieurs mois (Keith 2015). Un problème d'eaux oléagineuses à la Nouvelle-Orléans (É.-U.) avait forcé le Congrès à demander de l'aide à l'EPA pour analyser les composés présents. Une longue liste de 65 composantes avait été produite comme résultat de cette analyse, ce qui avait éveillé les consciences sur la problématique de la contamination de l'eau (Keith 2015). Plusieurs organisations environnementales avaient par la suite accusé l'EPA de ne pas prendre ses responsabilités au niveau de la régulation. Cela a déclenché, par la suite, la préparation d'un décret pour réglementer au niveau fédéral les niveaux acceptables des polluants détectés dans l'eau contaminée de la Nouvelle-Orléans (Keith 2015). Cette liste de 65 polluants contenait initialement 3 HAP : acénaphthène, naphthalène et fluoranthène. Mais ce n'était pas suffisant et le gouvernement fédéral a donné à l'EPA quelques semaines pour compléter la liste. D'autres HAP furent donc ajoutés à la liste de polluants prioritaires pour différentes raisons : sept (benzo[a]anthracène, benzo[a]pyrène, benzo[b]fluoranthène, benzo[k]fluoranthène, chrysène, dibenzo[a,b]anthracène et indéno[1,2,3-c,d]pyrène) furent choisis parce que des standards analytiques étaient disponibles à l'époque (indispensables pour pouvoir réaliser des suivis dans les écosystèmes) ; trois (acénaphthylène, fluorène et phénanthrène) furent choisis parce que leur potentiel carcinogène avait été suggéré dans un rapport précédent. Finalement, les trois derniers (benzo[ghi]pérylène, anthracène et pyrène) furent sélectionnés parce qu'ils étaient des composants abondants et bien connus, issus des activités industrielles aux É.U (Keith 2015). Ainsi, parmi les « 129 polluants prioritaires » ces seize HAP ont été incorporés au *Clean Water Act* promulgué aux É.U en 1976. Et comme à l'époque les autres pays n'avaient pas de meilleures listes, ils ont simplement copié et utilisé la liste telle quelle, et ces polluants prioritaires ont fait partie des réglementations à l'échelle mondiale (Keith 2015). Aujourd'hui, des décisions similaires prendraient beaucoup plus de temps, voir quelques années et impliqueraient de nombreuses réunions et discussions approfondies.

Le Canada a de nos jours des lignes directrices très précises (*Recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement*) pour délimiter les quantités de HAP maximales dans les sols, dans l'eau et dans d'autres environnements en fonction des usages (CCME Canadian Council of Ministers of the Environment 2008). Les recommandations canadiennes pour la qualité de l'environnement les plus récentes (2010), dont une sous-section peut être observée dans le **tableau 1-1**, ont été utilisées pour choisir la quantité de contaminant ajoutée aux expériences de cette thèse. La liste complète peut être retrouvée sur le site en ligne du Conseil canadien de ministres de l'Environnement (« Canadian Environmental Quality Guidelines. » 2010).

**Tableau 1-1 Extrait du tableau 2 appartenant au rapport des Guides Canadiennes sur la Qualité du Sol pour la Protection de l'Environnement et la Santé Humaine. Le tableau montre les quantités permises de quelques d'HAP, dont le phénanthrène en mg kg<sup>-1</sup>. La légende a été coupée pour collecter les index nécessaires à l'interprétation des valeurs correspondant au phénanthrène.**

Recommandations canadiennes pour la qualité des sols – Protection de l'environnement et de la santé humaine		HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES			
		Vocation du terrain			
		Agricole	Résidentielle/ parc	Commerciale	Industrielle
Recommandations pour la protection de l'environnement/valeurs de vérification	<b>Valeurs recommandées pour la protection de l'environnement pour le <u>naphthalène</u></b>				
	RQS <sub>E</sub> <sup>d</sup>	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
	Contact avec le sol (RQS <sub>CS</sub> )	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
	Ingestion de sol et d'aliments (RQS <sub>I</sub> )	8,8	8,8	-	-
	Protection de la vie aquatique <sup>f</sup> (RQS <sub>VA</sub> )	0,013 <sup>g,1</sup>	0,013 <sup>g,1</sup>	0,013 <sup>g,1</sup>	0,013 <sup>g,1</sup>
	RQS <sub>E</sub> provisoire (CCME 1997)	0,6 <sup>n</sup>	0,6 <sup>n</sup>	22 <sup>n</sup>	22 <sup>n</sup>
	<b>Valeurs recommandées pour la protection de l'environnement pour le <u>phénanthrène</u></b>				
	RQS <sub>E</sub> <sup>d</sup>	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
	Contact avec le sol (RQS <sub>CS</sub> )	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
	Ingestion de sol et d'aliments (RQS <sub>I</sub> )	43,0 <sup>e</sup>	43,0 <sup>e</sup>	-	-
	Protection de la vie aquatique <sup>f</sup> (RQS <sub>VA</sub> )	0,046 <sup>g,1</sup>	0,046 <sup>g,1</sup>	0,046 <sup>g,1</sup>	0,046 <sup>g,1</sup>
	Critère provisoire de la qualité des sols (CCME 1991)	0,1 <sup>o</sup>	5 <sup>o</sup>	50 <sup>o</sup>	50 <sup>o</sup>
	<b>Valeurs recommandées pour la protection de l'environnement pour le <u>pyrène</u></b>				
	RQS <sub>E</sub> <sup>d</sup>	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
	Contact avec le sol (RQS <sub>CS</sub> )	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.
	Ingestion de sol et d'aliments (RQS <sub>I</sub> )	7,7 <sup>e</sup>	7,7 <sup>e</sup>	-	-
	Protection de la vie aquatique <sup>f</sup> (RQS <sub>VA</sub> )	S.O. <sup>g,1</sup>	S.O. <sup>g,1</sup>	S.O. <sup>g,1</sup>	S.O. <sup>g,1</sup>
	Critère provisoire de la qualité des sols (CCME 1991)	0,1 <sup>q</sup>	10 <sup>q</sup>	100 <sup>q</sup>	100 <sup>q</sup>
	<b>Les recommandations et les valeurs de vérification suivantes ont été évaluées pour tous les HAP qui sont indiqués dans la section environnementale.</b>				
	Abreuvement du bétail (RQS <sub>AB</sub> )	N.C.	-	-	-
Eau d'irrigation (RQS <sub>IR</sub> )	N.C.	-	-	-	
Vérification pour le cycle des nutriments et de l'énergie (RQS <sub>CNE</sub> )	N.C.	N.C.	N.C.	N.C.	
Vérification pour la migration hors site (RQS <sub>MH-E</sub> )	-	-	N.C.	N.C.	

**Notes :** N.C. = non calculée; S.O. = sans objet; RQS<sub>AB</sub> = recommandations pour la qualité des sols en vue de la protection de l'eau d'abreuvement; RQS<sub>E</sub> = recommandation pour la qualité des sols – protection de l'environnement; RQS<sub>CD</sub> = recommandation pour la qualité des sols relative au contact direct – protection de la santé humaine; RQS<sub>CNE</sub> = recommandations pour la qualité des sols en vue de la protection du cycle des nutriments et de l'énergie; RQS<sub>CS</sub> = recommandation pour la qualité des sols fondées sur le contact avec le sol pour les organismes inféodés au sol - protection de l'environnement; RQS<sub>IR</sub> = recommandations pour la qualité des sols en vue de la protection de l'eau d'irrigation; RQS<sub>SH</sub> = recommandation pour la qualité des sols - protection de la santé humaine; RQS<sub>D</sub> = recommandation pour la qualité des sols définitive – protection de l'environnement et de la santé humaine; RQS<sub>EP</sub> = recommandation pour la qualité des sols pour la protection de l'eau souterraine potable; RQS<sub>MH-E</sub> = recommandation pour la qualité des sols relative aux migrations hors site - protection de l'environnement; RQS<sub>MH-SH</sub> = recommandation pour la qualité des sols relative aux migrations hors site – protection de la santé humaine; RQS<sub>OAI</sub>; recommandation pour la qualité des sols relative à la protection de la qualité de l'air intérieur. Le trait d'union correspond à une recommandation/valeur de vérification qui ne fait pas partie du scénario d'exposition pour l'utilisation de terrain dont il est question et qui n'est donc pas calculée.

<sup>d</sup> La RQS<sub>E</sub> est fondée sur la plus faible des recommandations visant la protection de l'environnement (contact avec le sol, ingestion de sol et d'aliments, protection de la vie aquatique). Dans le cas des HAP pour lesquels aucune recommandation visant le contact avec le sol n'a été élaborée, une RQS<sub>E</sub> globale n'a pas été calculée.

<sup>e</sup> Cette recommandation est préliminaire car les exigences minimales en matière de données, décrites dans le document du CCME (2006), n'ont pas été satisfaites. La valeur indiquée peut être utilisée par les utilisateurs, mais elle n'a pas été utilisée pour calculer la RQS<sub>E</sub> globale.

<sup>f</sup> On suppose l'absence de biodégradation des HAP dans la subsurface (il s'agit d'une supposition très prudente).

<sup>g</sup> RQS<sub>VA</sub> visant la protection de la vie aquatique fondées sur le protocole du CCME (2006) et obtenues par rétrocalcul en utilisant des

<sup>1</sup> Les utilisateurs peuvent appliquer la recommandation pour la qualité des sols visant la protection de la vie aquatique à un lieu lorsque les impacts potentiels sur eux de surface avoisinantes constituent une préoccupation. La valeur recommandée peut être inférieure au seuil de détection commun dans certaines juridictions. Consultez le juridiction appropriée pour obtenir des renseignements supplémentaires.

<sup>o</sup> Les données étaient insuffisantes ou inadéquates pour le calcul d'une RQS<sub>E</sub> ou d'une RQS<sub>E</sub> provisoire et on n'a pas tenté de calculer une RQS<sub>SH</sub>, ou une RQS<sub>SH</sub> provisoire; par conséquent, les critères provisoires pour la qualité des sols (CCME, 1991) sont conservés comme la recommandation environnementale pour la qualité des sols pour l'utilisation de ce terrain. Toutefois, s'il existe un risque d'impacts potentiels sur les eaux de surface, il faut appliquer la recommandation pour la qualité des sols visant la protection de la vie aquatique (RQS<sub>VA</sub>). Consultez d'autres juridictions pour la protection de la santé humaine contre le phénanthrène.

### 1.2.5 Le HAP modèle sélectionné pour ce projet : le phénanthrène

Pour déterminer la substance à utiliser dans cette thèse, plusieurs facteurs ont été pris en compte. Tout d'abord, idéalement, la matrice contaminée compterait un seul composant, pour mesurer clairement son évolution durant les expériences. Le choix d'un mélange plus complexe, mais réaliste, aurait compliqué le suivi en augmentant à la fois le temps et le budget alloué aux analyses sans permettre une meilleure résolution des hypothèses proposées. Ainsi, nous avons décidé d'utiliser le phénanthrène (phe) seul comme contaminant pour les traitements de contamination de cette thèse (Figure 1-1).

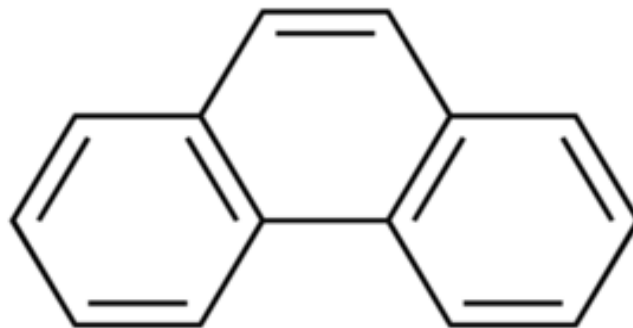


Figure 1-1 Structure moléculaire du phénanthrène.

Il s'agit d'une molécule composée de trois anneaux benzéniques dont la formule moléculaire est  $C_{14}H_{10}$  (**tableau 1-2**). Le choix du phe s'impose pour encore d'autres raisons avantageuses. D'abord, il s'agit d'un polluant organique persistant (POP), fait qui renforce l'intérêt socioéconomique du problème. Le phe ne se trouve pas parmi les HAP les plus toxiques. Cela nous a facilité son traitement lors des expériences ainsi que le traitement des résidus après la réalisation des études. Il est peu soluble dans l'eau ou dans l'air à température ambiante, ainsi la perte par évaporation se voit diminuée par rapport à d'autres HAP, comme le naphthalène. Simultanément, le phe est un peu moins hydrophobe que d'autres HAP de 4 anneaux ou plus, ce qui facilite son métabolisme par des microorganismes en conditions aérobies. Finalement, sa structure moléculaire le rend naturellement stable, quoiqu'il se dégrade lentement quand on l'expose à la chaleur, les UV, l'ozone ou le nitrate.

**Tableau 1-2 Sommaire des propriétés physicochimiques du phénanthrène.**

Propriété physico-chimique	Valeurs de référence
Poids moléculaire	178.23 g/mol
Point d'ébullition	338.9 °C à 760 mm Hg
Point de fusion	100 °C
Solubilité dans l'eau	1.10 mg/L à 25°C
Soluble dans le toluène, le benzène, l'éthanol, le diméthyle éther, l'acétone et le disulfide de carbone	e.g., 1000 mg dans 2.4 mL toluène
Densité	1.179 à 25°C
Log K <sub>ow</sub>	4.46
Log K <sub>oa</sub>	7.57

### 1.3 Les techniques de remédiation

Les techniques de décontamination des sols se divisent en trois volets : les traitements physiques, chimiques et biologiques.

#### 1.3.1 Les techniques physico-chimiques et leurs limitations

Diverses méthodes de remédiation *ex situ* et *in situ* ont été utilisées pour traiter les sols, les eaux souterraines et les cours d'eau contaminés par les HAP. Les traitements physiques consistent soit à l'immobilisation des polluants à travers des moyens physiques soit à l'extraction vers un milieu facilement traitable comme l'air ou l'eau.

Les méthodes d'immobilisation physique empêchent la dissémination des polluants vers le milieu naturel, sans viser leur dégradation. Parmi ces dernières, le confinement cible la limitation du contact du milieu qui a subi un événement de pollution avec un autre milieu qui se trouve aux environs. Cette méthode peut s'appliquer *in situ* ou *ex situ* avec des matériaux tels que l'argile, des ciments ou des géomembranes artificielles. Malgré la facilité de mise en place de ce système, ceci présente l'inconvénient de rendre inutilisable le terrain affecté (Simonnot et Croze 2008). Une autre méthode de stabilisation est l'ajout de charbon actif granulaire aux sédiments

contaminés, qui lie fortement les HAP et les empêchent de se déplacer dans les eaux (Zimmerman et al. 2004).

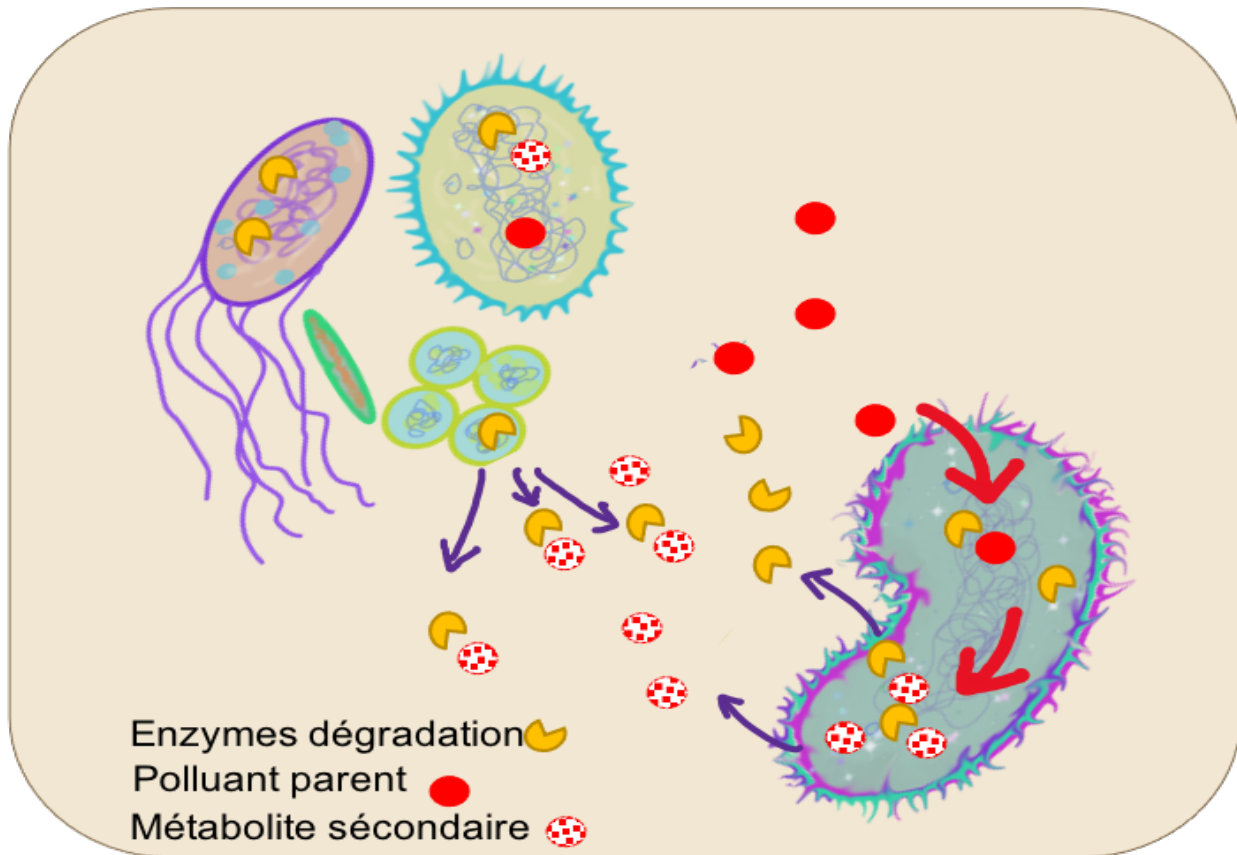
La désorption thermique consiste à provoquer la volatilisation du polluant par l'entremise d'un traitement à la chaleur. Ceux-ci peuvent ainsi se détacher de la matrice solide. Il s'agit d'une technique appliquée *ex situ* qui se trouve parmi les plus efficaces, puisqu'elle permet la réutilisation du sol rapidement (quelques jours). Néanmoins, en fonction de la quantité de terre à traiter, ceci peut devenir très coûteux lorsque le volume augmente (Simonnot et Croze 2008).

Les traitements chimiques consistent à dégrader ou extraire la pollution à travers l'ajout d'une substance qui peut être réactive envers les polluants ou qui peut servir au lavage du sol. Parmi les processus les plus utilisés, on compte l'oxydation et le lavage par solvants ou par agents tensioactifs. L'oxydation chimique consiste à détruire les polluants organiques sous l'action d'un oxydant. Les réactifs de Fenton, le peroxyde d'hydrogène, le persulfate activé, le permanganate et l'ozone sont des agents couramment utilisés (Huling et Pivetz 2006; Tsitonaki et al. 2010; Lemaire et al. 2013). Ces réactifs génèrent des radicaux libres et d'autres espèces réactives qui sont capables d'attaquer une large gamme d'HAP. Si la réaction est complète, on arrive à convertir les hydrocarbures en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O. Ce système implique cependant la formation de vapeurs d'hydrocarbures, de sorte qu'il est nécessaire d'ajouter un système d'extraction de vapeur (Simonnot et Croze 2008). Aussi, quand appliquée *in situ*, l'oxydation d'espèces non-cibles telle que la matière organique du sol complique le processus de remédiation, car elle consomme grandes quantités d'oxydant (Lemaire et al. 2013).

Le lavage consiste à mettre en contact la terre excavée avec un solvant dans une unité de lavage. L'eau est la plus utilisée, en raison des faibles coûts, mais ceci ne suffit pas à extraire les polluants organiques non aqueux, dont les HAP. Ainsi, il est nécessaire d'utiliser des agents tensioactifs tels que mentionnés plus haut. Le lavage *in situ* nécessite de trouver le point de saturation du sol avec le solvant et ensuite extraire celui-ci chargé en polluants dans la mesure où il n'existe pas une barrière en profondeur dans le terrain (Simonnot et Croze 2008).

### **1.3.2 Dégradation microbienne des HAP : Biodégradation**

Quant aux traitements biologiques, leur activité est basée sur l'utilisation du métabolisme d'organismes vivants pour dégrader ou bioaccumuler les polluants visés. La biodégradation



**Figure 1-2 Schéma de la bioremédiation.**

Durant la bioremédiation, les composés parent sont utilisés par les microorganismes par le biais d'un métabolisme intracellulaire ou extracellulaire. Les métabolites secondaires générés ainsi peuvent-être utilisés dans le cycle du carbone, dans le cas de la biodégradation des HAP. Plus des détails sont donnés dans les sections 1.3.2.1 à 1.3.2.3.

(Figure 1-2) est la plus utilisée et implique fréquemment l'utilisation de microorganismes. Il existe des variations, dont la phytoremédiation (voir section 1.3.3), et plus spécifiquement, la rhizoremédiation (ou rhizodégradation), c'est-à-dire la dégradation de polluants dans l'environnement des racines, notamment par les microorganismes qui y habitent et qui ont la capacité à consommer le carbone provenant du polluant.

### **1.3.2.1 Les voies métaboliques bactériennes pour la dégradation aérobie des HAP**

Les microorganismes ont développé une variété de voies métaboliques pour dégrader différents composés aromatiques. Ces voies métaboliques sont étudiées depuis plus de 50 ans, et ont été élucidées en utilisant le naphthalène et le phénanthrène comme contaminants modèles et

principalement *Pseudomonas aeruginosa* G7 comme dégradeur modèle (Goyal et Zylstra 1997). Depuis, la liste des bactéries et archées qui dégradent des HAP croît sans cesse. À ce jour, on trouve, entre autres, des représentants des genres *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* (Aitken et al. 1998; Nie et al. 2016; Jiang et al. 2015), *Rhodococcus*, *Corynebacterium*, *Bacillus* (Aitken et al. 1998), *Moraxella*, *Delftia* (Vacca et al. 2005), *Burkholderia* (Vacca et al. 2005; Nie et al. 2016; Aitken et al. 1998), *Collimonas* (Jiang et al. 2015), *Acidobacterium* (Jiang et al. 2015), *Streptomyces*, *Staphylococcus* (Jiang et al. 2015), *Agrobacterium* (Aitken et al. 1998) *Sphingomonas* (Aitken et al. 1998), *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Sinorhizobium*, *Aeromonas*, *Acidovorax*, *Hydrogenophaga* et *Rhodoferax* (Kanaly et al. 2000). Ces espèces se trouvent souvent dans le sol distant et certaines colonisent la rhizosphère des arbres des genres *Salix* (Bell et al. 2016) et *Populus* (Correa-García et al. 2021; Rheault et al. 2020). Le lecteur peut se référer au chapitre 2 de cette thèse pour plus de détails sur le rôle des microorganismes dans la rhizoremédiation et la phytoremédiation des HAP et d'autres hydrocarbures.

Toutes les voies de dégradation connues requièrent la présence d'un accepteur d'électrons terminal (AET). Ainsi, en fonction de la nature de cet AET, les voies peuvent être classées comme aérobies ou anaérobies. Pour l'exécution des expériences de cette thèse, nous avons travaillé dans un environnement aérobie. Par conséquent, seules les voies aérobies seront discutées pour fin de concision. Un schéma des voies de dégradation aérobie des HAP est présenté dans la Figure 1-3. Néanmoins, on peut trouver des revues de littérature sur les voies de dégradations anaérobies comme celle publiée par Fuchs (2008).

Autant pour les processus aérobies qu'anaérobies de biodégradation des hydrocarbures aromatiques, les voies sont divisées en deux étapes : premièrement, les **voies supérieures** : allant du composé aromatique original aux intermédiaires. Ensuite, les **voies inférieures** : qui va du clivage des anneaux des molécules intermédiaires aux molécules finales (Cafaro et al. 2004; Carmona et al. 2009).

Dans la nature, l'oxygène est l'agent oxydant sur lequel plusieurs réactions biologiques reposent. Ainsi, beaucoup de bactéries l'utiliseront comme AET, de sorte que la première étape de la voie métabolique (**voies supérieures**) implique l'action des oxygénases qui transforment un anneau benzénique en introduisant un nombre variable d'atomes d'oxygène sur des atomes de carbones adjacents. Il existe principalement deux types d'oxygénases :

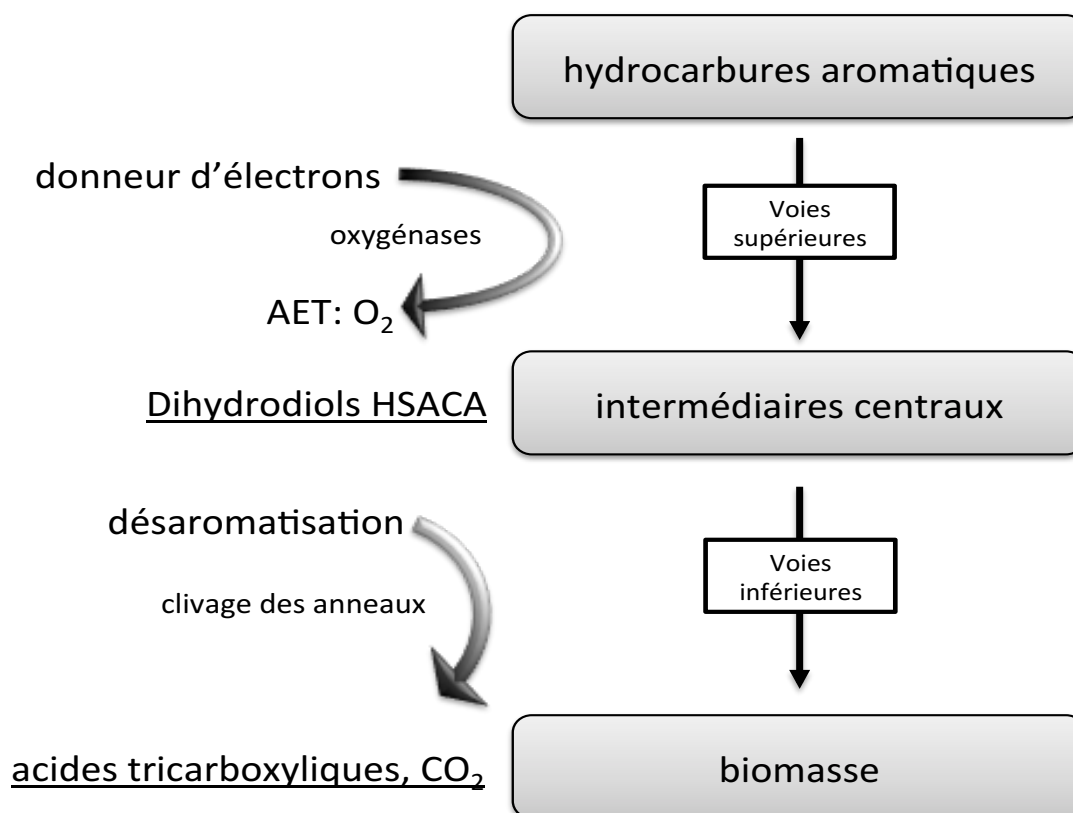
Les monooxygénases catalysent le clivage de la liaison oxygène-oxygène de l'O<sub>2</sub>, en introduisant un de ces atomes dans l'anneau aromatique et l'autre est réduit en H<sub>2</sub>O. Les monooxygénases peuvent oxyder les hydrocarbures monoaromatiques ainsi que les polyaromatiques. Ces



enzymes ajoutent séquentiellement des groupes hydroxyle au noyau aromatique, formant des phénols et puis des catéchols.

Les dioxygénases catalysent, dans la voie supérieure, la dihydroxylation réductrice du cycle aromatique formant des cis-dihydrodiols. Ces dihydrodiols sont transformés en catéchols par d'autres enzymes spécifiques, arrivant ainsi aux intermédiaires centraux (Parales et Resnick 2004). Le cis-dihydrodiol ainsi formé suit des réactions de réaromatisation pour former des molécules intermédiaires dihydroxylés (Kanaly et al. 2000). Les intermédiaires centraux qui sont des non-catéchols sont des acides carboxyliques aromatiques hydroxy-substitués (Fetzner 2012). Parmi les produits intermédiaires rapportés se trouvent l'acide 2-hydroxy-1-naphtoïc et l'acide salicylique, trouvés par Mallick et Dutta (2008) dans la dégradation du naphthalène par *Staphylococcus sp.* souche PN/Y.

La première étape **des voies inférieures** comprend la désaromatisation des intermédiaires centraux, qui, par la suite, subissent un clivage ortho-, méta- ou para- par des dioxygénases



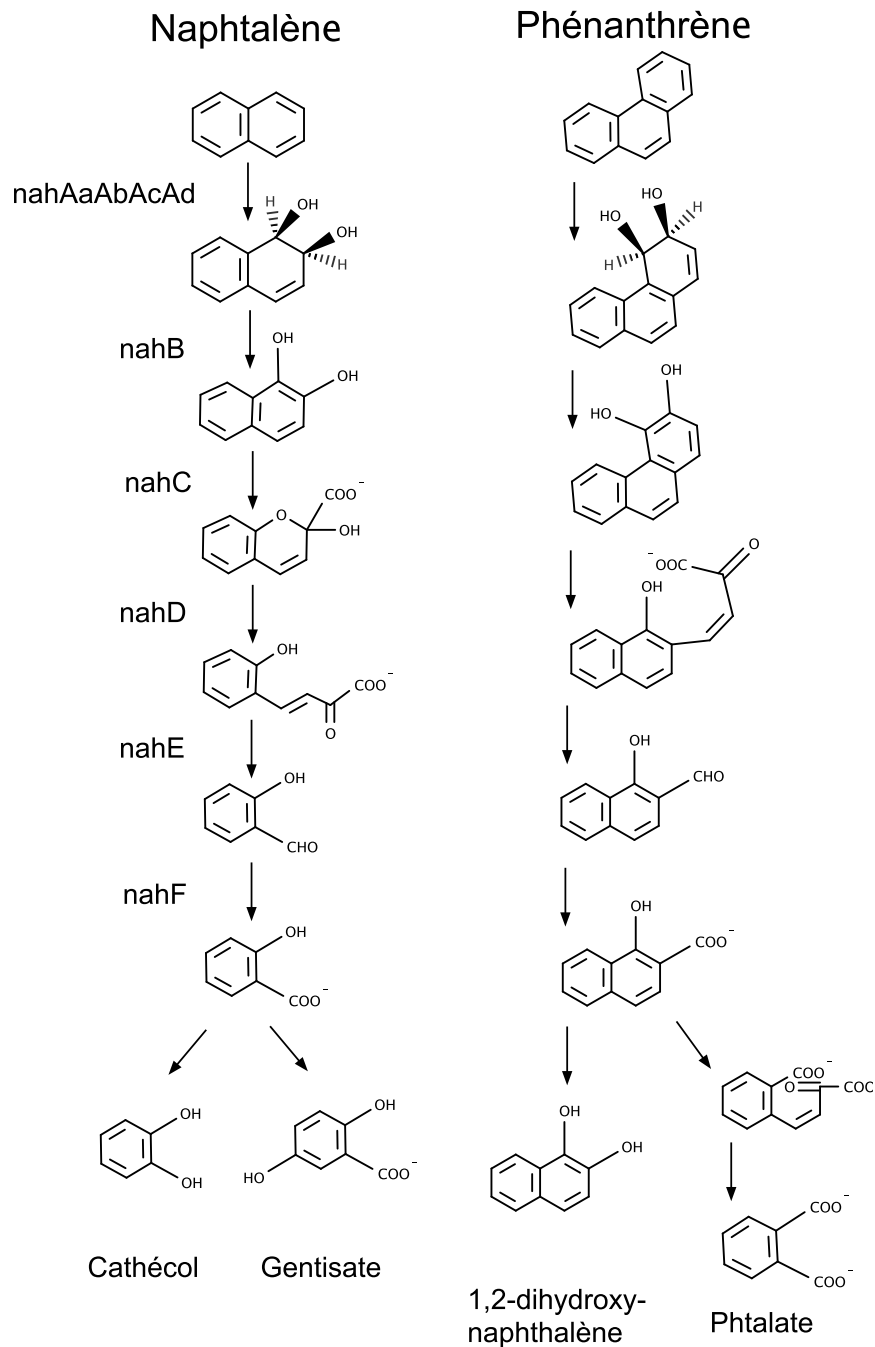
**Figure 1-3** Représentation schématique des voies métaboliques de dégradation. Dégradation des hydrocarbures aromatiques par des bactéries dans des conditions aérobies. Les voies supérieures regroupent le passage de la molécule d'hydrocarbure vers les intermédiaires centraux. Adapté (Ladino-Orjuela et al. 2016).

(Harwood et Parales 1996). Le clivage des anneaux d'acides carboxyliques aromatiques hydroxy-substitués est catalysé par des enzymes qui appartiennent à la superfamille des cupins. La plupart des dioxygénases de clivage de type cupin utilisent un centre Fe (II) pour la catalyse et un mécanisme d'action similaire aux dioxygénases extradiol (Fetzner 2012). En bref, suite aux réactions des voies inférieures les anneaux sont clivés, fait qui transforme les molécules intermédiaires dihydroxylées dans des métabolites intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques.

### **1.3.2.2 Gènes, enzymes et protéines impliqués dans la biodégradation**

La section précédente présentait un sommaire du processus de dégradation des HAP vers des intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques. Les enzymes et les étapes ont été principalement décrites grâce à des études réalisées majoritairement sur la dégradation du naphthalène en utilisant comme modèle biologique diverses souches bactériennes, dont les premières furent *Pseudomonas putida* PpG7 and NCIB 9816-4. La voie métabolique de la dégradation du naphthalène fut décrite en premier par Davis and Evans (1964) et les détails des étapes et l'identité des métabolites intermédiaires furent éclaircis par Eaton and Chapman plusieurs décennies plus tard (1992).

Les premières étapes, connues comme les voies supérieures, sont relativement semblables pour plusieurs HAP (e.g. le naphthalène, le phénanthrène et l'anthracène) et sont résumées dans la Figure 1-4. Lors du métabolisme du naphthalène, la première étape consiste en l'incorporation d'oxygène moléculaire dans un des noyaux aromatiques par un système enzymatique à composants multiples des dioxygénases hydroxylantes d'anneaux aromatiques (RHD, nahAaAbAcAd). Cette première dioxygénase hydroxylante transforme le naphthalène en *cis*-naphthalène dihydrodiol (Jeffrey et al. 1975). Depuis son identification, le complexe RHD a été traditionnellement utilisé comme marqueur moléculaire de la dégradation bactérienne des HAP grâce la création des amorces spécifiques pour la quantification en qPCR (Cébron et al. 2008). Ensuite, le *cis*-naphthalène dihydrodiol est transformé en 1,2-dihydroxynaphthalène par l'enzyme *cis*-dihydrodiol déshydrogénase (nahB).



**Figure 1-4 Voies de dégradation du naphthalène et du phénanthrène**

Ce produit subira le premier métaclivage par l'enzyme 1,2-dihydroxynaphthalène dioxygénase (nahC, du groupe des dioxygénases extradiol), donnant un produit très instable qui virera à sa forme acide quasi instantanément : l'acide 2-hydroxychromène-2-carboxilique (Eaton et Chapman 1992). Après, une isomérase (nahD) et une aldolase (nahE) transforment l'acide

carboxylique en salicyaldéhyde. Une déshydrogénase (nahF) catalyse la conversion en salicylate qui sera par la suite transformé dans un intermédiaire du cycle de Krebs, soit par la voie du catéchol ou celle du gentisate, dépendamment de la bactérie (Yen et al. 1988). *P. putida* peut suivre la voie du catéchol, qui se termine par la production de pyruvate et d'acétaldéhyde (Yen et al. 1988). D'autres souches de *P. putida*, ou des genres comme *Burkholderia*, *Agrobacterium* ou *Rhodococcus* (Eulberg et al. 1997) suivent la voie du catéchol pour former de l'acide cis, cis-muconique ou la voie du protocatéchuate pour former du 3-carboxymuconate. Suivant la voie du gentisate, *Polaromonas naphthalenivorans* et *Ralstonia* transforment le salicylate en fumarate (Pumphrey et Madsen 2007; Fuenmayor et al. 1998; Zhou et al. 2002).

Les dioxygénases qui s'occupent des clivages des anneaux sont connues comme dioxygénases extradiol ou intradiol en fonction de la position des carbones auprès desquels elles font le clivage. Les dioxygénases extradiol sont connues pour leurs rôles dans la dégradation bactérienne des hydrocarbures (Sipilä et al. 2006) et ont récemment été identifiées dans les voies de dégradation utilisés par des champignons (Gonzalez et al. 2018). Les dioxygénases extradiol catalysent la fission des anneaux entre les positions C2 et C3 du catéchol et entre les positions C2 et C4 ou C4 et C5 du protocatéchuate. Les dioxygénases intradiol font le clivage de l'anneau aromatique à la position C1-C2 du catéchol ou de ses dérivés par l'incorporation d'oxygène moléculaire (Guzik et al. 2013).

Les champignons constituent seulement 21% des organismes brevetés pour la bioremédiation des sols contaminés avec des hydrocarbures, et apparaissent loin derrière les bactéries dans la littérature, étant présents dans seulement 17% des publications (Quintella et al. 2019). Cependant, la présence de champignons lors de la bioremédiation garantit un processus de bioremédiation plus robuste face aux changements climatiques. En effet, la dégradation des HAP par des champignons ne remplace pas la dégradation par les bactéries, mais vient plutôt la compléter, notamment à cause de la capacité des champignons de sécréter une variété d'enzymes hydrolytiques qui agissent directement dans les sols contaminés de façon extracellulaire (Messias et al. 2009; Balaji et Ebenezer 2008).

Les champignons lignolytiques sont particulièrement efficaces pour la dégradation des HAP grâce à la faible spécificité des peroxydases (Acevedo et al. 2010) et des laccases (Zhang et al. 2015; Li et al. 2014) extracellulaires qu'ils produisent pour dégrader la lignine et qui participent dans l'oxydation initial des HAP. Le système lignolytique regroupe quatre types d'enzymes : la peroxydase de lignine (LiP), la peroxydase dépendante de la manganèse (MnP), la phénol oxydase (laccase, tyrosinase) et les enzymes productrices d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Novotný et al. 2004).

*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* et *Pleurotus ostreatus* sont capables de dégrader l'anthracène et le pyrène, mais leur taux de dégradation dépend des niveaux de MnP et laccases sécrétées dans le sol (Novotný et al. 2004). Ainsi, la dégradation fongique n'est pas aussi efficace et rapide que la dégradation bactérienne, mais elle très généraliste. La dégradation des HAP par des enzymes fongiques a été revue récemment par Kadri et al. (2017) où l'on peut trouver une liste exhaustive des microorganismes fongiques capables de dégrader les HAP ainsi que les métabolites qu'ils produisent.

Le système lignolytique de dégradation n'est pas le seul utilisé par des champignons pour la dégradation des HAP. Dans une étude métatranscriptomique des racines du saule *Salix purpurea* cv. « Fish Creek » dans des sols contaminés, malgré que l'abondance des transcrits des *Basidiomycota* ai augmenté suite à la contamination du sol, les monooxygénases dégradant les hydrocarbures n'étaient pas présentes parmi les contigs d'ARNm récupérés (Gonzalez et al. 2018). Dans cette étude, des ARNm fongiques codants pour deux protéines peu décrites de la famille des dioxygénases ont été détectés, incluant une dioxygénase extradiol à clivage d'anneau aromatique connue pour son rôle dans la dégradation bactérienne des HAP (Peng et al. 2008; Cerniglia 1992; Gibson et Parales 2000; Eaton et Chapman 1992), mais peu connue chez les champignons. D'autres enzymes impliquées dans la dégradation des HAP, comme les LiP, la MnP ou les laccases n'ont pas été identifiées dans l'étude, mais deux contigs codant pour des protéines de type glutathion peroxydase et une pour une peroxydase dépendante de la thiorédoxine ont été trouvés (Gonzalez et al. 2018).

D'autres enzymes généralistes des champignons peuvent aussi dégrader les HAP de façon intracellulaire. Par exemple, chez le champignon *Irpex lacteus*, le cytochrome-P450 est capable de cataboliser le phénanthrène en phénanthrène-9,10-dihydrodiol, réalisant ainsi la première étape de la dégradation (Cajthaml et al. 2002).

### **1.3.2.3 Les gènes HAP-RHD comme marqueurs moléculaires de la dégradation bactérienne des HAP**

Comme on l'a vu, l'étape initiale de la biodégradation des HAP se produit via l'incorporation d'oxygène moléculaire dans le noyau aromatique par le système enzymatique à composantes multiples des dioxygénases hydroxylantes d'anneaux aromatiques (RHD). La sous-unité alpha de ce système enzymatique a deux régions conservées : le centre Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> Rieske et le domaine

catalytique mononucléaire contenant du fer. Cette sous-unité est codée par des allèles différents chez les bactéries Gram-négatives et Gram-positives. Cébron et collaborateurs (2008) ont exploité cette diversité d'allèles pour développer deux paires d'amorces PCR qui peuvent être utilisées en tant que biomarqueurs moléculaires pour suivre et quantifier la diversité de dégradeurs bactériens dans un milieu donné. Ces biomarqueurs ont été amplement utilisés dans la littérature (Li et al. 2017; Guo et al. 2018; Storey et al. 2014; Cébron et al. 2009; Niepceon et al. 2014; Hong et al. 2015; Cavé-Radet et al. 2020; Yergeau et al. 2009a) et ont été choisis dans ce projet pour étudier la diversité de dégradeurs de phénanthrène.

### **1.3.3 La phytoremédiation**

La phytoremédiation est une stratégie de dépollution du sol, de l'eau ou de l'air utilisant les plantes, les algues et/ou les champignons pour retenir, dégrader, volatiliser, extraire ou immobiliser les polluants présents dans un environnement déterminé. Il s'agit d'une méthode peu coûteuse pour remédier les dommages infligés à l'environnement suite à un événement de contamination (Luo et al. 2015).

Ces techniques sont fortement liées aux interactions entre les plantes, le sol et les microorganismes qui y cohabitent. La phytoremédiation est un terme qui réunit plusieurs processus : la phytostabilisation, la phytovolatilisation, la phytoextraction, la phytodégradation et la rhizoremédiation (Figure 1-5).

#### **1.3.3.1 Technologies englobées par la phytoremédiation**

La phytostabilisation consiste à retenir certains contaminants dans le sol et prévenir sa dissémination dans les couches du sol. Les contaminants sont ainsi retenus dans la rhizosphère ou les racines de plantes. Ceci est un processus communément exploité pour prévenir la dispersion de contaminants provenant de résidus miniers (Wang et al. 2017). Les plantes tolérantes aux métaux lourds, comme *Agrostis* spp. (Pastor et al. 2015; Nandillon et al. 2019), et *Festuca* spp. (Pierzynski et al. 2002), sont très utilisées pour la phytostabilisation des sites miniers. La tolérance des plantes aux métaux lourds peut être améliorée par les champignons mycorhiziens à arbuscules (AMF), par la séquestration des métaux dans les réseaux d'hyphes

(Meier et al. 2012; Firdaus-e-Bareen et al. 2012). De plus, certains AMF peuvent sécréter la glycoprotéine glomaline qui peut fixer les métaux dans le sol (González-Chávez et al. 2004).

La phytovolatilisation consiste à l'absorption des contaminants par les racines et leur conversion dans un état gazeux et libération vers l'atmosphère. Ce processus s'appuie sur l'évapotranspiration des plantes, et les plantes avec des ratios d'évapotranspiration élevés sont utilisées pour décontaminer des sols suivant cette technique. Habituellement, ce sont les sols contaminés par des composants organiques volatils qui sont les plus susceptibles d'être décontaminés par phytovolatilisation (Limmer et Burken 2016). Par exemple, des peupliers ont été utilisés pour volatiliser le trichloréthylène (TCE) (Orchard et al. 2000; Doty et al. 2017).

La phytoextraction est similaire à la phytovolatilisation avec une différence fondamentale. Pendant ce processus, les contaminants absorbés par la plante (via les racines ou les feuilles) sont accumulés dans la biomasse aérienne au lieu de se faire rejeter dans l'atmosphère. La phytoextraction exploite la capacité de certaines espèces de plantes à hyperaccumuler des contaminants sans effets toxiques apparents. Ensuite, la biomasse aérienne de la plante est récoltée et traitée. Il est aussi possible d'extraire des métaux par le biais du *phytomining* (Wang et al. 2020), et il s'agit d'une technique prometteuse pour la récupération de métaux rares ou précieux (Novo et al. 2017) comme le nickel (Tognacchini et al. 2020) ou l'or (Anderson et al. 1999).

La phytodégradation implique la dégradation des polluants organiques en métabolites moins toxiques directement par des enzymes végétales ou par les microorganismes qui y habitent (endophytes). Les peupliers ont été utilisés avec succès pour la phytodégradation (Burken et Schnoor 1997; Chang et al. 2005).

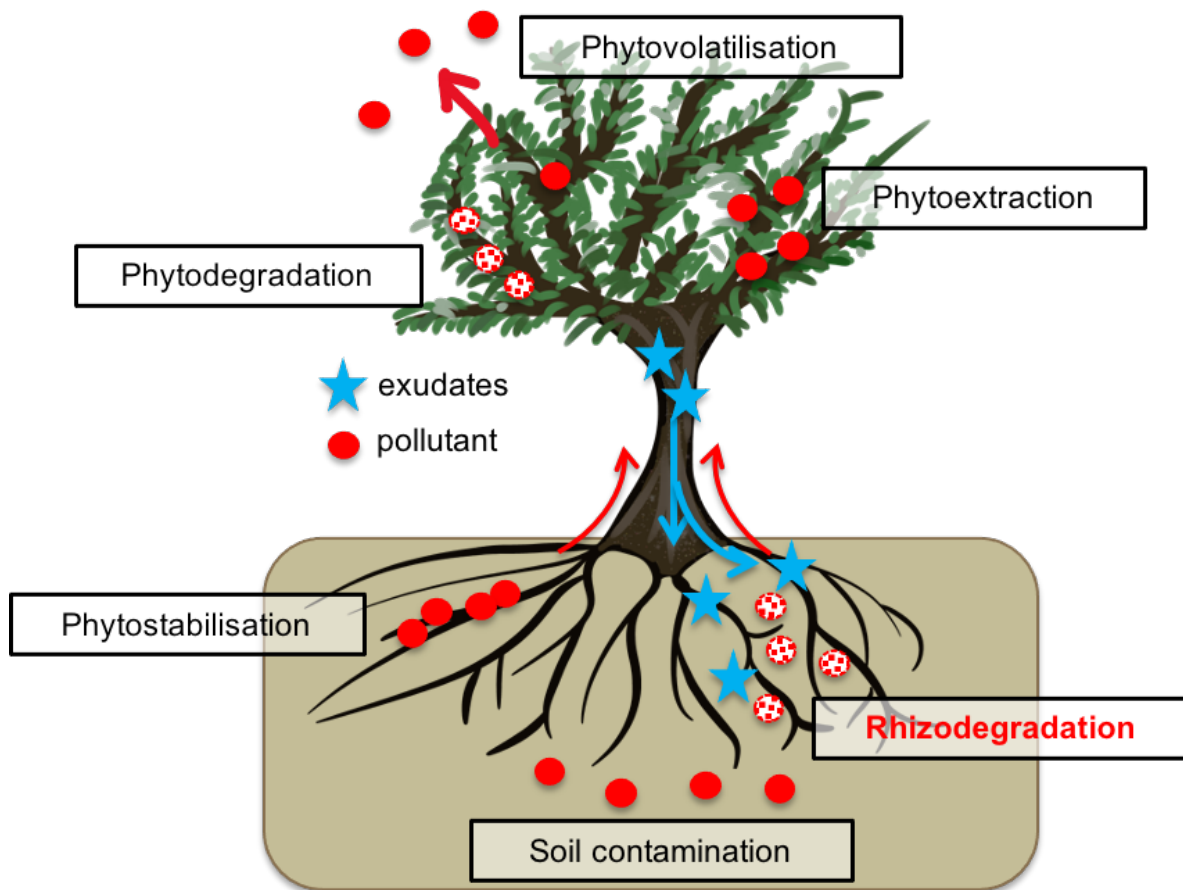
Lors de la rhizoremédiation, les microorganismes qui habitent dans la rhizosphère s'occupent de la dégradation des contaminants en conjonction avec des enzymes sécrétées par les racines (Correa-García et al. 2018). En fonction de l'hydrophobicité de la molécule, ce processus sera partiellement entamé par la plante ou complètement réalisé par les microorganismes. La revue de littérature présentée au chapitre 2 approfondi ce concept central à ma thèse en présentant des exemples de rhizoremédiation ainsi que certaines technologies de pointe utiles pour son amélioration.

Les mécanismes mentionnés précédemment ne sont pas mutuellement exclusifs. D'ailleurs, le même contaminant peut passer par plusieurs voies de remédiation en même temps. Plus spécifiquement, quand il s'agit des contaminants organiques, les plantes et leurs microbiotes

associés peuvent utiliser les polluants comme source d'énergie ou de carbone. La plante héberge dans sa rhizosphère ou ses racines les microorganismes qui dégradent les polluants pour obtenir de l'énergie ou les utiliser comme source de carbone, d'azote, voire d'autres éléments. Comme résultat, la rhizosphère comporte moins de contaminants et de métabolites nocifs. Des études ont montré que l'augmentation de la biomasse racinaire était corrélée au taux de décontamination (Gleba et al. 1999). En contrepartie, la plante libère des exsudats qui contribuent à la croissance des microorganismes (Quiza et al. 2015).

Néanmoins, d'autres études montrent que l'exposition à des contaminants particuliers peut limiter le développement des racines, empêchant ainsi l'accomplissement de la phytoremédiation. Ainsi, mieux comprendre ce processus constitue un des défis pour augmenter le succès des technologies de phytoremédiation.

L'effet de la plante dans la biodégradation des HAP a été constaté à plusieurs reprises dans la littérature, et aujourd'hui personne ne doute son effet bénéfique pour améliorer la dégradation de



**Figure 1-5 Schéma des processus impliqués dans la phytoremédiation.**  
 Les noms des processus apparaissent en anglais : Phytovolatilisation : Phytovolatilisation ;  
 Phytoextraction : phytoextraction ; Rhizodegradation : Rhizodégradation ; Soil contamination :  
 contaminants du sol ; Phytostabilisation : phytostabilisation ; Phytodegradation :  
 Phytodégradation, exudates : exsudats ; pollutant : polluant.

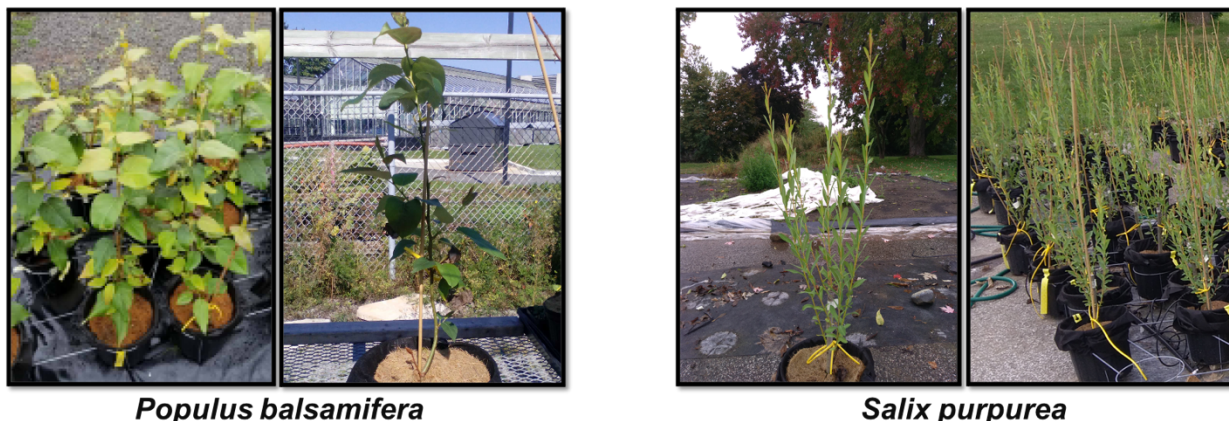


certaines composantes. Néanmoins, il est important de considérer les différences entre les types de plantes (e.g., les arbres vs les herbes) dans la phytoremédiation (Cook et Hesterberg 2013), parce que la morphologie et la physiologie de la plante déterminent son utilité lors de la dégradation des contaminants. Par exemple, les herbes développent des systèmes racinaires qui sont nettement plus petits et arrivent généralement à des couches plus superficielles des sols par rapport aux arbres. Aussi, certaines espèces d'arbres, tels que les saules et les peupliers, sont très utiles pour la phytoextraction des contaminants, car durant la récolte de la biomasse aérienne, les souches avec leurs racines peuvent être laissées dans le sol, permettant ainsi la production de rejets dans les années à venir pour favoriser une phytoextraction en continu (Labrecque et Lajeunesse 2017).

Mais malgré certains avantages que comporte l'utilisation d'espèces ligneuses, avant les années 2000, la majorité des plans de phytoremédiation comportaient des espèces végétales non arborescentes. Seulement une poignée d'études avaient évalué l'effet des arbres, tel que les saules (*Salix* sp.) (Vervaeke et al. 2003), les peupliers (*Populus* sp.) (Spriggs et al. 2005; Widdowson et al. 2005; Zalesny et al. 2005) ou le bouleau (*Betula* sp.) (Sipilä et al. 2008). Les résultats concernant la biodégradation des HAP n'étaient pas homogènes à travers les études. L'effet du bouleau dans la rhizoremédiation était variable en fonction de la concentration des HAP. Dans le cas d'une grande concentration d'HAP (1200 mg · kg<sup>-1</sup> total), la présence du bouleau augmentait le taux de dégradation d'anthracène et de pyrène dans la rhizosphère en comparaison avec un sol sans plante (Sipilä et al. 2008). Au contraire, la présence du bouleau ne causait pas de différences dans le taux de dégradation du phénanthrène, tandis que le fluoranthène était plus dégradé dans le sol non planté. Fait intéressant, quand les bouleaux étaient exposés à des doses plus faibles d'HAP (300 mg · kg<sup>-1</sup> total), autant l'anthracène que le fluoranthène subissaient des taux de dissipation avoisinant 100% dans la rhizosphère et dans le sol distant, alors que le phénanthrène et le pyrène étaient significativement mieux dégradés dans le sol distant que dans la rhizosphère (taux de dégradation de 95% vs 58 et 61% respectivement) (Sipilä et al. 2008).

### **1.3.3.2 *Populus* et *Salix* comme genres modèles végétaux**

Pour l'accomplissement des objectifs de cette thèse, le peuplier baumier (*Populus balsamifera*) et le saule pourpre (*Salix purpurea* cv. « Fish Creek ») ont été utilisés comme systèmes modèles pour la phytoremédiation du phénanthrène (Figure 1- 6).



**Figure 1-6 Exemplaires des deux espèces de Salicacées utilisées dans ce projet.**

Le choix du peuplier baumier été justifié pour plusieurs raisons. D'un côté, les connaissances acquises en génomique et sa vaste aire de distribution au Canada font du peuplier un bon choix pour les systèmes de phytoremédiation locaux. De plus, la distribution des peupliers s'étend à un large spectre de zones climatiques, montrant le potentiel de ce genre à supporter des conditions environnementales variées. Ceci fait des peupliers des candidats parfaits pour les expériences de tolérance au stress. Le genre *Populus* compte entre 30 et 35 espèces (Eckenwalder 1996). La variabilité génétique à l'intérieur du genre permet la sélection de génotypes qui soient adaptés à différentes conditions (Lubrano 1992; Chen et Polle 2010). Il s'agit aussi d'une espèce d'intérêt économique parce qu'elle constitue une importante ressource pour les industries du papier, de la biomasse et du bois, entre autres (Sannigrahi et al. 2010; Polle et al. 2013).

Également, *Populus* est un arbre modèle bien établi pour la recherche moléculaire et biotechnologique spécialement depuis 2006, quand la séquence complète du génome de *Populus trichocarpa* (Torr. and Gray) a été publiée (Tuskan et al. 2006). Ils existent des techniques qui permettent la production continue des plantes homogènes de *Populus* (Beckers et al. 2017; Kang et al. 2009). Il s'agit d'un arbre compatible avec la culture in vitro (Kang et al. 2009), et qui se propage facilement aussi par boutures (Lubrano 1992). La reproduction par boutures est intéressante dû à son coût réduit, l'obtention relativement rapide des arbres et la facilité de la mise en place. Ainsi, on adoptera cette méthode pour la multiplication des clones pour mon projet de recherche, réduisant aussi le facteur de variabilité génétique de la plante hôte.

Dans le cas du choix du saule pourpre, la variété « Fish Creek » a été privilégiée pour son adaptabilité aux conditions climatiques de la région, pour sa capacité de croissance rapide et

parce qu'elle est une variété très étudiée et exploitée à des fins de remédiation et de production de biomasse (Bell et al. 2014a; Gonzalez et al. 2015; Cameron et al. 2010; Dagher et al. 2020; Gonzalez et al. 2018). L'autre avantage du saule pourpre consiste à la rapidité et au haut taux de succès lors de l'enracinement des boutures (Cameron et al. 2010).

#### **1.4 Le sol comme écosystème complexe**

Le sol est formé par la couche la plus superficielle de la surface de la Terre. Cela constitue le support physico-chimique sur et dans lequel se développent toutes les activités des organismes terrestres, incluant l'être humain. À première vue, le sol peut avoir l'air de rien de plus que de la roche triturée, mais en réalité, il s'agit d'un de plus complexes systèmes connus sur Terre, capable de gérer des processus à toutes les échelles, du moléculaire jusqu'au régional, soutenant ainsi des processus physiques et chimiques vitaux pour le maintien de la vie terrestre. Le sol absorbe la précipitation et la libère graduellement vers les couches plus profondes où l'eau arrive aux racines des plantes et nourrit autant les aquifères souterrains que les cours d'eau superficielles. Le sol abrite les semences des plantes et est le support physique matricielle nécessaire pour leur développement, ainsi qu'une source des nutriments. Le sol, par les microorganismes qui y habitent, dégrade les déchets animaux ou végétaux, en recyclant ainsi la matière organique et la retournant aux différents cycles biogéochimiques. Lors de ces processus, le sol régule les flux de gaz, dont certains, tels que le CO<sub>2</sub>, le CH<sub>4</sub> ou le N<sub>2</sub>O, ont un impact majeur sur le climat par le biais de leur effet de serre. Le sol, via les microorganismes y habitant, dégrade des toxines et des contaminants, et inhibe des pathogènes, les rendant inoffensifs pour l'être humain.

À part la roche érodée et la matière organique en décomposition, le sol est formé par un mélange d'animaux et microorganismes, des gaz et de l'eau. La composition relative de ces composants varie aux échelles locales et régionales, ce qui fait du sol un système hautement variable. L'hétérogénéité du sol contribue à l'apparition de différentes niches écologiques exploitables par une grande variété d'espèces. Il existe toute une communauté de microorganismes habitant les sols, qui va des archées jusqu'aux algues, en passant par les bactéries, protistes et champignons, entre autres. On peut y trouver également des organismes de tailles plus importantes, telle que la mésofaune et la macrofaune : des arthropodes, des annélides ou bien des mammifères. Le sol constitue un écosystème, dont ses interfaces physique, chimique et biologique s'entremêlent pour

soutenir d'un côté les cycles biogéochimiques et de l'autre, les services écosystémiques qui en émanent (Ghaley et al. 2014; Adhikari et Hartemink 2016; Barrios 2007; Faucon et al. 2017).

#### **1.4.1 La plante et l'environnement de la rhizosphère**

Les plantes jouent un rôle central dans les biomes, en tant que producteurs primaires en fixant le carbone atmosphérique. Ainsi, une de leurs fonctions principales consiste à approvisionner les écosystèmes de matière organique, mais ce n'est pas la seule. Les plantes, dont les arbres particulièrement, contribuent à l'hétérogénéité spatiale avec leurs systèmes racinaires qui pénètrent les sols en changeant leur structure. Aussi, les plantes génèrent des débris végétaux et contribuent à la formation des différents microhabitats, comme la phyllosphère ou la rhizosphère où les microorganismes peuvent prospérer.

Le terme « rhizosphère » date du début du XX<sup>e</sup> siècle (Hiltner 1904). La rhizosphère a été traditionnellement définie comme étant le sol adjacent aux racines des plantes, soit la fraction du sol affecté par les exsudats de la plante, mais on sait que la plante peut affecter les communautés microbiennes au-delà du sol en intime contact avec les racines par le biais des gradients gazeux (de la Porte et al. 2020). Le sol étant sous l'influence de la plante constitue une niche unique pour la colonisation microbienne. On connaît l'existence de l'effet rhizosphère depuis les années 30, lorsque Starkey (1931; 1938) l'a défini comme étant l'ensemble des processus ayant lieu à l'interface plante-sol, incluant l'exsudation racinaire, l'activité microbienne, les échanges génétiques et la transformation des nutriments. Depuis, beaucoup d'études ont recueilli des données qui soutiennent son existence et décrivent la nature des relations entre le microbiote du sol et le système racinaire. Plusieurs articles récents synthétisent cette information (Lareen et al. 2016; Berendsen et al. 2012; Huang et al. 2014; Ballhausen et de Boer 2016; Oburger et Schmidt 2016; Quiza et al. 2015). Ces relations entre la plante et son microbiote sont essentielles pour la productivité et la santé de la plante. Premièrement, les microorganismes habitant la rhizosphère altèrent la composition des nutriments disponibles pour la plante à travers la décomposition de la matière organique et la minéralisation des éléments tels que l'azote ou le phosphore. Deuxièmement, le microbiote de la rhizosphère aide à maintenir la santé de la plante face aux pathogènes à travers des mécanismes qui incluent la compétition pour les micronutriments, la production d'enzymes lytiques, la production des substances antibiotiques ou la consommation des substances stimulatrices des pathogènes (Doornbos et al. 2012). Finalement, le microbiote de la rhizosphère joue un rôle important dans la survie de la plante face aux stress

environnementaux, telle que la sécheresse (Rolli et al. 2015), la salinité (Luo et al. 2009) ou la contamination du sol (Yergeau et al. 2015a; Bell et al. 2014a).

## **1.4.2 Microorganismes**

La minéralisation des nutriments à travers la décomposition de la matière organique se trouve parmi les activités microbiennes les plus importantes pour le fonctionnement des sols et le maintien des cycles biogéochimiques (Marschner et Rengel 2007). Mis à part les plantes, les microorganismes contribuent grandement à l'équilibre du C dans les écosystèmes du sol (Trivedi et al. 2013; Ramin et Allison 2019). Les microorganismes du sol jouent plusieurs rôles en tant que décomposeurs, symbiotes ou pathogènes, influençant ainsi le renouvellement du C mais aussi d'autres nutriments, intervenant dans plusieurs cycles de nutriments. (Trivedi et al. 2013). Cela maintient le réservoir de nutriments tel que l'azote (Kuypers et al. 2018) ou le phosphore (Deubel et Merbach 2005) disponible pour absorption par les plantes. C'est à travers ces activités que les microorganismes rendent des services écosystémiques très importants dans les sols. La remédiation des sols contaminés par des hydrocarbures contribue aussi au recyclage du carbone, mais à partir d'une source alternative (Cowie et al. 2010) et permet à ces contaminants de réintégrer le cycle des nutriments à travers des molécules moins complexes et inoffensives, comme le CO<sub>2</sub> généré par la respiration bactérienne. Dans cette section, on abordera la contribution de divers microorganismes aux principaux processus écosystémiques. Dans le chapitre 2 de cette thèse, le rôle des microorganismes dans la dégradation des hydrocarbures, dont les HAP, est discuté en profondeur.

### **1.4.2.1 Bactéries, archées et champignons**

Six taxa supérieurs dominent les communautés de bactéries dans les sols : *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia* and *Planctomycetes* (Lladó et al. 2017; Lauber et al. 2009; Fierer 2017). Mais plusieurs paramètres définissent la composition exacte des communautés à une échelle de microhabitat, notamment le pH (Fierer et Jackson 2006), suivi par le contenu en matière organique et la disponibilité des nutriments (Kuramae et al. 2012) ainsi que les interactions biotiques (de Menezes et al. 2018; Bray et al. 2019; Menzie et al. 2016; Hünninghaus et al. 2017; plus de détail dans les sections subséquentes). La variation spatiale de ces paramètres fait en sorte que les bactéries (et beaucoup d'autres

microorganismes, par conséquent) ne sont pas distribuées de façon uniforme dans le sol. Plutôt, l'abondance de bactéries se voit fortement augmentée dans des *hot spots* où s'accumule la matière organique : les débris végétaux, ou autour du système racine (dans la rhizosphère) (Kuzyakov et Blagodatskaya 2015). Chaque niche a des caractéristiques différentes qui rendent les communautés des bactéries y habitant relativement spécifiques. D'ailleurs, les différences observées dans la composition des exsudats racinaires entre espèces végétales déterminent la structure de la communauté bactérienne à travers les changements des composés chimiques excrétés par la plante (Quiza et al. 2015).

La dégradation de la matière organique en décomposition dans le sol, notamment la biomasse végétale, a été traditionnellement associée aux champignons. Mais de plus en plus d'études montrent que les bactéries sont aussi capables de dégrader les débris végétaux, fait qui rend les bactéries des acteurs clés du cycle du carbone (Ramin et Allison 2019). Par exemple, dans les forêts de conifères les bactéries incorporent plus de carbone dérivé de la cellulose végétale que les champignons (Štursová et al. 2012), avec des membres des phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* et *Acidobacteria* accumulant la plupart de cette cellulose. Ces résultats ne sont pas surprenants, compte tenu de la fréquence à laquelle on trouve des gènes cellulolytiques dans les génomes des bactéries (Berlemont et Martiny 2015). Particulièrement, les bactéries ont été retrouvées dans la matière organique en décomposition plus fraîche, comme les feuilles tombées durant l'automne, avec des membres du phyla *Proteobacteria* et *Bacteroidetes* consommant les sources plus labiles de carbone. Aussi, l'abondance des bactéries cellulolytiques augmente progressivement avec l'avancement de la dégradation, au fur et à mesure que les champignons augmentent leur présence et biomasse dans la matière en décomposition. Ainsi, on trouve des genres typiquement associés aux mycéliums décomposeurs, dont *Pedobacter* et *Chitinophaga* (*Bacteroidetes*) et *Pseudomonas*, *Variovorax*, *Ewingella* and *Stenotrophomonas* (*Proteobacteria*) (Tláskal et al. 2016). De plus, des genres tels que *Burkholderia*, *Phenylobacterium* ou *Methylovirgula*, très abondants lors de la décomposition tardive du bois dans le sol (Kielak et al. 2016), sont aussi connus pour leur capacité à dégrader des composants aromatiques complexes, dont les HAP (Hoppe et al. 2015). Des bactéries capables de dégrader des composants phénoliques, y compris la lignine, sont aussi abondantes dans le sol. Des bactéries lignolytiques peuvent être retrouvées parmi les protéobactéries (*Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, et *Pseudomonas*, entre autres), les *Firmicutes* (*Bacillus* et *Paenibacillus*), et les *Actinobacteria* (*Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Microbacterium*, et *Streptomonas*). Aussi, des genres possédant des laccases sont très actifs dans les sols, incluant des taxons tels que *Burkholderia*, *Bradyrhizobium* ou *Azospirillum*. La capacité enzymatique de ces bactéries à dégrader la matière

organique récalcitrante peut être derrière leur capacité à dégrader des contaminants organiques, dont la structure moléculaire peut être similaire (Correa-García et al. 2018). D'ailleurs, plusieurs espèces appartenant aux genres mentionnés précédemment sont abondantes dans les sols contaminés aux hydrocarbures (voir sections 1.3.2.1 et 1.3.2.2 de cette thèse).

Mais le rôle de bactéries dans les services écosystémiques ne s'arrête pas à leur contribution au cycle de carbone. Leurs contributions sont également importantes dans les cycles de l'azote, ou du phosphore. Plusieurs genres de bactéries du sol sont connus par leur capacité de fixer l'azote atmosphérique en le transformant en ammonium e.g. *Azotobacter* (Kizilkaya 2009). L'ammonium ainsi généré peut ensuite être absorbé par les plantes et d'autres organismes dans le sol. Certaines bactéries fixatrices de l'azote coexistent en symbioses avec des eucaryotes. C'est le cas de plusieurs membres de l'ordre *Rhizobiales*, qui habitent dans des nodules racinaires des légumineuses tels que la luzerne, le soja, la fève, ou le pois (Burris et Roberts 1993). Ensuite, d'autres bactéries sont capables d'exécuter voir une ou plusieurs des étapes suivantes de l'oxydation de l'ammonium. La plupart des bactéries connues oxydantes de l'ammonium appartiennent aux classes *Betaproteobacteria* et *Gammaproteobacteria*. Ces groupes transforment l'ammonium en nitrites (Arp et Stein 2003). Ensuite, les oxydoréductases de plusieurs bactéries appartenant aux groupes *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Chloroflexi*, *Nitrospinae* et *Nitrospirae* catalysent l'oxydation de nitrite en nitrate. De même, les réactions de réduction de nitrate vers l'azote gazeux se produisent en diverses étapes par plusieurs organismes. Une revue de littérature récemment publiée par Marcel Kuypers et collaborateurs (2018) souligne l'importance des microorganismes du sol dans le cycle de l'azote en faisant le point sur les processus, la stœchiométrie, les gènes, les enzymes et les espèces connues qui participent dans le cycle.

Les bactéries sont des médiateurs importants du cycle du P car certaines sont capables de solubiliser le phosphore minéral tandis que d'autres peuvent l'immobiliser dans leur biomasse. Malheureusement, l'implication des bactéries dans le cycle du P a reçu beaucoup moins d'attention que celle des cycles du carbone et de l'azote. Le principal mécanisme responsable de l'absorption de phosphore par les bactéries est la solubilisation et l'absorption de phosphore inorganique, sa source la plus abondante. La capacité de solubiliser le P inorganique a été décrite pour différentes bactéries et champignons ectomycorhiziens présents dans la rhizosphère et le sol. Cette capacité est liée à la libération d'anions organiques, tels que le citrate, le gluconate, l'oxalate et le succinate, dans le sol (Richardson et Simpson 2011). De plus, les enzymes phosphatases libèrent du phosphate à partir d'esters de phosphate organiques pendant la

désintégration de la matière organique (Nannipieri et al. 2011; Rodríguez et Fraga 1999). Dans une analyse métagénomique récente des sols forestiers tempérés, il a été mis en évidence que les membres des *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Actinobacteria* et *Acidobacteria* dominaient les processus liés au renouvellement du P (Bergkemper et al. 2016).

Les archées sont des organismes procaryotes connus, entre autres, par leur capacité à survivre dans des environnements extrêmes. Mais à part ceci, les archées jouent un rôle fondamental dans le cycle de l'azote, qui pour certaines étapes pourrait être plus important que celui des bactéries (Leininger et al. 2006). D'ailleurs, les *Thaumarchaeota* et les *Crenarchaeota* sont plus abondantes que les bactéries dans certains types de sols (Leininger et al. 2006). Les gènes archéens codant pour l'ammonium monooxygénase, impliquée dans l'oxydation de l'ammonium (*amoA*, *amoB* et *amoC*) sont souvent plus nombreux que la version bactérienne de ces mêmes gènes (Leininger et al. 2006).

Les champignons du sol sont surtout connus par la capacité de certains taxa à former des relations plus au moins symbiotiques (e.g., champignons mycorhiziens, saprophytiques) avec les racines des plantes. Les champignons sont responsables de la décomposition de la matière organique récalcitrante dans beaucoup d'écosystèmes, particulièrement dans les forêts, grâce à leurs enzymes extracellulaires capables de dégrader la matière végétale morte. De plus, les champignons mycorhiziens sont impliqués dans la mobilisation et la séquestration de l'azote et du phosphore dans leurs mycéliums, en plus d'être connus comme voie de transport du carbone entre différents systèmes racinaires et le sol.

#### **1.4.2.2 Protistes et autres microorganismes**

Les protistes sont un groupe paraphylétique qui domine la diversité eucaryote dans la plupart des écosystèmes à cause de leur représentation à travers tous les supergroupes qui forment l'arbre de la vie (Burki et al. 2020). Des estimations indiquent qu'il pourrait exister plusieurs millions d'espèces de protistes (Geisen et al. 2018). De plus, leur importance au niveau fonctionnel est conséquente aux estimations mentionnées. Par exemple, dans les systèmes aquatiques, la plupart des algues appartiennent aux protistes et ceux-ci sont donc responsables de quasiment la moitié de la fixation du carbone par photosynthèse sur la planète (Falkowski 2002). Malheureusement, les études des protistes dans le sol comportent des défis spécifiques liés à leur taille microscopique. Ainsi, la recherche visant à déterminer le rôle de la diversité des sols



dans le fonctionnement des écosystèmes a traditionnellement ignoré les protistes dans ses modèles suite à ces difficultés (Geisen et al. 2020). Néanmoins, parmi les nombreux microorganismes qui habitent dans le sol, les protistes ont un rôle particulier dans les processus écologiques. Par exemple, jusqu'à la moitié des espèces de protistes peuvent être parasites, contribuant ainsi au contrôle de la composition des communautés animales dans le sol (Mahé et al. 2017). De plus, les protistes phototrophiques du sol contribuent au cycle du carbone en tant que fixateurs (Oliverio et al. 2020). En tant que consommateurs principaux du microbiote du sol (Jürgens et al. 1997; Alphei et al. 1996; Bonkowski 2004; Geisen 2016; Oliverio et al. 2020), les protistes régulent également plusieurs processus écologiques simultanément à travers les changements apportés à la composition des communautés microbiennes du sol (Geisen et al. 2020; Oliverio et al. 2020). Par exemple, Hünninghaus et collaborateurs ont démontré lors de leurs expériences que la minéralisation du carbone des débris végétaux est augmentée de 1.15 fois lors des premiers quatre jours de la décomposition en présence des protistes consommateurs, et que la composition de la communauté microbienne subit un changement notable après trois semaines (Hünninghaus et al. 2017). De plus, l'identité et la richesse de la communauté de protistes avaient affecté la composition de la communauté microbienne. En général, l'identité des protistes semblait avoir un effet significatif sur la composition des communautés microbiennes au début de la décomposition tandis que la richesse en espèces protistes semblait être plus critique dans la phase tardive et lente de la décomposition (Hünninghaus et al. 2017).

Néanmoins, les protistes ne sont pas les seuls microorganismes capables de provoquer des changements au sein de la communauté bactérienne responsable de la dégradation de la matière organique. Les virus du sol pourraient constituer des composants importants régulant l'étroite relation entre la composition des communautés microbiennes et le fonctionnement de l'écosystème édaphique. Malheureusement, relativement peu d'études se sont concentrés sur ce volet de recherche, donc le rôle précis des virus dans le contrôle des communautés microbiennes (spécialement bactériennes) reste hypothétique (McGuire et Treseder 2010), et même les revues de littérature plus récentes parlent des rôles « probables » des virus dans le fonctionnement des sols (Kuzakov et Mason-Jones 2018). Pourtant, le rôle des virus dans le cycle du carbone dans les systèmes aquatiques est connu et quantifié, avec des estimations qui affirment que jusqu'à 20% des microorganismes dans l'océan sont lysés chaque jour par des virus (Suttle 1994).

Il existe plusieurs preuves des effets des organismes bactériovores, notamment les nématodes et les protistes, sur le contrôle du cycle de vie des bactéries, et par conséquent, sur le recyclage

des nutriments. Leur rôle dans la distribution des nutriments à travers le réseau trophique microbien, connu traditionnellement comme le « *Microbial Loop in soil* » (la boucle microbienne dans le sol ; Clarholm 1985), peut être résumé comme suit : les racines des plantes libèrent des substrats riches en C (photosynthétats) dans la rhizosphère, notamment des sucres, qui sont utilisés par la microbiote et qui stimulent la croissance microbienne, la libération d'enzymes, et la minéralisation supplémentaire d'azote à partir de la matière organique du sol. Les microorganismes utilisent cet enrichissement en nutriments pour leur croissance. Cette croissance, nettement supérieure à celle trouvée dans le sol distant, attire des bactériovores et fongivores, dont les protistes et les nématodes, qui migrent vers la rhizosphère attirée par la grande abondance de microorganismes. Ces bactériovores se nourrissent du microbiote de la rhizosphère, libérant à nouveau de l'azote minéral dans le sol, qui peut être ensuite absorbé par les racines. L'azote ainsi obtenu stimule la croissance de la plante et du système racinaire, créant une rétroaction pour améliorer la libération de photosynthétats dans la rhizosphère (Clarholm 1985). Pourtant, le mouvement des protistes et nématodes prédateurs des bactéries dans le sol est restreint par la présence d'eau dans les pores et le potentiel hydrique. Et souvent, les bactéries se trouvent dans des pores dans les aires protégées où l'accès des prédateurs est limité (Wright et al. 1995). Mais si la taille des pores est suffisamment grande pour permettre l'accès aux bactéries, il peut aussi permettre l'accès des virus. De plus, les populations animales sont réduites quasiment à zéro à partir d'une certaine profondeur (approximativement 50 cm (Potapov et al. 2017)). Ainsi, la théorie de la boucle microbienne peut seulement expliquer une partie de la mort bactérienne, et seulement dans les couches les plus superficielles du sol. Il est estimé que les virus sont derrière une bonne partie de la mortalité bactérienne dans le sol (Kuzakov et Mason-Jones 2018). Les phages, particulièrement, seraient derrière le renouvellement rapide d'une grande proportion de la communauté bactérienne du sol.

Dans le contexte de la phytoremédiation, d'un point de vue des effets sur la dégradation de la matière organique et le cycle du carbone, la dégradation des HAP peut être considérée comme un processus contenu dans la minéralisation du carbone. Par conséquent, les études portant sur le rôle des divers organismes du sol dans les changements des communautés microbiennes peuvent également apporter des pistes sur les effets que ces organismes peuvent avoir sur le taux de dégradation des polluants organiques, et vice-versa. Ainsi, la considération des rôles d'autres microorganismes du sol – comme les protistes et les virus – dans les changements de la communauté microbienne, aiderait à mieux modéliser la dégradation du phénanthrène et d'autres polluants par les bactéries et les champignons.

### **1.4.3 Macroorganismes**

Par leur consommation de la matière organique en décomposition, la faune du sol influence fortement les communautés microbiennes du sol et les cycles des nutriments. Dans certains cas attribuable à leur activité, ils peuvent aussi modifier les caractéristiques physico-chimiques du sol. Ces transformations agissent sur la teneur en eau et en air du sol, sur la distribution et la texture de la matière organique (Teuben et Verhoef 1992) et finalement, sur l'activité des microorganismes (Jusselme et al. 2015). La faune du sol peut modifier la disponibilité des certains contaminants (Krauss, Wilcke et Zech 2000; Hickman et Reid 2008) et aussi contribuer à leur dégradation (Schaefer et Juliane 2007) et constitue donc un paramètre incontournable pour les études de bioremédiation. Néanmoins, ce groupe d'organismes a souvent été ignoré lors des études de biodégradation des contaminants du sol.

#### **1.4.3.1 Microarthropodes**

Les microarthropodes du sol sont composés principalement par des animaux appartenant aux groupes des Acariens et des Collemboles. Ce sont des animaux très diversifiés et abondants dans la plupart des écosystèmes (Nielsen, Wall et Six 2015) et ils sont soupçonnés de contribuer de façon importante aux services écosystémiques, notamment par leur participation dans le cycle des nutriments. Un de ces rôles est la libération de l'azote (N) et du phosphore (P) pendant la décomposition de la litière (Carrillo et al. 2011). Les microarthropodes sont capables d'augmenter la disponibilité du  $\text{NO}_3^-$  (Teuben et Verhoef 1992) et cette altération dans la disponibilité des nutriments change l'efficacité de l'utilisation des substrats carbonés par la communauté microbienne (Sinsabaugh et al. 2013). De plus, leurs préférences alimentaires agissent sur la biomasse et la composition de la communauté microbienne (Maaß et al. 2015). En effet, durant leur activité de broutage, que ce soit sur les détritux ou sur la matière organique vivante, les microarthropodes se nourrissent des microorganismes présents sur la matière organique de base, modifiant ainsi les abondances relatives de certains groupes des microorganismes et la composition de la communauté microbienne.

#### **1.4.3.2 Nématodes**

Les nématodes sont des vers « ronds » d'entre 0.03 et 1 mm de long, qui forment un groupe monophylétique diversifié qui compte environ un million d'espèces. Dans le sol, on peut trouver entre 2.5 et 8.3 millions d'individus · m<sup>-2</sup> appartenant à plus de 200 espèces (Yeates 2007).

Les nématodes contribuent aux cycles des nutriments par le fait que leur ratio C : N est plus élevé que ceux des organismes dont ils se nourrissent, de sorte que jusqu'au 40% de l'N ingéré peut être excrété sous forme d'ammonium à travers la paroi externe de l'animal (Ferris et al. 1997). L'ammonium est ensuite disponible pour être réutilisé par les plantes et les microorganismes. L'excrétion de nutriments, couplée à leur influence sur l'augmentation du renouvellement des communautés microbiennes par leur broutage sont les mécanismes principaux par lesquels les nématodes contribuent aux processus du sol. Les nématodes bactériovores peuvent ingérer jusqu'à 20 cellules par succion (Ferris et al. 1997), avec une préférence pour les cellules plus petites (plus faciles à ingérer à travers l'étroite cavité buccale) ou Gram négatives (qui possèdent une paroi cellulaire plus fine, donc plus facile à digérer; Liu et al. 2017). Ainsi, les nématodes altèrent la composition de la communauté bactérienne par des mécanismes passifs. Les nématodes bactériovores ont été aussi corrélés à un changement dans la composition et la quantité des rhizodépôts. Sundin et al. (1990) ont observé une augmentation de 2.6 fois de la quantité de rhizodépôts en présence des nématodes, avec une incrémentation de l'allocation de carbone à la rhizosphère. Il est fort possible que cela change la communauté microbienne de la rhizosphère.

De plus, les nématodes bactériovores peuvent augmenter la croissance de la plante. Dans une méta-analyse réalisée par Trap et collaborateurs (2016), les chercheurs ont trouvé un effet positif de la présence de nématodes dans les études considérées, menant à augmentation moyenne de 27% de la biomasse aérienne et de 21% de la biomasse racinaire par rapport aux témoins. Dans la même méta-analyse, les auteurs signalent aussi une influence des nématodes bactériovores dans la structure racinaire avec une augmentation de 1.2 fois de la formation des nouvelles pointes racinaires, tel qu'observé dans les études de Cheng et al. (2011).

#### **1.4.3.3 Annélides**

La rhizosphère constitue un environnement où les vers de terre peuvent avoir des effets importants sur le cycle des nutriments par leurs interactions avec les microorganismes de la

rhizosphère et les racines. Malgré la quantité limitée des données disponibles sur ces interactions, l'étude des vers de terre est importante pour mieux comprendre les synergies entre leurs activités de minéralisation des nutriments et l'absorption de ceux-ci par les racines des végétaux.

De plus, les racines et les vers modifient la structure, la géochimie et l'activité microbienne du sol de manière similaire. Ils créent des pores dans la matrice du sol, augmentent la stabilité des agrégats, secrètent des composés de carbones labiles de faible poids moléculaire, et stimulent l'activité microbienne.

Ils existent des preuves quant aux effets des vers de terre dans le fonctionnement de la rhizosphère, notamment dans le cycle de l'azote. James et Seastedt (1986) ont observé une augmentation de la biomasse de la racine d'*Andropogon gerardii* avec une diminution du NO<sub>3</sub>-N dans le lixiviat lorsque des vers du genre *Diplocardia* étaient présents dans les pots de cultures par rapport aux pots sans vers.

Dans une étude menée par Spain, Lavelle et Mariotti (1992), les chercheurs ont trouvé des preuves pour l'implication des vers de terre dans l'augmentation de la production de biomasse de la plante. Cette croissance était liée à l'augmentation de l'absorption d'N et de P en présence des vers. Comme les auteurs avaient marqué la biomasse microbienne avec du <sup>15</sup>N, ils ont pu constater que la présence des vers de terre était positivement corrélée avec une augmentation des transferts de <sup>15</sup>N au feuillage et à la racine.

Également, la capacité de la racine d'utiliser les nutriments présents dans les turricules (petits monticules de terre constitués des tortillons issus des déjections de vers de terre) a été observée par Spiers et al. (1986). Les auteurs ont trouvé des racines vivantes très fines poussant dans des excréments frais de *Arctiostrotus* sp.

Les vers de terre ont montré une capacité pour la dispersion des champignons mycorrhiziens à arbuscules (AMF par son acronyme anglais : arbuscular mycorrhizal fungi), lesquels forment une association mutualiste avec les racines, ce qui augmente généralement la croissance de la plante par une augmentation de son apport en éléments nutritifs. Reddell et Spain (1991) ont décrit la présence de spores intactes d'AMF dans les tortillons de 13 espèces de vers en Australie, capables de recoloniser les racines de *Sorghum bicolor*. Madsen et Alexander (1982) ont montré la capacité de *Lumbricus rubellus* de permettre la colonisation de *Rhizobium japonicum* plus en profondeur dans le sol. Également, des bactéries du genre *Rhizobium* ont vu leur dispersion augmentée à travers l'espèce *L. terrestris* (Doube et al. 1994).

Finalement, les vers de terre peuvent améliorer la dégradation des hydrocarbures à travers trois mécanismes : l'amélioration du processus oxydatif due à l'aération du sol résultant des activités du « creusage des galeries », l'augmentation de l'activité microbienne et l'augmentation de la disponibilité des hydrocarbures pour les microorganismes dû à la bioturbation.

### **1.5 Aspects de la diversité du sol liés au fonctionnement de l'écosystème : redondance fonctionnelle, biodiversité et complexité du réseau trophique**

Dans la section précédente, l'importance de certains groupes biologiques a été exposée par rapport à leur contribution individuelle aux processus écosystémiques. Pourtant, dans les écosystèmes plusieurs espèces performant les mêmes fonctions coexistent suite à de petites différences dans les niches qu'elles occupent, phénomène connu sous le nom de redondance fonctionnelle. Le concept de redondance fonctionnelle se base sur la notion que la plupart des écosystèmes contiennent plus d'espèces que de processus. La redondance fonctionnelle est visible lorsque la disparition d'un certain nombre d'espèces de la communauté ne se traduit pas par une perte des processus menés par ces espèces. (Walker 1992).

La redondance fonctionnelle est un aspect important de la diversité des sols, parce que cela garantit que les fonctions écosystémiques continueront d'être menées malgré la disparition de certaines espèces suite, par exemple, à une perturbation. L'absence de redondance fonctionnelle peut mener à la perte de fonctionnalités du sol lors de perturbations.

Mais pour que la redondance fonctionnelle existe dans un écosystème, celui-ci doit compter plusieurs espèces. Le plus d'espèces que contient un écosystème, le plus de chances il y aura qu'en cas de conditions changeantes ou de perturbations les fonctions puissent se réaliser de façon identique ou très similaire (hypothèse de l'assurance, Yachi et Loreau 1999). Ainsi, la richesse, considérée comme le nombre d'espèces présentes dans un écosystème, est une caractéristique très importante pour assurer les services écosystémiques (Wagg et al. 2014; Delgado-Baquerizo et al. 2020). Beaucoup des services écosystémiques sont liés à la diversité de l'écosystème. Par exemple, la productivité végétale, les cycles de nutriments, la décomposition de la matière organique, le contrôle de pathogènes ou encore la dégradation de contaminants sont des services écosystémiques fortement dépendants de la diversité des microorganismes (bactéries, archées et champignons) (Reed et Martiny 2007; Trivedi et al. 2019; Maron et al. 2018; Ramin et Allison 2019) ou de la faune (annélides, arthropodes, nématodes,

collemboles, protistes, rotifères, tardigrades, entre autres) (Cole et al. 2006; Hooper et al. 2005; Setälä et al. 2005; Hünninghaus et al. 2017). Dans les sols, la réduction de l'abondance et de la diversité des organismes entraîne le déclin de multiples fonctions de l'écosystème, comme le cyclage et la rétention des nutriments (Wagg et al. 2014).

Plus de 200 ans de recherche ont démontré comment la biodiversité au sein des communautés végétales soutient la stabilité et la productivité des écosystèmes (Maron et al. 2018). Au contraire, peu de démonstrations directes de la relation entre la diversité et la fonction dans les communautés microbiennes sont disponibles.

Néanmoins, depuis les dernières 10-15 années, de plus en plus de preuves soutiennent le rôle de la diversité du sol, dont la diversité microbienne, dans le maintien des fonctions écosystémiques (Trivedi et al. 2019; Delgado-Baquerizo et al. 2020). La méta-analyse récemment réalisée par Delgado-Baquerizo et collaborateurs (2020) a mis en évidence l'importance de la biodiversité du sol dans le maintien de multiples fonctions de l'écosystème. Parmi les fonctions analysées dans cette étude, on trouve le cyclage des nutriments, la décomposition, la production végétale et l'antagonisme aux pathogènes du sol. Leurs résultats, issus de la combinaison d'une étude observationnelle globale, ont montré des associations positives et significatives entre la diversité de groupes spécifiques (protistes, nématodes, vers de terre, collemboles, tardigrades, rotifères, bactéries, champignons) et la multidiversité (la diversité combinée de plusieurs groupes) avec la multifonctionnalité de l'écosystème. De plus, la pente de la corrélation entre la multidiversité et la multifonctionnalité était plus prononcée que celle de la diversité de n'importe quel autre groupe individuel, suggérant que la diversité de plusieurs organismes du sol alimente la multifonctionnalité dans les écosystèmes terrestres. Ceci met en évidence un effet synergique des différents membres du réseau trophique observable dans les sols présentant des réseaux plus complexes.

La complexité du réseau trophique est un aspect important de la diversité, car les interactions liées à l'alimentation changent les communautés microbiennes via des changements dans la composition et l'abondance relative de certains groupes de microbes. Quand une diversité faible de consommateurs animaux se trouve dans l'environnement de la rhizosphère, la pression de broutage sur certains microbes pourrait faire diminuer drastiquement leur abondance. En conséquence, une diminution de la diversité microbienne se produirait, et comme résultat, une perte de la fonctionnalité de l'écosystème pourrait survenir (Trivedi et al. 2019). Une plus grande diversité du réseau trophique supérieur (e.g. une plus grande richesse de protistes) a résulté en une augmentation de la résilience de la structure de la communauté microbienne face à une

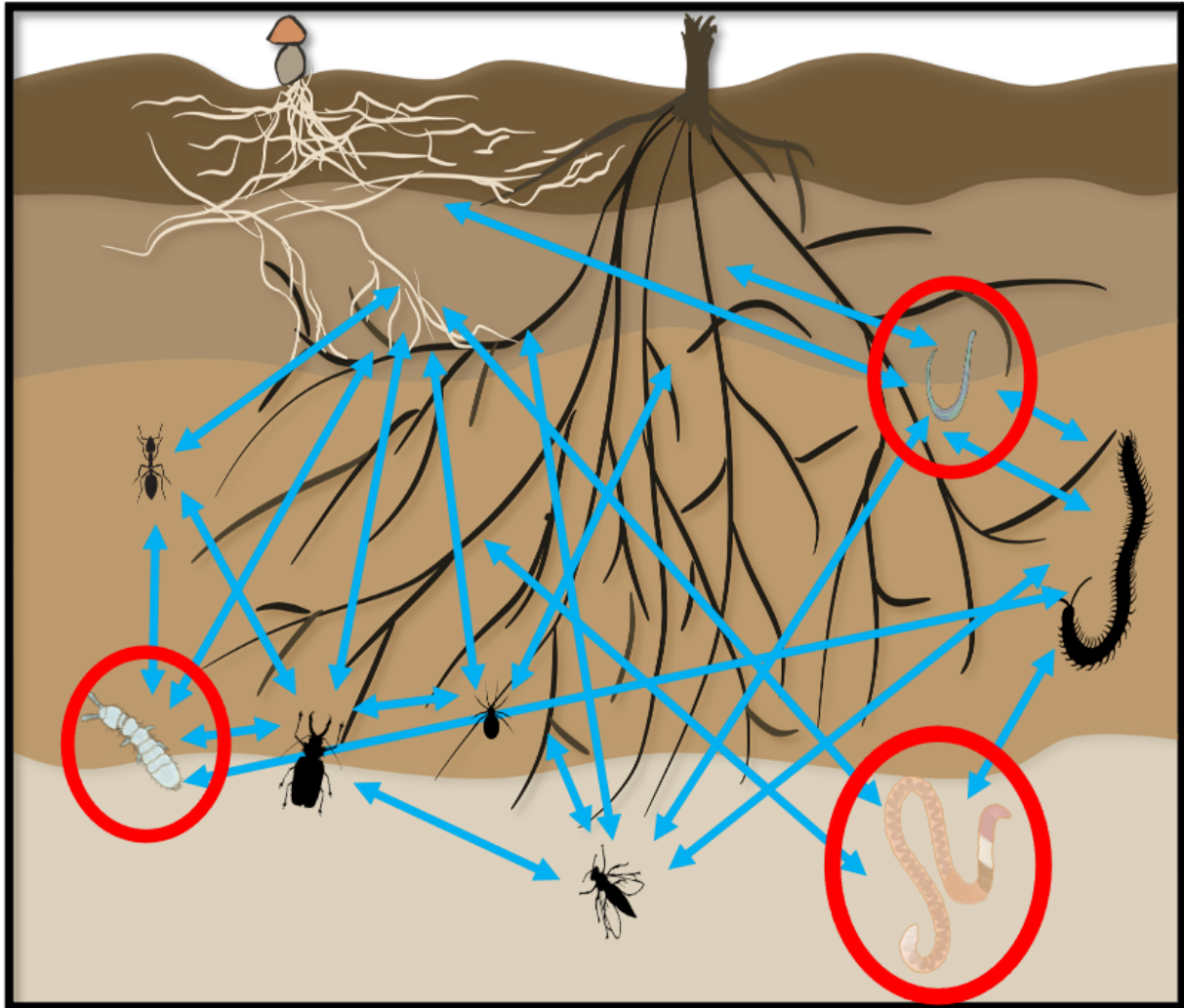
perturbation par la sécheresse (De Vries et Shade 2013). Les différents membres de la faune du sol ont des préférences alimentaires différentes et se déplacent de façons distinctes. Ainsi, une plus grande diversité ou une plus grande richesse spécifique des niveaux trophiques supérieurs du sol (invertébrés, protistes, etc.) pourrait améliorer la résilience des communautés microbiennes, car ces animaux, de par leurs activités d'alimentation et leurs déplacements, stimulent la croissance et la dispersion d'une plus large gamme de microbes du sol que les communautés fauniques de moindre diversité.

Une autre étude réalisée dernièrement a trouvé que la présence des invertébrés dans le sol favorisait l'apparition de communautés microbiennes distinctes et modifiait à la fois la biomasse et les fonctions microbiennes (Bray et al. 2019). Dans cette étude, les chercheurs ont observé que les macroinvertébrés du sol augmentaient la diversité bactérienne, changeaient l'abondance relative de certains phyla bactériens et augmentaient la biomasse fongique, ainsi que les activités des enzymes phénol oxydase et glucosidase, importantes dans la dégradation de la matière organique. Leurs résultats indiquent que dans la rhizosphère, les macroinvertébrés, par le biais d'un broutage de faibles intensités pourraient avoir un effet stimulant sur les communautés et les processus microbiens, probablement en raison du recyclage des éléments nutritifs ou de la dispersion des cellules microbiennes et des spores par les invertébrés mobiles (Bray et al. 2019).

Plus les prédateurs sont diversifiés, plus les choix alimentaires de ceux-ci se diversifient, et la pression de broutage exercé sur chacun des groupes de microbes se réduit. Cela pourrait se traduire par une perte moins importante de la diversité microbienne, voir une augmentation, lorsqu'on considère aussi la macrofaune, comme les vers de terre, qui transportent des microorganismes entre les différentes zones du sol.

Mais dans un contexte de phytoremédiation, l'importance relative de chaque élément du réseau trophique du sol a été très peu évaluée. Dans une certaine mesure, le sol reste une boîte noire, et de nos jours, la compréhension des mécanismes de fonctionnement des sols constitue un domaine de recherche actif, et ce, malgré les nombreuses études récentes menées pour démêler la nature complexe des relations microbe-sol- plante lors de la phytoremédiation et dans d'autres contextes (Steffan et Dharampal 2019; Bennett et al. 2019; Schmitz et Leroux 2020).





**Figure 1-7 Schéma sur la complexité du réseau trophique dans le sol.**

**La faune qui habite autour de la rhizosphère et le sol annexe présente des comportements alimentaires généralistes et variables qui affectent la composition de la communauté microbienne, la morphologie et la biomasse de la plante. Les nematodes, les collemboles et les vers de terre, utilisés dans la deuxième partie de la thèse, sont encadrés en rouge.**

Naturellement, la plupart des études de rhizoremédiation se concentrent sur le rôle des microbes et de la plante, car ce sont les principaux acteurs participant à ce processus. De même, il existe une compréhension raisonnable de l'effet des propriétés physico-chimiques des matrices du sol influençant les perspectives de dégradation. Au contraire, il y a un manque d'études explorant le rôle que les habitants du sol, mis à part les champignons, les archées et les bactéries, jouent pendant la rhizoremédiation.

L'une des raisons possibles derrière le manque d'études mettant en évidence le rôle de la faune du sol pendant la rhizoremédiation -ou tout autre processus biogéochimique du sol - est la complexité intrinsèque des réseaux trophiques (Fry et al. 2019). Souvent, les réseaux trophiques

du sol impliquent de nombreuses interactions complexes entre des centaines d'espèces d'animaux, de plantes, de champignons, de bactéries et d'archées (mis à part les interactions avec d'autres groupes, tels que les virus, Figure 1-7) à différents niveaux trophiques (Wolkovich 2016). En fait, un bon nombre de ces interactions sont basées sur les échanges de nutriments (alimentation) et il est de plus en plus évident que ces réseaux trophiques sont à l'origine de processus écosystémiques clés pour le fonctionnement des écosystèmes (Bardgett et Wardle 2010; Bardgett et Van Der Putten 2014).

Parmi les stratégies d'alimentation adoptées par les animaux vivants dans les sols, le généralisme est préféré par beaucoup de groupes, due à sa meilleure adaptation dans les conditions hétérogènes du sol (Erktan et al. 2020a). Concrètement, la structure du sol empêche généralement la détection à longue distance des ressources (Digel et al. 2014), donc les macroorganismes doivent faire avec ce que ils ont à leur disposition. Le généralisme ajoute une couche supplémentaire de difficulté lorsque l'on tente de démêler les relations au sein des réseaux trophiques du sol dans un contexte de phytoremédiation. Par exemple, les collemboles peuvent se nourrir soit d'hyphes fongiques ou de systèmes racinaires fins (Endlweber et al. 2009; Erktan et al. 2020b; Johnson et al. 2005), modifiant ainsi directement la structure physique de la matrice qui permet la rhizoremédiation (la biomasse racinaire). Mais des changements indirects dus à l'activité des collemboles sont aussi possibles, par exemple, en affectant la morphologie de la racine à travers un changement dans la disponibilité et la distribution des nutriments (Endlweber et Scheu 2006). Des espèces appartenant au genre *Protaphorura* améliorent la séquestration du phosphore par la plante, ce qui cause une augmentation de la biomasse végétale totale (Ngosong et al. 2014). Dans un contexte de phytoremédiation, cette augmentation de la biomasse pourrait impliquer un système racinaire plus large et donc une efficacité de dégradation améliorée. De plus, cette activité de broutage a des effets sur la respiration du sol, la minéralisation du carbone et de l'azote, donc un effet sur la rhizoremédiation pourrait également être attendu.

Les nématodes sont connus par leur broutage sur les bactéries et les champignons, mais aussi sur les racines des plantes (Crowther et al. 2011; Yeates 2007; Cheng et al. 2011). Leur activité de broutage a été liée à des changements dans l'abondance relative des champignons, où les nématodes stimulaient des souches fongiques moins compétitives (Crowther et al. 2011). Comme pour les collemboles, les nématodes ont été positivement liés à une augmentation de la biomasse végétale, en particulier du système racinaire (Alphei et al. 1996). Il est intéressant de noter que

les nématodes ont été associés à des taux de dégradation plus élevés pour différents HAP grâce à leur activité de broutage sur les bactéries. Par exemple, la présence de nématodes a mené à une dégradation accrue du phénanthrène par *Pseudomonas* (Jing et al. 2017) et du pyrène par *Sphingobium* (Sun et al. 2017).

Les vers de terre représentent 80% de la biomasse faunistique totale des sols (Yasmin et D'Souza 2010) et sont des habitants communs de la rhizosphère (Springett et Gray 1997). Ce sont des organismes avec une résistance remarquable, avec des espèces telles que *Pontoscolex corethrurus*, *Gossodrillus sp.* ou bien *Dichogaster salines* étant présentes dans les sols contaminés par de fortes concentrations d'hydrocarbures pétroliers (environ 12 000 mg kg<sup>-1</sup>; Zavala-Cruz et al. 2013). De plus, la présence de vers de terre a été liée à des taux accélérés de dégradation des hydrocarbures (Delgado-Balbuena et al. 2016). Cette dégradation accélérée étant probablement due à des changements dans les communautés microbiennes du sol, puisque les sols traités avec des vers de terre présentaient des abondances relatives plus élevées de protéobactéries (Bernard et al. 2012; Delgado-Balbuena et al. 2016), qui contient de nombreux genres de bactéries dégradant les hydrocarbures. De plus, les vers de terre peuvent faciliter la dégradation et la volatilisation des HAP par l'excavation de leurs tunnels, augmentant ainsi l'aération du sol (Bartlett et al. 2010; Lavelle et Spain 2001) et par le déplacement de microbes entre le sol distant et la rhizosphère (Luepromchai et al. 2002).

Dans un contexte de phytoremédiation, évaluer les effets des différents niveaux de complexité du réseau trophique avec une diversité variable des taxa supérieurs pourrait être intéressant du point de vue des possibles effets positifs (augmentation de la biomasse et de la diversité microbienne) qui pourraient potentiellement se traduire en une augmentation du taux de dégradation du contaminant.

## 1.6 Hypothèses et objectifs

### Hypothèse générale

La diversité et la complexité trophique du sol sont les facteurs les plus importants pour permettre la survie de la plante face aux stress parce qu'elles assurent respectivement, la redondance fonctionnelle et la résilience du système. De sorte que quand le sol est sujet à une contamination, un bassin suffisant d'organismes capables de réaliser les fonctions dont la plante a besoin pour sa survie sera présent.

Les hypothèses spécifiques qu'on pose dans ce projet sont les suivantes :

- 1) Dans des sols contaminés au phénanthrène, lorsqu'exposé à deux communautés microbiennes différentes, **le peuplier s'associera à différents microorganismes qui présenteront toujours des patrons semblables de fonctionnalité** (dégradeurs d'HAP), résultant en des taux similaires de dégradation des HAP.
- 2) Dans des sols contaminés au phénanthrène, lorsqu'exposé à huit niveaux différents de complexité trophique eucaryote (micro-, méso- et macrofaune), **le saule s'associera à différents microorganismes et présentera différents patrons de productivité, et c'est le réseau le plus complexe qui sera le plus bénéfique pour la phytoremédiation (croissance de la plante et dégradation des HAP).**

### Objectif général

Déterminer les facteurs de la diversité du sol (diversité spécifique et complexité trophique) qui contribuent le plus à façonner les communautés microbiennes de dégradeurs, influençant ainsi la performance des arbres pour la phytoremédiation du phénanthrène.

### Objectifs spécifiques

- 1) Déterminer quels facteurs influencent plus fortement la phytoremédiation.
- 2) Analyser l'importance de la diversité microbienne initiale dans la réponse du peuplier face à la contamination par le phénanthrène.
- 3) Analyser l'importance de la complexité du réseau trophique sur la performance du saule et sur la composition des communautés microbiennes face à la contamination par phénanthrène

## 1.7 Approche expérimentale et liens entre les objectifs et les chapitres de la thèse

### 1.7.1 Chapitre 2 : Déterminer quels facteurs influencent plus fortement la phytoremédiation (objectif spécifique 1)

Cet objectif, formulé sans hypothèse associée, visait, d'un côté, à mieux comprendre les facteurs influençant la phytoremédiation des hydrocarbures dans le sol et, et d'un autre côté, à cerner les lacunes dans les connaissances sur ce sujet. Après la détermination de l'état des connaissances, on pourrait ensuite formuler des hypothèses spécifiques pour que les expériences associées puissent contribuer significativement à la compréhension de la phytoremédiation et son amélioration.

Ainsi, dans ce chapitre, j'ai utilisé une approche de revue de littérature pour cette mise au point en me concentrant sur les facteurs influençant la rhizoremédiation. Au cours de cette revue de littérature, j'ai examiné les rôles de plantes, microorganismes et autres organismes du sol dans le succès de la rhizoremédiation. Ceci m'a permis d'observer des résultats très variables, j'ai allégué que cela pourrait être dû, entre autres causes, à des disparités dans la diversité des sols contaminés. J'ai sélectionné ensuite la diversité microbienne initiale du sol et la diversité et complexité du réseau trophique animal comme facteurs pouvant avoir un impact sur la phytoremédiation. Comme résultat, ces deux points ont formé la base des hypothèses spécifiques pour lesquelles j'ai conçu, mis en place et analysé deux expériences, présentées aux chapitres 3 et 4.

### 1.7.2 Chapitre 3 : Analyser l'importance de la diversité microbienne initiale dans la réponse du peuplier face à la contamination par le phénanthrène (objectif spécifique 2)

Cet objectif a été formulé afin de tester l'hypothèse suivante :

*Dans des sols contaminés au phénanthrène, lorsqu'exposé à deux communautés microbiennes différentes, le peuplier s'associera à différents microorganismes qui présenteront toujours des patrons semblables de fonctionnalité (dégradeurs d'HAP), résultant en des taux similaires de dégradation des HAP.*

Donc, dans ce chapitre je voulais répondre aux questions suivantes : est-ce que les peupliers sélectionnent le même type de communautés microbiennes dans la rhizosphère quand ceux-ci sont exposés à la contamination par rapport aux témoins non exposés ? Est-ce qu'il y a des différences entre les réponses des bactéries, archées et champignons ? Est-ce que les patrons de sélection, s'ils existent, sont les mêmes indépendamment du type de sol d'origine ? Est-ce

que l'effet de la rhizosphère outrepassé l'effet du type de sol ou de la contamination par le phénanthrène ? En termes de richesse et redondance fonctionnelle pour les gènes de dégradation, quels sont les facteurs qui maximisent la dégradation ?

Pour ce faire, j'ai utilisé une approche génomique pour caractériser la structure des communautés bactériennes et fongiques présentes dans le sol et la rhizosphère de peupliers dans deux types de sols, forestier et agricole, abritant des diversités microbiennes de départ différentes et exposés ou non à la présence de phénanthrène. La richesse spécifique a été définie à l'aide du séquençage Illumina d'amplicons PCR du gène de l'ARNr 16S pour les bactéries et archées et de la région ITS pour les champignons. Également, on a caractérisé la richesse fonctionnelle en se focalisant sur la structure de la communauté de dégradeurs bactériens des HAP, à l'aide du séquençage et de la quantification par qPCR des gènes codant pour la sous-unité alpha des dioxygénases impliquées dans les premières étapes de la dégradation des HAP (sous l'acronyme PAH-RHD $\alpha$ ). Pour déterminer l'efficacité des communautés microbiennes dans la dégradation du phénanthrène, j'ai quantifié le phénanthrène par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). Finalement pour quantifier la réponse de la plante face au phénanthrène, j'ai récolté la biomasse en fin d'expérience.

Le but primaire de ce chapitre était de découvrir des patrons de sélection communs qui se seraient manifestés après que la plante ait été soumise à la contamination. Je voulais aussi déterminer si la sélection de la plante sur la communauté microbienne de la rhizosphère présente des patrons généraux identifiables. Déterminer l'importance relative de ces patrons pourrait aider à améliorer les programmes de phytoremédiation.

Pour cette expérience, j'ai mis en place un dispositif expérimental multifactoriel complet avec des plantes en pots comprenant trois facteurs explicatifs avec deux niveaux chacun : Le facteur « **diversité microbienne** » correspondait aux deux types de sols récoltés, agricole et forestier, dans des sites soumis à différentes pressions anthropiques. Ces sols distincts ont contribué différents pools génétiques pour les bactéries, les archées et les champignons. La distance géographique entre les localisations de l'échantillonnage ont permis d'assurer une bonne divergence du bassin de diversité microbienne. Le facteur « **contamination** » correspondait à la présence ou l'absence de contamination par le phénanthrène à raison de 50 mg kg<sup>-1</sup> de sol. Le facteur « **présence de la plante** », avec les niveaux planté et non-planté, m'a servi à retracer les changements dans le microbiote du sol qui étaient dus à la sélection par la rhizosphère et non à la présence de la contamination ou la diversité intrinsèque du sol d'origine.

J'ai pu constater que la diversité initiale du sol a un fort impact sur les communautés microbiennes de la rhizosphère et du sol distant, et ce pour les deux types de sols utilisés. Dans le cas du sol agricole, la diversité présente et les caractéristiques physicochimiques ont permis une biodégradation complète du phénanthrène sans que la présence du peuplier augmente significativement le taux de dégradation. Par contre, dans les sols forestiers, la diversité microbienne présente dans le sol n'était pas suffisante pour aboutir seule à la dégradation complète du phénanthrène et la présence des peupliers a significativement amélioré la dégradation du phénanthrène. Les communautés de dégradeurs, bien que similaires dans les sols non plantés, divergèrent dans les rhizosphères analysées. La présence de certains genres était indépendante du sol d'origine, tandis que la présence d'autres genres, qui variaient en fonction du type de sol, pourrait expliquer les différences entre les taux de dégradation. Les champignons, eux, différaient des bactéries dans leur réponse aux traitements, ceux-ci étant fortement influencés par la présence des peupliers, avec une dominance complète du genre *Sphaerospora* dans tous les pots plantés. Dans l'ensemble, les résultats de ce chapitre montrent l'importance de la composition spécifique et fonctionnelle initiale des sols sur l'efficacité de la phytoremédiation.

### 1.7.3 Chapitre 4 : Analyser l'importance de la complexité du réseau trophique sur la performance du saule et sur la composition des communautés microbiennes face à la contamination par le phénanthrène (objectif spécifique 3)

Cet objectif a été formulé afin de tester l'hypothèse suivante :

*Dans des sols contaminés au phénanthrène, lorsqu'exposé à huit niveaux différents de complexité trophique eucaryote (micro-, méso- et macrofaune), le saule s'associera à différents microorganismes et présentera différents patrons de productivité, et c'est le réseau le plus complexe qui sera le plus bénéfique pour la phytoremédiation (croissance de la plante et dégradation des HAP).*

Dans ma thèse, le concept de la complexité du réseau trophique a été simplifié dans le but de rendre les expériences factorielles réalisables. Ainsi, aux fins de cette expérience, la complexité du réseau trophique serait une diversité faunistique variable comprenant différentes combinaisons de représentants de la micro-, méso- et macrofaune. Dans le quatrième chapitre j'évalue l'effet des interactions complexes du réseau trophique se produisant dans la rhizosphère pendant la rhizoremédiation du phénanthrène. On sait que l'un des facteurs provoquant des

changements dans les communautés bactériennes et fongiques est la présence de brouteurs bactériens et fongiques, notamment les nématodes. Les vers de terre sont considérés comme des vecteurs de transport microbiens, tandis que certains collemboles sont reconnus pour se nourrir de champignons et de petites racines de plantes. Dans ce chapitre, je cherchais à déterminer si la combinaison la plus complexe (diversifiée) d'invertébrés (comprenant les représentants des groupes mentionnés ci-dessus) est plus efficace pour améliorer la rhizoremédiation et / ou favoriser le développement des saules dans des sols contaminés par le phénanthrène, à travers la stimulation de la communauté microbienne en générale ou, plus spécifiquement, des dégradeurs bactériens.

Pour ce faire, j'ai réalisé une expérience factorielle complète en pot. Le système consistait en des pots contenant de la terre irradiée aux rayons gamma pour éliminer tous les invertébrés naturellement présents. Les boutures de saule ont été soumises à deux facteurs avec des niveaux différents. D'un côté, le facteur « **contamination** » consistant en deux niveaux, soit contaminé à raison de 100 mg de phénanthrène  $\text{kg}^{-1}$  ou non contaminé. D'un autre côté, on a le facteur « **niveaux de complexité du réseau trophique** », avec huit combinaisons possibles entre présence/absence de nématodes, collemboles et vers de terre. Le sol distant et celui de la rhizosphère ont été récoltés et les mêmes analyses qu'au chapitre 3 ont été menées.

Le phénanthrène a été dégradé presque complètement dans tous les pots, au point où aucune différence significative n'a été observée entre les traitements. Cependant, le phénanthrène a eu un impact négatif en termes de biomasse de saule dans tous les traitements de complexité du réseau trophique sauf dans le plus complexe, où les nématodes, les collemboles et les vers de terre ont aidé la plante à atteindre des niveaux de biomasse comparables aux traitements témoins sans contaminant. J'ai aussi observé un fort effet de la contamination par le phénanthrène sur les communautés bactériennes du sol distant et rhizosphérique, couplé à un effet presque significatif du traitement de diversité. Encore une fois, le traitement le plus complexe du réseau trophique ainsi que le traitement des vers de terre et des nématodes étaient les plus différenciés par rapport aux autres.







## **2 RHIZOREMEDIATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS: A MODEL SYSTEM FOR PLANT MICROBIOME MANIPULATION**

---

Rhizorémédiation des hydrocarbures pétroliers: un système modèle pour la manipulation du microbiome de la plante

### **Auteurs :**

Sara Correa García<sup>1,2</sup>, Pranav Pande<sup>1,3</sup>, Armand Séguin<sup>2</sup>, Marc St-Arnaud<sup>3</sup> and Etienne Yergeau<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie, Institut national de la recherche scientifique, Université de Québec, Laval, QC, Canada

<sup>2</sup> Laurentian Forest Center, Natural Resources Canada, Québec City, QC, Canada

<sup>3</sup> Institut de recherche en biologie végétale, Université de Montréal and Jardin Botanique de Montréal, Montréal, QC, Canada

### **Titre de la revue ou de l'ouvrage :**

Microbial Biotechnology, volumen 11, numéro 5, pages : 819-832

Publié en ligne le 31 Juillet 2018

Doi: [10.1111/1751-7915.13303](https://doi.org/10.1111/1751-7915.13303)

### **Contribution des auteurs :**

Sara Correa-García (SCG) et Pranav Pande (PP): recherche bibliographique, synthèse de la littérature, écriture du brouillon original. SCG production des figures.

Dr. Marc St-Arnaud and Dr. Armand Séguin : contribution au contenu du brouillon original, révision scientifique du manuscrit.

Prof. Etienne Yergeau : coordination et supervision de la recherche bibliographique, orientation de SCG et PP dans la rédaction du manuscrit, écriture du brouillon original, révision scientifique du manuscrit.

## 2.1 Abstract

Phytoremediation is a green and sustainable alternative to physico-chemical methods for contaminated soil remediation. One of the flavours of phytoremediation is rhizoremediation, where plant roots stimulate soil microbes to degrade organic contaminants. This approach is particularly interesting as it takes advantage of naturally evolved interaction mechanisms between plant and microorganisms and often results in a complete mineralization of the contaminants (i.e. transformation to water and CO<sub>2</sub>). However, many biotic and abiotic factors influence the outcome of this interaction, resulting in variable efficiency of the remediation process. The difficulty to predict precisely the timeframe associated with rhizoremediation leads to low adoption rates of this green technology. Here, we review recent literature related to rhizoremediation, with a particular focus on soil organisms. We then expand on the potential of rhizoremediation to be a model plant-microbe interaction system for microbiome manipulation studies.

## 2.2 Introduction

Phytoremediation is the use of plants to remediate contaminated environments (usually soils, but also water). Many processes can be involved in the removal of the pollutants such as phytovolatilization (the removal of volatile compounds through plant tissues), phytotransformation (the transformation of contaminants from one state to another), phytostabilization (the stabilization of mobile contaminants in the soil), phytoextraction (the removal of trace elements from the soil and its fixation in plant tissues). Although all these processes involve both the plant and its microbiota, rhizoremediation clearly stands out as an integrated plant-microbes endeavor. Rhizoremediation is the degradation of organic pollutants in the soil zone surrounding the plant roots (the rhizosphere), usually as a result of the stimulation of the catalytic activities of microorganisms by the plant roots (Pilon-Smits 2005). For many organic contaminants, such as most petroleum hydrocarbons, rhizoremediation results in the complete mineralization of the contaminants, effectively removing it from the environment. The principle behind rhizoremediation is simple: as the plant roots colonize the contaminated soil, as for any soil, they associate with a subset of the microorganisms present in the soil and stimulate them through the exudation of a variety of organic compounds (Kuiper et al. 2004) (Figure 2-1A). Some of the microbes stimulated by the root exudates are also able to degrade petroleum hydrocarbons. Many facets of the rhizosphere environment make this soil zone particularly appropriate for the degradation of organic contaminants. First, the plant secondary metabolites that are part of the exudates are often structurally very similar to organic contaminants (Singer et al. 2003). This results in a heightened presence and activity of microbes being able to degrade organic contaminants in the rhizosphere, even in the absence of contaminants (Yergeau et al. 2014). Second, because of the presence of the root exudates, the rhizosphere microbial communities are generally more active and more abundant than microbial communities in the bulk soil (i.e. not under the influence of the roots) (Smalla et al. 2001; Kowalchuk et al. 2002). Third, the rhizosphere is generally recognized as a hotspot for horizontal gene transfer (Van Elsas et Bailey 2002), and plasmids were shown to help microorganisms adapt to contamination stress and degrade organic compounds (Top et Springael 2003; Sentchilo et al. 2013). Additionally, some root exudates help detach organic contaminants from the organic matter present in soil, making them more available to microbes (Gao et al. 2010). Altogether, this again highlights the distinct roles of plants and microorganisms during rhizoremediation: the plant act as a promoter for microbial degraders, by providing them with a suitable environment and stimulating them through root exudates. The suitability of the

rhizosphere environment for microbial processes related to the degradation of hydrocarbons also exposes one of the major pitfalls of rhizoremediation: it only works where plant roots are. Therefore, in compacted or very clayey soils, or in cases where contamination is deeper than the root zone, or at too high concentration for roots to survive, rhizoremediation is not effective. As root growth patterns and exudates amount and quality differ between different plants, even between closely related genotypes (O'Toole et Bland 1987; Jones et al. 2004; Manschadi et al. 2006), the choice of an appropriate plant genotype is crucial in rhizoremediation.

The rhizosphere microbes, especially bacteria, are thought to be the major players in organic contaminant degradation during rhizoremediation (Bell et al. 2014a, 2014b; El Amrani et al. 2015), and recent plant-microbe metatranscriptomic studies confirmed that the hydrocarbon degradation genes expressed in the root-rhizosphere environment were mostly linked to bacteria (Yergeau et al. 2018; Gonzalez et al. 2018) (Box 1). Petroleum hydrocarbon contamination is often composed of a mixture of saturated aliphatic (alkanes) and aromatic hydrocarbons (including polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs). Microorganisms can degrade virtually all the hydrocarbons present in petroleum through various pathways, although with different efficiencies. In addition to this central role, microbes also have another major role in rhizoremediation (Figure 2-1B). Indeed, microbes known as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are recognized to have the capacity to increase plant growth (Kloepper et Schroth 1978), and the ones that can increase root growth are particularly interesting in the context of rhizoremediation. On top of their of nutrients, PGPR also have the capacity to reduce plant stress through various mechanisms ability to promote the growth of plants through the production of plant hormones or the mobilization (Rajkumar et al. 2012; De Zelicourt et al. 2013), including through the reduction of ethylene concentrations in the roots (Glick et al. 1998; Glick 2003) which would allow a plant to grow in highly contaminated environments without the adverse effects of stress (Burd et al. 2000).

Rhizoremediation offers a unique system to study plant-microbe interactions and experiment with microbiome manipulation approaches. First, the response variable of interest is easily measurable: a lowered soil contamination. Second, the hydrocarbon degradation pathways are well known, and the genes are well represented and annotated in databases (e.g. the biocatalysis/biodegradation database, <http://eawag-bbd.ethz.ch/>). Third, the capacity to degrade hydrocarbons is widespread among bacteria, and major players, such as *Pseudomonas* and *Rhodococcus* can be easily cultured. It is thus relatively easy to create

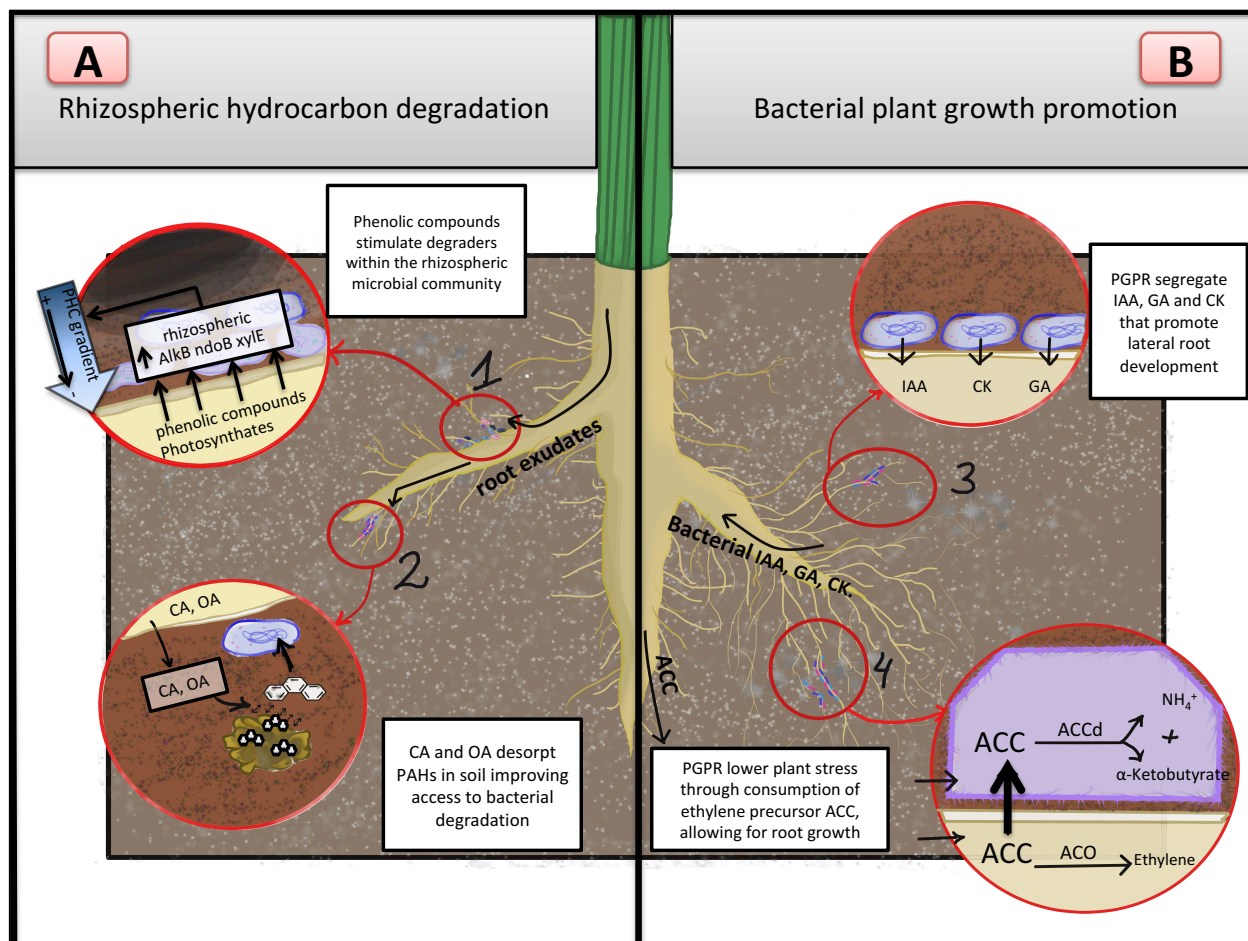


Figure 2-1 Petroleum hydrocarbon degradation through exudates and PGPR.

**A. Main effects of plant exudates in enhancing rhizodegradation petroleum hydrocarbons (PHC).** 1. Plants segregate root exudates including a large range of photosynthates that stimulate microbial growth in the rhizosphere. Among these root exudates, there are phenolic compounds that share a similar physicochemical structure with some petroleum hydrocarbons. Phenolic compounds stimulate the degrader microbial community, leading towards an increase in the total abundance of genes related to the petroleum hydrocarbon metabolism. Root exudates increase in alkane mono-oxygenase (*alkB*), naphthalene dioxygenase (*ndoB*) and catechol-2,3-dioxygenase (*xylE*) genes, all of them coding for a range of oxygenases capable of degrading PH. This creates a negative gradient of TPH concentrations, where there is a significant decrease of pollutants in closer to the rhizosphere. These gradients lower the stress suffered by the plant, allowing the roots to dig deeper in soil layers, bringing the degraders bacterial community in further contact with the pollutant. 2. Other compounds present in root exudates have shown a capacity to promote desorption of certain PAHs from the organic matter in soil. Oxalic (OA) and citric acid (CA) facilitate desorption of at least two polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) -phenanthrene and pyrene -, making these molecules more accessible to rhizodegradation. **B. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) enhance rhizodegradation through two main processes concerning lateral root development.** 3. PGPR have demonstrated a capability to form certain phytohormones that get into the root tissues, modulating processes such as root enlargement or lateral root development. There are at least three bacterial phytohormones with effects over root development: indolacetic acid (IAA), cytokinins (CKs) and gibberellic acid (GA). 4. Another important component of the rhizospheric mechanisms involved in the success of rhizodegradation is the capability of PGPR to consume 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC), the precursor of the stress phytohormone

ethylene. Several microorganisms present genes encoding for ACC deaminase (ACCd). This bacterial enzyme transforms the plant ACC into  $\text{NH}_4^+$  and  $\alpha$ -ketobutyrate, for the plant to obtain the nitrogen contained in the ACC molecule. While doing so, bacteria are directly competing with the ACC oxidase (ACO), enzyme that catalyzes the transformation of ACC into ethylene. ACCd depletes ACC reserves in the plant tissues, in such a way that plants have lower amounts of ethylene within the root systems. This, ultimately, leads to a promotion of root development in a contaminated environment. All of these processes acting simultaneously allow for a better performance of rhizodegradation of petroleum hydrocarbons.

consortia of hydrocarbon-degrading bacteria, follow their fate in the environment using molecular tools and measure their effect on rhizoremediation efficiency. It is also possible to measure the effects of various manipulations on the hydrocarbon-degrading microbiota abundance and activities in the rhizosphere using relatively inexpensive molecular tools such as qPCR.

### **2.2.1 Box 1: The holobiont and the hologenome**

All multicellular eukaryotes are associated with a wide diversity of microorganisms, forming an inseparable entity known as a holobiont (Rosenberg et al. 2009; Bordenstein et al. 2015; Van Opstal et Bordenstein 2015; Theis et al. 2016). This observation has led Ilana Zilber-Rosenberg and Eugene Rosenberg to enounce the hologenome theory of evolution that states that the hologenome (the combined genomes of the host and its microbiota) forms one of the units of evolution (Zilber-Rosenberg et Rosenberg 2008). Consequently, it is predicted that holobionts can rapidly evolve/adapt through their microbiota by: (i) horizontal gene transfer among their existing microbiota, (ii) recruitment of new microbes from the environment, (iii) shifts in the relative abundance/gene expression of various members of the microbiota. These mechanisms are thought to enable holobionts to adapt within a single or a few generations (Voss et al. 2015; Rosenberg et Zilber-Rosenberg 2016). It has recently been shown that the response of willows to stressful conditions (soil contamination) results in large shifts in the metatranscriptome of root and rhizosphere bacterial and fungal communities, but not in the plant root transcriptome (Gonzalez et al. 2018; Yergeau et al. 2018). Taken together, these results emphasize the importance of the plant microbiota in the response to environmental stresses and confirms that microbiota manipulation is a viable alternative to optimize phytoremediation (Quiza et al. 2015; El Amrani et al. 2015).

## **2.3 Soil organisms**

### **2.3.1 Microbes has plant-growth promoters**

Hydrocarbon contamination is often a complex mixture of chemicals, requiring several different genes and pathways for its complete degradation. Most components can be classified as



saturated aliphatic (alkanes) or aromatic hydrocarbons. Hydroxylation of an alkyl group catalyzed by oxygenases is usually the first step in the degradation of organic compounds alkanes. There are several categories of alkyl-group hydroxylases, including cytochrome P450s (CYP) and alkane hydroxylase (Harayama et al. 1992). The alkane hydroxylase catalyzes the hydroxylation of the terminal carbon of alkanes and consists of three different subunits, including the membrane-bound hydroxylase subunit encoded by *alkB*. CYP153, an enzyme of the CYP superfamily, can also catalyze the hydroxylation of alkanes (Van Beilen et al. 2006). Aromatic rings also need to be hydroxylated to be degraded, but the key step in aromatic hydrocarbon degradation is the opening of the hydroxylated aromatic ring, which is catalyzed by aromatic-ring-cleavage dioxygenases (Harayama et al. 1992). There are three main types of aromatic-ring cleavage dioxygenases (intradiol, extradiol and gentisate/homogentisate) that can be differentiated based on their substrate and on the position where the ring fission occurs relative to the hydroxyl groups (Harayama et al. 1992).

Many specific bacteria of the phylum *Actinobacteria* and *Proteobacteria* were shown to degrade aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). These bacteria are ubiquitous even in the most pristine environments (Yergeau et al. 2012; Yergeau et al. 2015b; Yergeau et al. 2015a), probably because many of the petroleum hydrocarbon contaminants are widespread naturally occurring molecules. Recent metatranscriptomic studies in the rhizosphere highlighted several key taxa that responded to petroleum hydrocarbon contamination. For instance, in a pot study, transcripts related to *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria* and *Acidobacteria* were more abundant in the rhizosphere of willows growing in contaminated soil as compared to non-contaminated soils (Yergeau et al. 2014). Also, functional genes related to aromatic and aliphatic hydrocarbon degradation were more prevalent in the rhizosphere of willows growing in contaminated soils (Yergeau et al. 2014), and these genes were shown to be related to bacterial orders such as *Actinomycetales*, *Rhodospirillales*, *Burkholderiales*, *Alteromonadales*, *Solirubrobacterales*, *Caulobacterales* and *Rhizobiales* (Pagé et al. 2015). In the field, the differences in the expression of hydrocarbon degradation genes and in the active taxa between the rhizosphere of willows growing in contaminated and non-contaminated soils varied and depended on the willow species (Yergeau et al. 2018). The abundance of PAH degrading genes was higher in phenanthrene-contaminated soils planted with ryegrass as compared to non-planted soils, with plants favoring the activities of bacterial degraders belonging to the *Pseudomonadales*, *Actinobacteria*, *Caulobacterales*, *Rhizobiales* and *Xhantomadales* (Thomas et al. 2016). Similarly, the presence of ryegrass was shown to stimulate the expression of bacterial PAH-ring hydroxylating dioxygenase genes, such as *nidA3*, *pdoA*, *nahAc* and *phnAc*

(Guo et al. 2017a; Guo et al. 2017b). Several *Lotus corniculatus* (common bird's-foot trefoil) and *Oenothera biennis* (common evening primrose) root endophytes belonging to the genera *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* and *Rhodococcus* harbored genes encoding for CYP153 alkane hydroxylases and showed the capacity to grow with n-hexadecane as sole source of carbon (Pawlik et al. 2017). Other plants, such as *Achillea millefolium* (yarrow), *Solidago canadensis* (Canadian goldenrod), *Trifolium aureum* (hop clover) and *Dactylis glomerata* (orchard grass), growing in a heavily contaminated site, harbored hydrocarbon-degrading bacterial endophytes mostly belonging to the *Actinobacteria* (Lumactud et al. 2016).

Fungi are particularly interesting in the context of rhizoremediation in view of their ability to form intimate associations with plant roots and colonize large volumes of soil through hyphal growth, and their production of a wide spectrum of extracellular hydrolytic enzymes, allowing them to grow on a wide variety of substrates. Ectomycorrhizal and saprotrophic basidiomycetes (white and brown rot fungi) have shown remarkable in vitro capacity for the degradation of PAHs and phenolic compounds, among others. Fungal hydrocarbon degradation is mostly an extracellular process, consisting in the release in the environment of active broad-specificity oxidoreductase enzymes, such as laccases, manganese peroxidases and lignin peroxidases (Harms et al. 2011). In nature, these enzymes are mainly used to degrade lignin (a cross-linked phenolic polymer), but their low specificity also allows them to degrade other phenolic compounds, such as the ones found in petroleum hydrocarbons (Karigar et Rao 2011). A detailed list of fungi degrading organic pollutants is given in the review by Kadri et al. (2017), but it is still difficult to pinpoint which fungi is the most effective for rhizoremediation and what environmental factors influence this efficiency. For instance, the colonization of the rhizosphere and roots by fungi depend on factors like root exudate patterns, which are influenced by the presence of contaminant (Harms et al. 2011).

However, even if the microbial partners have the genetic capacity to degrade the contaminants, many substances are recalcitrant and elude microbial degradation. For instance, high molecular weight petroleum molecules (HMW) present a low bioavailability (Gamerding et al. 1997) and a high degree of adsorption to soil organic matter (Reddy et Sethunathan 1983) and are thus difficult to access by microbes. At the same time, high concentrations of these substances inhibit root elongation and ramification (Peña-Castro et al. 2006; Ma et al. 2010). Furthermore, the efficiency of the rhizoremediation depends on the microbes capable of surviving within the polluted niche, which in turn depends on the microbial diversity originally present in the polluted soil.

### 2.3.2 Microbes has plant-growth promoters

One of the most important factors for maximizing the success of rhizoremediation is facilitating the growth of the plant root system. Rhizoremediation can only occur in the direct vicinity of plant roots and any treatment that can increase the growth of plant roots will result in a positive outcome for rhizoremediation (Figure 2-1B). The root-associated PGPR that can stimulate plant growth and help them tolerate stress, are frequently used under agricultural settings, but their use for phytoremediation has received less attention, representing a huge untapped potential.

Several mechanisms of action of PGPR have been described up to now (Olanrewaju et al. 2017). Some strains produce phytohormones related to plant growth and development such as indole-3-acetic acid (IAA) (Patten et Glick 1996; Spaepen et Vanderleyden 2011; Raut et al. 2017) and gibberellic acid (Gutiérrez-Mañero et al. 2001). Other strains, such as phosphate-solubilizers, mobilize nutrients from soil, making them more available for the plant (Rodríguez et Fraga 1999), whereas other PGPR compete with pathogens and suppress their action (Beneduzi et al. 2012). One particularly interesting way through which PGPR contribute to rhizoremediation is the suppression of the plant responses to stress, making the plant function as if there was no stress. Many mechanisms were shown to be involved in the enhancement of plant stress tolerance by microbes. Some target the modulation of plant stress genes (Timmusk et Wagner 1999) or the reduction of the stress hormone ethylene levels through degradation of its precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) by the bacterial enzyme ACC deaminase (Mayak et al. 2004; Glick 2005; Glick et al. 1998). By reducing the levels of ethylene, bacteria harboring the ACC deaminase gene allow plants to function as if they were not subjected to stress and to develop their root system normally. In other cases, the expression of plant genes related to stress protection can be activated by bacterial volatile organic compounds (Ryu et al. 2004) or the drought stress-related DNA methylation patterns can be modulated by endophytes (Hubbard et al. 2014).

Some studies have inoculated PGPR strains in the rhizosphere to improve plant growth under contaminated conditions. Liu et al. (2014) found that inoculating tall fescue with the ACC deaminase-producing *Klebsiella* sp. enhanced plant growth and petroleum hydrocarbon remediation efficiency. Similarly, *Avena sativa* (common oat) growing in oil-contaminated soil and inoculated with an *Acinetobacter* PGPR strain showed an increased dry mass and stem height compared to controls, along with a higher rate of decontamination (Xun et al. 2015). Inoculating bacterial strains transformed with a plasmid containing the ACC deaminase gene was shown to be more effective in promoting *Brassica napus* (rapeseed or canola) growth in PAH contaminated

soils than when inoculating with the wild-type strains (Reed et Glick 2005). More recently, *Zea mays* growing in soils contaminated with 10 g kg<sup>-1</sup> light crude oil and inoculated with a *Bacillus subtilis* strain producing ACC deaminase showed a significant increase in height, root length and biomass, which resulted in a 43% increase in petroleum hydrocarbon degradation compared to uninoculated plants after 60 days (Asghar et al. 2017). In a 3-year field test carried at a site located in Ontario (Canada), the inoculation of PGPR resulted in an increased plant biomass and a reduction of the recalcitrant petroleum hydrocarbon fractions with HMW (Gurska et al. 2009). The inoculation of plant-growth promoting endophytes was also shown to be effective for the rhizoremediation of petroleum hydrocarbons. The inoculation of the endophyte *Pseudomonas putida* PD1 in two willow clones (*Salix purpurea* 94006 and *Salix discolor* S-365) growing in soil contaminated with 100 mg kg<sup>-1</sup> phenanthrene resulted in a 25–40% increase in the degradation rate of this PAH compared to uninoculated controls (Khan et al. 2014).

Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) have multiple interesting roles that can improve rhizoremediation. For instance, under contaminated settings AMF can modify the rhizosphere microbial communities (Iffis et al. 2016, 2017) and improve plant growth (Xun et al. 2015), thereby likely increasing the efficiency of rhizoremediation. It is also well known that AMF can improve plant nutrition (Smith et Read 2008) or provide protection against pathogens (Hamel 2007; Tang et al. 2009), which could result in increased root growth and increased stimulation of the rhizosphere microorganisms. The AMF *Glomus mosseae* was shown to improve rhizoremediation of PAH, with significantly higher reductions in the concentrations of chrysene and dibenz(a,h)anthracene in AMF-inoculated pots as compared to non-inoculated pots (Joner et al. 2001). Interestingly, non-inoculated pots had degradation levels similar to those observed for non-planted pots. In a field study, the AMF associated with willows were strongly structured by the contamination levels, with reduced diversity at higher contamination levels, suggesting that only a narrow number of AMF can thrive in these highly contaminated environments (Hassan et al. 2014). Ectomycorrhizal fungi were also shown to be influenced by contamination levels, with some species only associating with local willow genotypes under high contamination levels (Bell et al. 2014a). The same fungus was subsequently shown to be related to willow Zn uptake at a metal contaminated field site (Bell et al. 2015). A holistic approach combining AMF and PGPR inoculation, as it has already been proposed in the context of crop production (Nadeem et al. 2014), could lead to more effective rhizoremediation strategies due to the synergistic effect these organisms can have in improving plant physiology and by increasing of the volume of soil under the influence of the roots.

### 2.3.3 Other soil organisms

Although not part of the plant microbiome *per se*, many other organisms living in the soil can influence the interactions between the plant, the microbiome and contaminated soils during rhizoremediation. As such, they could be interesting targets for plant microbiome manipulation. These organisms include nematodes, protists, collembola, and earthworms among others. In this section, we will focus on earthworms as a model soil organism for modulating rhizoremediation. Earthworms are typical soil inhabitants making up > 80% of the biomass of soil macrofauna (Yasmin et D'Souza 2010), and are frequently found in the rhizosphere environment (Springett et Gray 1997). Earthworms can survive in the most highly contaminated soils as only water soluble compounds can be absorbed through their skin (Jager 1998), which excludes most toxic PAHs (Ma et al. 1998) and PCBs (Beyer et Stafford 1993). For instance, Zavala-Cruz et al. (2013) recorded the presence of *Pontoscolex corethrurus*, *Gossodrillus* sp. and *Dichogaster salines* in a site polluted with crude oil for 20 years with petroleum hydrocarbons concentrations up to 12 000 mg kg<sup>-1</sup>. The model species *Eisenia fetida* can survive to up to 3500 mg kg<sup>-1</sup> of petroleum hydrocarbons (Geissen et al. 2008). Several studies have shown that the presence of earthworms improves or accelerates the degradation rate of several PHC. For instance, the application of the earthworm *E. fetida* resulted in the removal of 92% of anthracene from an arable soil after 56 days, as compared to 57% in the untreated soil (Delgado-Balbuena et al. 2016).

Earthworm are also having a strong impact on soil microbial community composition (Emmerling et Paulsch 2001), and the bacterial taxa containing major hydrocarbon degraders (such as the *Proteobacteria*) are often more abundant when earthworms are present. For instance, the application of the earthworms to an anthracene contaminated soil resulted in a shift in the soil microbial community with a decrease in the relative abundance of *Gemmatimonadetes*, *Chloroflexi* and *Acidobacteria* and an increase in the *Proteobacteria* compared to the untreated soil (Delgado-Balbuena et al., 2016). Similarly, the *Alpha*- and *Betaproteobacteria* were shown to be mostly unaffected after their passage through the digestive system of the earthworms (Nechitaylo et al. 2010). *Betaproteobacteria* were in fact stimulated in the presence of the earthworm *P. corethrurus* (Bernard et al. 2012). Additionally, the degradation of many hydrocarbon substances may start in the direct environment of the earthworm, as many known degraders such as *Rhodococcus* and *Azotobacter* were found in the burrows of *Lumbricus terrestris* (Tiunov et Dobrovolskaya 2002), whereas other known degraders such as *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acidobacterium*, and the fungus *Penicillium*, were found in the intestine and cast of earthworms (Singleton et al. 2003).

In addition to the ones mentioned above, earthworms have other roles that could make them a key component of rhizoremediation. Indeed, earthworms are recognized ecological engineers, contributing to the mineralization and humification of organic matter (Lavelle et Spain 2001), being highly mobile vectors moving bacteria in and out the rhizosphere (Luepromchai et al. 2002), and improving water infiltration and soil aeration (Bartlett et al. 2010). Although all these activities are expected to positively stimulate rhizoremediation, only a few studies have tested the effect of earthworms in the context of rhizoremediation. One such study looked at PCB rhizoremediation and found that ryegrass co-inoculated with AMF and earthworms decreased soil PCB contents by 79.5% as compared to 74.3% for AMF alone, 62.6% for earthworms alone or 58.4% for ryegrass alone (Lu et al. 2014). Earthworms and other soil fauna thus represent an unexploited potential for rhizoremediation of petroleum hydrocarbons.

## **2.4 Plant root exudates**

Root exudates have been identified as a major ecological driver that actively modulate the microbial community composition, diversity and activity of the rhizosphere (Figure 2-1A). The plant exudes a variety of specialized antimicrobials and signaling molecules (e.g. flavonoids, salicylic acid and phytoalexins), carbon (e.g. organic acids, aromatic compounds) and nitrogen (e.g. amino acids) compounds. Therefore, only a specific group of microbes that can utilize these compounds are selectively enriched in this highly competitive environment (Marcial Gomes et al. 2003; Haichar et al. 2008; Berg et al. 2009). However, exudation is not for the sole benefit of microbes; it also directly benefits the plant itself. For instance, organic acids, such as malate, citrate and oxalate are often present in the rhizosphere, and in addition to being a carbon source for many microbes, they are involved in many plant processes like nutrient acquisition, metal detoxification, and alleviation of stress (Jones 1998). Plants confronted with stressful environments normally respond by increasing root exudation (Qin et al. 2007; Jones et al. 2004), which leads to increased microbial biomass (Esperschütz et al. 2009) and activity (Yergeau et al. 2014) in the rhizosphere. Root exudates can also improve the availability of contaminant for microbial degradation, as it was shown that the desorption of phenanthrene and pyrene from soil particles was increased by the addition of citric and oxalic acid (Gao et al. 2010). An increasing amount of scientific evidence points towards the crucial importance of exudates as mediators of hydrocarbon rhizoremediation (Martin et al. 2014; Rohrbacher et St-Arnaud 2016).

Interestingly, many compounds found in the rhizosphere are analogous to organic contaminants (Singer et al. 2003), including terpenes, lignin derived components and flavonoids (Hartmann et

al. 2009). Negative correlations between the concentrations of plant root exudates and petroleum hydrocarbons have been observed, with lower concentrations of PHC observed close to the roots where maximum concentrations of exudates are found (Gao et al. 2011; Ling et al. 2013), because exudates induce the degradation of PHC by rhizospheric microorganisms (Sun et al. 2010). For instance, the phenolic root exudates fomonin, caffeic acid and protocatechuic acid were linked to bacterial degradation of tricyclic and tetracyclic PAHs in the rhizosphere (Ely et Smets 2017) and increases in phenolic root exudates have been associated with higher rates of degradation of benzo[a]pyrene in the rhizosphere of *Phragmites australis* (cosmopolitan common reed) (Toyama et al. 2011). In fact, the rhizosphere of plants is often enriched in microbial genes related to the degradation of organic contaminants that are actively expressed even in the absence of contaminants (Yergeau et al. 2014). Conversely, in the absence of plants, supplementing a PAH contaminated agricultural soil and a pyrene-spiked soil with maize and soybean exudates resulted in an increased initial PAH degradation that faded through time as exudates were depleted (Guo et al. 2017a, b). The interaction between *Mycobacterium* and the root exudates accelerated the removal of PAH by provoking a shift in the soil bacterial community structure and diversity (Guo et al., 2017a, b).

## **2.5 Rhizoremediation as a model for microbiome manipulation**

### **2.5.1 Choosing the right plant**

Choosing the right plant is crucial to achieve optimal rhizoremediation. The main aspects to take into account when choosing the best fit for rhizoremediation are root morphology, plant tolerance to the contaminant and root exudate profile. For instance, various *Poaceae* species (grasses) are often selected for rhizoremediation purposes as they produce a dense secondary root system that can harbor an abundant microbial community (Adam et Duncan 2002; Lee et al. 2008; Gaskin et Bentham 2010; Barrutia et al. 2011). However, most *Poaceae* plants are not appropriate when the pollutants have reached deeper layers in the soil, and deeper rooting plants, such as trees like willows or poplars should be preferred in these cases (Kuzovkina et Volk 2009). The quantity and quality of root exudates also vary substantially even between closely related plant genotypes, resulting in significant differences in the recruitment and stimulation of microbes in the rhizosphere (Lundberg et al. 2012; Yergeau et al. 2018). This variation in the microbiome then results in different degradation rates in the rhizosphere of different plant genotypes. The choice of the right plant is thus one of the actionable ways to manipulate the rhizosphere microbiome and increase remediation rates.

Many studies have shown that different plant species have different capacity for the rhizoremediation of petroleum hydrocarbons. For instance, the removal rate of eight PAHs (tetracyclic and pentacyclic) was measured in the rhizosphere of *Echinacea purpurea* (purple coneflower), *Festuca arundinacea* (tall fescue), and *Medicago sativa* (alfalfa) growing in pots (Liu et al. 2015). Although the degradation rates increased for all plants as compared to the unplanted controls, the level of degradation strongly varied by plant species (Liu et al., 2015). Similarly, in a field study on a former coal mine site, the capacity for various legume tree species [*Cassia siamea* (cassod tree), *Albizia lebbbeck* (lebbeck), *Delonix regia* (flame tree) and *Dalbergia sissoo* (North Indian rosewood)] to reduce soil PAH levels was evaluated (Mukhopadhyay et al. 2017). The results showed that the degradation rates varied from 51.5% to 81.6% among the trees tested (Mukhopadhyay et al., 2017).

The response of the plant itself to contamination will also have a determining effect on the success of rhizoremediation. Willow genotypes showed large differences in the response of their growth patterns and physiology to contamination (Grenier et al. 2015). These results were mirrored in the transcriptomic response of the rhizosphere microbiota (Yergeau et al., 2018), with the willow species showing the largest decreases in biomass and photosynthetic capacity also showing the largest decreases in the expression of genes in their associated microbiota. This suggests that the physiological responses of the willow genotypes to contamination could be good indicators of their rhizoremediation potential. Additionally, when growing in highly contaminated soils in Canada, North American willow genotypes showed a strong association with an ectomycorrhizal fungus, *Sphaerospora brunnea*, whereas Asian and European genotypes did not associate with this particular fungus (Bell et al. 2014a, b). Therefore, the region of origin of the plant appears to have an importance, with local plants being better adapted to interact with the local beneficial soil microbiota.

### **2.5.2 Modify the microbiota**

Generally, indigenous hydrocarbon-degrading microbes in contaminated soils can be efficiently stimulated by plants (Yergeau et al. 2014; Pagé et al. 2015) or fertilizers (Yergeau et al. 2009b; Bell et al. 2011; Yergeau et al. 2012). Bioaugmentation (inoculations) with a single or a few hydrocarbon-degrading strains is thus generally ineffective (Thomassin-Lacroix et al. 2002), and it has been shown that pre-selecting microorganisms that can degrade hydrocarbons results in less efficient degradation than using the entirety of the microbes present in a soil (Bell et al. 2016). However, a recent report suggested that the success of invasion by the inoculated microbes could

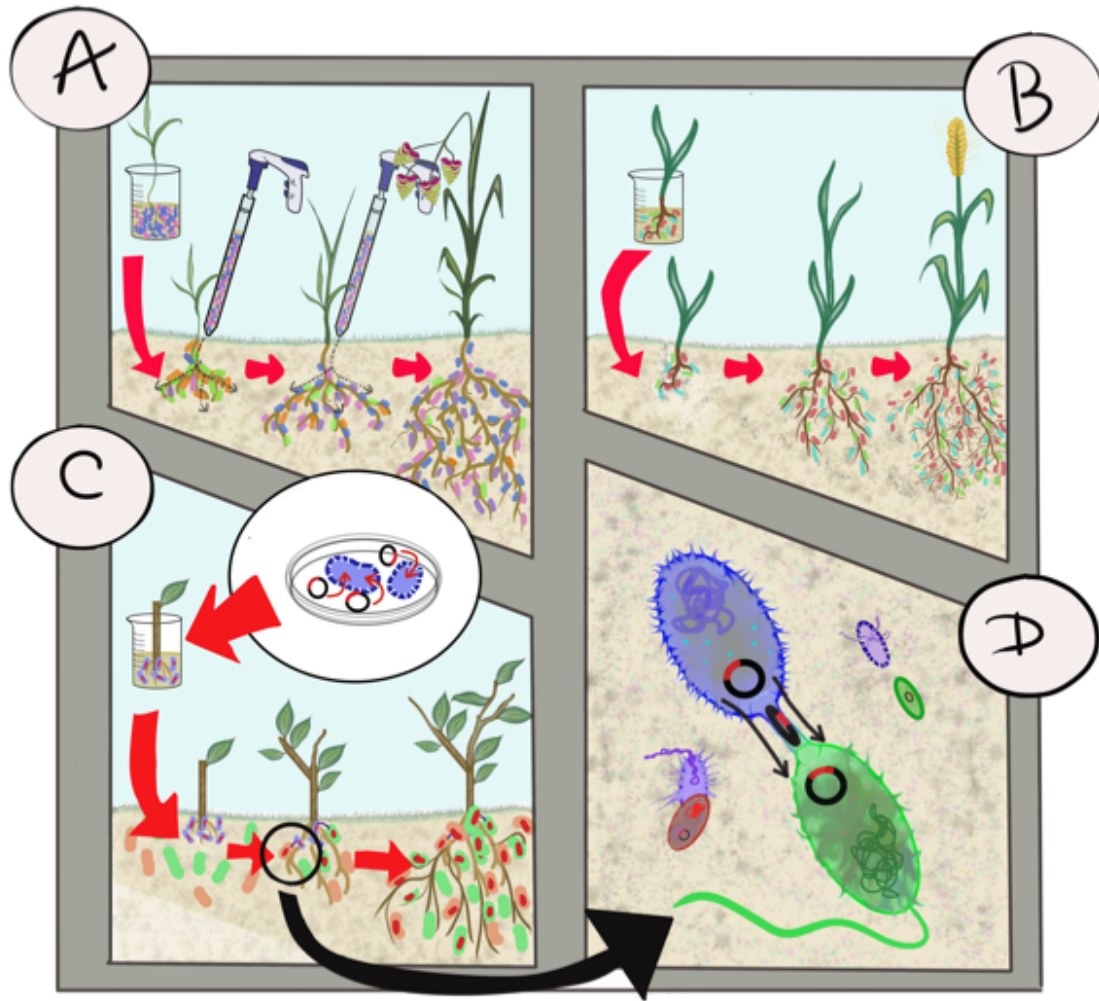


be increased by successive inoculation (Figure 2-2), as the initial inoculation opens up a niche space for the invader (Mallon et al. 2018). The inoculum density could also play a role for single strain inoculations, as the inoculation of *Lolium perenne* (perennial ryegrass) with different concentrations of the alkane degrading *Pantoea* sp., resulted in maximum plant growth, diesel degradation, bacterial abundance and CYP153 alkane hydroxylase gene expression in the treatment with the densest inoculation (108 cell cm<sup>-3</sup> soil) (Shabir et al. 2016). In addition, several studies have reported successful single PGPR strain inoculations in the context of rhizoremediation (Asghar et al. 2017; Reed et Glick 2005; Gurska et al. 2009; Xun et al. 2015).

Alternatively, the inoculation of consortia is generally more efficient than individual strains for degrading hydrocarbons (Ghazali et al. 2004; Heinaru et al. 2005; Jacques et al. 2008; Mroziak et Piotrowska-Seget 2010)(Figure 2-2). Some of the desired properties for the microbial constituents of a rhizoremediation consortia have been suggested: (i) be proficient in the colonization of the plant root surface in the rhizosphere, (ii) be able to survive, grow and not outcompete the rest of the members of the consortia, (iii) be able to attach to the root surface, (iv) be able to promote plant growth or the growth of other members of the consortia, (v) be able to handle abiotic stress, especially contaminant stress, (vi) be able to grow to the desired density under stressful conditions (Yang et al. 2009; Calvo et al. 2014). Consequently, candidate microbes for a rhizoremediation consortia should at least be selected for the strength of their association with the plant, with traits such as a strong chemotaxis towards plant root exudates and a strong attachment to the plant root surface (Bashan et al. 2014; Yang et al. 2009).

Taking the concept of consortia one step further, some studies have tried using synthetic communities for rhizoremediation (Pizarro-Tobias et al. 2015). These synthetic communities should be designed to improve positive interactions, like commensalism and cooperation, while preventing negative interactions like predation and parasitism. Furthermore, several hydrocarbon degraders should be combined to ensure the presence of a diverse and redundant hydrocarbon degradation gene pool. Ideally, synthetic communities should be prepared from hundreds to thousands of strains, making it nearly impossible to test all interactions between consortia members. It is also difficult to maintain synthetic microbial communities for several generations (Johns et al. 2016), probably because of the numerous interactions happening simultaneously between members of the synthetic community (Stubbendieck et al. 2016). The use of naturally occurring, highly performing communities could be a better alternative, removing the need to test the compatibility of isolated strains with each other. Indeed, exposing willows to differentially selected initial soil communities can result in large differences in biomass when willows are grown

under high stress levels, and these differences persist through time even though rhizosphere microbial communities become eventually identical (Yergeau et al. 2015a). This lends weight to the idea that exposing the plant partner to a different complex microbiota during its establishment can result in an improved growth in contaminated soils. However, many technical hurdles are facing the propagation and inoculation of complex microbiota at large scales.



**Figure 2-2 Biotechnological techniques aimed at engineer the microbiome.**

**A.** The first technique consist in inoculating a consortia of microbes acknowledged as degraders. The local microbial community displaces the members of the artificial consortia. To ensure the success of colonization, several inoculations can be made in time. **B.** Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) colonize the rhizosphere more effectively than local microbes because the former improve plant fitness and thus, there is a positive selection exerted by the plant by the means of root exudates. Usually a single event of inoculation is enough to establish the PGPR community. **C.** A third technique consists in using a given bacteria species as a vector to bring genes of interests (degrader genes or genes related to plant growth promotion) into the local microbial community. One or several inoculations with the clone carrying a plasmid can effectively introduce the genes into the community. Usually, members of the local community displace the bacteria used as transport vector. **D.** However, the vector can effectively transform other bacteria in the rhizosphere, thus increasing the number of degrader/PGPR genes in the community.

Inoculating bacteria that harbored hydrocarbon degradation genes on mobile genetic elements has resulted in some successes (Figure 2-2). For example, Weyens et al. (2009) observed a decrease in trichloroethylene (TCE) evapotranspiration (thus an increased degradation) after inoculation of hybrid poplars with a *Pseudomonas* strain containing a plasmid coding for the constitutive expression of the TCE degradation genes. This strain altered the rhizosphere community, even though it did not establish in this compartment. The strain did establish inside plant tissues, and the plasmid it contained was transmitted to other members of the endophytic community (Weyens et al., 2009). Similarly, the inoculation of two *Burkholderia* strains containing a plasmid coding for the constitutive expression of toluene degradation genes resulted in an improved plant growth and an increased toluene degradation (reduced evapotranspiration) (Taghavi et al. 2005). Although the two strains could not be detected in the plants, the plasmid they carried was detected in various other endophytic bacteria (Taghavi et al., 2005). Both these examples used endophytic bacteria, but a similar approach could be used for rhizoremediation, especially in view of the enhanced horizontal gene transfer rates in the rhizosphere (Van Elsas et Bailey 2002).

### 2.5.3 Predictive models

Because it is a biological process, the time for soil decontamination by way of phytoremediation is difficult to estimate accurately, which often makes this option less attractive. Recent work has provided interesting evidence that various ecosystem processes could be predicted from microbiological data. For instance, the degradation of diesel in arctic soils could be predicted by the initial bacterial diversity and the abundance of specific assemblages of *Betaproteobacteria*, which was also related to the soil organic matter content (Bell et al. 2013). In that study, high *Betaproteobacteria* abundance was positively correlated with high diesel degradation. The predictability with which bacterial communities respond to these disturbances suggest that costly and time-consuming chemical assessments of contaminated sites may not be necessary in the future and could be replaced by simple biological assessments (quantification of *Betaproteobacteria*). Similarly, the growth of willows after 100 days in highly contaminated soil could be predicted by the initial bacterial and fungal community composition and the initial relative abundance of specific taxa (Yergeau et al., 2015a). The Zn accumulation by willows growing for 16 months in a former landfill could be predicted by the relative abundance of specific fungal taxa in the rhizosphere after 4 months of growth (Bell et al. 2015). It therefore appears that the

composition and relative abundance of the early colonizers of the plant environment are good predictors of its future behavior. Creating predictive models could assist in choosing the right plant and the right microorganisms for a specific site without the need for labor-intensive and costly preliminary trials, and, more importantly, estimate more precisely the time that will be needed for complete rhizoremediation.

## **2.6 Perspectives**

Despite the remarkable advances detailed above, phytoremediation remains a marginal option for in situ soil remediation (Mench et al. 2010). The major obstacle to market penetration is that many sites to be decontaminated are in peri-urban areas and need to be efficiently decontaminated over a short period, which is incompatible with the current practice of in situ phytoremediation. Additionally, phytoremediation is rarely suggested as a remediation technique by accredited experts because it is believed to be inefficient and because of the inability to precisely determine the duration of this biological process as it depends on contaminant and soil natures, plant used, environmental conditions and microbial activities (Montpetit et Lachapelle 2015, 2016). One of the main reasons behind this was the low level of knowledge shown by accredited experts in the field of soil remediation partly due to poor communication from scientists (Montpetit et Lachapelle 2015, 2016). Therefore, on top of research efforts aiming at better understanding the plant–microbe interactions during rhizoremediation, future endeavors should also (i) set-up large scale demonstration experiments, potentially using integrated bioremediation approaches (Megharaj et Naidu 2017), (ii) partner with environmental consulting firms and accredited experts, (iii) develop a genomics-based tool to suggest management strategies and predict the duration of phytoremediation and (iv) test novel microbiome management approaches applicable at the field scale, such as inocula combining PGPR and microbial degraders (Baez-Rogelio et al. 2017).

## **2.7 Conflict of interest**

None declared.

## **2.8 Acknowledgments**

This work was supported by NSERC Discovery grants RGPIN-2014-05274 to EY and RGPIN-2014-05426 to MSA and by a NSERC Strategic grant for projects STPGP 494702 to EY and MSA. SCG was supported by the Research Associate Program of the Government of Canada.

## **2.9 References**

All references for the present chapter are located at the end of the thesis.





### **3 SOIL CHARACTERISTICS CONSTRAIN THE RESPONSE OF MICROBIAL COMMUNITIES AND ASSOCIATED HYDROCARBON DEGRADATION GENES DURING PHYTOREMEDIATION**

---

*Les caractéristiques du sol limitent la réponse des communautés microbiennes et des gènes de dégradation des hydrocarbures associés pendant la phytoremédiation.*

**Auteurs :**

Sara Correa-Correa García<sup>1,2</sup>, Karelle Rheault<sup>2</sup>, Julien Tremblay<sup>3</sup>, Armand Séguin<sup>2</sup>, and Etienne Yergeau<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie, Institut national de la recherche scientifique, Université de Québec, Laval, QC, Canada

<sup>2</sup> Laurentian Forest Center, Natural Resources Canada, Québec City, QC, Canada

<sup>3</sup> Energy, Mining and Environment, National Research Council Canada, Montréal, QC, Canada

**Titre de la revue ou de l'ouvrage :**

ASM – Applied and Environmental Microbiology, volume 87, numéro 2, pages : e02170-20

Publié en ligne le 4 Janvier 2021

DOI : <https://doi.org/10.1128/AEM.02170-20>

**Contribution des auteurs :**

Sara Correa García : conceptualisation, méthodologie, montage expérimental, travaux de terrain, collecte de données, curation des données, analyse de données, recherche, écriture du brouillon original, édition

Karelle Rheault : méthodologie, travaux de terrain, montage expérimental, édition du brouillon original

Dr. Julien Tremblay : analyse des données bio-informatiques, écriture du brouillon original

Dr. Armand Séguin : conceptualisation, méthodologie, montage expérimental, supervision, édition du brouillon original, ressources et infrastructures.

Prof. Etienne Yergeau : conceptualisation, méthodologie, supervision, écriture et édition du brouillon original, ressources et infrastructures.



### 3.1 Abstract

Rhizodegradation is a promising cleanup technology where microorganisms degrade soil contaminants in the rhizosphere. A symbiotic relationship is expected to occur between plant roots and soil microorganisms in contaminated soils that enhance natural microbial degradation in soils. However, little is known about how this initial microbiota influences the rhizodegradation outcome in a context of different soil microbiotas. Recent studies have hinted that soil initial diversity has a determining effect on the outcome of contaminant degradation. To test this, we planted (P) or not (NP) balsam poplars (*Populus balsamifera*) in two soils of contrasting diversity (agricultural and forest) that were contaminated or not with 50 mg kg<sup>-1</sup> of phenanthrene (PHE). The DNA from the rhizosphere of the P and the bulk soil of the NP pots was extracted and the bacterial genes encoding for the 16S rRNA, the PAH ring-hydroxylating dioxygenase alpha subunits (PAH-RHD $\alpha$ ) of gram-positive and gram-negative bacteria, and the fungal ITS region were sequenced to characterize the microbial communities. The abundance of the PAH-RHD $\alpha$  genes were quantified by real-time quantitative PCR. Plant presence had a significant effect on PHE degradation only in the forest soil, whereas both NP and P agricultural soils degraded the same amount of PHE. Fungal communities were mainly affected by plant presence, whereas bacterial communities were principally affected by the soil type, and upon contamination the dominant PAH degrading community was similarly constrained by soil type. Our results highlight the crucial importance of soil microbial and physicochemical characteristics in the outcome of rhizoremediation.

### 3.2 Importance

Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) are a group of organic contaminants that pose a risk to ecosystems' health. Phytoremediation is a promising biotechnology with the potential to restore PAH contaminated soils. However, some limitations prevent it from becoming the remediation technology of reference, despite being environmentally friendlier than mainstream physicochemical alternatives. Recent reports suggest that the original soil microbial diversity is the key to harness the potential of phytoremediation. Therefore, this study focused on determining the effect of two different soil types in the fate of phenanthrene under balsam poplar remediation.

Poplar increased the degradation of phenanthrene in forest, but not in agricultural soil. The fungi were affected by poplars, whereas bacteria and PAH degraders were constrained by soil type, leading to different degradation patterns between soils. These results highlight the importance of performing preliminary microbiological studies of contaminated soils to determine whether plant presence could improve remediation rates or not.

### 3.3 Introduction

The expansion of the human population coupled with a burst in industrialization has led to a sensible increase in fossil fuel combustion (Jonsson 2012). As a result, there has been an increase in all types of pollutant emissions, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) (Jones et al. 1989; Ravindra et al. 2008). PAH are organic compounds formed by a variable number of fused aromatic rings that constitute a priority concern due to their adverse effects on environmental (Menzie et al. 1992) and human health (Kim et al. 2013). PAH are ubiquitous in the environment and are often found polluting soils (Wilcke 2007). This is of special concern, since soil is one of the most important resources upon which many key human economic and social activities depend (Robinson et al. 2017).

To remediate soils, a wide range of clean up technologies have been developed, ranging from relatively simple but expensive excavation, transportation, washing and dumping of small affected soil areas (Kuppusamy et al. 2016) to more complex but comparatively cheaper phytoremediation strategies where the soil is cleaned up by the combined action of plant and microorganisms (Pilon-Smits 2005). Phytoremediation has proven to be effective to decontaminate soils polluted by PAH (Kuppusamy et al. 2017; Lu et Lu 2015; Spriggs et al. 2005; Guo et al. 2018). Among the many types of phytoremediation approaches, rhizodegradation is a genuine plant-microbe co-enterprise, with the potential to completely remove PAH from soils through the action of bacterial, fungal and plant enzymes in the rhizospheric environment (Correa-García et al. 2018). Members of the *Salicaceae* family, such as willows and poplars, are often seen as good candidates for phytoremediation in view of their deep rooting system, their extremely rapid growth, their large evapotranspiration rates, their high genetic diversity, their resistance to biotic and abiotic stresses, their ease of clonal propagation through cuttings, and the availability of genetic tools and sequenced genomes. For instance, the model species selected here, *Populus balsamifera*, has a wide distribution in Canada and can thus adapt to various (cold) climates and soil types, making it an ideal candidate for phytoremediation in Canada.

Phenanthrene (PHE) is a low molecular weight PAH formed by three fused rings. In Canadian soils, background levels of PHE range between 0.05 and 0.14 mg kg<sup>-1</sup> in agricultural soils and are around 0.03 mg kg<sup>-1</sup> in rural soils, whereas in urban areas, the median and maximum concentrations measured were 5.7 and 66 mg kg<sup>-1</sup>, respectively (CCME Canadian Council of Ministers of the Environment 2008). However, the highest PAH concentrations in soils (as mixture of 16 contaminants) are found near former cocking plants, where values as high as 11,473 mg kg

<sup>-1</sup>, before restoration, have been registered (CCME Canadian Council of Ministers of the Environment 2008). PHE is known for its cytotoxic and carcinogenic effects on living organisms (Weis et al. 1998; Murray et Penning 2018). Because of this, Canada regulates the amount of phenanthrene that can be found in soils depending on the land use. As such, 50 mg kg<sup>-1</sup> of phenanthrene is the maximum amount that can be found in soil for commercial and industrial uses (CCME Canadian Council of Ministers of the Environment 2008). Beyond this threshold, the soil is considered contaminated and no activities can be carried out before the soil is remediated. In this study, in line with this threshold, soils were contaminated with 50 mg kg<sup>-1</sup> of phenanthrene.

Fortunately, PHE is relatively easy to degrade by a wide range of microorganisms through aerobic or anaerobic metabolic pathways (Cerniglia 1993). Most of microbial degraders are bacteria or archaea, although PHE degradation has been described among fungi (Haritash et Kaushik 2009; Agrawal et al. 2018). Typically, under aerobic conditions the initial step of the bacterial catabolic pathways starts with the incorporation of molecular oxygen into the aromatic nucleus by a ring hydroxylating dioxygenase (RHD) enzyme system to yield cis dihydrodiol. Cis-dihydrodiol is then rearomatized to a diol intermediate that is further transformed by ring-opening dioxygenases into catechols and other intermediates. Finally, these catechols can be converted to TCA cycle intermediates (Mallick et al. 2011; Cerniglia 1993; Eaton et Chapman 1992). RHD genes are often used as markers of PHE degradation, since they catalyze the first step of the degradation process. They are multicomponent enzyme systems composed of a large alpha subunit and a small beta subunit (Kauppi et al. 1998). The genes coding for the alpha subunit of PAH-RHD form a monophyletic group (Habe et Omori 2003), and were consequently used to design PCR primers for both Gram negative and Gram positive bacteria (Cébron et al. 2008), providing a useful way to track bacterial degraders in PAH contaminated environments.

Many microorganisms harbor RHD genes such as members of the genera *Enterobacter* (Cébron et al. 2014; Jha et al. 2012; Gonzalez et al. 2018) *Sphingomonas* (Li et al. 2019; Ding et al. 2012; Singha et Pandey 2020) , *Burkholderia* (Timm et al. 2016; Andreolli et al. 2011; Cébron et al. 2008; Pagé et al. 2015), *Pseudomonas* (Wang et al. 2014; Khan et Bano 2016; Cébron et al. 2014; Timm et al. 2016), *Mycobacterium* (Hormisch et al. 2004; Chen et al. 2016; Li et al. 2019; Guo et al. 2017b) and *Polaromonas* (Eriksson et al. 2002; Jeon et al. 2004; Ding et al. 2012), among others. Moreover, many of these microorganisms have been found to thrive in the rhizosphere of many plants (Thomas et al. 2019; Auffret et al. 2015), including trees, which explains, in part, the success of phytoremediation approaches.

Unravelling the complex microbe-soil-plant relationships within the context of rhizoremediation of PAH contaminated soils remains challenging but was suggested to be key to optimizing phytoremediation to increase its use (Bell et al. 2014b; Correa-García et al. 2018). Many recent studies have demonstrated that the diversity of microbial communities has an important role in the degradation prospects in soils (Bell et al. 2013; Bell et al. 2016) and in the rhizosphere of various *Salicaceae* tree species used for phytoremediation (Yergeau et al. 2015a; Bell et al. 2015). For instance, Bell et al. (2016) showed that a soil with a high initial diversity was more efficient at degrading complex hydrocarbon mixture than a soil inoculated with a consortium of confirmed hydrocarbon degraders. Furthermore, under high levels of hydrocarbon contamination, willows grew better when planted in a diverse bulk soil that was not previously planted than in a less diverse rhizospheric soil of a willow that had previously grown well under the same contamination conditions (Yergeau et al. 2015a). Taken together these two studies highlight the importance of a diverse initial microbial community over a less diverse pre-selected community for the successful degradation of hydrocarbon in soils. Other studies have shown that the initial community composition also had an importance for the degradation of hydrocarbons in soils. For instance, the initial relative abundance of some of the major families of *Betaproteobacteria* in the soil before contamination were significantly correlated to the amount of diesel degraded across a range of arctic soils (Bell et al. 2013). In another study, the total amount of zinc taken up by willows after 16 months of growth was strongly linked to the relative dominance of four fungal taxa in the rhizosphere of the plants after 4 months of growth (Bell et al. 2015). Soil microbiological characteristics appear to have a determining effect on the degradation of hydrocarbons and on the outcome of soil remediation efforts, potentially explaining the variable efficiency of phytoremediation in different soils and, consequently, its low retention as a preferred remediation technique (Mench et al. 2010).

Here, we hypothesize that differences in the microbiological characteristics of soil (namely, microbial diversity) are a major constrain to PAH rhizoremediation, overriding the rhizosphere effect central to this technology. We aimed at determining the response of the microbial communities of two different soils to contamination with phenanthrene and its subsequent rhizoremediation by poplars. To attain this objective, we designed a pot experiment and sequenced the 16S rRNA gene of bacteria and archaea, the ITS1 region of fungi and the PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes of Gram negative and Gram positive bacteria, and determined the residual concentration of phenanthrene after nine weeks of poplar growth.

## **3.4 Material and Methods**

### **3.4.1 Experimental design**

The experimental design consisted of a full factorial experiment involving three factors: soil contamination, presence of the plant, and soil type. The contamination factor consisted of two levels: soil contaminated with 50 mg kg<sup>-1</sup> dry soil of phenanthrene (PHE) and uncontaminated soils (CTRL). Plant presence consisted of either a pot without a plant (NP) or a planted pot (P). Finally, the soil type factor consisted of one agricultural and one forest soil. These three factors with two levels each produced 8 treatment combinations. The 12 total replicates per treatment were arranged in four blocks. Pots were randomly distributed inside blocks. A total of 96 pots were placed outside at the Laurentian Forestry Centre (Natural Resources Canada, Sainte-Foy, QC, Canada). After planting, the pots were covered with coconut fiber to reduce phenanthrene evaporation and photooxidation. The plants were subsequently connected to an automated irrigation system and received approximately 400 mL of water every day at 8 am. Phenanthrene leakage into the running water was evaluated and judged negligible for both soils in a preliminary experiment (data not shown). Therefore, no water collection system was implemented.

### **3.4.2 Soil and biological material**

In this experiment, two types of soils were selected: an agricultural soil and a forest soil. The agricultural soil was collected from the 15 cm of the upper soil layer from two sites closely situated within a family farm located in Ste-Famille de l'Île d'Orléans, Quebec, Canada (GPS coordinates site one: 46.941037,-70.974966 and site two: 46.937038, -70.968887). The farm had been alternating crops for more than thirty years with rotations including corn, soy, oat, hay, with fallow every three years. The forest soil used in this experiment was a mix of two different soils. Two thirds (vol/vol) of the forest soil mixture corresponded to soil collected from the upper layer of two closely situated forested plots of the Valcartier forest research station located in Saint-Gabriel-de-Valcartier, Quebec Canada (GPS coordinates for site one: 46.950110, -71.497922 and for site two: 46.951730, -71.497097). Due to the high content of organic matter and low mineral proportion of this forest soil, 1/3 of garden topsoil was incorporated to the forest soil. This was

done in order to better compare the two soil type matrices in terms of physical characteristics. The garden topsoil was acquired from a local company (Les développements Robko Inc., Quebec City, Quebec, Canada). All the soils used were thoroughly homogenized prior to sieving (4 mm mesh) and before setting the experiment. Physicochemical analyses of the experimental potting mixes were performed at AgroEnviroLab, La Pocatière, Quebec, Canada (Tableau Suppl. 1).

Half of each soil was spiked with 50 mg kg<sup>-1</sup> dry soil of phenanthrene according to the following protocol. One-tenth of the soil was spiked while leaving the rest untreated. Five hundred mg of phenanthrene (Sigma Aldrich) diluted in 100 mL of acetone were applied to 1kg batches of dried 2 mm sieved soil. The soil spiked this way was left outside protected from direct sunlight for 24 h until the acetone was completely evaporated. Then, the spiked batches were thoroughly incorporated into 9 kg of uncontaminated soil in a cement mixer until the potting mix reached homogeneity.

The plants used for the experiments were cuttings harvested from the same adult poplar tree. Cuttings were propagated following the method described in (Rheault et al. 2020). Briefly, cuttings were kept at 4 °C until rooting. Dormancy was disrupted by soaking the cuttings in a rooting mixture for a few weeks, then, planted in 500 g of potting media. Subsequently, between the 19<sup>th</sup> and the 21<sup>th</sup> of July 2017, a total of 48 trees were planted into 6 L pots containing approximately 5 kg of either agricultural or forest mix soil, PHE or CTRL. Forty-eight extra pots containing only soil were used for the non-planted treatments (NP).

### **3.4.3 Sampling and plant trait measurements**

The experiment was sampled between the 18<sup>th</sup> and 20<sup>th</sup> of September 2017, 9 weeks after planting. Aboveground biomass was clipped, collected and kept at 4 °C until biomass measurements. For the planted pots, the soil adhering to the roots after a vigorous shaking of the root system was considered as “rhizosphere” (P soil). The non-planted soil was collected at a depth of approximately 10 cm (NP soil). Soil samples were kept at 4 °C until transportation to the lab (around 2 h) where they were placed at -20 °C. Soil samples were used for phenanthrene and microbial community analyses. Harvested plants were weighed fresh and again after 24 h at 60 °C to obtain dry biomass. The remaining contaminated soils were left outdoor for photooxidation and complete biodegradation of phenanthrene for 14 months. Following an analytical confirmation of the complete disappearance of the phenanthrene, the soil was disposed of as regular soil.

#### 3.4.4 Phenanthrene quantification

Soil samples were analyzed for phenanthrene content at the end of the experiment for both NP and P pots. Two phenanthrene measurements were taken per biological replicate. The phenanthrene extraction protocol consisted of the following in-house method developed in the lab.

For sample preparation, approximately 4 g of frozen soil were introduced in a screw cap glass tube. Nine hundred  $\mu\text{L}$  of ethyl acetate were added to each sample together with 3 mL of distilled water. Ten ppm of phenanthrene- $\text{d}_{10}$  in 100  $\mu\text{L}$  of ethyl acetate was added as the internal standard. Glass tubes containing samples were shaken to thoroughly mix the soil with the organic solvent. Next, the tubes were placed in an ultrasonic bath at 60 kHz for 15 min to detach the remaining phenanthrene from the soil organic matter. Then, the tubes were placed horizontally in a shaker at 300 rpm and left overnight at room temperature. The next day, the tubes were centrifuged at 270 g for 10 min. Afterward, the ethyl acetate phase was recovered and further centrifuged at 5,000 g for 1 min. Lastly, the ethyl acetate containing the phenanthrene was recovered and placed in a GC vial for GC-MS analysis.

Extracts were analyzed for phenanthrene content with a Trace GC Ultra system (Thermo Scientific) equipped with a 30 x 0.25 mm (0.25  $\mu\text{m}$  thickness) DB-5 MS capillary column (Agilent J & W capillary GC) and coupled to a Polaris Q benchtop Ion Trap Mass Spectrometer. The injector and analyzer temperatures were at 250 °C and 350 °C, respectively. The GC-MS temperature program consisted of 2 min hold at 70 °C, increasing temperature to 310 °C at 30 °C  $\text{min}^{-1}$  followed by 6 min hold at 310 °C. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 0.3 mL/min. The injection volume was 3  $\mu\text{L}$  and the MS scan range was from 70-600 m/z.

Calibrations curves for the samples were prepared using phenanthrene as a marker. The phenanthrene was weighed and dissolved in ethyl acetate at concentrations ranging from 1 ppm to 100 ppm. Standard calibration curves were calculated by plotting the peak areas against the corresponding concentration of reference.



### 3.4.5 DNA isolation and amplicon library preparation

DNA was extracted from up to 250 mg of soil using the DNeasy® Powersoil® DNA Isolation kit (Qiagen) following the protocol provided. The bead-beating step was carried out on a FastPrep®-24 (MP Biomedicals) at 6 m/s for 45 s, twice. Bacterial and archaeal V4 regions of the 16S rRNA gene were amplified using the primer set 515F (5'- GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') – 806R (5'- GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al. 2012). The fungal internal transcribed spacer region 1 (ITS1) was amplified using the primers ITS1F (5'- CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') – 58A2R (5'- CTGCGTTCTTCATCGAT-3') (Martin et Rygielwicz 2005). The PAH-RHD $\alpha$  genes cluster corresponding to GN bacteria (*nahAc*, *nahA3*, *nagAc*, *ndoB*, *ndoC2*, *pahAc*, *pahA3*, *phnAc*, *phnA1*, *bphAc*, *bphA1*, *dntAc* and *arhA1*) was amplified using the primer set 610F (5'- GAG ATG CATACC ACG TKG GTT GGA-3') and 916R (5'- AGC TGT TGT TCG GGA AGAYWG TGC MGT T-3') and the genes cluster corresponding to GP bacteria (*narAa*, *phdA/pdoA2*, *nidA/pdoA1*, *nidA3/fadA1*) was amplified using the primer set 641F (5'- CGG CGC CGA CAA YTT YGT NGG-3') and 933R (5'- GGG GAA CAC GGTGCC RTG DAT RAA-3') developed elsewhere (Cébron et al. 2008). All microbial regions were amplified in 25  $\mu$ L volumes using 19.125  $\mu$ L of sterile water, 50 nM BSA, 20mM Taq reaction buffer ( 20mM Tris HCl pH 8.4), 400 nM (0.5  $\mu$ L at 20  $\mu$ M) of each primer, 500 nM of MgCl<sub>2</sub>, 200 nM dNTP, 0.25 U Taq DNA polymerase and 1  $\mu$ L of DNA template (5-10 ng/ $\mu$ L) on a T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad). Thermal cycling conditions for bacteria and archaea were as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min; 35 cycles at 95 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 1 min, and a final elongation phase at 72 °C for 5 minutes. For fungi, a similar protocol was used except that the annealing temperature was at 59 °C and 30 cycles were performed. PAH-RHD $\alpha$  genes also had different annealing temperatures set at 57 °C and 54 °C for GN and GP primer sets, respectively for a total of 30 cycles. Following amplification, PCR products were cleaned using 16  $\mu$ L of magnetic beads (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter Life Science) following the Illumina's protocol 16S Metagenomic Sequencing Library preparation guide (Part #15044223 Rev. B). Then, 400 nM of each Nextera XT unique index primers (2  $\mu$ L at 5  $\mu$ M) were added to 5  $\mu$ L of our PCR product, in a PCR mix containing 50 nM BSA, 20 mM Taq reaction buffer ( 20mM Tris HCl pH 8.4), 500 nM of MgCl<sub>2</sub>, 200 nM dNTP, 0.25 U Taq DNA polymerase and 12.175  $\mu$ L of sterile water. The PCR product was tagged under the following thermal cycling conditions: 95 °C initial denaturation phase for 5 min, followed by 8 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 30 s, elongation at 68 °C for 30 s, and a final elongation phase at 68 °C during 5 min. The indexed amplicons were purified using magnetic beads as described above, and quantified the DNA using the Quant-iT™ Picogreen dsDNA Assay kit (Invitrogen). The libraries were combined in an

equimolar ratio and sent them for 2 x 250 bp pair-end sequencing on an Illumina Miseq at The Genome Quebec Service Center (Montréal, QC, Canada).

### **3.4.6 Quantification of PAH degrading bacteria (qPCR)**

The real-time quantitative PCR (qPCR) was conducted on a Stratagene Mx3005P qPCR system (Agilent Technologies), associated with the corresponding software MxPro Mx3005P (v4.10; Agilent). The qPCR reactions were performed using the primers designed by (Cébron et al. 2008) in 20 µL total volume containing 1x iTaq universal SYBR® Green reaction mix supplemented with 300 µM of each primer (Integrated DNA Technologies™) and 5 µL of DNA template at a concentration around 5-10 ng µL<sup>-1</sup> or distilled sterile water (negative no template control).

The amplifications were carried out following the protocol provided in (Cébron et al. 2008) with some modifications. Briefly, the first step consisted of denaturation at 95 °C for 5 min followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing for 35 s at either 57 °C (GN) or 54 °C (GP) and an elongation step at 72 °C for 75 s, after which the SYBR Green signal intensities were measured. At the end of the run, a melting curve analysis was performed where signal intensities were measured at 0.5 °C temperature increment every 5 s from 51 to 95 °C. Standards for each gene were made from 10-fold dilutions of linearized plasmid containing the gene fragment of interest, cloned from amplified soil DNA (Yergeau et al. 2009b).

At the end of the qPCR run, the threshold line was automatically defined within the logarithmic increase phase of the acquired fluorescence data. The Ct values were assessed for all the samples and the gene copy numbers were deducted from the standard curve based on the Ct value. Efficacy of the qPCRs were of 89.3% (standard curve  $R^2 = 0.998$ ) and 92% ( $R^2 = 0.995$ ) for PAH-RHD $\alpha$  GN genes and 90.6% ( $R^2 = 0.995$ ) and 85.8% ( $R^2 = 0.999$ ) for PAH-RHD $\alpha$  GP genes.

### **3.4.7 Bioinformatic analyses**

Sequences were analyzed by AmpliconTagger (Tremblay et Yergeau 2019). Briefly, raw reads were scanned for sequencing adapters and PhiX spike-in sequences. Remaining reads were filtered based on quality (Phred) score and remaining sequences were dereplicated/clustered at 97% identity (16S rRNA and ITS genes) and then processed for generating Operational

Taxonomic Units (OTUs) (DADA2 v1.12.1) (Callahan et al. 2016). Chimeras were removed with DADA2's internal removeBimeraDeNovo(method="consensus") method followed by UCHIME reference (Edgar et al. 2011). OTUs for which abundance across all samples were lower than 5 were discarded. A global read count summary throughout the pipeline steps is provided in Tableau Suppl. 5 for all datasets. OTUs were assigned a taxonomic lineage with the RDP classifier (Wang et al. 2007) using an in-house training set containing the complete Silva release 138 database (Quast et al. 2013) supplemented with eukaryotic sequences from the Silva database and a customized set of mitochondria, plasmid and bacterial 16S sequences. For ITS OTUs, a training set containing the Unite DB was used (sh\_general\_release\_s\_04.02.2020 version). The RDP classifier assigns a score (0 to 1) to each taxonomic depth of each OTU. Each taxonomic depth having a score  $\geq 0.5$  were kept to reconstruct the final lineage. Taxonomic lineages were combined with the cluster abundance matrix obtained above to generate a raw OTU table, from which a bacterial organisms OTU table was generated.

Custom RDP classifier training sets were generated for both PAH-RHD GP and GN amplicon data types. Raw reads were processed as described above up to the quality filtering step. Then, remaining sequences were dereplicated/clustered at 100%, thus processes for generating Amplicon Sequence Variants (ASVs) (DADA2 v1.12.1) (Callahan et al. 2016).

Each ASV were blasted (BLASTn) against the NCBI nt database (downloaded as of 21<sup>st</sup> February 2020) with `-max_target_seqs` set to 20. Blast output was filtered to keep hits that had an e-value  $\leq 1e-20$ , alignment length of at least 100 bp and alignment percentage of at least 60 percent. Taxonomic lineages of each filtered blast hit were fetched from the NCBI taxonomy database (version downloaded on December 4th 2019). RDP training sets were generated as described (<https://github.com/jtremblay/RDP-training-sets>).

### **3.4.8 Statistical analyses**

Statistical analyses were performed in R (v.3.5.0)(R Core Team 2020), with basic analysis performed with the stats package (R Core Team 2020). Normality and homoscedasticity of data were calculated with Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. When distributions did not attain normality, variables were log transformed or converted using a Box-Cox transformation using the MASS package (Venables et Ripley 2002). The differences in plant trait results and phenanthrene concentration were assessed through univariate analysis of variance using ANOVA followed by

*post hoc* Tukey HSD tests. When transformations did not yield linearity, Kruskal-Wallis analysis of the variance was performed instead, with the Dunn tests performed for multiple comparisons. Univariate analysis of relative abundance of genera were performed with ANOVA test with White's correction for heteroscedastic data using the car package (Fox et Weisberg 2019). Differences were considered significant at the 0.05 level.

Shannon diversity index and Species Richness were calculated with the otuSummary package (Yang 2020).

Principal coordinate analyses (PCoA) were performed to assess differences in community composition and between treatments using normalized OTU or ASV tables with the Bray-Curtis dissimilarity index calculated with the vegan package (Oksanen et al. 2019). PERMANOVA analyses tested the interaction between treatments in the microbial communities through 999 permutations using the Adonis function from vegan. All graphs were created with the ggplot2 package (Wickham et al. 2019). Finally, correlation analysis where performed with the stats package.

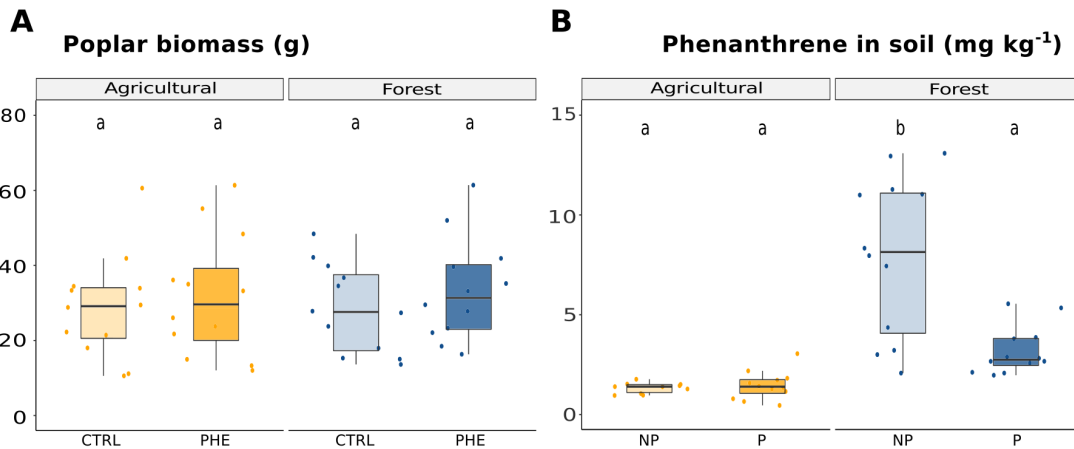
### **3.4.9 Data availability**

The raw sequence data was deposited in the Short Read Archive (SRA) of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under the BioProject accession PRJNA666553.

## 3.5 Results

### 3.5.1 Plant morphological response and phenanthrene degradation

All the 48 poplar cuttings survived throughout the experiment and were included in the analysis. Poplar growth was evaluated as the plant aboveground biomass but neither soil type nor contamination had a significant impact on this variable (Figure 3-1A).



**Figure 3-1** Boxplots of poplar biomass and phenanthrene presence.

**A)** Dried biomass of poplars grown in agricultural and forest soil contaminated with phenanthrene (PHE) or not (CTRL); **B)** Quantification of phenanthrene in agricultural and forest soils after a nine weeks of poplar growth in pots (P, for planted) compared to non-planted pots (NP). Different letters denote significant differences found with the Tukey HSD post-hoc test ( $n = 12$ ).

Phenanthrene degradation was measured as the quantity of remaining phenanthrene after nine weeks of incubation and was expressed as absolute  $\text{mg kg}^{-1}$  retrieved in soil. The soil type ( $F = 79.508$ ,  $p < 0.001$ ), plant presence ( $F = 9.442$ ,  $p = 0.004$ ) and the interaction term ( $F = 8.166$ ,  $p = 0.007$ ) were all significant (Figure 3-1B). The interaction term revealed that the effect of soil type depended on plant presence. More precisely, in agricultural soils, both P and NP pots showed similar degradation, with 1.33 and 1.45  $\text{mg kg}^{-1}$  of phenanthrene left in NP and P pots, respectively. In contrast, after nine weeks the non-planted forest soils contained significantly more phenanthrene than the planted forest soils (7.97 vs. 3.19  $\text{mg kg}^{-1}$  of phenanthrene; Figure 3-1B).

Tableau 3-1 Summary of permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) examining differences in microbial composition based on the OTUs of the ITS region for fungi and 16S RNA gene for total bacteria and ASVs for GN and GP PAH-RHD $\alpha$  genes for bacterial degraders.

<b>Fungi</b>						
<b>PERMANOVA</b>	<i>Df</i>	<i>SumsOfSqs</i>	<i>MeanSqs</i>	<i>F Model</i>	<i>R<sup>2</sup></i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
soil	1	<b>3.938</b>	<b>3.938</b>	<b>44.745</b>	<b>0.145</b>	<b>0.001</b>
contamination	1	0.109	0.109	1.234	0.004	0.26
plant	1	<b>13.526</b>	<b>13.526</b>	<b>153.690</b>	<b>0.497</b>	<b>0.001</b>
soil:contamination	1	0.174	0.174	1.977	0.006	0.101
soil:plant	1	<b>1.353</b>	<b>1.353</b>	<b>15.377</b>	<b>0.050</b>	<b>0.001</b>
contamination:plant	1	0.148	0.148	1.678	0.005	0.157
soil:contamination:plant	1	0.197	0.197	2.241	0.007	0.078
Residuals	88	7.745	0.088	NA	0.285	NA
Total	95	27.189	NA	NA	1.000	NA
<b>Bacteria</b>						
soil	1	<b>12.348</b>	<b>12.348</b>	<b>115.521</b>	<b>0.512</b>	<b>0.001</b>
contamination	1	<b>0.530</b>	<b>0.530</b>	<b>4.955</b>	<b>0.022</b>	<b>0.004</b>
plant	1	<b>0.572</b>	<b>0.572</b>	<b>5.353</b>	<b>0.024</b>	<b>0.003</b>
soil:contamination	1	<b>0.451</b>	<b>0.451</b>	<b>4.221</b>	<b>0.019</b>	<b>0.009</b>
soil:plant	1	<b>0.460</b>	<b>0.460</b>	<b>4.301</b>	<b>0.019</b>	<b>0.005</b>
contamination:plant	1	0.165	0.165	1.542	0.007	0.150
soil:contamination:plant	1	0.169	0.169	1.583	0.007	0.145
Residuals	88	9.406	0.107	NA	0.390	NA
Total	95	24.101	NA	NA	1.000	NA
<b>PAH-RHD<math>\alpha</math> GN genes</b>						
soil	1	<b>4.341</b>	<b>4.341</b>	<b>14.912</b>	<b>0.119</b>	<b>0.001</b>
contamination	1	<b>2.622</b>	<b>2.622</b>	<b>9.007</b>	<b>0.072</b>	<b>0.001</b>
plant	1	0.283	0.283	0.971	0.008	0.457
soil:contamination	1	<b>3.091</b>	<b>3.091</b>	<b>10.618</b>	<b>0.085</b>	<b>0.001</b>
soil:plant	1	0.193	0.193	0.663	0.005	0.811
contamination:plant	1	0.228	0.228	0.782	0.006	0.659
soil:contamination:plant	1	0.293	0.293	1.005	0.008	0.401
Residuals	86	25.034	0.291	NA	0.688	NA
Total	94	36.402	NA	NA	1.000	NA
<b>PAH-RHD<math>\alpha</math> GP genes</b>						
soil	1	<b>4.900</b>	<b>4.900</b>	<b>16.970</b>	<b>0.146</b>	<b>0.001</b>
contamination	1	<b>1.230</b>	<b>1.230</b>	<b>4.261</b>	<b>0.037</b>	<b>0.001</b>
plant	1	<b>0.644</b>	<b>0.644</b>	<b>2.232</b>	<b>0.019</b>	<b>0.014</b>
soil:contamination	1	0.340	0.340	1.176	0.010	0.176
soil:plant	1	0.417	0.417	1.446	0.012	0.082
contamination:plant	1	0.441	0.441	1.528	0.013	0.08
soil:contamination:plant	1	<b>0.670</b>	<b>0.670</b>	<b>2.322</b>	<b>0.020</b>	<b>0.01</b>
Residuals	85	24.54	24.54	NA	0.733	NA
Total	93	36.402	NA	NA	1.000	NA

Values in bold indicate significant effects. Df, degrees of freedom. SumsOfSqs, sum of squares. MeanSqs, Mean squares. Pr(>F), p-value.

### **3.5.2 Fungal diversity**

Shannon diversity index for fungi ranged from 1.599 to 3.646 (Figure 3-2A). The Kruskal-Wallis test showed significant differences among treatments ( $\chi^2 = 17.779$ , p-value = 0.013). The Dunn test showed that this difference was due to significantly higher Shannon diversity in the P CTRL forest soils as compared to the NP CTRL and NP PHE agricultural soils and to the NP PHE forest soil (Figure 3-2A – Shannon index). The same trends were visible for species richness, but this was not statistically significant (Figure 3-2A – Species richness).

### **3.5.3 Fungal community structure**

Analysis of the beta diversity with the PCoA (Figure 3-2B) based on relative abundance showed that the fungal community structured differed between plant presence and soil types. The main factor was plant presence ( $R^2 = 49.7\%$ ,  $p = 0.001$ ), followed by the soil type ( $R^2 = 14.5\%$ ,  $p = 0.001$ ). However, the main plant effect was modulated by the interaction with the soil type factor ( $R^2 = 5.0\%$ ,  $p = 0.001$ ). However, contamination, either as a main effect or its interaction with other factors had no significant influence on the fungal community structure (Tableau 3-1).

More specifically, while the fungal communities found in the NP pots diverged significantly from one another depending on the soil type, these communities tended to converge in the P pots. The PERMANOVA analysis confirmed this visual interpretation, with plant presence representing the main source of variation, followed by first order effect of soil type and the interaction of both factors (Tableau 3-1).

### **3.5.4 Fungal community composition**

A total of 3,099 fungal OTUs were retained after the bioinformatic quality filtering pipeline. As for the community structure, the fungal community composition was principally influenced by plant presence. As such, the rhizosphere (P) of both PHE and CTRL in forest and agricultural soils

were vastly dominated by fungi from the genus *Sphaerospora* (Class *Pezizomycetes*; Figure 3-2C and Tableau Suppl. 2). The NP pots of both types of soil showed mixed community composition, strongly distinct from the P pots. The lower diversity of fungi in the agricultural soil could be explained by the prevalence of *Mortierellomycotina* (Figure 3-2C and Tableau Suppl. 2), that accounted for around 45% and 35% of total OTUs in CTRL and PHE agricultural NP pots, respectively. In contrast, the presence of *Mortierellomycotina* in forest soils was lower than 20%, whereas *Basidiomycota* (*Tremellomycetes* and *Agaricomycetes* classes) were significantly more abundant (Fig 2c and Tableau Suppl. 2). Within the *Ascomycota* phylum, *Leotiomyces* were also significantly more abundant in forest than in agricultural soils (Tableau Suppl. 2).

Some significant but weak correlations were found among some fungal OTUs and the plant biomass. The top 10 OTUs had a Pearson's correlation coefficient  $r$  ranging from 0.395 to 0.331, and the OTUs belonged mainly to the *Ascomycota* phylum.

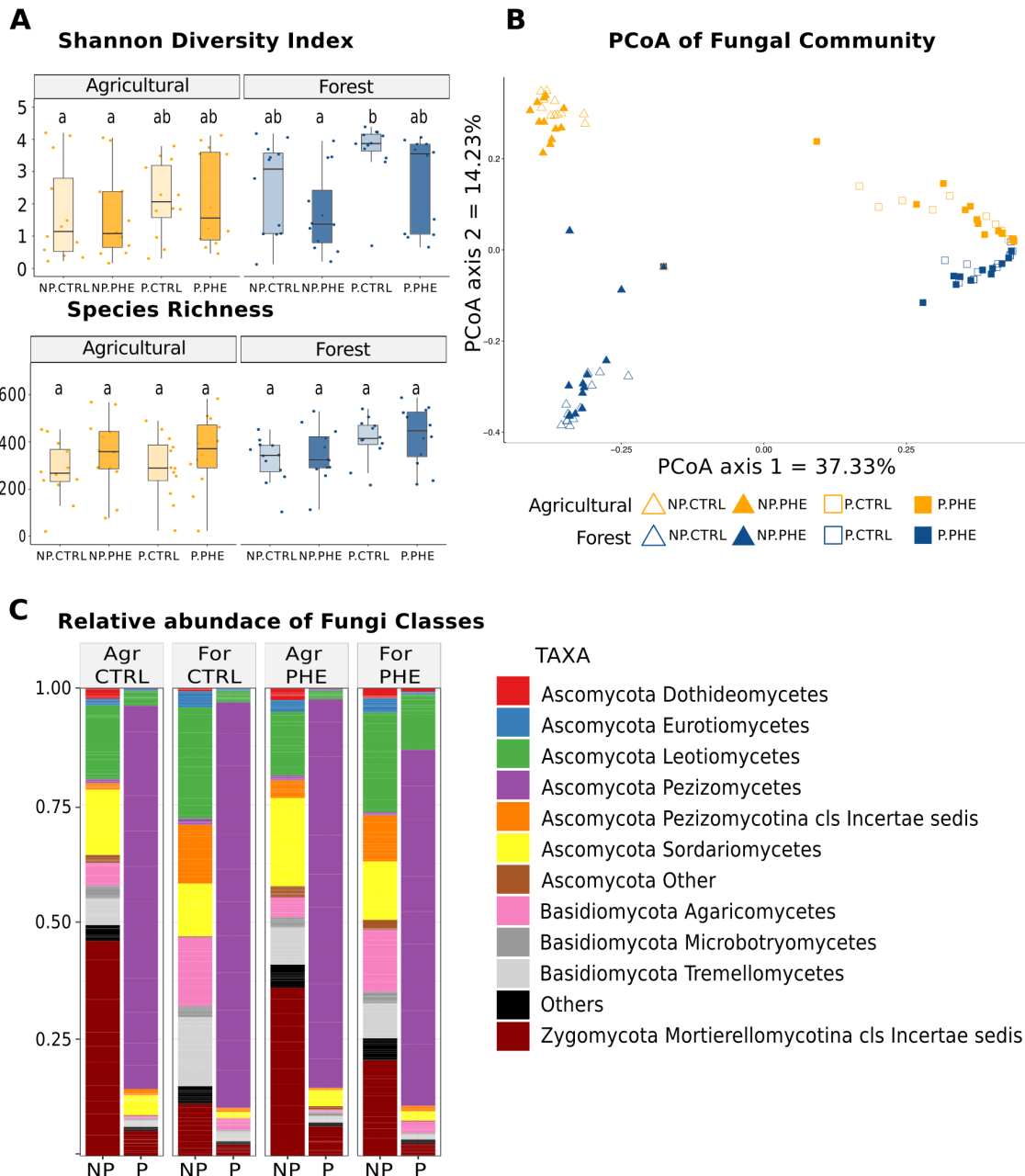
The significant correlations found between fungi and phenanthrene concentration in soils at the end of the experiment were stronger (Pearson's correlation coefficient  $r$  between 0.834-0.744). The top 10 OTUs presenting positive correlations belonged to the genera: *Aspergillus*, *Acrodonium*, *Imleria*, *Postia*, *Umbelopsis*, *Acrophialophora*, *Wilcoxina*, an unclassified *Basidiomycota* and *Leptodontidium* (Tableau Suppl. 3).

### 3.5.5 Bacterial diversity

A total of 45 archaeal OTUs were found in the soil samples representing a combined relative abundance of less than 0.1%, therefore they were not retained for the analyses.

In terms of bacterial diversity, there were no significant differences between treatments although slightly higher values were found in NP PHE soils for the Shannon index (Figure 3-3A - Shannon index). For the species richness, the forest soils seemed to present higher number of OTUs in PHE pots while the agricultural soils showed higher OTU numbers in CTRL soils (Figure 3-3A - Species richness), but, again, this difference was not significant.





**Figure 3-2 Summary of the fungal community diversity, structure and composition.**

Summary based on OTUs of the ITS region. A) Boxplots of Shannon diversity index and Species richness (as observed number of OTUs) by treatment. Different letters denote significant differences found with the Tukey HSD post-hoc test. B) Principal coordinates analysis (PCoA) based on Bray-Curtis dissimilarity of the relative abundance of fungal OTUs showing the effects of contamination, soil type and plant presence on the fungal community structure. C) Fungal community composition at the class level. Only taxa with a relative abundance above 0.01 are shown. Values are averaged across treatments (n = 12). Legend: NP: non planted pots. P: planted pots. CTRL: non contaminated pots. PHE: pots contaminated with 50 mg kg<sup>-1</sup> of phenanthrene.

### 3.5.6 Bacterial community structure

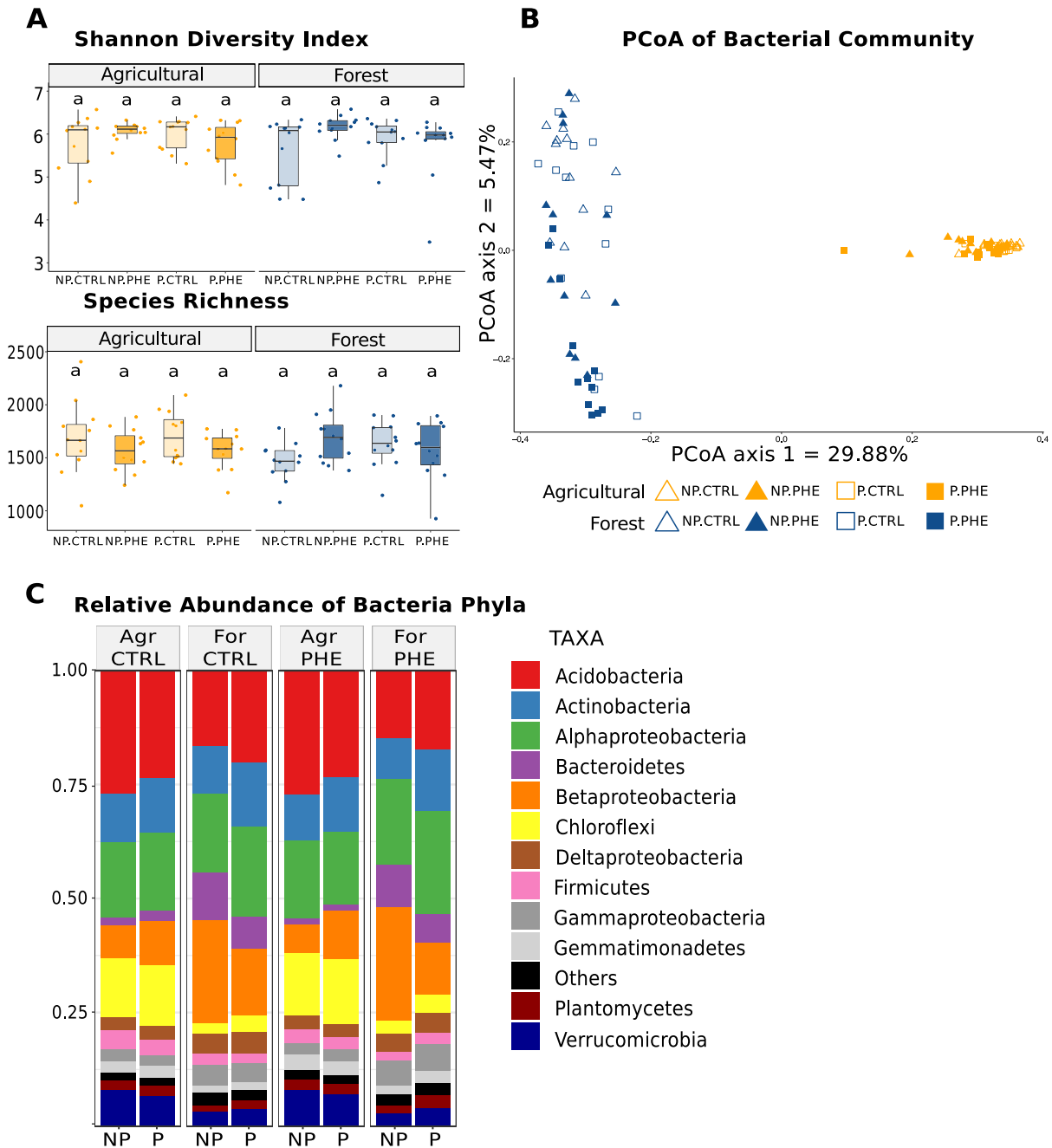
The PCoA based on relative abundance (Figure 3-3B) along with the PERMANOVA analysis (Tableau 3-1), showed that the soil type was the main factor shaping the bacterial community ( $R^2 = 51.2\%$ ,  $p = 0.001$ ), separating agricultural from forest soil samples along the first axis, in sharp contrast to what we observed in the fungal community structure. Moreover, plant presence ( $R^2 = 2.4\%$ ,  $p = 0.003$ ) and the contamination status ( $R^2 = 2.2\%$ ,  $p = 0.004$ ), had minor but significant main effects and also modulated the effect of soil type through significant interaction terms ( $R^2 = 1.9\%$ ,  $p = 0.005$  and  $p = 0.009$ , respectively; Tableau 3-1). These interaction effects are visible in Figure 3-3B, as the bacterial communities found in the agricultural soils all clustered together, whereas the bacterial communities of the forest soil were also clustering loosely based on soil contamination and plant presence on the second axis of the ordination.

### 3.5.7 Bacterial community composition

A total of 5,716 OTUs were retained from the 16S rRNA gene sequences. From those, the vast majority belonged to Bacteria, and only 45 OTUs were Archaea.

The 5,671 bacterial OTUs were classified in 35 phyla, although the majority of OTUs belonged to *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes* and *Verrucomicrobia*. Even though agricultural and forest soils presented very different community structures (Figure 3-3B), the composition at the phylum level was relatively homogeneous among treatments (Figure 3-3C), with a few significant differences in terms of the overall relative abundance of phyla (Tableau Suppl. 4).

In contrast, major differences were observed in the relative abundance at genus levels (Tableau 3-2). Compared to forest soils, agricultural soils had significantly higher relative abundance of the following genera: unclassified uncultured *Acidobacteriaceae* Subgroup 1 (*Acidobacteria*, mean of 14.84% vs 2.52%), HSB OG53-F07FA (*Chloroflexi*, 8.07% vs 0.12%), DA101 soil group FA (*Verrucomicrobia*, 5.06% vs 0.36%), *Candidatus Solibacter* (*Acidobacteria*, 2.40% vs 0.94%) *Sphingomonas* (*Alphaproteobacteria*, 3.51% vs 2.50%) and *Gemmatimonas* (*Gemmatimonadetes* 2.40% vs 1.27%), the latest being mostly absent in the forest soils. In contrast, the forest soils had significantly higher relative abundances of the genera: *Ramlibacter* (*Betaproteobacteria* 1.11% vs 4.66%), *Geothrix* (*Acidobacteria*, 0.02% vs 5.61%) and *Variibacter* (*Alphaproteobacteria*, 2.88% vs 4.6%).



**Figure 3-3 Summary of the bacterial community diversity, structure and composition.**

Summary based on OTUs of the 16 rRNA gene. A) Boxplots of Shannon diversity index and Species richness (as observed number of OTUs) by treatment. Different letters denote significant differences found with the Tukey HSD *post-hoc* test. B) Principal coordinates analysis (PCoA) based on Bray-Curtis dissimilarity of the relative abundance of bacterial OTUs showing the effects of contamination, soil type and plant presence on the bacterial community structure. C) Bacterial community composition at the class level. Only taxa with a relative abundance above 0.01 are shown. Values are averaged across treatments ( $n = 12$ ). Legend: NP: non planted pots. P: planted pots. CTRL: non contaminated pots. PHE: pots contaminated with  $50 \text{ mg kg}^{-1}$  of phenanthrene.

Also, the forest soils presented some particularities linked to the effects of the contamination and plant presence that were absent in agricultural soils, and that explained the different community structure captured in the PCoA (Figure 3-3B). For instance, regarding the effect of plant presence, *Polaromonas* (*Betaproteobacteria*), *Aquicola* (*Betaproteobacteria*) and *Acidothermus* (*Actinobacteria*) were nearly absent from the P pots, while the *Acidobacteria* subgroup 2CL was significantly more abundant in the planted forest soils as compared to the NP soils (Tableau 3-2). Moreover, the significant effect of the interaction between plant presence and contamination, was greatly explained by the higher mean relative abundance of bacteria from the genus *Polaromonas* (*Betaproteobacteria*) in NP PHE forest soils (10.95%) compared to the P PHE of forest soils (1.46%), while being nearly absent in CTRL pots (Tableau 3-2).

As it was for fungi, the correlations between bacterial OTUs' relative abundances and the biomass of the plant were weak. The top ten significant positive correlations had a Pearson's correlation coefficient  $r$  ranging from 0.476 to 0.414. These OTUs were diversely classified as *Alphaproteobacteria*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Armatimonadetes*, *Actinobacteria*, and *Gammaproteobacteria*. The strongest positive correlation involved an OTU from the genus *Sphingomonas*.

The OTU with the strongest positive correlation with the amount of phenanthrene in soil was a member of the *Polaromonas* genus (Pearson's correlation coefficient  $r = 0.923$ ) which was one of the more abundant genera found in NP PHE forest soils. Moreover, the top ten highly correlated OTUs all presented very high correlation coefficients (Pearson's correlation coefficient  $r$  ranging from 0.880 to 0.824) and were mostly present in the NP pots (Tableau Suppl. 3).

Alternatively, the strongest negative correlations between OTUs and phenanthrene concentrations in soil, were mostly for OTUs well represented in the agricultural soil (Tableau Suppl. 3).

Tableau 3-2 Summary of the three-way analysis of the variance (ANOVA) – with White’s correction for heteroscedasticity on the relative abundance of the 16S rRNA gene OTUs identified at the genus level of bacteria. Values in bold indicate significant effects. Df, degrees of freedom. SumsOfSqs, sum of squares. MeanSqs, Mean squares. Pr(>F), p-value.

<b>Acidobacteria Subgroup 2CL</b>			
	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>soil</b>	<b>1.000</b>	<b>6.402</b>	<b>0.013</b>
contamination	1.000	1.200	0.276
plant	1.000	0.333	0.565
soil:contamination	1.000	0.232	0.632
<b>soil:plant</b>	<b>1.000</b>	<b>18.052</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination:plant	1.000	2.681	0.105
soil:contamination:plant	1.000	0.236	0.629
Residuals	88.000		
<b>Actinobacteria Acidothermus</b>			
	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>soil</b>	<b>1.000</b>	<b>202.047</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	1.000	2.195	0.142
<b>plant</b>	<b>1.000</b>	<b>54.144</b>	<b>&lt;0.001</b>
soil:contamination	1.000	0.606	0.438
<b>soil:plant</b>	<b>1.000</b>	<b>8.664</b>	<b>0.004</b>
contamination:plant	1.000	0.034	0.855
soil:contamination:plant	1.000	2.662	0.106
Residuals	88.000		
<b>Gammaproteobacteria Aquincola</b>			
	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
soil	1.000	1.083	0.301
<b>contamination</b>	<b>1.000</b>	<b>29.161</b>	<b>&lt;0.001</b>
plant	1.000	2.822	0.097
soil:contamination	1.000	2.972	0.088
<b>soil:plant</b>	<b>1.000</b>	<b>18.062</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination:plant	1.000	0.634	0.428
soil:contamination:plant	1.000	0.034	0.853
Residuals	88.000		
<b>Actinobacteria Pseudarthrobacter</b>			
	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>soil</b>	<b>1.000</b>	<b>23.154</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	1.000	0.165	0.685
<b>plant</b>	<b>1.000</b>	<b>6.909</b>	<b>0.010</b>
<b>soil:contamination</b>	<b>1.000</b>	<b>6.797</b>	<b>0.011</b>

soil:plant	1.000	3.357	0.070
contamination:plant	1.000	2.648	0.107
soil:contamination:plant	1.000	0.531	0.468
Residuals	88.000		

#### ***Acidobacteria Geothrix***

	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>soil</b>	<b>1.000</b>	<b>46.073</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	1.000	1.607	0.208
plant	1.000	1.799	0.183
<b>soil:contamination</b>	<b>1.000</b>	<b>4.526</b>	<b>0.036</b>
soil:plant	1.000	1.005	0.319
contamination:plant	1.000	0.004	0.947
soil:contamination:plant	1.000	0.710	0.402
Residuals	88.000		

#### ***Betaproteobacteria Massilia***

	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
soil	1.000	0.038	0.847
<b>contamination</b>	<b>1.000</b>	<b>6.642</b>	<b>0.012</b>
plant	1.000	1.497	0.224
soil:contamination	1.000	1.138	0.289
soil:plant	1.000	3.685	0.058
contamination:plant	1.000	0.491	0.486
soil:contamination:plant	1.000	2.378	0.127
Residuals	88.000		

#### ***Betaproteobacteria Polaromonas***

	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>soil</b>	<b>1.000</b>	<b>71.821</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	1.000	0.612	0.436
plant	1.000	0.173	0.679
<b>soil:contamination</b>	<b>1.000</b>	<b>4.101</b>	<b>0.046</b>
<b>soil:plant</b>	<b>1.000</b>	<b>10.727</b>	<b>0.002</b>
contamination:plant	1.000	1.798	0.183
<b>soil:contamination:plant</b>	<b>1.000</b>	<b>10.349</b>	<b>0.002</b>
Residuals	88.000		

#### ***Alphaproteobacteria Variibacter***

	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>soil</b>	<b>1.000</b>	<b>67.316</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	1.000	0.057	0.811
<b>plant</b>	<b>1.000</b>	<b>9.031</b>	<b>0.003</b>
soil:contamination	1.000	1.088	0.300

<b>soil:plant</b>	<b>1.000</b>	<b>8.056</b>	<b>0.006</b>
contamination:plant	1.000	0.200	0.656
soil:contamination:plant	1.000	2.349	0.129
Residuals	88.000		

#### ***Alphaproteobacteria Sphingomonas***

	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>soil</b>	<b>1.000</b>	<b>8.023</b>	<b>0.006</b>
<b>contamination</b>	<b>1.000</b>	<b>5.332</b>	<b>0.023</b>
<b>plant</b>	<b>1.000</b>	<b>12.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>soil:contamination</b>	<b>1.000</b>	<b>5.730</b>	<b>0.019</b>
soil:plant	1.000	1.643	0.203
contamination:plant	1.000	0.407	0.525
soil:contamination:plant	1.000	1.358	0.247
Residuals	88.000		

#### ***Betaproteobacteria Ramlibacter***

	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>soil</b>	<b>1.000</b>	<b>133.801</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>contamination</b>	<b>1.000</b>	<b>29.482</b>	<b>&lt;0.001</b>
plant	1.000	0.486	0.488
<b>soil:contamination</b>	<b>1.000</b>	<b>4.124</b>	<b>0.045</b>
<b>soil:plant</b>	<b>1.000</b>	<b>4.620</b>	<b>0.034</b>
contamination:plant	1.000	3.097	0.082
soil:contamination:plant	1.000	0.673	0.414
Residuals	88.000		

#### ***Gemmatimonadetes Gemmatimonas***

	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>soil</b>	<b>1.000</b>	<b>57.249</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>contamination</b>	<b>1.000</b>	<b>9.794</b>	<b>0.002</b>
plant	1.000	1.408	0.239
soil:contamination	1.000	0.023	0.879
soil:plant	1.000	1.705	0.195
contamination:plant	1.000	0.266	0.608
soil:contamination:plant	1.000	2.930	0.090
Residuals	88.000		

#### ***Acidobacteria Candidatus Solibacter***

	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>soil</b>	<b>1.000</b>	<b>299.754</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	1.000	1.219	0.273
<b>plant</b>	<b>1.000</b>	<b>28.450</b>	<b>&lt;0.001</b>
soil:contamination	1.000	0.019	0.892

<b>soil:plant</b>	<b>1.000</b>	<b>10.756</b>	<b>0.001</b>
contamination:plant	1.000	0.290	0.591
soil:contamination:plant	1.000	0.392	0.533
Residuals	88.000		

#### ***Verrucomicrobia* DA101 soil groupFA**

	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>soil</b>	<b>1.000</b>	<b>603.476</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	1.000	3.051	0.084
plant	1.000	0.018	0.894
soil:contamination	1.000	0.228	0.634
<b>soil:plant</b>	<b>1.000</b>	<b>19.820</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination:plant	1.000	0.037	0.849
soil:contamination:plant	1.000	0.643	0.425
Residuals	88.000		

#### ***Chloroflexi* HSB OF53 F07FA**

	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>soil</b>	<b>1.000</b>	<b>580.036</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	1.000	0.273	0.603
<b>plant</b>	<b>1.000</b>	<b>20.951</b>	<b>&lt;0.001</b>
soil:contamination	1.000	0.170	0.681
soil:plant	1.000	1.232	0.270
contamination:plant	1.000	2.152	0.146
soil:contamination:plant	1.000	0.000	0.993
Residuals	88.000		

#### ***Acidobacteria* uncultured *Acidobacteriaceae* Subgroup 1**

	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>soil</b>	<b>1.000</b>	<b>605.363</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	1.000	0.201	0.655
<b>plant</b>	<b>1.000</b>	<b>11.038</b>	<b>0.001</b>
soil:contamination	1.000	1.004	0.319
<b>soil:plant</b>	<b>1.000</b>	<b>11.469</b>	<b>0.001</b>
contamination:plant	1.000	3.830	0.054
soil:contamination:plant	1.000	0.019	0.891
Residuals	88.000		



### 3.5.8 PAH-RHD $\alpha$ GN gene diversity

Three phyla were found in the PAH-RHD $\alpha$  GN gene dataset: *Bacteroidetes* (aggregated with other phyla under “Other Bacteria” in Fig 4c), *Firmicutes* (“*Bacilli - Lysinibacillus*” in Figure 3-4C) and *Proteobacteria*. When looking at the Shannon diversity index, the mean values ranged from 2.442 to 3.801 with significant differences among treatments (Figure 3-4A). For P and NP agricultural soils, PAH-RHD $\alpha$  GN Shannon diversity was significantly higher in the PHE soils compared to their corresponding CTRL (Figure 3-4A). This pattern was similar for forest soils, but not statistically significant.

Similar trends were observed for species richness (Figure 3-4A), with the number of ASVs significantly higher in the PHE agricultural soil as compared to the CTRLs, for both the P and the NP pots.

### 3.5.9 PAH-RHD $\alpha$ GN gene community structure

The PCoA of the PAH-RHD $\alpha$  GN gene dataset showed that, in CTRL soils, all the samples clustered more or less together, but that in the presence of contaminant, the PAH-RHD $\alpha$  GN communities of the two soil types clustered separately, at the two opposite ends of the first axis (Figure 3-4B). PERMANOVA analysis corroborated the significant effects of soil type ( $R^2 = 11.9\%$ ,  $p = 0.001$ ), contamination ( $R^2 = 7.2\%$ ,  $p$  value = 0.001) and the interaction of soil type and contamination ( $R^2 = 8.5\%$ ,  $p = 0.001$ ), and a lack of effect for the presence of plants and the related interactions (Tableau 3-1).

### 3.5.10 PAH-RHD $\alpha$ GN gene community composition

The community composition of PAH-RHD $\alpha$  GN genes reflected well the results of the PCoA and PERMANOVA, with similar communities across all treatments for the CTRL treatment, and largely different communities between the two soil types under PHE conditions (Figure 3-4C). The PHE agricultural soils were dominated by the *Betaproteobacteria* genera *Comamonas* and *Ralstonia*, whereas in the PHE forest soils, the *Betaproteobacteria* genus *Delftia* replaced *Ralstonia* (Figure 3-4C and Tableau 3-3).

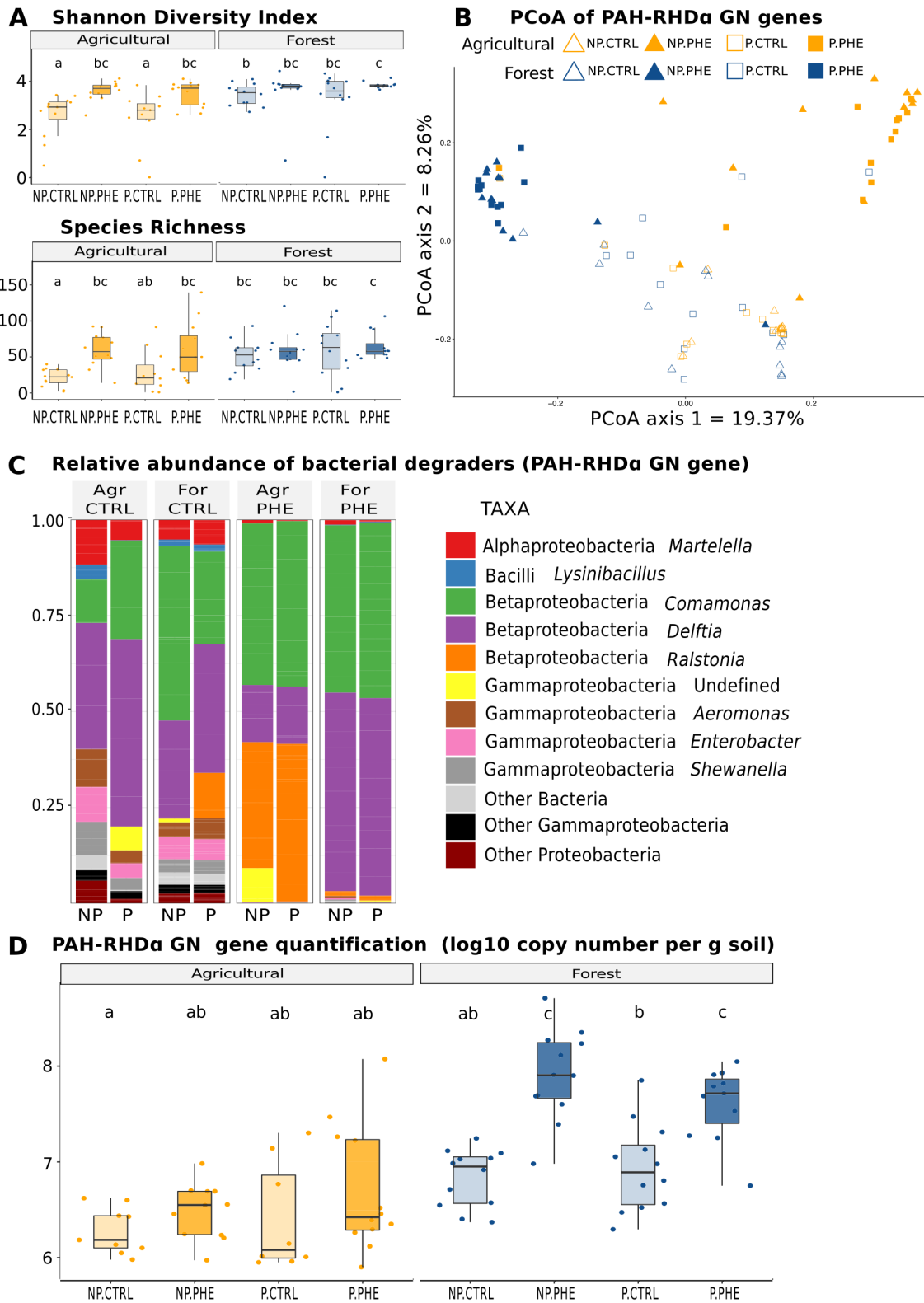


Figure 3-4 Summary of the diversity, structure and composition of GN degraders.

Summary of PAH-degrading bacterial communities based on ASVs of the PAH-RHD $\alpha$  GN genes. A) Boxplots of Shannon diversity index and Species Richness (observed number of ASVs) by treatment. Letters denote significant differences found with the Tukey HSD post-hoc test. B) Principal coordinates analysis (PCoA) based on Bray-Curtis dissimilarity of the relative abundance of the PAH-RHD $\alpha$  GN ASVs showing the effects of contamination, soil type and plant presence on the PAH-degrading Gram-negative bacterial community structure. C) PAH-degrading Gram-negative bacterial community composition at the class level. Only taxa with a relative abundance above 0.01 are shown. Values are averaged across treatments (n = 12). D) PAH-RHD $\alpha$  GN gene copy numbers determined by real-time PCR quantification on DNA. Legend: NP: non planted pots. P: planted pots. CTRL: non contaminated pots. PHE: pots contaminated with 50 mg kg<sup>-1</sup> of phenanthrene.

For phenanthrene concentrations, we found significant positive correlations with the relative abundance of various *Delftia* spp., (Pearson's correlation coefficient  $r$  ranging from 0.537 to 0.515), and significant negative correlations with the relative abundance of two *Ralstonia* spp. (Pearson's correlation coefficient  $r$  -0.421 and -0.426) and various *Comamonas* spp. (Pearson's correlation coefficient  $r$  ranging from -0.410 to -0.398) (Supp. Tableau 3).

**Tableau 3-3 Summary of the three-way analysis of the variance (ANOVA) – with White's correction for heteroscedasticity on the relative abundance of PAH-RHD $\alpha$  amplicon ASVs identified at the genus level of Gram-negative and Gram-positive bacteria. Values in bold indicate significant effects. Df, degrees of freedom. SumsOfSqs, sum of squares. MeanSqs, Mean squares. Pr(>F), p-value.**

<b>PAH-RHD<math>\alpha</math> Gram Negative</b>			
<b><i>Betaproteobacteria Comamonas</i></b>			
	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>P value</i>
soil	1	0.9105	0.34314
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>6.7655</b>	<b>0.01124</b>
plant	1	0.1857	0.66782
soil:contamination	1	1.3443	0.25006
soil:plant	1	0.3172	0.57499
contamination:plant	1	0.8946	0.34735
soil:contamination:plant	1	1.5475	0.21749
Residuals	73		
<b><i>Betaproteobacteria Ralstonia</i></b>			
	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>P value</i>
soil	1	0.9909	0.32281
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>7.163</b>	<b>0.009184</b>
plant	1	2.0175	0.159747
<b>soil:contamination</b>	<b>1</b>	<b>25.5137</b>	<b>&lt;0.001</b>

soil:plant	1	0.2757	0.601121
contamination:plant	1	0.2601	0.611605
soil:contamination:plant	1	1.4116	0.238641
Residuals	73		

### ***Betaproteobacteria Delftia***

	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>P value</i>
<b>soil</b>	<b>1</b>	<b>30.7704</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	1	1.6399	0.204396
plant	1	0.016	0.899766
<b>soil:contamination</b>	<b>1</b>	<b>8.4392</b>	<b>0.004857</b>
soil:plant	1	0.0143	0.90525
contamination:plant	1	0.4815	0.489946
soil:contamination:plant	1	0.0542	0.816595
Residuals	73		

### **PAH-RHDa Gram Positive**

#### ***Actinobacteria Microbacterium***

	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>P value</i>
<b>soil</b>	<b>1</b>	<b>17.863</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	1	0.968	0.329
plant	1	1.155	0.287
<b>soil:contamination</b>	<b>1</b>	<b>4.273</b>	<b>0.043</b>
<b>soil:plant</b>	<b>1</b>	<b>15.902</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination:plant	1	2.338	0.132
<b>soil:contamination:plant</b>	<b>1</b>	<b>7.418</b>	<b>0.009</b>
Residuals	58		

#### ***Actinobacteria Mycobacterium***

	<i>Df</i>	<i>F</i>	<i>P value</i>
soil	1	1.478	0.229
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>43.171</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>plant</b>	<b>1</b>	<b>7.798</b>	<b>0.007</b>
<b>soil:contamination</b>	<b>1</b>	<b>4.302</b>	<b>0.043</b>
soil:plant	1	3.534	0.065
contamination:plant	1	0.193	0.662
<b>soil:contamination:plant</b>	<b>1</b>	<b>8.304</b>	<b>0.006</b>
Residuals	58		

### **3.5.11 PAH-RHD $\alpha$ GN gene abundance**

The abundance of PAH-RHD $\alpha$  GN genes was significantly affected by soil type ( $F = 74.64$ ,  $p < 0.001$ ), contamination ( $F = 37.968$ ,  $p < 0.001$ ) and the interaction between these two factors ( $F = 11.142$ ,  $p < 0.001$ ). Both NP and P PHE forest soils harbored significantly more of PAH-RHD $\alpha$  GN gene copies than agricultural samples and CTRL forest samples (Figure 3-4D).

### **3.5.12 PAH-RHD $\alpha$ GP gene diversity**

The Shannon diversity of the PAH-RHD $\alpha$  GP genes was generally higher in the forest soils as compared to the agricultural soils (Figure 3-5A). Kruskal-Wallis tests showed that the differences among treatments were significant ( $\chi^2 = 65.466$ ,  $p\text{-value} < 0.001$ ), and the Dunn's test revealed that the P and NP CTRL agricultural soils had a significantly lower diversity than all the other treatments, except for the P PHE agricultural soils (Figure 3-5A). The trends for the abundance of ASVs observed were similar, with the P and NP CTRL agricultural soils showing a significantly lower abundance of PAH-RHD $\alpha$  GP ASVs compared to all the forest soil treatments.

### **3.5.13 PAH-RHD $\alpha$ GP gene community structure**

The PCoA ordination of the PAH-RHD $\alpha$  GP gene dataset showed a strong differentiation between the community structure of the two soil types ( $R^2 = 14.6\%$ ,  $p = 0.001$ ). The main effects of contamination ( $R^2 = 3.7\%$ ,  $p\text{ value} = 0.001$ ) and plant presence ( $R^2 = 1.9\%$ ,  $p = 0.019$ ) were also significant, as well as the interaction between the three factors ( $R^2 = 2.0\%$ ,  $p = 0.01$ ; Tableau 3-1). For the forest treatment, there was a clear separation between the communities in NP and P pots, but not so much between the PHE and CTRL communities. In contrast, for the agricultural treatment, the PHE and CTRL communities were distinct from one another, but we also observed a separation of the NP and P communities on the first (CTRL) or second (PHE) axis of the ordination (Figure 3-5B).

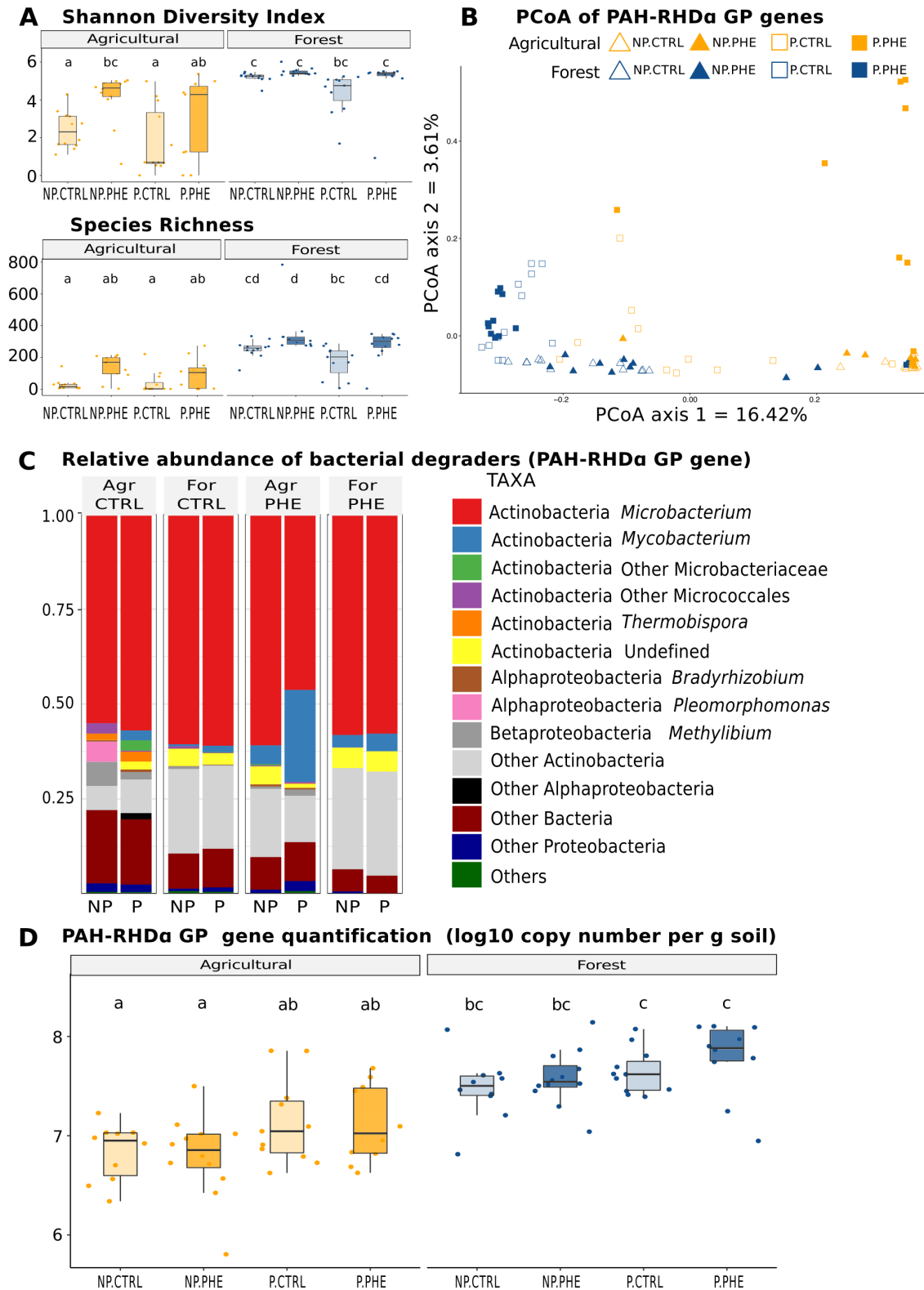


Figure 3-5 Summary of the diversity, structure and composition GP degraders.

**Summary of PAH-degrading bacterial communities based on ASVs of the PAH-RHD $\alpha$  GP genes. A) Boxplots of Shannon diversity index and Species Richness (observed number of ASVs) by treatment. Letters denote significant differences found with the Tukey HSD post-hoc test. B) Principal coordinates analysis (PCoA) based on Bray-Curtis dissimilarity of the relative abundance of the PAH-RHD $\alpha$  GP ASVs showing the effects of contamination, soil type and plant presence on the PAH-degrading Gram-positive bacterial community structure. C) PAH-degrading Gram-positive bacterial community composition at the class level. Only taxa with a relative abundance above 0.01 are shown. Values are averaged across treatments (n = 12). D) PAH-RHD $\alpha$  GP gene copy numbers determined by real-time PCR quantification on DNA. Legend: NP: non planted pots. P: planted pots. CTRL: non contaminated pots. PHE: pots contaminated with 50 mg kg<sup>-1</sup> of phenanthrene.**

### **3.5.14 PAH-RHD $\alpha$ GP gene community composition**

All the treatments, regardless of soil type, plant presence or contamination status were dominated by *Microbacterium* spp. ASVs (*Actinobacteria*) that accounted for more than 50% of the total amplicon sequences recovered for the PAH-RHD $\alpha$  GP genes (Figure 3-5C). The other 50% of ASVs were divided among the phyla *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and other unclassified Bacteria. The difference between the PHE agricultural P and NP pots observed in the PCoA could be due to the higher relative abundance of *Mycobacterium* (*Actinobacteria*) in the P PHE agricultural soils (Figure 3-5C and Tableau 3-3). Also in accordance with the trends observed in the PCoA, the two different soil types showed different PAH-RHD $\alpha$  GP community compositions (Figure 3-5C).

The top 10 most positive significant correlations with phenanthrene concentrations were for some *Microbacterium* and undefined *Actinobacteria* showing Pearson's correlation coefficient  $r$  ranging from 0.505 to 0.599 (Tableau Suppl. 3). In this case, no significant negative correlations were found.

### **3.5.15 PAH-RHD $\alpha$ GP gene abundance**

There was a highly significant main effect of soil type ( $F = 72.674$ ,  $p < 0.001$ ), and of plant presence ( $F = 10.523$ ,  $p = 0.002$ ) but not of contamination on the number of PAH-RHD $\alpha$  GP gene copies (Figure 3-5D). Forest soils showed higher numbers of PAH-RHD $\alpha$  GP genes than the agricultural soils, whereas the P pots harbored generally higher abundance of GP gene copies compared to the NP pots (Figure 3-5D).

### 3.6 Discussion

Recent studies have suggested that the initial soil diversity was linked to the outcome of soil remediation and phytoremediation (Bell et al. 2013; Bell et al. 2015; Bell et al. 2016; Yergeau et al. 2015a). Similarly, the initial soil diversity has been pointed as responsible for the variable efficiency of phytoremediation in practice (Mench et al. 2010). Based on those studies, we had hypothesized that differences in the microbiological characteristics of soil are a major constrain to PAH rhizoremediation, overriding the rhizosphere effect central to this technology. Although it is difficult to completely disentangle the effects of soil physicochemical and microbiological characteristics with our experimental design, our results confirmed that soil types had a major influence on the microbial communities and degradation functions, which resulted in different remediation patterns of phenanthrene. Indeed, soil type constrained the response of the general bacterial community to the rhizosphere effect and to contamination, with shifts mostly visible for the forest soil. Similarly, for both hydrocarbon-degradation functional genes targeted, the response of the community to contamination was constrained by soil type. These microbiological differences were mirrored in the phenanthrene degradation, which was significantly higher in the agricultural soil, with no rhizosphere effect, and lower in the forest soil, where the presence of plant significantly decreased contaminant concentrations. In contrast, fungal communities responded strongly to the rhizosphere effect, regardless of soil type and contamination, and a soil type effect was only visible in the absence of a plant.

In terms of phenanthrene degradation, the agricultural soil outperformed the forest soil. However, there were no significant differences in phenanthrene degradation in planted and unplanted pots for the agricultural soil. Both treatments efficiently degraded nearly 98% of the spiked phenanthrene at the end of the 9<sup>th</sup> week, suggesting that the mere fact of distributing the soil in pots and watering them stimulated the microbial degradation enough, so that the poplar trees had no effect in agricultural soils. On the contrary, significant differences in the degradation of phenanthrene were observed between forest planted and unplanted pots. In the unplanted pots, we observed a mean total degradation around 80% as compared to 90-95% in the planted pots. This means that the effectiveness of rhizoremediation is strongly influenced by the soil type and its initial microbial diversity. Although we did not measure the initial soil microbial communities, the strong differences in fungal and bacterial communities observed in the control unplanted pots at the end of the experiment suggest that the soils initially harbored very different microbial communities. Some soils appear to effectively degrade phenanthrene and potentially other PAH



through the action of the microbial communities alone, without the need to introduce a plant to shift the microbial communities, whereas other soils with a different bacterial diversity and physicochemical characteristics may need stimulation from a plant in order to more effectively degrade phenanthrene. Other studies had already shown the divergences that occur during remediation of organic compounds (Bundy et al. 2002), with communities of microbial degraders being significantly different depending on the soil type and the original microbial diversity. When it comes specifically to PAH, the response of different soil microbial communities was also divergent, with groups of different microbial degraders arising when exposed to PAH alone or in co-contamination (Sawulski et al. 2015). These contrasting observations may result from the initial soil microbial diversity, which might explain the variable efficiency of phytoremediation across different sites.

Ideally for rhizoremediation to work across sites with different soil types, the rhizosphere effect should be stronger than the soil effect. Maybe poplars do not offer this level of rhizosphere effect for PAH decontamination. Nevertheless, it is important to notice that we used a single pure contaminant in this study, which is rarely the case in non-experimental conditions. Other studies with this and other plant species have shown the overriding effect of soil characteristics on bacterial communities in a variety of studies, as compared to plant characteristics (Yergeau et al. 2009b; Azarbad et al. 2020; Bell et al. 2014a). Alternatively, as fungi were shown here and elsewhere to be generally more affected by plant characteristics (Yergeau et al. 2015a) and identity (Boeraeve et al. 2018), rhizoremediation based on fungi could be more successful across various soil types. However, metatranscriptomic studies have shown that hydrocarbon degradation genes are mainly expressed by bacteria during rhizoremediation using willows (Gonzalez et al. 2018; Yergeau et al. 2014; Yergeau et al. 2018).

Even though the community composition of PAH GN degraders was similar in control soils for both soil types, the communities widely differed when soils were contaminated, with *Ralstonia* and *Comamonas* dominating in the agricultural soils versus *Comamonas* and *Delftia* dominating in the forest soils. The divergence we observed in our results depending on the soil type is in agreement with the findings of other studies (Bundy et al. 2002; Sawulski et al. 2015). This is a good example of functional redundancy that is one of the trademark aspect of soil diversity (Dunlevy et al. 2013) and can be defined as the coexistence of multiple distinct taxa or genomes capable of performing the same biochemical function (Louca et al. 2018). The relationship between biological diversity and ecological processes is far from being completely understood at a mechanistic level (Louca et al. 2018). Our study has shown that even in the context where there

is an important functional redundancy among PAH degraders, the outcome at the process level, namely degradation of phenanthrene, varies widely among different soils. Similar results were previously reported, where two different soils showed specific degradation patterns for phenanthrene (Ding et al. 2012). Conversely, in the unplanted pots, PAH degrader communities were similar for both soil types, but resulted in different degradation rates of phenanthrene, pointing toward an interaction between degrader communities and soil physicochemical characteristics or other microbial communities. Taken together, these results suggest that not all degraders are equal, and that depending on the pool of degraders in the original soil, of the soil physicochemical and microbiological characteristics and on the level of influence of the plant on the degraders, the outcome of the remediation will vary for similar levels of degrader diversity. Interestingly, *Lysinibacillus* (*Firmicutes*), a well-known Gram-positive bacteria, was amplified in control soils using the PAH-RHD $\alpha$  Gram-negative primer set. The genus *Lysinibacillus* contains some species capable of degrading hydrocarbons and phenanthrene (Li et al. 2020; Ifeoluwa et al. 2020). However, to our knowledge, this is the first time *Lysinibacillus* has been amplified with the PAH-RHD $\alpha$  Gram-negative primer set. It could well be that the sequence of the PAH-RHD $\alpha$  of *Lysinibacillus* presents enough homology to the primer sequence to allow for annealing with the Gram-negative primer set.

The bacterial community was mainly shaped by the soil type, but the contamination and the presence of a plant also influenced the community structure and composition. These effects were not evident at the phylum level but were clearly visible at finer taxonomical levels. For instance, *Polaromonas* and *Sphingomonas* were relatively more abundant in the PHE soils, in line with previous reports (Ding et al. 2012). *Polaromonas* is a genus containing known hydrocarbon degrading species such as *P. naphthalenivorans* (Cébron et al. 2011; Jeon et al. 2004; Ding et al. 2012), and it was accordingly positively correlated with the phenanthrene concentrations in soils as it was found mainly in non-planted forest soils, where the phenanthrene degradation was probably still ongoing. Based on our qPCR quantification of PAH-RHD $\alpha$  GP genes, PAH degraders were significantly more abundant in planted pots as compared to unplanted pots, regardless of the contamination status of the soil. This agrees with previous studies that reported higher abundance of hydrocarbon degradation genes and transcripts in the rhizosphere of plants, even in the absence of contaminant (Cébron et al. 2011), which was suggested to be linked with the structural similarity between several plant secondary metabolites present in root exudates and PAH (Singer et al. 2003). In contrast, the rhizosphere effect on PAH-RHD $\alpha$  GN genes was stronger in the contaminated soils, an effect that had been previously reported (Yergeau et al.

2014). Moreover, the soil contamination has also been found to override the willow rhizosphere effect on transcript abundance patterns in field studies (Yergeau et al. 2018).

In contrast to bacterial and to PAH degrader communities, fungal communities were very strongly influenced by the presence of poplar and not so much by contamination. These results suggest that the fungal community is relatively stable when it comes to responding to stress caused by phenanthrene contamination, both in the rhizosphere of poplars and in the absence of plants. Most importantly, the convergence from strikingly different fungal communities in the absence of plants towards the more homogeneous communities found in rhizosphere indicate a strong plant effect. The main reason behind this trend was the complete dominance of the ectomycorrhizal fungus *Sphaerospora* in the rhizosphere of poplars across all treatments. This fungus has been found to dominate the rhizosphere of various *Salicaceae* tree species in a range of pot and field experiments involving remediation of different contaminants. For instance, (Dagher et al. 2020) found that willow (*Salix miyabeana* clone SX67) inoculation with *Sphaerospora brunnea* alone was capable of significantly improving biomass production and Ba, Zn and Cd phytoextraction with bioaccumulation in the shoot plant biomass, and an additional decrease of Cu, Pb and Sn concentrations in soil. However, (Bell et al. 2015) reported that early colonization by *S. brunnea* negatively impacted the Zn accumulation efficiency of willows. In another study, the relative abundance of *S. brunnea* was positively correlated with the shoot biomass of willows (Yergeau et al. 2015a). In (Tardif et al. 2016), *S. brunnea* showed an increase in its relative abundance in the rhizosphere of willows with increasing petroleum hydrocarbon concentrations. Similarly, willows were shown to associate more strongly with *Sphaerospora* when growing in highly contaminated fields of Canada, but this trend was only visible for North American willows and not for Asian or European genotypes (Bell et al. 2014a). Therefore, it appears that *Sphaerospora* plays a growth promoting or stress relieving role for *Salicaceae* growing in contaminated soils, supporting the idea of a dual effect of the microbial community in rhizoremediation processes where some elements would play a degradative role while others would stimulate the plant growth via direct plant growth promotion, or by relieving stress (Correa-García et al. 2018). Even though this is not directly related to the degradation of contaminants, it is still of the utmost importance for rhizoremediation, as this technology is only effective where roots penetrate the soil, and an impaired growth is likely to reduce its efficiency. In the present study, since *Sphaerospora* colonized all the rhizospheres regardless of the soil type or the contamination status, it is difficult to conclude to any positive effects on poplar growth and tolerance to contamination stress. One indication is that poplars did not present any visible stress response to phenanthrene exposition and produced equal amounts of biomass in the contaminated and non-contaminated pots.

Alternatively, it could also be that the concentration of phenanthrene used was not high enough to trigger a strong stress response that would hinder plant development, as observed in previous studies (Hultgren et al. 2010; Kuhn et al. 2004; Ballach et al. 2003). Yet again, other microbes in the rhizosphere could also have contributed by degrading enough phenanthrene in the proximity of the roots to allow for plant roots to grow without contaminant stress (Correa-García et al. 2018). Finally, the lack of apparent response of fungi to phenanthrene contamination could be well due to the presence of relic DNA in the soil, which could have obscured this and other results. However, previous studies came up with similar conclusions using methods that are not affected by relic DNA such as metatranscriptomics, which suggests that the trend observed here are most probably due to live organisms and not to the sequencing of relic DNA.

In conclusion, rhizoremediation using poplars significantly improved the degradation of phenanthrene in forest soil, but not in agricultural soil. The fungal communities were the only ones strongly affected by the presence of poplar, whereas the effect of poplar on the diversity, composition, and abundance of the total bacterial and PAH degrader communities was strongly constrained by soil type, probably leading to this different degradation patterns between soils. This has important implications for rhizoremediation since these results highlight the importance of preliminary microbiological or physicochemical studies of contaminated soils in order to determine whether plant presence could improve remediation rates. Further studies could improve the predictive power of such preliminary analyses, leading to a wider adoption of this green remediation technology.

### **3.7 Funding**

This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery grant RGPIN-2014-05274 and Strategic grant for projects STPGP 494702 to EY).

SCG was supported by the Research Affiliate Program from the Government of Canada. This research was enabled in part by support provided by Calcul Québec ([www.calculquebec.ca](http://www.calculquebec.ca)) and Compute Canada.

### **3.8 Credit authorship contribution statements**

SCG: Conceptualization, Methodology, Field Work, Data collection, Data curation, Data Analysis, Writing and Original draft preparation. KR: Methodology, Field Work, Experimental Set up. JT: Bioinformatic analysis and Bioinformatic methods writing. AS: Conceptualization, Methodology, Experimental Set up, Supervision Reviewing and editing. EY: Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing, Reviewing and Editing.

### **3.9 Declaration of competing interests**

None declared.

### **3.10 Acknowledgements**

The authors would like to thank the precious help provided by Denis Lachance and Gervais Pelletier during the set-up of the experiment and the maintenance of the plants both before and during the experiments, Vincenzo Corelli for developing the inhouse phenanthrene extraction methodology as well as all the members of the Laurentian Forestry Centre and the Institute Armand Frappier that contributed with ideas and discussions to improve the outcome of this study.

### **3.11 References**

All references for the present chapter are located at the end of the thesis.





#### **4 ANIMAL SOIL FOOD WEB COMPLEXITY TRIGGERS SHIFTS IN MICROBIAL COMMUNITIES, INCLUDING PAH DEGRADERS, BUT WITHOUT CLEAR EFFECTS ON PHENANTHRENE PHYTOREMEDIATION**

---

La complexité du réseau trophique animal du sol déclenche des changements dans les communautés microbiennes, y compris les dégradeurs d'HAP, mais sans effets clairs sur la phytoremédiation du phénanthrène

**Auteurs :**

Sara Correa-Garcia<sup>1,2</sup>, Vincenzo Corelli<sup>3</sup>, Julien Tremblay<sup>4</sup>, Jessica Ann Dozois<sup>1</sup>, Eugenie Mukula Kaswing<sup>1</sup>, Armand Séguin<sup>2</sup>, Etienne Yergeau<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie, Institut national de la recherche scientifique, Université du Québec, Laval, QC, Canada.

<sup>3</sup> Laurentian Forestry Center, Natural Resources Canada, Québec City, QC, Canada

<sup>2</sup> Concordia University, Montréal, QC, Canada

<sup>4</sup> Energy, Mining and Environment, National Research Council Canada, Montréal, QC, Canada

**Titre de la revue ou de l'ouvrage :**

En préparation

**Contribution des auteurs :**

Sara Correa García : conceptualisation, méthodologie, montage expérimental, travaux de terrain, collecte de données, curation des données, analyse de données, recherche, écriture du brouillon original, édition

Vincenzo Corelli: méthodologie, collecte de données, édition du brouillon original

Dr. Julien Tremblay : méthodologie bioinformatique, curation des données bioinformatiques, édition du brouillon original



Jessica Ann Dozois et Eugenie Mukula Kaswing: montage expérimental, travaux de terrain, collecte de données, édition du brouillon original

Dr. Armand Séguin : conceptualisation, méthodologie, montage expérimental, supervision, édition du brouillon original, ressources et infrastructures.

Prof. Etienne Yergeau : conceptualisation, méthodologie, supervision, écriture et édition du brouillon original, ressources et infrastructures.



## 4.1 Abstract

The aim of this study was to determine whether the complexity of the animal soil food web (SFWC) is a significant factor influencing the soil microbial communities, the productivity of the willow, and the degradation rates of 100 mg kg<sup>-1</sup> phenanthrene contamination. The SFWC treatment had eight levels: just the microbial community (BF), or the BF with nematodes (N), springtails (C), earthworms (E), CE, CN, EN, CEN. After eight weeks of growth, the height and biomass of willows were significantly affected by the SFWC, whereas the amount of phenanthrene degraded was not affected, reaching over 95% in all pots. SFWC affected the structure and the composition of the bacterial, archaeal and fungal communities, with significant effects of SFWC on the relative abundance of fungal genera such as *Sphaerospora*, a known willow symbiont during phytoremediation, and bacterial phyla such as *Actinobacteriota*, containing many PAH degraders. These SFWC effects on microbial communities were not clearly reflected in the community structure and abundance of PAH degraders, even though some degraders related to the *Actinobacteriota* and the diversity of Gram-negative degraders were affected by the SFWC treatments. Overall, our results suggest that, under our experimental conditions, SFWC does not affect significantly willow phytoremediation outcomes.

## 4.2 Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) are organic compounds originating from the incomplete combustion of organic matter. They are considered as contaminants in the environment (Jones et al. 1989; Ravindra et al. 2008), especially in soils (Wilcke 2007), due to their well-documented detrimental effects on ecosystems (Menzie et al. 1992). Phenanthrene (PHE) is a PAH formed by three fused benzenic rings. It has been widely used as a model molecule, alone or with other PAHs in degradation experiments (Li et al. 2019; Menzie et al. 2016; Sun et al. 2010; Lu et al. 2019).

Phytoremediation is a green technology that has demonstrated a significant potential to tackle PAH contamination (Kuppusamy et al. 2017; Spriggs et al. 2005; Guo et al. 2018; Lu et al. 2015; Pilon-Smits 2005). Rhizoremediation, the process where microorganisms are stimulated to degrade contaminants in the rhizosphere environment by root exudates (Correa-García et al. 2018), is one of the main phytoremediation approaches used to degrade PAH. In the Canadian geographical and climatic context, several species from the *Salicaceae* family have been proven to be successful for the phytoremediation of hydrocarbons (Yergeau et al. 2014; Tardif et al. 2016; Yergeau et al. 2015a; Yergeau et al. 2018; Gonzalez et al. 2018), including PHE (Correa-García et al. 2021). Moreover, willows are especially interesting for phytoremediation in view of their rapid growth, deep root systems, resistance to biotic and abiotic stressors and the facility to propagate plants through cuttings.

Several microorganisms can metabolize PHE and other PAH (Cerniglia 1993). Under aerobic conditions, PHE is catabolized into catechols that can be converted to TCA cycle intermediates (Cerniglia 1993; Eaton et Chapman 1992; Mallick et al. 2011). This degradation process starts with the incorporation of a molecular oxygen into one of PHE aromatic nucleus by a ring hydroxylating dioxygenase (RHD) multicomponent enzyme system (Kauppi et al. 1998). The genes coding for the alpha subunit of the PAH-RHD form a monophyletic group (Habe et Otori 2003). Hence, these genes are often used to monitor bacterial degrader communities in PAH contaminated environments using PCR primers designed for either Gram-negative or Gram-positive bacteria (Cébron et al. 2008). Many bacteria contain RHD genes are commonly found in the root systems of *Salicaceae* trees (Correa-García et al. 2021; Bell et al. 2014a; Khan et al. 2014; Bell et al. 2015; Pagé et al. 2015). However, the outcome of phytoremediation often remains unpredictable and variable (Correa-García et al. 2018; Bell et al. 2014b). This variability is partially

due to the initial soil microbial community composition and diversity (Bell et al. 2013; Bell et al. 2015; Yergeau et al. 2015a) and soil physicochemical characteristics (Correa-García et al. 2021). Interestingly, both factors can be affected by soil animal communities. For instance, collembolans and nematodes feed on soil bacteria, fungi and secondary roots, which can stimulate the growth of specific microbial taxa (Crowther et al. 2011; Endlweber et al. 2009; Erktan et al. 2020b; Erktan et al. 2020a). Collembolans and nematodes were also shown to stimulate the growth of secondary plant roots mainly through changes in the availability of nutrients (Alpei et al. 1996; Ngosong et al. 2014; Endlweber et Scheu 2006). Earthworms, as ecosystem engineers, have a significant impact on soil physicochemical characteristics, due to their role in organic matter degradation, nutrient turnover, soil oxygenation and microbial movement between the bulk soil and the rhizosphere (Spain et al. 1992; Bartlett et al. 2010; Lavelle et Spain 2001; Yang et van Elsas 2018).

Consequently, collembolans, nematodes, earthworms and the rest of the soil fauna may have an interesting, yet unexplored, role to play in the rhizoremediation of PAH (Li et al. 2015; Zeb et al. 2020), probably through changes in soil microbial communities and/or soil physicochemical properties. Still, just a few studies have explored the role of soil fauna during remediation of PAH, and the majority of the experiments have only considered single species or single ecological groups (Jing et al. 2017; Zhou et al. 2019). However, many animal groups survive in contaminated soil matrices (Zavala-Cruz et al. 2013; Jing et al. 2017; Sun et al. 2017; Delgado-Balbuena et al. 2016). Despite these hints, little is known about the possible effect of trophic complexity of soil food webs in the fate of PAH in soils. In view of their essential roles in soil ecosystems, soil animals and the complexity of their food web interactions could also affect the outcome of phytoremediation.

Here, we hypothesized that more complex soil food webs result in more efficient phytoremediation. Specifically, we hypothesized that more complex food webs under phenanthrene contamination would result in 1) larger plants, 2) larger shifts in microbial communities when compared to non-contaminated controls and, consequently, 3) more degradation. Therefore, we aimed at determining the response of microbial communities and willow trees to increasingly complex soil animal food webs during PHE rhizoremediation. We performed a PHE rhizoremediation pot experiment consisting of a full factorial combination of collembolans, nematodes and earthworms presence/absence. After eight weeks of willow growth, the 16S rRNA gene of *Bacteria* and *Archaea*, the ITS1 region of *Fungi* and the PAH-RHD $\alpha$  genes of Gram-negative and Gram-positive bacteria were sequenced, the absolute abundance of PAH-

RHD $\alpha$  genes was measured and the willow height and biomass and the residual concentration of phenanthrene were determined.

## 4.3 Material and Methods

### 4.3.1 Soil and biological material

The soil used was acquired from Savaria Matériaux paysagers Ltée (Laval, QC, Canada) and it was subjected to gamma irradiation at a dose ranging from 12.4 to 24.8 kGy by Nordion (Laval, QC, Canada) to significantly reduce the community of soil dwelling invertebrates whilst preserving a significant fraction of the microbial diversity and abundance (McNamara et al. 2003). The irradiated soil was subjected to funnel extractions with heat irradiation to confirm the effectiveness of the gamma irradiation. No invertebrates were recovered after 48h of extraction, thus confirming the almost complete reduction of living soil invertebrates' communities. A wet extraction to recover nematodes was not performed since previous experiments report recovering 100% empty carcasses of nematodes several weeks after soil irradiation with doses as low as 3 kGy (Gebremikael et al. 2015; Buchan et al. 2012). The control potting mix was prepared by mixing perlite and the irradiated soil in a proportion of 1:2 (v:v) to improve permeability and prevent soil compaction. For the contaminated soil, after gamma irradiation, the soil was spiked with 100 mg·kg<sup>-1</sup> dry soil of phenanthrene according to the following protocol. Batches of 1 kg of dried, 2 mm sieved soil were spiked with 1 g of phenanthrene (Sigma Aldrich) diluted in 100 mL of acetone. Batches of control soil were also spiked with acetone alone. The spiked soil was left in a chemical hood for 48h until the acetone was completely evaporated. Then, the spiked 1 kg batches (contaminated or control) were thoroughly incorporated into 9 kg of uncontaminated soil in a cement mixer. After that, perlite was incorporated to the soil in a proportion of 1:2 (v:v) and continued mixing until the potting mix reached homogeneity.

Willow cuttings (*Salix purpurea* cv. FishCreek) were acquired from Agro Énergie (Saint-Roch-de-l'Achigan, Quebec, Canada). Prior to planting, willow cuttings were pre-soaked by submerging 80% of their length in tap water at room temperature for one week. Cuttings showing signs of disruption of dormancy (greener buds, incipient root tips) were selected for the experiment.

*Aporrectodea caliginosa* adult earthworm specimens with a fully developed clitellum were collected in April 2018 on the INRS campus and were kept in soil microcosms composed of 20x20x12 cm plastic boxes containing 500 g of 2 mm sieved soil with a pierced cover. Up to 10 adult earthworms were kept in each microcosm. This system was enriched with 100 g of cattle manure and the soil humidity was kept at 30% by weighing the boxes and adding the

corresponding amount of tap water every two weeks. Five adults presenting a fully developed clitellum were deposited at the surface of the corresponding pots.

Adult nematodes from *Caenorhabditis sp.* were isolated from a decomposing earthworm in our soil microcosms. Isolation in agar culture plates, identification and culture conditions for the nematodes were carried out as described in (Barrière et Félix 2006). Briefly, the decomposing earthworm body where the nematodes were found was placed in a standard Nematode Growth Medium (NGM) agar Petri dish containing an *E. coli* OP50 lawn (Brenner 1974). The Petri dish was moistened with sterile water to facilitate migration. Up to 30 individual worms were collected from the bacterial lawn after times ranging from 15 min to 2 h and placed with a worm picker into a new individual agar plate. The Petri dishes were kept at room temperature. After 7 days, *Caenorhabditis sp.* worms were identified under the dissecting microscope discriminating the different families by their oral apparatus, the color of the intestinal cell contents (light brown) and the central position of the vulva. Cultures were maintained by transferring nematodes every 2-4 days into a fresh agar plate for 2 weeks prior to the beginning of the experiment. A water solution of nematodes was prepared and 5 mL of it, containing approximately 5,000 individuals of all ages, were inoculated into the soil. This amount was calculated by mounting 10  $\mu$ L of the solution in a slide and counting individuals under the stereoscope. A total of 4 slides were mounted and used to calculate the mean. The number of observed individuals ranged between 8 and 12 per slide.

Springtails from *Tomocerus sp.* and *Folsomia candida* were used as the collembolans representatives. *Tomocerus* culture were purchased at Magazoo (Montréal, QC, Canada). *Folsomia* springtails were extracted from the same soil used in this experiment through heat irradiation with a funnel and kept in culture conditions at room temperature for 2 weeks prior to the beginning of the experiment. The springtail cultures consisted of coconut fiber and charcoal moistened once a week in 500 mL tubular plastic containers with a pierced lid covered with light filter paper to allow air exchange. Before inoculation, springtail cultures were placed at 4 °C overnight to reduce their metabolic rate and allow handling of the colonies (Cooper 2011). The colonies were mixed, including the substrate, and were subsequently divided in 55 individual bags of approximately 100 g. Springtails of 4 bags were extracted (funnel extraction with a clamped rubber tube for 24 h under incandescent lamp) and counted, showing that each bag contained approximately 200 to 250 individuals. To keep the springtails anesthetised, the bags were kept at 4 °C in ice until inoculation where one bag per pot was used.



### **4.3.2 Experimental design**

A full factorial experiment consisting of three factors was implemented: contamination, food web complexity and plant compartment. The contamination treatment consisted of two levels: soils contaminated with  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  dry soil of phenanthrene (PHE) and an uncontaminated control soil (CTRL). The soil was gamma-irradiated to allow for the control of the food web complexity treatment (see below for more details). The food web complexity treatments consisted of eight levels: bacteria and fungi as control (BF, the irradiated soil only), the irradiated soil with added springtails (C), nematodes (N) or earthworms (E), and all the possible two and three animal combinations (CE, CN, EN, CEN). Microbial communities and phenanthrene concentrations were evaluated in two soil compartments: bulk (Bulk) and rhizosphere (Rhizo) soils. The two first factors (contamination and food web complexity) resulted in 16 soil treatments that were used for the pot experiment. The pots were arranged in six experimental blocks, wherein the 16 treatments were randomly distributed, for a total of 96 pots that were placed outside at the Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie (INRS, Laval, QC, Canada, GPS coordinates 45.541393, -73.716980). One cutting was planted per six-liter pot containing approximately 4 kg of potting mix on the 7<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> of August 2018. Animals were added at the surface of the potting mix (N and E) or at 5 cm under the surface (C), immediately after the cuttings were planted. Immediately after that, pots were covered with coconut fiber to prevent animals from escaping and to reduce phenanthrene evaporation and photooxidation. Then, the pots were connected to an automated drip irrigation system and received approximately 400 mL of water every day at 8 am.

### **4.3.3 Sampling and plant trait measurements**

The experiment was sampled between the 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> of October 2018, after approximately 8 weeks of plant growth. Plant height and the number of shoots were measured prior to clipping aboveground shoot biomass (excluding the original cutting). Afterwards, the cuttings with the attached roots were taken out from the pots and rhizosphere and bulk soil samples were collected for microbial community analysis and phenanthrene concentration measurements as described in (Correa-García et al. 2021), resulting in 192 soil samples. Soil samples were kept at 4 °C until transportation to the lab (around 2 h) where they were placed at -20 °C. For all plants harvested, aboveground willow biomass was weighed fresh, oven-dried for 24 h at 60 °C and weighed again to recover dried biomass and aboveground water content values. Root biomass was collected sieving at 2 mm all the soil from every pot to ensure recovery of the maximum amount of root

biomass. Roots collected were subsequently cleaned from perlite and adhered soil, then dried and weighed. The objective of our study was not to determine the effects of PHE on the survival and fitness of soil invertebrates, therefore no animal extraction was performed. However, the presence of variable numbers of surviving E and C was visually confirmed on the pots receiving these treatments at the end of the experiment.

#### **4.3.4 Phenanthrene quantification**

Phenanthrene concentration was measured in the rhizosphere and bulk soil samples taken at the end of experiment. Two phenanthrene measurements were taken per biological replicate. The phenanthrene extraction protocol consisted on an in-house method developed in the lab and described in Correa-Garcia (2021). Briefly, approximately 4 g of frozen soil were mixed with 900  $\mu\text{L}$  of ethyl acetate, 3 mL of distilled water and 10 ppm of phenanthrene- $\text{d}_{10}$  in 100  $\mu\text{L}$  of ethyl acetate used as internal standard. Next, soil samples were placed in an ultrasonic bath at 60 kHz for 15 min to detach the phenanthrene from the soil organic matter. Then, soil samples were shaken overnight at 300 rpm on an incubator at room temperature. The next day, the samples were centrifuged at 270 g for 10 min, then the ethyl acetate organic phase was recovered avoiding the water phase. The organic phase was further purified by centrifugation at  $5,000 \times g$  for 1 min. Lastly, the ethyl acetate containing the phenanthrene was recovered and placed in a GC vial for GC-MS analysis. Soil leftovers were dried to obtain the final concentration of phenanthrene in each sample, expressed as  $\text{mg kg}^{-1}$ .

Phenanthrene extracts were analyzed with a Trace GC Ultra system (Thermo Scientific) equipped with a 30 x 0.25 mm (0.25  $\mu\text{m}$  thickness) DB-5 MS capillary column (Agilent J & W capillary GC) and coupled to a Polaris Q benchtop Ion Trap Mass Spectrometer. The injector and analyzer temperatures were set at 250°C and 350°C, respectively. The GC-MS temperature program consisted in 2 min hold at 70°C, increasing temperature to 310°C at 30 °C  $\text{min}^{-1}$  followed by 6 min hold at 310°C. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 0,3 mL/min. The injection volume was 3  $\mu\text{L}$ . MS scan range was set at 70-600 m/z.

Calibrations curves for the samples were prepared using phenanthrene as marker. The phenanthrene was weighed and dissolved in ethyl acetate to produce a series of concentrations ranging from 1 ppm to 100 ppm. Standard calibration curves were calculated by plotting the peak areas against the corresponding concentration of reference.

#### 4.3.5 Microbial community composition: DNA isolation and library preparation

Two hundred fifty mg of either bulk or rhizosphere soil per sample were transferred to a 2 mL Powerbead Pro tube containing zirconium beads. DNA was then homogenized in a FastPrep®-24 (MP Biomedicals) at 6 m/s for two times 45 s. After homogenization, DNA was extracted using the DNeasy® Powersoil® kit (Qiagen) following the protocol provided. Bacterial and archaeal V3-V4 regions of the 16S rRNA gene were amplified using the primer set 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') – 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') (Caporaso et al. 2012). The fungal communities were targeted using the internal transcribed spacer region (ITS) with the primer set ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') – 58A2R (5'-CTGCGTTCTTCATCGAT-3') (Martin et Rygielwicz 2005). The PAH-RHD $\alpha$  gene cluster corresponding to Gram negative (GN) bacteria was amplified using the primer set 610F (5'-GAG ATG CATACC ACG TKG GTT GGA-3') and 916R (5'-AGC TGT TGT TCG GGA AGAYWG TGC MGT T-3') and the gene cluster corresponding to Gram positive (GP) bacteria was amplified using the primer set 641F (5'-CGG CGC CGA CAA YTT YGT NGG-3') and 933R (5'-GGG GAA CAC GGTGCC RTG DAT RAA-3') (Cébron et al. 2008). All microbial regions were amplified in 25  $\mu$ L volumes containing 19.125  $\mu$ L of sterile water, 50 nM BSA, 20mM Taq reaction buffer (20mM Tris HCl pH 8.4), 400 nM (0.5  $\mu$ L at 20  $\mu$ M) of each primer, 500 nM of MgCl<sub>2</sub>, 200 nM dNTP, 0.25 U Taq DNA polymerase and 1  $\mu$ L of DNA template (10 - 20 ng). Thermal cycling conditions were as follows: for bacteria and archaea, initial denaturation at 95°C for 5 min; 35 cycles at 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 1 min, and a final elongation phase at 72°C for 5 minutes. For fungi, the annealing temperature was set at 59°C instead of 55°C, and the number of cycles at 30 instead of 35. PAH-RHD $\alpha$  genes had annealing temperatures set at 57°C and 54°C for GN and GP primer sets, respectively and a total of 30 cycles. PCRs were performed in a T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad). PCR products were cleaned using 16  $\mu$ L magnetic beads (Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter Life Science) following the Illumina's protocol "16S Metagenomic Sequencing Library preparation" guide (Part #15044223 Rev. B). Then, 400 nM of each Nextera XT unique index primers (2  $\mu$ L at 5  $\mu$ M) were added to 5  $\mu$ L of our PCR product, in a PCR mix containing 50 nM BSA, 20mM Taq reaction buffer (20mM Tris HCl pH 8.4), 500 nM of MgCl<sub>2</sub>, 200 nM dNTP, 0.25 U Taq DNA polymerase and 12.175  $\mu$ L of sterile water. The PCR products were tagged under the following thermal cycling conditions: 95°C initial denaturation phase for 5 min, followed by 8 cycles consisting of 95°C denaturation for 30 s, annealing at 55°C for 30 s, elongation at

68°C for 30 s, and a final elongation phase at 68°C during 5 min. The indexed amplicons were purified using magnetic beads as described above and quantified using Quant-iT™ Picogreen dsDNA Assay kit (Invitrogen). The different amplicons were then combined at an equimolar ratio and sent to be sequenced (2 x 250 bp) on an Illumina Miseq sequencer at the Centre d'expertise et de services Génome Québec (Montréal, QC, Canada).

#### **4.3.6 Real-time PCR quantification of PAH degrading genes**

The real-time quantitative PCR (qPCR) was conducted on a Stratagene Mx3005P qPCR system (Agilent Technologies), associated with the corresponding software MxPro Mx3005P (v4.10; Agilent). The qPCR reactions were performed using the primers designed by Cébron et al. (2008) in 20 µL total volume containing 1x iTaq universal SYBR® Green reaction mix supplemented with 300 µM of each primer (Integrated DNA Technologies™) and 5 µL of DNA template at a concentration around 5-10 ng µL<sup>-1</sup> or distilled sterile water (negative no template control).

The amplifications were carried out following the protocol provided in Cébron et al. (2008) with some modifications. Briefly, the first step consisted of denaturation at 95°C for 5 min followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 s, annealing for 35 s at either 57°C (GN) or 54°C (GP) and an elongation step at 72°C for 75 s, after which the SYBR Green signal intensity was measured. At the end of the run, a melting curve analysis was performed where signal intensity was measured at 0.5 °C temperature increment every 5 s from 51 to 95 °C. Standards for each gene were made from 10-fold dilutions of linearized plasmid containing the gene fragment of interest, cloned from amplified from soil DNA (Yergeau et al. 2009).

At the end of the qPCR run, the threshold line was automatically defined within the logarithmic increase phase of the acquired fluorescence data. The Ct values were assessed for all the samples and the gene copy numbers were deducted from the standard curve based on the Ct value. Efficacy of the qPCRs were of 59.0% (standard curve  $R^2 = 0.994$ ) and 58.9% ( $R^2 = 0.986$ ) for PAH-RHDα GN bulk soil genes; 49.6% ( $R^2 = 0.994$ ) and 58.9% ( $R^2 = 0.986$ ) for PAH-RHDα GN rhizosphere soil genes; and 84.0% ( $R^2 = 0.997$ ) and 85.0% ( $R^2 = 0.996$ ) for PAH-RHDα GP bulk soil genes and 88.1% ( $R^2 = 1.000$ ) and 85.0% ( $R^2 = 0.996$ ) for PAH-RHDα GP rhizosphere soil genes.

#### 4.3.7 Bioinformatic analyses

Sequences were analyzed using AmpliconTagger (Tremblay et Yergeau, 2019). Briefly, raw reads were scanned for sequencing adapters and PhiX spike-in sequences. Remaining reads were filtered based on quality (Phred) score and remaining sequences were dereplicated/clustered at 100% identity and then processed for generating Amplicon Sequence Variants (ASV; DADA2 v1.12.1; Callahan *et al.* 2016). Chimeras were removed with DADA2's internal removeBimeraDeNovo(method="consensus") method followed by UCHIME reference (Edgar et al., 2011). ASV for which abundance across all samples were lower than 5 were discarded. A global read count summary throughout the pipeline steps is provided in Tableau Suppl. 6 for all datasets. ASV were assigned a taxonomic lineage with the RDP classifier (Wang et al. 2007) using an in-house training set containing the complete Silva release 138 database (Quast et al. 2013) supplemented with eukaryotic sequences from the Silva database and a customized set of mitochondria, plasmid and bacterial 16S sequences. For ITS ASV, a training set containing the Unite DB was used (sh\_general\_release\_s\_04.02.2020 version). The RDP classifier assigns a score (0 to 1) to each taxonomic depth of each ASV. Each taxonomic depth having a score  $\geq 0.5$  were kept to reconstruct the final lineage. Taxonomic lineages were combined with the cluster abundance matrix obtained above to generate a raw ASV table, from which a bacterial/fungal organisms ASV table was generated.

Custom RDP classifier training sets were generated for both PAH-RHD $\alpha$  GP and GN amplicon data types. Raw reads were processed as described above up to the quality filtering step and remaining sequences were dereplicated/clustered at 100%, thus processes for ASV (DADA2 v1.12.1) (Callahan et al. 2016).

Each ASV were blasted (BLASTn) against the NCBI nt database (downloaded on February 21, 2020) with `-max_target_seqs` set to 20. Blast output was filtered to keep hits that had an e-value  $\leq 1e-20$ , alignment length of at least 100 bp and alignment percentage of at least 60 percent. Taxonomic lineages of each filtered blast hit were fetched from the NCBI taxonomy database (version downloaded on December 4, 2019). RDP training sets were generated as described (<https://github.com/jtremblay/RDP-training-sets>).

#### **4.3.8 Statistical analyses**

Statistical analyses were performed in R (v.3.5.0) (R Core Team 2020), with basic analysis performed with the stats package (R Core Team 2020). Normality and homoscedasticity of data were verified with Shapiro-Wilk and Bartlett tests, respectively. When distributions did not attain normality, variables were log transformed or square root transformed. The differences in plant trait results, qPCR quantifications and phenanthrene concentration were assessed using ANOVA followed by *post hoc* Tukey HSD tests. When transformations did not yield normality, Kruskal-Wallis analysis of variance was performed instead, with the Dunn test for multiple comparisons. Univariate analysis of the relative abundance of genera were performed with ANOVA test with White's correction for heteroscedastic data using the car package (Fox et Weisberg 2019). Differences were considered significant at the 0.05 level.

Shannon H' diversity index and Species Richness (observed number of ASV) were calculated with the otuSummary package (Yang 2020) and tested with univariate ANOVA.

Principal coordinate analyses (PCoA) were performed to assess differences in community composition and between treatments using normalized ASV tables with the Bray-Curtis dissimilarity index calculated using the vegan package (Oksanen et al. 2019). PERMANOVA analyses tested the interaction between treatments in the microbial communities through 999 permutations using the Adonis function from the vegan package. PCoA and relative abundance graphs were created with the ggplot2 package (Wickham et al. 2019) and percentage changes in diversity indexes using Microsoft Excel.

#### **4.3.9 Data deposition**

Raw sequencing reads were deposited in the NCBI SRA under BioProject accession PRJNA700608.

## 4.4 Results

### 4.4.1 Plant biomass and phenanthrene concentration

The willow shoot fresh biomass was mainly influenced by contamination ( $F = 17.806$ ,  $p < 0.001$ ), with CTRL presenting significantly higher biomass values (from 50.542 g in CEN to 37.773 g in N) than PHE pots (44.510 g in CEN to 24.167 g in BF; Tableau 4-1). Generally, the willows with the highest biomass were growing in the CTRL soil, apart from the CEN PHE willows, which had the third highest biomass of all treatments (Tableau 4-1). The soil food web complexity (SFWC) was also a significant factor ( $F = 3.531$ ,  $p \text{ value} = 0.002$ ), with higher biomass values in the CEN treatment for both contamination levels.

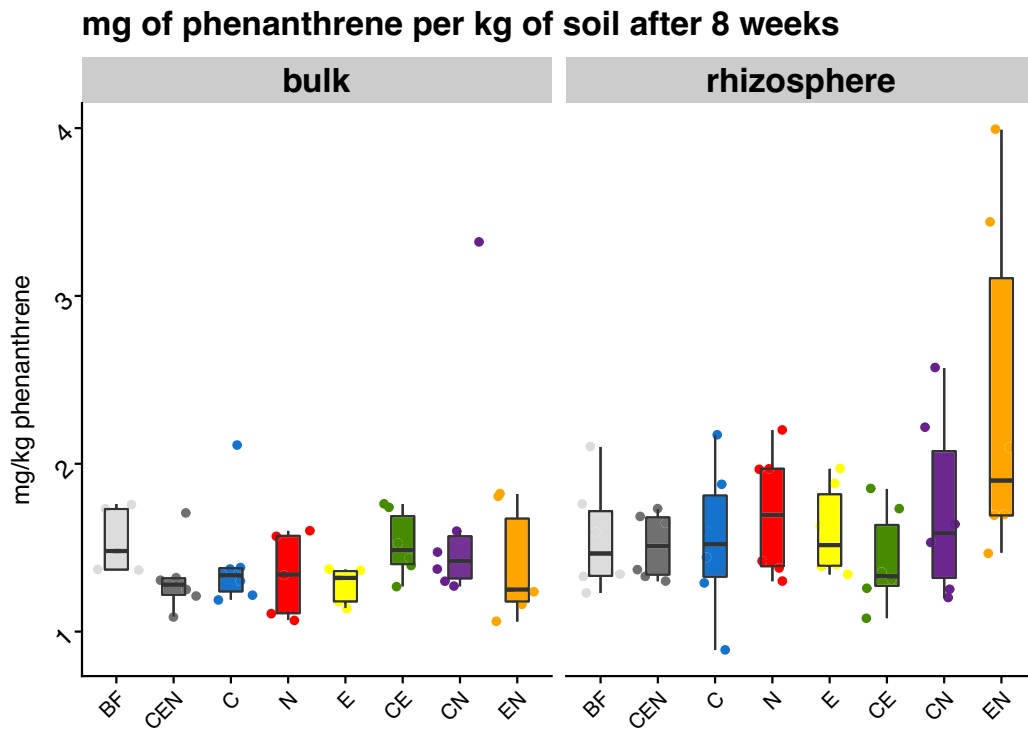
**Tableau 4-1 Mean and standard deviation for willow morphological traits. Letters denote significantly different groups as stated by the Tukey *post hoc* test.**

SFWC	Cont.	Fresh aerial biomass (g)			Total dry biomass (g)			Height (cm)		
		mean	std		mean	std		mean	std	
BF	CTRL	39.771	± 9.989	ab	16.379	± 4.852	ab	96.500	± 7.423	ab
	PHE	24.166	± 4.149	b	9.670	± 2.177	b	76.167	± 5.307	b
CEN	CTRL	50.542	± 17.757	a	19.062	± 7.321	a	96.833	± 10.534	ab
	PHE	44.510	± 13.843	ab	16.066	± 4.336	ab	90.333	± 16.464	ab
C	CTRL	40.752	± 6.718	ab	16.540	± 3.305	ab	91.750	± 8.507	ab
	PHE	31.013	± 5.053	ab	12.041	± 2.165	ab	81.667	± 13.397	ab
N	CTRL	37.773	± 5.857	ab	14.305	± 3.144	ab	89.500	± 4.806	ab
	PHE	29.856	± 16.586	ab	11.400	± 6.149	ab	81.667	± 23.036	ab
E	CTRL	44.483	± 7.462	ab	17.028	± 2.986	ab	91.750	± 5.707	ab
	PHE	39.862	± 8.949	ab	14.949	± 3.523	ab	92.417	± 6.829	ab
CE	CTRL	41.609	± 13.081	ab	16.373	± 6.874	ab	91.917	± 7.697	ab
	PHE	39.886	± 5.249	ab	15.512	± 3.207	ab	87.667	± 12.242	ab
CN	CTRL	40.651	± 13.615	ab	15.760	± 5.488	ab	95.083	± 8.857	ab
	PHE	30.841	± 8.299	ab	12.343	± 3.167	ab	87.000	± 7.239	ab
EN	CTRL	47.372	± 13.038	a	17.830	± 4.930	ab	99.167	± 11.839	a
	PHE	36.539	± 7.378	ab	13.324	± 2.166	ab	87.500	± 7.342	ab

Legend: SFWC: Soil food web complexity; Cont: contamination; CTRL: control pots; PHE: phenanthrene contaminated pots. BF: naturally present Fungi and Bacteria. CEN: BF and collembola, earthworms and nematodes; C: BF and collembola; N: BF and nematodes; E: BF and earthworms; CE: BF and collembola and earthworms; CN: BF and collembola and nematodes and EN: BF and earthworms and nematodes.

Total dry biomass was significantly higher for willows growing in CTRL soils (from 19.062 g in CEN to 14.305 g in N) than in PHE soils (16.066 g in CEN to 6.670 g in BF) ( $F = 19.725$ ,  $p$  value  $< 0.001$ ; Tableau 4-1). SFWC also had a significant effect on willow total dry biomass ( $F = 2.147$ ,  $p$  value = 0.048). Here again, the PHE CEN willows had similar biomass to willows growing in CTRL soil, and all willows growing in PHE soils with earthworms had higher total biomass than the willows growing in PHE soils without earthworms (Tableau 4-1). Only the total biomasses of the CTRL CEN and the PHE BF treatments were significantly different in *post-hoc* tests.

Contamination was the only factor significantly affecting the willow height ( $F = 15.176$ ,  $p < 0.001$ ). Again, in general, CTRL plants (from 99.167 cm in EN to 89.500 cm in N) were higher than PHE plants (from 92.417 cm in E to 76.167 cm in BF), but, here again, willows growing in PHE soil in the presence of earthworms were taller than in the absence of earthworms (Tableau 4-1). For the three plant parameters, only BF PHE was significantly lower than the best performers of the CTRL groups (Tableau 4-1).



**Figure 4-1 Phénanthrène quantification after 8 weeks of growth.**  
 Quantification of phenanthrene (as  $\text{mg kg}^{-1}$  soil) in bulk and rhizosphere soil compartments for all soil food web complexity (SFWC) treatments. No significant differences were found ( $n = 6$ ). Legend: SFWC levels: BF = only naturally present *Bacteria* and *Fungi*; CEN = BF plus added collembola, nematodes and earthworms; C = BF and added collembola; N = BF and added nematodes; E = BF and added earthworms; CE = BF and added collembola and earthworms; CN = BF and added collembola and nematodes; EN = BF and added nematodes and earthworms.



There were significant differences in terms of phenanthrene degradation between compartments ( $F = 8.721$ ,  $p = 0.004$ ), with slightly more phenanthrene degraded in the bulk soil. There was also a nearly significant effect of the compartment x SFWC interaction term ( $F = 1.848$ ,  $p = 0.091$ ). However, these differences were not biologically significant, since the highest phenanthrene value retrieved was of  $3.99 \text{ mg kg}^{-1}$  and the lowest  $0.89 \text{ mg kg}^{-1}$  (Figure 4-1), representing overall degradation rates ranging between 96 and 99% of the  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  phenanthrene applied, both in the bulk and rhizosphere soils.

#### 4.4.2 Microbial community diversity

The median values for the Shannon  $H'$  diversity index and the number of observed ASV for all treatments and soil compartments are presented in Tableau 4-2 and the statistical analysis on the observed number of ASV are presented in the Tableau Suppl. 7. The contamination and the soil compartment significantly affected the fungal Shannon  $H'$  diversity, but the SFWC treatment also had a minor effect (Tableau 4-3). The mean Shannon  $H'$  diversity was the highest in N (1.79) and CEN (1.66) soils, whilst the lowest was CN (0.96). In general, PHE and bulk soils had lower fungal Shannon  $H'$  diversity.

The bacterial and archaeal Shannon  $H'$  diversity was significantly influenced by contamination and the soil compartment (Tableau 4-3). PHE pots and rhizosphere soils were more diverse as compared to CTRL and bulk compartments. Interestingly, the rhizosphere of PHE CN (5.58), CEN (5.48), CE (5.45) and EN (5.44) had the highest Shannon  $H'$  diversity (other values ranging from 5.41 to 4.72). However, the only two significantly different treatments in *post-hoc* tests were the rhizosphere of PHE CN treatments, compared to the bulk of CTRL C (Tableau 4-2).

The Shannon  $H'$  diversity of Gram-negative bacterial PAH degraders experienced a significant effect of the triple interaction term (Tableau 4-3). In this sense, the bulk of PHE CEN presented the highest median Shannon  $H'$  diversity (Tableau 4-2), followed by the rhizosphere of PHE CEN and the rhizosphere of CTRL BF.

Regarding the Gram-positive bacterial degraders, the Shannon  $H'$  index was also significantly higher in the PHE pots and the rhizosphere soil compartment (Tableau 4-3), in line with the results for the *Bacteria* and *Archaea* general community. All the treatments with nematodes (N) had the highest absolute diversity (Tableau 4-2).

**Tableau 4-2 Median Shannon H' diversity and median ASV numbers used in the calculation of the percentage change presented in Figure 4-2 and Figure Suppl. 1. Legend as in Tableau 1.**

	ITS gene (n=6)		16S rRNA gene (n=6)		PAH - RHD Gram Negative gene (n=6)		PAH - RHD Gram Positive gene (n=6)	
	H'	ASV	H'	ASV	H'	ASV	H'	ASV
<b>BF bulk CTRL</b>	1.480	75	5.045	463	2.766	29.5	4.944	227
<b>BF bulk PHE</b>	0.746	53.5	5.446	473.5	3.466	62.5	5.127	242
<b>BF rhizosphere CTRL</b>	1.617	108	5.350	535	3.496	51	5.108	281.5
<b>BF rhizosphere PHE</b>	1.643	136.5	5.215	498	3.360	40.5	5.572	409.5
<b>CEN bulk CTRL</b>	2.102	82	4.920	337	2.581	20	4.854	189.5
<b>CEN bulk PHE</b>	0.944	50	5.411	473	3.580	52.5	5.197	225
<b>CEN rhizosphere CTRL</b>	2.835	153	5.175	482	3.050	35.5	5.035	218.5
<b>CEN rhizosphere PHE</b>	1.435	92	5.304	557	3.499	49.5	5.607	410
<b>C bulk CTRL</b>	1.233	61.5	4.723	342.5	2.675	17.5	4.674	137
<b>C bulk PHE</b>	0.723	34.5	5.118	371.5	3.288	46	5.017	209
<b>C rhizosphere CTRL</b>	1.255	97	5.189	455.5	3.267	37	5.242	281
<b>C rhizosphere PHE</b>	1.101	87	5.312	477.5	3.479	50	5.585	409.5
<b>N bulk CTRL</b>	2.428	91	5.037	377	3.276	42	4.758	164
<b>N bulk PHE</b>	0.555	29.5	5.391	502	3.121	38.5	5.158	249
<b>N rhizosphere CTRL</b>	1.594	162	5.211	495.5	2.727	20	5.330	301.5
<b>N rhizosphere PHE</b>	1.557	153.5	5.463	533.5	3.484	54.5	5.633	436
<b>E bulk CTRL</b>	1.056	75.5	5.207	418.5	3.152	28.5	4.781	158
<b>E bulk PHE</b>	0.669	39.5	5.330	477	3.447	52	5.163	230
<b>E rhizosphere CTRL</b>	2.410	120	5.222	522	2.588	22.5	4.933	185
<b>E rhizosphere PHE</b>	0.793	105	5.338	481	3.387	41	5.519	360
<b>CE bulk CTRL</b>	1.170	63	4.990	405.5	3.037	25	4.966	211.5
<b>CE bulk PHE</b>	0.835	33	5.311	429	3.063	31.5	5.479	328
<b>CE rhizosphere CTRL</b>	2.093	104	5.258	472.5	2.880	27.5	5.038	263
<b>CE rhizosphere PHE</b>	1.262	108	5.428	552	3.472	55	5.584	432.5
<b>CN bulk CTRL</b>	0.828	40	4.910	337	3.025	47.5	4.692	149.5
<b>CN bulk PHE</b>	0.658	28.5	4.914	315.5	3.178	32.5	5.233	243.5
<b>CN rhizosphere CTRL</b>	1.225	113.5	5.350	462	2.911	33.5	5.370	355
<b>CN rhizosphere PHE</b>	0.843	98.5	5.619	571.5	3.394	44	5.680	457
<b>EN bulk CTRL</b>	0.949	49	5.221	461	3.376	53	4.811	162.5
<b>EN bulk PHE</b>	0.530	25.5	5.323	458	3.404	55.5	5.135	209
<b>EN rhizosphere CTRL</b>	0.894	79	5.225	523.5	2.896	26.5	5.051	221
<b>EN rhizosphere PHE</b>	0.841	98	5.533	574.5	3.408	48	5.659	430

Tableau 4-3 Summary of the ANOVA on the Shannon diversity.

<i>Fungi</i>	<i>Df</i>	<i>Sum Sq</i>	<i>Mean Sq</i>	<i>F value</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
<b>SFWC</b>	<b>7</b>	<b>13.89</b>	<b>1.985</b>	<b>1.882</b>	<b>0.076</b> .
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>18.3</b>	<b>18.299</b>	<b>17.351</b>	<b>&lt;0.001</b> ***
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>5.87</b>	<b>5.869</b>	<b>5.565</b>	<b>0.020</b> *
SFWC:contamination	7	2.52	0.361	0.342	0.934
SFWC:compartment	7	1.6	0.228	0.217	0.981
contamination:compartment	1	0.92	0.916	0.868	0.353
SFWC:contamination:compartment	7	2.16	0.309	0.293	0.956
Residuals	160	168.74	1.055		
<i>Bacteria and Archaea</i>	<i>Df</i>	<i>Sum Sq</i>	<i>Mean Sq</i>	<i>F value</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
SFWC	7	0.039	0.006	1.116	0.355
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.136</b>	<b>0.136</b>	<b>27.074</b>	<b>&lt;0.001</b> ***
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.086</b>	<b>0.086</b>	<b>17.085</b>	<b>&lt;0.001</b> ***
SFWC:contamination	7	0.025	0.004	0.711	0.663
SFWC:compartment	7	0.042	0.006	1.196	0.308
contamination:compartment	1	0.002	0.002	0.332	0.565
SFWC:contamination:compartment	7	0.016	0.002	0.464	0.859
Residuals	159	0.799	0.005		
<i>PAH-RHD Gram Negative</i>	<i>Df</i>	<i>Sum Sq</i>	<i>Mean Sq</i>	<i>F value</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
SFWC	7	0.5	0.072	0.304	0.951
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>6.23</b>	<b>6.226</b>	<b>26.486</b>	<b>&lt;0.001</b> ***
compartment	1	0.01	0.01	0.043	0.836
SFWC:contamination	7	0.68	0.097	0.411	0.895
SFWC:compartment	7	1.34	0.192	0.816	0.575
contamination:compartment	1	0.24	0.236	1.005	0.318
<b>SFWC:contamination:compartment</b>	<b>7</b>	<b>3.91</b>	<b>0.558</b>	<b>2.375</b>	<b>0.025</b> *
Residuals	159	37.38	0.235		
<i>PAH-RHD Gram Positive</i>	<i>Df</i>	<i>Sum Sq</i>	<i>Mean Sq</i>	<i>F value</i>	<i>Pr(&gt;F)</i>
SFWC	7	0.0624	0.0089	1.103	0.364
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.723</b>	<b>0.723</b>	<b>89.547</b>	<b>&lt;0.001</b> ***
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.4619</b>	<b>0.4619</b>	<b>57.204</b>	<b>&lt;0.001</b> ***
SFWC:contamination	7	0.0414	0.0059	0.733	0.644
SFWC:compartment	7	0.0862	0.0123	1.525	0.162
contamination:compartment	1	0.0215	0.0215	2.667	0.104
SFWC:contamination:compartment	7	0.0122	0.0017	0.215	0.982
Residuals	157	1.2677	0.0081		

**Based on the ASVs of the ITS region for fungi, the 16S rRNA gene for total bacterial and archaea, and ASVs for Gram-negative and Gram-positive PAH-RHD $\alpha$  genes for bacterial degraders.**

#### **4.4.3 Microbial community structure**

The fungal community structure was mainly shaped by contamination ( $R^2 = 5.3\%$ ,  $p < 0.001$ ), and the soil food web complexity (SFWC;  $R^2 = 6.1\%$ ,  $p = 0.007$ ; Figure 4-2A). The PCoA showed CTRL (left side) and PHE (right side) pots dispersed along the first axis. The second axis allowed for a greater dissemination of CTRL fungal community structures, compared to PHE pots (Figure 4-2A), along with the separation of pots containing collembolans (C and CN) from the ones containing earthworms and/or nematodes (E, N, CE and EN).

For *Bacteria* and *Archaea*, the PERMANOVA analysis (Figure 4-2B), showed that the contamination ( $R^2 = 11.0\%$ ,  $p < 0.001$ ), the soil compartment ( $R^2 = 3.4\%$ ,  $p < 0.001$ ) and the SFWC treatment ( $R^2 = 4.4\%$ ,  $p = 0.002$ ), had all significant main effects on the community structure. In addition, the effect of the contamination was modulated by the soil compartment ( $R^2 = 0.7\%$ ,  $p = 0.034$ ). Most of these effects are visible in the PCoA (Figure 4-2B), as the communities separate along the first axis in two clear groups, with CTRL soils on the left and PHE soil on the right. These clusters further separate between the rhizosphere and bulk soil samples along the second axis. As for the interaction between the contamination and the soil compartment, the samples within the bulk soil and the rhizosphere of the CTRL treatments were more dispersed than the samples from bulk and rhizosphere of the PHE treatment, respectively. The changes in the community structure caused by the SFWC were not evident on the first two axis of the ordination and the specific effects are presented in the community composition section of this manuscript.

The PERMANOVA analysis of the PAH-RHD $\alpha$  GN gene dataset showed that contamination was the only factor significantly affecting the community structure ( $R^2 = 12.3\%$ ,  $p < 0.001$ ; Figure 4-2C). As opposed to the ordination of the bacterial and archaeal community structures, the PAH-RHD $\alpha$  GN gene dataset did not cluster into clearly identifiable groups. However, it is possible to detect some separation between PHE (right) and CTRL (center-left).

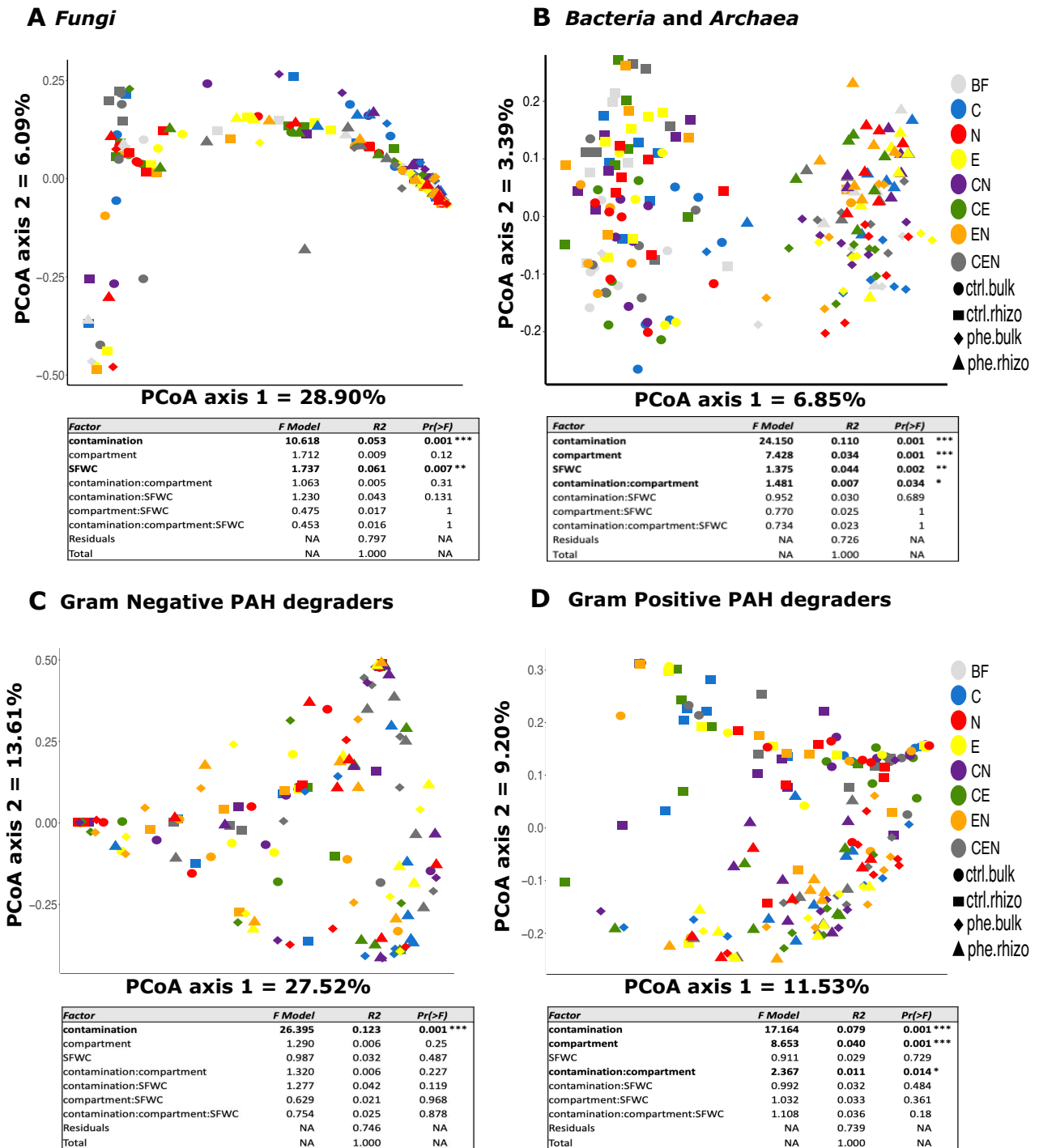


Figure 4-2 Microbial community structure: PCoAs and PERMANOVAs.

**Principal coordinate analysis (PCoA) based on Bray-Curtis dissimilarity of the relative abundance of ASV showing the effects of contamination, soil food complexity treatment, soil compartment and the respective interactions of these three factors on the community structures of A) *Fungi* (based on the ITS region); B) *Bacteria* and *Archaea* (based on the 16S rRNA gene); C) Gram Negative bacterial degraders (based on the PAH-RHD $\alpha$  GN gene) and D) Gram Positive bacterial degraders (based on the PAH-RHD $\alpha$  GP gene). Below each PCoA there is the summary table of the permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) examining the differences in the microbial communities based on the above-mentioned factors. Legend: SFWC levels: BF = only naturally present *Bacteria* and *Fungi*; CEN = BF plus added collembola, nematodes and earthworms; C = BF and added collembola; N = BF and added nematodes; E = BF and added earthworms; CE = BF and added collembola and earthworms; CN = BF and added collembola and nematodes; EN = BF and added nematodes and earthworms; con.bul: bulk compartment in control pot; con.rhi: rhizosphere compartment in control pot; phe.bul: bulk compartment in phenanthrene contaminated pot and phe.rhi: rhizosphere compartment in phenanthrene contaminated pot.**

Finally, the PCoA ordination of the PAH-RHD $\alpha$  GP gene dataset showed a stronger separation between PHE (bottom) and CTRL (top) communities (Figure 4-2D). Again, the main effect shaping the community structure was the contamination level ( $R^2 = 7.9\%$ ,  $p < 0.001$ ), but the compartment ( $R^2 = 4.0\%$ ,  $p < 0.001$ ) and its interaction with contamination ( $R^2 = 1.1\%$ ,  $p < 0.001$ ; Figure 4-2D) had also significant effects (Figure 4-2D).

#### **4.4.4 Community composition**

A total of 5,408 fungal ASVs were retained after the bioinformatic pipeline. As for the community structure, the fungal community composition was principally influenced by contamination. The ASV were classified in 14 phyla, with *Ascomycota* being the principal phylum. These phyla were further classified in 41 classes and 599 genera. Out of this, 14 genera had a relative abundance higher than 0.5%, and accounted in average for 67.44 to 98.83% of the total ASV in each treatment combination. However, most pots were vastly dominated by the genus *Sphaerospora* (Class *Pezizomycetes*; Figure 4-3A). The contamination significantly decreased the relative abundances of *Alternaria*, *Cladosporium*, *Cystobasidium*, *Gibberella*, *Mortierella*, other *Ascomycota*, other *Fungi*, other *Ostropales*, *Rhodotorula* and *Zopfiella* and only increased the relative abundance of *Sphaerospora* (Figure 4-3A and Tableau Suppl. 8). The soil compartment affected the relative abundance of fewer genera, with the bulk soil harboring relatively more *Cystobasidium* and *Rhodotorula* whereas the relative abundance of *Mortierella*, other *Ascomycota* and other *Fungi* was higher in the rhizosphere (Figure 4-3A and Tableau Suppl. 8). Some genera were influence by the SFWC treatment. *Chaetomium*, *Sphaerospora* and *Zopfiella* were significantly affected by the SFWC treatment, whereas *Cystobasidium*, other

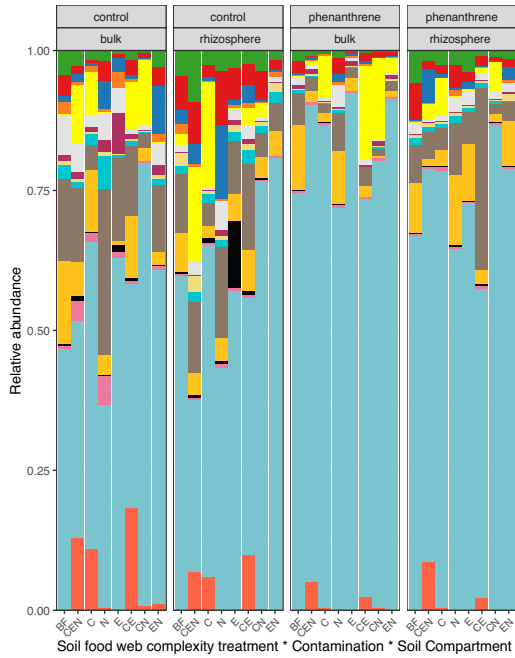
*Ascomycota* and other *Fungi* were marginally affected (Figure 4-3A and Tableau Suppl. 8). The relative abundance of *Chaetomium* was higher in treatments with collembolans, with mean relative abundances of 10.04%, 7.26%, 7.60% and 4.41% in C, CE, CEN and CN treatments, respectively, whereas its relative abundance in the rest of the treatments did not attain 1%. The relative abundance of *Zopfiella* increased in the presence of earthworms and collembolans, with mean relative abundances of 4.36%, 8.13%, 8.26% and 0.29% in C, CE, CEN and CN treatments, respectively. Again, in the E, EN, N and BF treatments *Zopfiella* did not present relative abundances higher than 1%. The changes in the relative abundance of *Sphaerosporella* could not be attributed to a single animal or a specific combination of animals, with the lowest mean relative abundances appearing in the CE (53.17%), N (54.08%) and CEN (56.38%) treatments and the highest in the CN (80.71%) and EN (77.57%) treatments.

A total of 15,154 ASVs were retained from the 16S rRNA gene sequences. Those ASVs were classified in 50 phyla, where 5 belonged to *Archaea*, clustering into a total of 86 ASVs (*Crenarchaeota*, *Euryarchaeota*, *Halobacterota*, *Nanoarchaeota* et *Thermoplasmatota*). The rest of the 45 phyla belonged to *Bacteria*, but the majority of the ASV belonged to *Acidobacteriota*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Bdellovibrionota*, *Chloroflexota*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadota*, *Mycococcota* (previously classified as an order of *Deltaproteobacteria*), *Planctomycetota*, *Proteobacteriota* and *Verrucomicrobiota*.

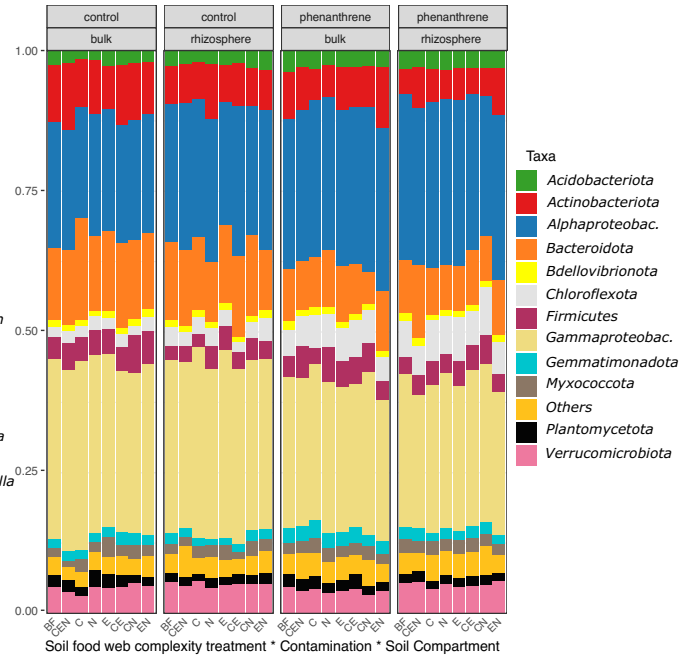
The main effects among *Bacteria* at phylum level relative abundances were caused by contamination and compartment (Tableau Suppl. 9 and Figure 4-3B). Specifically, the phyla *Actinobacteriota* (8.48% vs 6.63%), *Bacteroidota* (13.77% vs 9.18%), and *Gammaproteobacteriota* (30.94% vs. 26.47%) had significantly higher relative abundances in CTRL soils as compared to PHE soils. In contrast, *Acidobacteriota* (2.45% vs 3.15%), *Alphaproteobacteriota* (22.85% vs. 28.07%), *Chloroflexota* (2.54% vs 6.14%), *Gemmatimonadota* (1.76% vs. 2.37%) and *Mixococcota* (2.08% vs 2.25%) had higher relative abundances in PHE soils (Tableau Suppl. 9 and Figure 4-3B). There were significant changes in relative abundance of bacterial phyla due to soil compartment. For instance, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Firmicutes*, *Gammaproteobacteriota*, *Gemmatimonadota*, and *Planctomycetota* had slightly higher relative abundances in bulk soils compared to the rhizosphere. In contrast, *Chloroflexota* and *Verrucomicrobiota* had higher relative abundance in the rhizosphere. Even though the SFWC treatment did not significantly affect the composition of the general bacterial and archaeal community at the phylum level, it modulated the response of *Actinobacteriota* and *Bacteroidota* to the contamination level (Tableau Suppl. 9). For instance, the CEN and the EN treatments

increased the relative abundances of *Actinobacteriota* and *Bacteroidota* in the rhizosphere of PHE pots up to levels similar to CTRL, while in bulk soils, the C and the CN treatments reduced the relative abundance of *Bacteroidota* in PHE pots (Figure Suppl. 1).

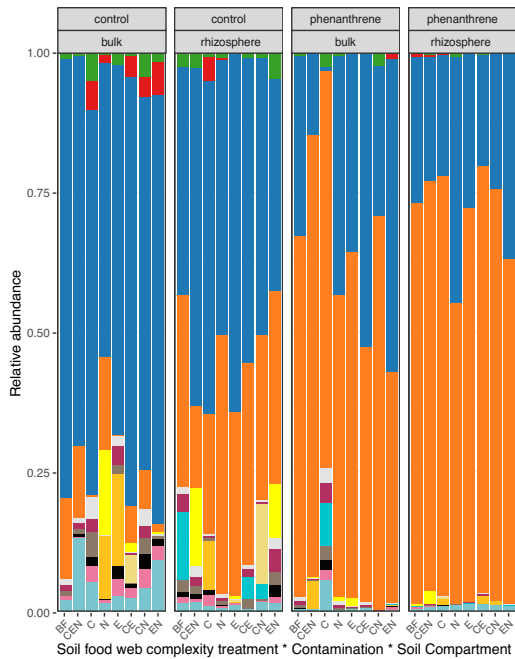
### A Fungi



### B Bacteria and Archaea



### C Gram Negative PAH degraders



### D Gram Positive PAH degraders

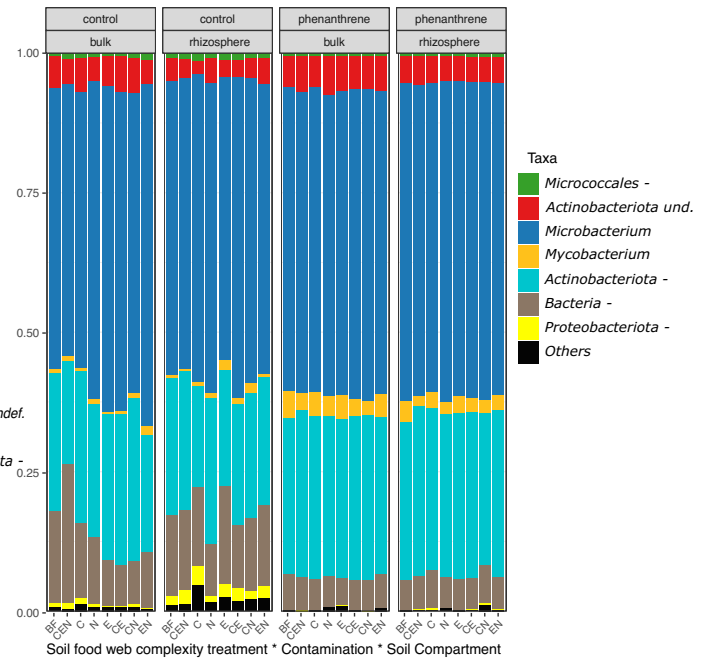


Figure 4-3 Microbial community composition based on the relative abundance of ASV.



Values are averaged across treatments. Only taxa with a relative abundance above 0.1% are shown. A) Fungal community composition at the genus level. B) Bacterial and archaeal community composition at the phylum level. C) Gram negative bacterial degraders community composition at the genus level. D) Gram positive bacterial degraders community composition at the genus level. Legend: SFWC levels: BF = only naturally present *Bacteria* and *Fungi*; CEN = BF plus added collembola, nematodes and earthworms; C = BF and added collembola; N = BF and added nematodes; E = BF and added earthworms; CE = BF and added collembola and earthworms; CN = BF and added collembola and nematodes; EN = BF and added nematodes and earthworms. The “-” symbol represents other members of the taxa they accompany (ej. “*Ostropales* -” means “other *Ostropales*”).

After quality filtering, 2,818 ASVs were retained for the PAH-RHD $\alpha$  GN genes, classified into 3 phyla (*Deinococcota*, *Firmicutes*, *Proteobacteriota*), 6 classes (*Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Bacilli* and *Deinococci* and other *Bacteria*) and 22 genera. From the later, 13 genera had a relative abundance higher than 0.5% (Tableau Suppl. 10): (*Aeromonas*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Gammaproteobacteria*-undef, *Marteella*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Ralstonia*, *Shewanella*, other *Bacteria* and other *Proteobacteria*). Contamination was the main factor determining the changes in the relative abundance of these genera, some were also affected by the soil compartment and none were affected by the SFWC treatment (Tableau Suppl. 10 and Figure 4-4C). The phenanthrene reduced the relative abundance of *Aeromonas* (1.19% vs. 0.30%), *Bacillus* (1.39% vs. 0.17%), *Comamonas* (59.68% vs. 30.60%), *Enterobacter* (1.40% vs. 0.31%), *Marteella* (1.79% vs. 0.47%), other *Bacteria* (0.98% vs. 0.19%), other *Proteobacteriota* (1.24% vs. 0.18%) and *Shewanella* (1.32% vs. 0.28%). Only the relative abundance of *Delftia* was increased in contaminated pots both in the bulk (7.67% vs. 60.87%) and the rhizosphere (31.46% vs. 69.68%) compartments. The compartment also affected the relative abundance of both *Comamonas* and *Delftia*. The former represented on average 49.77% of the relative abundance of all bulk compartments and 39.79% of the rhizosphere soils. *Delftia*, on the other hand, represented in average 50.77% of the relative abundance in the rhizosphere compartment compared to the 36.08% of the bulk compartment.

For PAH-RHD $\alpha$  GP genes, a total of 6,415 ASVs were retained after quality filtering, belonging to 9 phyla (*Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Chloroflexota*, *Firmicutes*, *Planctomycetota*, *Proteobacteriota*, *Spirochaetota*, *Verrucomicrobiota*), 18 classes and 67 genera. Only 7 genera had a mean relative abundance higher than 0.05% (Tableau Suppl. 11 and Figure 4-4D). *Microbacterium* was the only genus not affected by contamination, compartment or SFWC, representing approximately 53 to 56% of all PAH-RHD $\alpha$  GP ASV. The contamination was again

the main factor changing the mean relative abundance of the other genera. All *Actinobacteria* genera increased their mean relative abundance in contaminated soils compared to controls, including *Mycobacterium* (0.83% vs. 3.20%), undefined *Actinobacteria* (4.60% vs. 5.48%) and other *Actinobacteria* (23.76% vs. 29.05%). On the other hand, other *Bacteria*, (13.18% vs. 5.92%), other *Micrococcales* (0.85% vs. 0.50%) and other *Proteobacteriota* (1.30% vs. 0.10%) decreased their relative abundance in contaminated pots compared to controls. The mean relative abundance of other *Bacteria* was slightly affected by the SFWC treatment, with a higher relative abundance in the CEN (12.94%) compared to the BF (10.61%) and the other treatments (ranging from 7.36% to 9.73%).

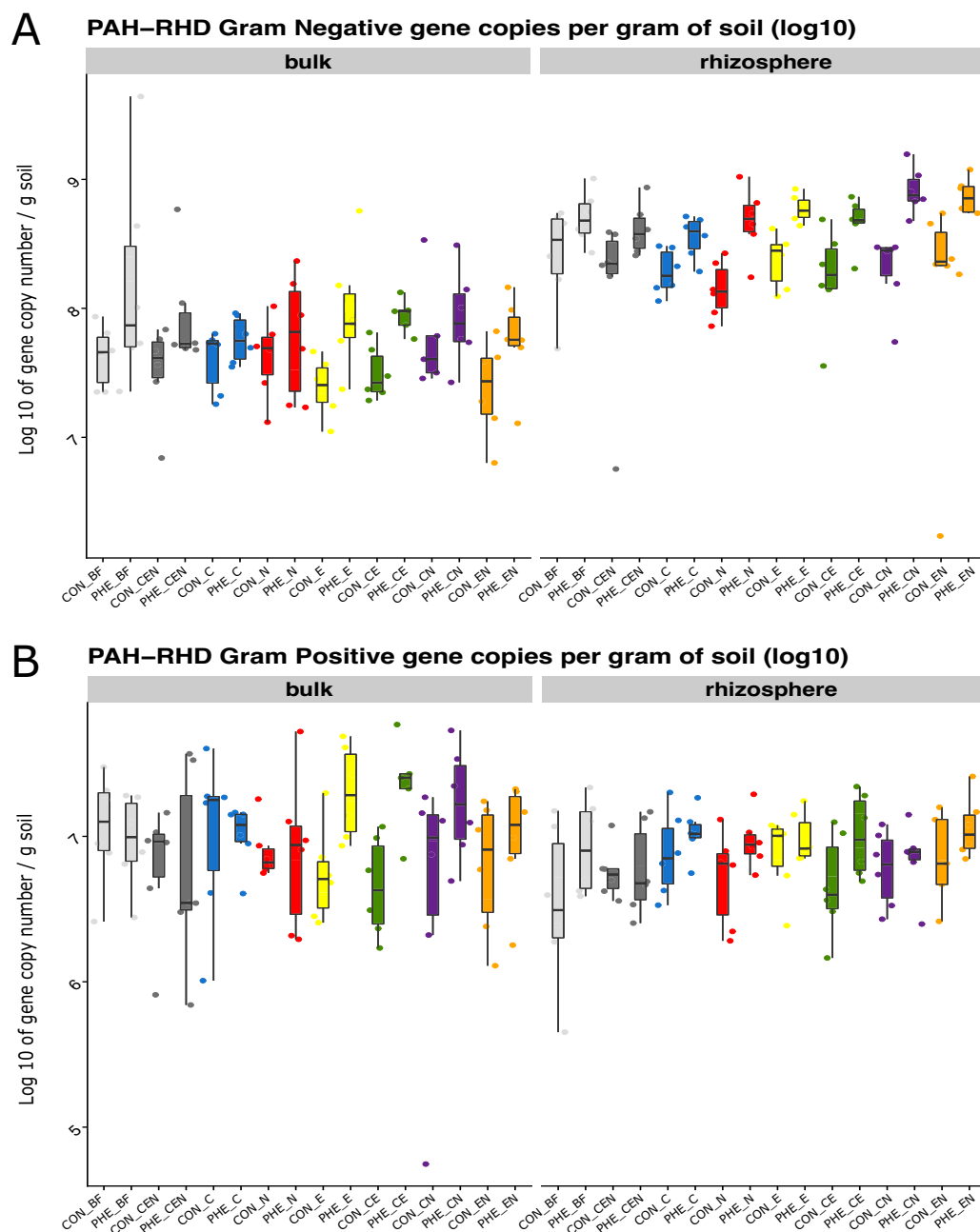
#### **4.4.5 PAH-RHD $\alpha$ GN and GP gene abundance**

The absolute abundance of GP and GN genes differed by soil compartment and contamination level (Figure 4-4 and Tableau 4-4). The contamination with phenanthrene increased the absolute abundance of PAH-RHD $\alpha$  genes for both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Tableau 4-4). However, the compartment effect was stronger in PAH-RHD $\alpha$  Gram-Negative genes, with the rhizosphere presenting a higher relative abundance compared to bulk soil. For PAH-RHD $\alpha$  Gram-Positive genes, the compartment effect was weaker, with a slightly higher relative abundance in the bulk soil compared to the rhizosphere (Figure 4-4 and Tableau 4-4). There was no significant effect of the SFWC treatment (Tableau 4-4).

**Tableau 4-4 Absolute abundance of PAH - RHD degradation genes**  
**Summary of the three-way analysis of the variance (ANOVA) on the absolute abundance of PAH-RHD genes (on copy numbers per gram of soil)<sup>a</sup>.**

<b>Absolute abundance of PAH - RHD degradation genes</b>					
<b><i>Gram negative genes</i></b>	<b><i>Df</i></b>	<b><i>Sum Sq</i></b>	<b><i>Mean Sq</i></b>	<b><i>F value</i></b>	<b><i>Pr(&gt;F)</i></b>
SFWC	7	1.29E+18	1.84E+17	1.486	0.1757
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>2.86E+18</b>	<b>2.86E+18</b>	<b>23.124</b>	<b>&lt;0.001</b> ***
<b>compartment</b>	<b>2</b>	<b>3.88E+18</b>	<b>1.94E+18</b>	<b>15.702</b>	<b>&lt;0.001</b> ***
SFWC:contamination	7	6.73E+17	9.61E+16	0.778	0.6064
SFWC:compartment	7	8.83E+17	1.26E+17	1.022	0.4181
<b>contamination:compartment</b>	<b>1</b>	<b>3.91E+17</b>	<b>3.91E+17</b>	<b>3.166</b>	<b>0.0771</b> .
SFWC:contamination:compartment	7	1.28E+18	1.82E+17	1.475	0.1799
Residuals	157	1.94E+19	1.24E+17		
<b><i>Gram positive genes</i></b>	<b><i>Df</i></b>	<b><i>Sum Sq</i></b>	<b><i>Mean Sq</i></b>	<b><i>F value</i></b>	<b><i>Pr(&gt;F)</i></b>
SFWC	7	2.43E+14	3.47E+13	0.423	0.887
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>1.30E+15</b>	<b>1.30E+15</b>	<b>15.758</b>	<b>&lt;0.001</b> ***
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>1.14E+15</b>	<b>5.70E+14</b>	<b>6.937</b>	<b>0.001</b> **
SFWC:contamination	7	9.81E+14	1.40E+14	1.705	0.111
SFWC:compartment	7	2.96E+14	4.23E+13	0.514	0.823
<b>contamination:compartment</b>	<b>1</b>	<b>2.47E+14</b>	<b>2.47E+14</b>	<b>3.000</b>	<b>0.085</b> .
SFWC:contamination:compartment	7	9.88E+14	1.41E+14	1.718	0.108
Residuals	159	1.29E+16	8.22E+13		

<sup>a</sup> Values in bold indicate significant or marginally significant effects. Df, degrees of freedom; F, variance ratio; Pr(>F), P value.



**Figure 4-4 PAH-RHD $\alpha$  gene quantification for GN and GP degraders.**

PAH-RHD $\alpha$  gene copy numbers determined by real-time PCR quantification on DNA for A) Gram negative bacterial degraders and B) Gram positive bacterial degraders. Values are log transformed. Legend: CON\_\* : control pots; PHE\_\* : phenanthrene contaminated pots; SFWC levels: BF = only naturally present *Bacteria* and *Fungi*; CEN = BF plus added collembola, nematodes and earthworms; C = BF and added collembola; N = BF and added nematodes; E = BF and added earthworms; CE = BF and added collembola and earthworms; CN = BF and added collembola and nematodes; EN = BF and added nematodes and earthworms.

## 4.5 Discussion

Although there is the ample evidence that the soil fauna strongly affects the soil microbial communities (Yeates 2007; Cheng et al. 2011; Jing et al. 2017; Bonkowski et al. 2009) and that these latter are the central actors during contaminant degradation (Correa-García et al. 2018), little evidence is available linking soil fauna to phytoremediation efficiency and the underlying microbial communities. In this study, we aimed to study the effects of adding collembolans, nematodes and earthworms to soils on the phytoremediation of phenanthrene by willows.

Our first hypothesis was that the willows subjected to the highest level of soil food web complexity (SFWC) treatment would be more productive than the willows exposed to lower levels of SFWC. Our results related to this hypothesis are not conclusive. Indeed, all faunal treatments resulted in taller trees that produced more biomass as compared to the microbes-only contaminated pots, but because of the high variability between replicates, this was mostly not statistically significant. Significant differences in biomass and length were observed between the willows growing in contaminated soils in the presence of microbes only and the willows growing in the non-contaminated soils and inoculated with either collembolans, nematodes and earthworms or earthworms and nematodes. This is probably the result of a combination of a decreased growth due to phenanthrene contamination and an increased growth due to the inoculation of soil fauna. Also, gamma radiation may have significantly reduced the initial microbial community hence contributing to a decrease in willow growth. But since no microbial analyses were performed before or after irradiation, this explanation remains hypothetical. Košnář, Mercl and Tlustoš (2020) found significantly lower biomass production for willows (*Salix smithiana*) growing in PAHs contaminated pots compared to controls. A field study looking at higher concentrations of mixed contaminants also showed significant decreases of the willow biomass in contaminated plots compared to controls (Brereton et al. 2016). Our results are also in line with the reported positive effects of earthworms on plant productivity (Van Groenigen et al. 2014; Blume-Werry et al. 2020), including during phytoremediation of lead (Jusselme et al. 2015). This effect has been previously attributed to the bioturbation (burrowing) activity of earthworms, that results in many beneficial effects on plants, such as improved soil porosity (Shipitalo et Le Bayon 2004) leading to increased soil water infiltration (Bouché et Al-Addan 1997), aeration (Bartlett et al. 2010), and organic matter degradation and increased nutrient cycling (Edwards 1997). Bacterivorous nematodes, such as the one used in this study, also have the potential to stimulate plant growth through an increased mineralization of soil nutrient (Alpei et al. 1996).

Our second hypothesis was that the microbial communities would be affected by the SFWC treatments. We confirmed this hypothesis as the SFWC had a relatively small but significant effect on the community structure and composition of *Bacteria* and *Archaea*, but not on its diversity. Previous studies have shown that remediation rates and plant growth can be linked to the initial soil microbial community composition and structure (Bell et al. 2016; Yergeau et al. 2015a; Correa-García et al. 2021; Bell et al. 2015). The shifts in the bacterial and archaeal communities caused by the SFWC treatments could therefore indirectly explain part of the trends observed for plant growth. However, this shift in microbial communities caused by the SFWC treatments did not seem to translate into different degradation rates, most probably because the PAH-degraders subset of the community was, in general, not affected by the SFWC treatments. Indeed, for PAH degraders, the only significant effect of SFWC was on the diversity of Gram-negative degraders, and on the relative abundance of a few phyla for Gram-positive degraders. Their general community composition and structure were unaffected by SFWC, in contrast to the trends observed for *Bacteria* and *Archaea*. The abundance of both Gram-negative and Gram-positive was mostly determined by the contamination levels, in agreement with previous work (Cébron et al. 2008; Sawulski et al. 2014).

We also observed that SFWC appeared to modulate the effect of the contamination on *Bacteria* and *Archaea* (marginally significant SFWC x Contamination effects on relative abundance of some phyla). For instance, for the pots treated with earthworms and nematodes or collembolans, earthworms and nematodes the relative abundances of the phyla *Actinobacteriota* and *Bacteroidota* were higher in the contaminated rhizosphere as compared to the control rhizosphere, effectively reversing the trend observed for all other treatments. These results are in agreement with the increased relative abundance reported for *Bacteroidota* in the presence of the earthworms *Pontoscolex corethrurus* (Bernard et al. 2012), *Eisenia fetida* (Cai et al. 2018), *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa* (Nechitaylo et al. 2010). An increased relative abundance of *Actinobacteriota* in soils after their passage through the earthworm gut has also been reported (Aira et al. 2016; Medina-Sauza et al. 2019; Sun et al. 2020; Cai et al. 2018). The trends observed for *Actinobacteriota* were also visible in the significant effect of SFWC (in interaction with other factors) on Gram-positive PAH degraders related to this phylum. This specific effect of SFWC on *Actinobacteriota* could partly explain why earthworms have proven to be especially useful in PAH remediation (Contreras-Ramos et al. 2006; Hernández-Castellanos et al. 2013; Coutiño-González et al. 2010).

As for fungi, we found a significant effect of the SFWC treatments on the community structure, composition, and diversity. Similarly, the presence of earthworms have been previously related to higher fungal diversity during lead phytoremediation (Jusselme et al. 2015). In our study, the shifts caused by the SFWC treatments seemed to be mainly driven by *Chaetomium*, *Zopfiella* and *Sphaerosporella*. For instance, *Chaetomium* was found here to be significantly more abundant in the presence of collembolans. Accordingly, several springtail species (*Ceratophysella denticulata*, *Folsomia candida*, *Protaphorura fimata*, *Sinella curviseta*) have been found to graze on *Chaetomium globosum* hyphae and to participate to the dispersion of their spores (Haque 2018; Haubert et al. 2008; Erktan et al. 2019). *Chaetomium* had also been reported as predominant in greenhouse mesocosms aiming to degrade oxytetracycline with earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi (Cao et al. 2015). Also, in our experiment, the genus *Zopfiella* was relatively more present in treatments containing a combination of collembolans and earthworms. This is in line with previous reports that found that *Zopfiella* was particularly present during vermicomposting (Neher et al. 2013). In contrast, *Zopfiella* was found to account for up to 5% of the relative abundance of fungi in control farmland soils, which was significantly higher than in the same soils treated with earthworms (Song et al. 2020). Some *Zopfiella* species produce zopfiellin, a secondary metabolite with antifungal properties (Futagawa et al. 2002), that could be involved in soil pathogen suppression (Liu et al. 2019) in some soils, and might have indirectly affected the fungal community in our experiment, explaining indirectly some of the SFWC effect on fungal communities. Furthermore, collembolans have been found to feed preferably on pathogen fungi rather than on mycorrhizal hyphae (Innocenti et al. 2018). In our study, a similar behavior could explain the higher relative abundance of *Sphaerosporella* in more complex SFWC treatments.

Finally, we hypothesized that willows growing in soils with a higher SFWC would rhizodegrade more phenanthrene than willows growing in soils with a lower SFWC. Although we did find some effect of SFWC on microbial communities and willow growth, which are the two most important factors for rhizoremediation efficiency, our results disproved this hypothesis as there were no significant differences due to the SFWC treatments in the amount of phenanthrene found in soils after 8 weeks of willow growth. As mentioned above, this could be due to the general lack of effect of the SFWC treatments on the PAH-degraders. These results are in sharp contradiction with previous studies that reported a positive direct effect of soil fauna, especially earthworms, on the degradation of different types of pollutants (Contreras-Ramos et al. 2006; Coutiño-González et al. 2010; Hernández-Castellanos et al. 2013). A recent study from our group showed that initial soil physicochemical and microbiological characteristics were critical for effective

phytoremediation, with poplar trees only significantly affecting phenanthrene degradation in one of the two soils tested (Correa-García et al. 2021). Similarly, it could be well possible that because of the characteristics of the soil used here, the effect of SFWC on degradation rates has gone unnoticed. In fact, in most pots, both for rhizosphere and bulk soil, over 95% of the applied phenanthrene was degraded, suggesting that plant presence was not effective in enhancing degradation under our conditions. Alternatively, the unique sampling point after eight weeks of growth might have precluded the observation of any differences in degradation that might have occurred before that. Indeed, the addition of root exudates to phenanthrene contaminated sand resulted in significant reductions of the phenanthrene contamination compared to the unamended controls after only 10 days (Louvel et al. 2011). Other studies have shown a complete degradation of phenanthrene by willows within 3 months (Hultgren et al. 2010), 2 months (Correa-García et al. 2021) or as little as 21 days (Tiralerdpanich et al. 2018). Additional studies using different SFWC levels where the contaminant is evaluated at several time points throughout the experiment and in soils with different biological and physico-chemical characteristics will be needed to rule out if soil fauna influences the degradation rates during phytoremediation.

Even though most of the contaminant had disappeared, large differences in microbial communities, including PAH degraders abundance, diversity and community composition, were still visible between contaminated and control pots, suggesting some level of legacy effect of contamination. The phenanthrene contamination triggered a general reduction of the fungal diversity, which was driven by large increases in the relative abundance of *Sphaerospora*. The predominance of this fungus has already been reported in other pot and field phytoremediation experiments carried out with trees (Danielson 2007; Dagher et al. 2020; Correa-García et al. 2021; Yergeau et al. 2015a; Bell et al. 2014a). Furthermore, its presence in the rhizosphere or in the bulk soil of pots with tree cuttings has been related to an enhancement of plant biomass (Yergeau et al. 2015a) and to resistance to contamination stress (Bell et al. 2014a), probably through its role as an ectomycorrhiza (Danielson 2007). In our study, *Sphaerospora* relative abundance was significantly higher in contaminated pots, supporting the premise that this fungus may be helping *Salicaceae* trees survive in stressful environments. Quite interestingly, *Sphaerospora* relative abundance was also significantly affected by the SFWC treatments, being generally higher in more complex treatments, which could contribute to explain the effects of SFWC on plant growth parameters.



## 4.6 Conclusion

In this study we investigated the effects of increasing experimentally soil food web complexity on microbial communities, willows and phenanthrene during phytoremediation. Our results showed that, while general microbial communities were significantly affected by SFWC treatments, this translated only in minor shifts in the PAH degraders. Consequently, although some treatments did affect willow growth, phenanthrene degradation was unaffected by either SFWC treatments or plant presence, being almost complete in all pots after 8 weeks of willow growth. The lability of the contaminant used, the soil initial physico-chemical and microbiological characteristics and the physical limits imposed on willows growing in pots could explain this lack of effect of SFWC on the outcome of phytoremediation. Nevertheless, effects of the SFWC on the ectomycorrhizal fungi *Sphaerospora* and on the actinobacterial PAH degraders suggest potential ways by which SFWC could affect phytoremediation outcomes. Future studies should look at the effect of SFWC on phytoremediation outcomes in different soils, at different time scales, and directly in the field to rule out the potential of soil food web complexity more conclusively in enhancing phytoremediation.

## 4.7 Funding

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery grant RGPIN-2014-05274 and strategic grant for projects STPGP 494702) to E.Y

S.C.G. was supported by the Research Affiliate Program from the Government of Canada. V.C. and J.A.D. were both supported by the Undergraduate Student Research Awards from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. E.M.K. was supported by a scholarship from the Armand-Frappier Foundation. This research was enabled in part by support provided by Calcul Québec ([www.calculquebec.ca](http://www.calculquebec.ca)) and Compute Canada.

## 4.8 Acknowledgments

We thank the precious help provided by Denis Lachance during the setup of the experiment, as well as all the members of the Laurentian Forestry Centre and the Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie who contributed with ideas and discussions to improve the outcome of this study.

#### **4.9 Authors contributions**

S.C.G., Conceptualization, Methodology, Experimental Setup, Field Work, Data collection, Data curation, Data Analysis, Writing–Original draft preparation. V.C., in-house PHE extraction methodology, Field Work, Data Collection, Original draft edition. J.A.D and E.M.K, Experimental Setup, Field Work, Data Collection, Original draft edition. J.T., Bioinformatic Analysis and Bioinformatic methods writing, Original draft edition. A.S., Conceptualization, Methodology, Supervision, Reviewing, and Editing. E.Y., Funding, Conceptualization, Methodology, Supervision, Writing, Reviewing, and Editing.

#### **4.10 Conflicts of interests**

We declare no competing interests.

#### **4.11 References**

All references for the present chapter are located at the end of the thesis.



## 5 DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

---

### 5.1 Discussion

Bien que la phytoremédiation se soit avérée à plusieurs reprises comme une procédure efficace pour la remédiation des sols contaminés aux hydrocarbures, elle continue d'être une biotechnologie sous-utilisée en raison, entre autres facteurs, de la faible prévisibilité de ses résultats. Ainsi, cette thèse a été menée dans le but de mieux comprendre les effets de différents aspects de la diversité des sols sur le succès de la phytoremédiation des HAP utilisant le phénanthrène comme polluant modèle et deux espèces d'arbres de *Salicaceae* comme plantes phytoremédiatrices. L'objectif général de cette thèse était de déterminer comment deux facteurs de la diversité du sol façonnent les communautés microbiennes de dégradeurs, influençant ainsi la performance des arbres pour la phytoremédiation du phénanthrène. Ainsi, dans cette thèse j'ai exploré le rôle de la diversité microbienne initiale du sol, et le rôle de la faune du sol (nettement moins étudié dans la littérature) dans les processus de dégradation du phénanthrène.

Premièrement, au chapitre 2, j'ai fait le point sur l'état des connaissances par rapport à la phytoremédiation des hydrocarbures, plus spécifiquement sur la rhizoremédiation (ou rhizodégradation). Grâce à cette revue de littérature, j'ai identifié plusieurs lacunes dans les connaissances. D'une part, comme les résultats de la phytoremédiation sont très variables, j'ai allégué que cela pourrait être dû, entre autres causes, à des disparités dans la diversité microbienne retrouvée dans les sols contaminés. D'autre part, malgré leur influence importante sur les communautés microbiennes du sol, j'ai mis en évidence un manque flagrant de connaissances sur les effets de la faune du sol sur la phytoremédiation. Ces deux points ont formé la base de deux hypothèses spécifiques pour lesquelles j'ai conçu, mis en place et analysé deux expériences présentées aux chapitres 3 et 4. J'ai utilisé une approche génomique et des expériences en pots pour décrire trois paramètres centraux à la phytoremédiation : 1) les caractéristiques des communautés microbiennes, avec une attention spéciale aux dégradeurs, 2) la productivité de l'arbre choisi et 3) la dégradation totale de phénanthrène. Ce dernier chapitre met en contexte les résultats présentés dans cette thèse et les intègre pour répondre à l'objectif général.

Sachant que seulement une partie non significative de la diversité totale des communautés microbiennes peut être caractérisée par les techniques microbiologiques classiques impliquant la

culture, l'approche génomique choisie pour ma thèse m'a permis de dessiner un aperçu global de la grande majorité de la diversité microbienne associée tant au sol distant qu'à la rhizosphère de plantes impliquées dans le processus de phytoremédiation.

Dans le chapitre 3, des peupliers baumiers ont été utilisés pour stimuler la dégradation du phénanthrène dans deux types de sols différents. J'y ai décrit et comparé les communautés microbiennes de la rhizosphère des peupliers croissants dans deux sols différents, un sol d'origine agricole et un sol d'origine forestier, contaminés avec du phénanthrène. Les indices de diversité de Shannon et la richesse spécifique (entendu comme le nombre d'OTU) des bactéries et les archées étaient similaires et très élevés dans les deux sols. Puisque des études antérieures avaient montré que des communautés plus diverses sont capables de dégrader plus de contaminants que des communautés spécifiques présélectionnées (Bell et al. 2016), je m'attendais donc à des taux de dégradations similaires entre les deux types de sols compte tenu de leurs diversités comparables. Néanmoins, la dégradation dans les sols non plantés était différente entre les deux types de sols. Curieusement, dans le sol agricole, où la dégradation a progressé plus rapidement que dans le sol forestier, la présence du peuplier n'a pas considérablement aidé à la remédiation du phénanthrène. Par contre, la dégradation dans le sol forestier a bénéficié de la présence du peuplier baumier, et les concentrations de phénanthrène dans la rhizosphère des peupliers croissant dans le sol forestier étaient à des niveaux similaires aux sols agricoles. J'ai attribué cette différence dans le taux de dégradation aux différences entre les propriétés physicochimiques et microbiologiques initiales des deux sols. Les différences dans la composition microbienne se reflétaient au niveau du phylum avec des profils d'abondance relative distincts entre les deux types de sols. Ces résultats sont en ligne avec les travaux de Bell et collaborateurs (2016) qui avaient montré que les conditions abiotiques du sol ont une influence significative sur la taxonomie bactérienne au niveau de phylum. Dans l'expérience du chapitre 3, le sol forestier, moins performant pour la bioremédiation, recelait relativement plus de protéobactéries, reconnues pour abriter des plusieurs genres de dégradeurs d'hydrocarbures (Parales 2010; Martin et al. 2012), que le sol agricole plus performant. Ceci indique potentiellement que les changements observés à des niveaux taxonomiques plus fins sont plus importants que ceux au niveau du phylum dans le contexte de la phyto- et bioremédiation. Dans ce cas, les différences observées dans la dégradation du phénanthrène seront principalement attribuables à une composition différente au niveau du genre, de l'espèce ou de la souche. Un point faible dans mon dispositif expérimental est caractérisé par la nature contrastante de deux sols. Bien que la diversité fût similaire en termes de nombre de genres et leur uniformité (entendu selon d'indice de diversité de Shannon) parmi les deux sols, les caractéristiques

physicochimiques associés à chaque sol n'étaient pas tout à fait similaires. Le sol agricole était un loam argileux, tandis que le sol forestier était un loam sableux, Ces différences ont une incidence sur les analyses qui n'a pas pu être mise en compte. Comme résultat, je n'ai pas pu distinguer entre les effets dans la dégradation du phénanthrène attribuables à la composition de la communauté microbienne par rapport à ceux attribuables à la composition physicochimique du sol. Lors de futures expériences, un analyse physicochimique individuel de chaque échantillon devrait être effectué pour mesurer les effets des variables physicochimiques du sol qui expliquent la dégradation, la composition microbienne ou les deux. Alternativement, une autre approche consisterait à sélectionner des sols contenant des propriétés physicochimiques similaires (testées préalablement) pour bien modeler l'effet de la composition et la structure des communautés microbiennes sur la dégradation.

D'autres chercheurs ont expérimentalement séparé les effets de la diversité microbienne et des propriétés physicochimiques pour une fonction générale (respiration du sol) et une fonction spécialisée (taux de dénitrification) (Delgado-Baquerizo et al. 2016). Lors de leurs expériences, ces chercheurs ont trouvé que la fonction spécialisée est plus sensible à des changements dans la communauté microbienne, contrairement à la fonction générale, plus sensible aux changements dans la structure du sol. La dégradation du phénanthrène pouvant être considérée comme une fonction spécialisée, il est plausible que les différents microbiotes présents dans les sols agricole et forestier expliquent les différents taux de dégradation de phénanthrène observés au chapitre 3. En effet, dans l'expérience du chapitre 3, la communauté microbienne de dégradeurs du phénanthrène était représentée par deux genres différents, avec le genre *Ralstonia* fortement représenté dans le sol contaminé agricole, tandis que *Delftia* prédominait dans le sol contaminé forestier. Ici, j'ai aussi pu constater que le genre *Comamonas* était en commun parmi les dégradeurs Gram-négatifs contenant le gène PAH-RHD $\alpha$ , et que son abondance relative était similaire dans les deux sols contaminés. Également, j'ai pu constater dans le chapitre 4 que *Comamonas* et *Delftia* étaient présents dans les sols pour tous les traitements animaux. Considérant que dans cette deuxième expérience le phénanthrène était fortement réduit, mais pas complètement dégradé (comme dans le sol forestier du chapitre 3), et que l'abondance relative de *Delftia* avait connu une forte augmentation dans les sols contaminés, on peut supposer que ce genre est un dégradeur actif du phénanthrène dans les sols du Québec et dans les rhizosphères des salicacées. Fait intéressant, dans les communautés de dégradeurs Gram-positifs contenant le gène PAH-RHD $\alpha$ , le genre *Microbacterium* et les autres *Actinobacteria* dominaient dans les expériences des chapitres 3 et 4, confirmant que les différents sols du Québec et que la rhizosphère de différents salicacées contiennent des dégradeurs similaires.

Les résultats du chapitre 3 mènent à deux conclusions intéressantes : 1) la phytoremédiation n'est toujours pas la meilleure approche pour dégrader un contaminant à court et moyen terme (de quelques semaines à quelques mois) et 2) la diversité microbienne initiale du sol, ainsi que les caractéristiques physicochimiques sont donc des éléments clés à analyser préalablement pour trouver la meilleure approche de remédiation.

Dans le quatrième chapitre, des saules pourpres ont été plantés dans le but de dégrader le phénanthrène lorsqu'en contact avec différents niveaux de complexité trophiques, caractérisés par la combinaison factorielle de collemboles, nématodes et vers de terre. Suite à cette expérience, j'ai trouvé qu'un réseau plus complexe contribue à une meilleure productivité végétale. Plus précisément, les saules croissant dans du sol contaminé et exposé à une communauté faunique plus complexe ont produit la même biomasse que les saules témoins, dans du sol non-contaminé. Au contraire, les saules croissant dans un sol contaminé sans l'ajout d'animaux ont produit significativement moins de biomasse que les saules témoins croissant dans le sol non-contaminé exposés au réseau trophique animal plus complexe.

Par contre dans le chapitre 4, aucune différence significative quant au taux de dégradation n'a été observée ni entre les niveaux de complexité trophique ni entre les sols distants et la rhizosphère. Le sol utilisé dans le chapitre 4 était différent des sols utilisés dans le chapitre 3. Dans ce sens, et compte tenu des conclusions tirées dans ce chapitre, ce n'est pas surprenant l'absence de différence significative dans le taux de dégradation du phénanthrène au bout de huit semaines avec différents niveaux de complexité ou parmi les deux compartiments du sol. Ayant observé une dégradation quasi complète du phénanthrène dans le sol agricole du chapitre 3, avec ou sans peuplier, il semble raisonnable d'estimer que la diversité initiale du sol utilisé au chapitre 4 était suffisante pour promouvoir une dégradation rapide du contaminant, sans l'apport du saule ou de la faune du sol. Mes résultats sont en ligne avec les observations d'autres études qui ont rapporté la dégradation totale de quantités similaires de phénanthrène en des temps variant entre 21 jours (Tiralerdpanich et al. 2018) et 3 mois (Hultgren et al. 2010).

Bien que la complexité trophique n'ait pas été liée à l'efficacité de la phytoremédiation, la présence des animaux a été liée à des changements dans la communauté fongique, et dans un moindre degré, à des changements dans la structure des communautés des bactéries et des archées. Contrairement au chapitre 3, j'ai utilisé un seul type de sol pour les expériences du chapitre 4. Ainsi, les changements observés dans les profils d'abondance relative au niveau du phylum ont été principalement attribués à la contamination, le compartiment du sol (rhizosphère

vs. sol distant), mais aussi, dans une moindre mesure, aux réseaux trophiques. La présence de vers de terre a augmenté l'abondance relative des *Actinobacteria* dans la rhizosphère des sols contaminés. Les *Actinobacteria* comptent beaucoup de dégradeurs parmi ses rangs, notamment les genres *Microbacterium* et *Mycobacterium*, qui étaient présents dans le sol utilisé. Les vers de terre sont reconnus pour leur capacité à survivre dans des conditions de contamination assez sévères, et pour stimuler la dégradation de différents hydrocarbures (Delgado-Balbuena et al. 2016; Hickman et Reid 2008; Rodriguez-Campos et al. 2019). Également, plusieurs études montrent une productivité végétale plus élevée quand les vers de terre sont présents (Van Groenigen et al. 2014). Les résultats du chapitre 4 sont cohérents avec ces observations.

Au-delà des changements mineurs dans les communautés bactériennes, la complexité du réseau trophique a résulté en des changements significatifs dans les abondances relatives des différents taxons de champignons. Notamment, les abondances relatives de *Sphaerospora*, *Zopfiella* et *Chaetomium* ont été significativement affectées par la combinaison des collemboles et vers de terre. Fait intéressant, les champignons ne sont pas toujours directement impliqués dans la dégradation d'hydrocarbures, mais ils jouent un rôle fondamental dans la croissance de la plante, notamment par la formation des mycorhizes. Le fait que les animaux ont significativement changé la diversité, la structure et la composition des communautés de champignons, combiné au fait que les saules étaient généralement plus grands en présence d'animaux, pourrait indiquer un effet indirect des animaux sur la phytoremédiation. Cet effet indirect sur la croissance des saules serait lié à deux causes différentes : 1) des changements dans les conditions physicochimiques du sol (vers de terre) ou 2) par la stimulation de champignons bénéfiques mycorrhiziens capables d'alléger le stress causé à la plante lors de son exposition aux contaminants.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats m'a permis de dessiner un portrait général de l'importance relative de chacun des éléments impliqués dans la phytoremédiation du phénanthrène, à savoir, la présence de la plante, les caractéristiques de la communauté microbienne du sol et la présence de la faune.

## 5.2 Conclusion

Le but ultime de cette thèse était de contribuer à une meilleure connaissance de l'écologie microbienne lors de la phytoremédiation afin d'améliorer la gestion et de favoriser l'applicabilité



de cette technique en cas de contamination aux hydrocarbures. Ainsi, j'ai proposé une hypothèse générale qui énonçait que la diversité et la complexité trophique du sol sont les facteurs les plus importants pour permettre la survie de la plante face aux stress parce qu'elles assurent respectivement, la redondance fonctionnelle et la résilience du système. Ainsi, j'ai exploré les rôles de la diversité microbienne initiale et du réseau trophique du sol dans la dégradation du phénanthrène au cours de deux expériences. À la fin, j'ai démontré que 1) l'efficacité de la phytoremédiation du phénanthrène par le peuplier est directement tributaire de la communauté microbienne initiale du sol et de ses caractéristiques physicochimiques, et 2) la présence d'une plus grande complexité trophique rend le saule plus résilient à la contamination par le phénanthrène, lui permettant de croître normalement même en présence de contaminants. Ainsi, mon hypothèse générale a été partiellement confirmée : ce n'est pas la diversité en soit le facteur qui majoritairement promeut une phytoremédiation plus efficace, sinon la composition de la communauté microbienne présente. Ensuite, la complexité du réseau trophique a été confirmée comme un facteur important pour la productivité et la survie de la plante face au stress de la contamination, par le biais de la stimulation de la communauté fongique (résilience du système).

Au chapitre 3 j'ai découvert que la diversité initiale du sol est primordiale pour déterminer le succès de la phytoremédiation. En effet, le taux de dégradation du phénanthrène dans le sol forestier était supérieur lorsque la plante était présente. Cependant, la même quantité de phénanthrène a été dégradée dans le sol agricole avec ou sans plante. Ainsi, ce chapitre a démontré l'importance d'effectuer une évaluation préliminaire des caractéristiques physicochimiques et microbiologiques du sol avant de procéder à appliquer la phytoremédiation comme approche pour la décontamination d'un sol donné. Certains sols contenant une communauté microbienne riche et des caractéristiques physicochimiques appropriées rendent la décontamination du phénanthrène faisable dans un délai raisonnable sans que l'ajout de la plante accélère significativement le processus. Comparativement, d'autres sols avec des caractéristiques physicochimiques semblables, mais avec une diversité différente pourraient bénéficier de l'utilisation des arbres pour accélérer la décontamination du phénanthrène. Cependant, avec le plan expérimental, ce n'était pas possible de discerner entre les effets dus à la diversité microbienne de ceux dus aux propriétés physicochimiques des sols.

Le chapitre 4 de cette thèse suggère que le succès de la phytoremédiation sur le terrain n'est pas uniquement dû à la plante et aux microorganismes de la rhizosphère. En effet, les invertébrés semblent être des acteurs importants, quoique indirects, dans le succès de la phytoremédiation. La clé pour amplifier l'impact de la rhizoremédiation et l'étendre à d'autres zones de sol reposerait

potentiellement sur la complexité des interactions entre la macro-, la méso- et la microfaune du réseau trophique du sol. Un sol contenant un réseau trophique plus complexe faciliterait le développement de la plante, à travers les changements causés au niveau de la communauté fongique, qui pourrait aider la plante à surmonter les effets stressants de la contamination et à ses racines de pénétrer plus profondément le sol.

Grâce aux connaissances produites lors de cette thèse, nous pourrions être en mesure de surmonter, au moins partiellement, les limites qui entravent actuellement l'adoption de la phytoremédiation en 1) prédisant l'utilité de l'approche par des analyses de la diversité microbienne initiale du sol, et 2) s'assurant de la présence d'un réseau trophique complet et robuste dans le sol à remédier. De cette façon, la plante croissant dans un sol contaminé aura accès à des partenaires microbiens préférés et à un réseau trophique robuste, lui permettant de stimuler la dégradation microbienne et de croître de façon optimale. Les résultats de ma thèse me permettent de conclure que l'adoption d'une approche holistique considérant l'ensemble de l'écosystème édaphique est désirable pour améliorer l'efficacité de la phytoremédiation, et la positionner ainsi comme technologie préférée pour résoudre les problématiques de contamination de demain.

## 6 BIBLIOGRAPHIE

---

- Acevedo, F, L Pizzul, M Castillo, ME González, M Cea, L Gianfreda et MC Diez. 2010. « Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by free and nanoclay-immobilized manganese peroxidase from *Anthracophyllum discolor*. » *Chemosphere* 80 (3). Elsevier Ltd: 271-278. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.04.022.
- Adam, G et H Duncan. 2002. « Influence of diesel fuel on seed germination. » *Environmental Pollution* 120 (2). Elsevier: 363-370. doi:10.1016/S0269-7491(02)00119-7. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749102001197?via%3Dihub#BIB1>.
- Adhikari, K et AE Hartemink. 2016. *Linking soils to ecosystem services - A global review. Geoderma*. Vol. 262. s.l.: Elsevier. doi:10.1016/j.geoderma.2015.08.009. [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706115300380?casa\\_token=hu2W6Tx10Z4AAAAA:vqQANMb8BKyLKe9qMg49VytX95oEPUnTsVaMMtLWaz2q5rLIGuXo7sqDw3liUGQfeiocbviQdro](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016706115300380?casa_token=hu2W6Tx10Z4AAAAA:vqQANMb8BKyLKe9qMg49VytX95oEPUnTsVaMMtLWaz2q5rLIGuXo7sqDw3liUGQfeiocbviQdro).
- Agrawal, N, P Verma et SK Shahi. 2018. « Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (phenanthrene and pyrene) by the ligninolytic fungi *Ganoderma lucidum* isolated from the hardwood stump. » *Bioresources and Bioprocessing* 5 (1). Springer: 11. doi:10.1186/s40643-018-0197-5. <https://bioresourcesbioprocessing.springeropen.com/articles/10.1186/s40643-018-0197-5>.
- Aira, M, J Olcina, M Pérez-Losada et J Domínguez. 2016. « Characterization of the bacterial communities of casts from *Eisenia andrei* fed with different substrates. » *Applied Soil Ecology* 98. Elsevier: 103-111. doi:10.1016/j.apsoil.2015.10.002.
- Aitken, MD, WT Stringfellow, RD Nagel, C Kazunga et S Chen. 1998. « Characteristics of phenanthrene-degrading bacteria isolated from soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. » *Canadian Journal of Microbiology* 44: 743-752.
- Alpei, J, M Bonkowski et S Scheu. 1996. « Protozoa, nematoda and lumbricidae in the rhizosphere of *Hordelymus europaeus* (Poaceae): Faunal interactions, response of microorganisms and effects on plant growth. » *Oecologia* 106 (1). Springer Verlag: 111-126. doi:10.1007/BF00334413. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00334413>.
- El Amrani, A, AS Dumas, LY Wick, E Yergeau, R Berthomé?? et R Berthomé. 2015. « “Omics” Insights into PAH Degradation toward Improved Green Remediation Biotechnologies. » *Environmental Science and Technology* 49 (19): 11281-11291. doi:10.1021/acs.est.5b01740.
- Anderson, CWN, RR Brooks, A Chiarucci, CJ Lacoste, M Leblanc, BH Robinson, R Simcock et RB Stewart. 1999. « Phytomining for nickel, thallium and gold. » In *Journal of Geochemical Exploration*, 67:407-415. s.l.: Elsevier. doi:10.1016/S0375-6742(99)00055-2.
- Andreolli, M, S Lampis, E Zenaro, M Salkinoja-Salonen et G Vallini. 2011. « *Burkholderia fungorum* DBT1: A promising bacterial strain for bioremediation of PAHs-contaminated soils. » *FEMS Microbiology Letters* 319 (1): 11-18. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02259.x.
- Anyanwu, IN et KT Semple. 2015. « Phytotoxicity of phenanthrene and its nitrogen polycyclic aromatic hydrocarbon analogues in ageing soil. » *Water, Air, and Soil Pollution* 226 (10). Kluwer Academic Publishers: 1-12. doi:10.1007/s11270-015-2589-x. [www.chemspider.com/Chemical-Structure](http://www.chemspider.com/Chemical-Structure).
- Arp, DJ et LY Stein. 2003. « Metabolism of inorganic N compounds by ammonia-oxidizing bacteria. » *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. doi:10.1080/10409230390267446.
- Asghar, HN, HM Rafique, MY Khan et ZA Zahir. 2017. « Phytoremediation of light crude oil by maize (*Zea mays* L.) bio-augmented with plant growth promoting bacteria. » *Soil and*

- Sediment Contamination: An International Journal* 26 (7-8). Taylor & Francis: 749-763. doi:10.1080/15320383.2017.1414771. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15320383.2017.1414771>.
- Auffret, MD, E Yergeau, D Labbé, F Fayolle-Guichard et CW Greer. 2015. « Importance of Rhodococcus strains in a bacterial consortium degrading a mixture of hydrocarbons, gasoline, and diesel oil additives revealed by metatranscriptomic analysis. » *Applied Microbiology and Biotechnology* 99 (5): 2419-2430. doi:10.1007/s00253-014-6159-8. <http://link.springer.com/10.1007/s00253-014-6159-8>.
- Azarbad, H, J Tremblay, C Giard-Laliberté, LD Bainard et E Yergeau. 2020. « Four decades of soil water stress history together with host genotype constrain the response of the wheat microbiome to soil moisture. » *FEMS Microbiology Ecology* 96 (7). doi:10.1093/femsec/fiaa098. <https://academic.oup.com/femsec/article/doi/10.1093/femsec/fiaa098/5841940>.
- Baez-Rogelio, A, YE Morales-García, V Quintero-Hernández et J Muñoz-Rojas. 2017. « Next generation of microbial inoculants for agriculture and bioremediation. » *Microbial Biotechnology* 10 (1). Wiley/Blackwell (10.1111): 19-21. doi:10.1111/1751-7915.12448. <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12448>.
- Baird, WM, LA Hooven et B Mahadevan. 2005. « Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. » *Environmental and Molecular Mutagenesis*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. doi:10.1002/em.20095.
- Balaji, V et P Ebenezer. 2008. « Optimization of extracellular lipase production in Colletotrichum gloeosporioides by solid state fermentation. » *Indian Journal of Science and Technology* 1 (7): 1-8. doi:10.17485/ijst/2008/v1i7/29600. <http://www.indjst.org>.
- Ball, A et A Truskewycz. 2013. « Polyaromatic hydrocarbon exposure: An ecological impact ambiguity. » *Environmental Science and Pollution Research*. Springer. doi:10.1007/s11356-013-1620-2. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11356-013-1620-2>.
- Ballach, HJ, A Kuhn et R Wittig. 2003. « Biodegradation of anthracene in the roots and growth substrate of poplar cuttings. » *Environmental Science and Pollution Research* 10 (5). Springer Verlag: 308-316. doi:10.1065/espr2003.04.150.2. <https://link.springer.com/article/10.1065/espr2003.04.150.2>.
- Ballhausen, MB et W de Boer. 2016. « The sapro-rhizosphere: Carbon flow from saprotrophic fungi into fungus-feeding bacteria. » *Soil Biology and Biochemistry* 102. Elsevier Ltd: 14-17. doi:10.1016/j.soilbio.2016.06.014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.06.014>.
- Bardgett, RD et WH Van Der Putten. 2014. « Belowground biodiversity and ecosystem functioning. » *Nature*. Nature Publishing Group. doi:10.1038/nature13855. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13855>.
- Bardgett, RD et DA Wardle. 2010. *Aboveground-belowground linkages: biotic interactions, ecosystem processes, and global change*. s.l.: Oxford University Press.
- Barrière, A et MA Félix. 2006. « Isolation of C. elegans and related nematodes. » *WormBook : the online review of C. elegans biology*. The C. elegans Research Community. doi:10.1895/wormbook.1.115.1.
- Barrios, E. 2007. *Soil biota, ecosystem services and land productivity*. *Ecological Economics*. Vol. 64. s.l.: Elsevier. doi:10.1016/j.ecolecon.2007.03.004. [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921800907001693?casa\\_token=Oq-uMe9Yc-YAAAAA:uxnUaYZMx2MIO0lJcKVVdwD7CTRLzAwGiD2lt7tMkZXhymKcv4LwkPI-fk1TSTgYVbjzDDLikwY](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921800907001693?casa_token=Oq-uMe9Yc-YAAAAA:uxnUaYZMx2MIO0lJcKVVdwD7CTRLzAwGiD2lt7tMkZXhymKcv4LwkPI-fk1TSTgYVbjzDDLikwY).
- Barrutia, O, C Garbisu, L Epelde, MCC Sampedro, MAA Goicolea et JMM Becerril. 2011. « Plant tolerance to diesel minimizes its impact on soil microbial characteristics during rhizoremediation of diesel-contaminated soils. » *Science of the Total Environment* 409 (19). Elsevier: 4087-4093. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.06.025.

- <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969711006498>.
- Bartlett, MD, MJI Briones, R Neilson, O Schmidt, D Spurgeon et RE Creamer. 2010. « A critical review of current methods in earthworm ecology: From individuals to populations. » *European Journal of Soil Biology* 46 (2). Elsevier Masson SAS: 67-73. doi:10.1016/j.ejsobi.2009.11.006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2009.11.006>.
- Bashan, Y, LE De-Bashan, SR Prabhu et JP Hernandez. 2014. « Advances in plant growth-promoting bacterial inoculant technology: Formulations and practical perspectives (1998-2013). » *Plant and Soil* 378 (1-2). Springer International Publishing: 1-33. doi:10.1007/s11104-013-1956-x. <http://link.springer.com/10.1007/s11104-013-1956-x>.
- Beckers, B, MO De Beeck, N Weyens, W Boerjan et J Vangronsveld. 2017. « Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees. » *Microbiome* 5 (1). BioMed Central Ltd.: 326. doi:10.1186/s40168-017-0241-2. <https://link.springer.com/articles/10.1186/s40168-017-0241-2>.
- Van Beilen, JB, EG Funhoff, A Van Loon, A Just, L Kaysser, M Bouza, R Holtackers, M Röthlisberger, Z Li et B Witholt. 2006. « Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. » *Applied and Environmental Microbiology* 72 (1): 59-65. doi:10.1128/AEM.72.1.59-65.2006.
- Bell, TH, B Cloutier-Hurteau, F Al-Otaibi, M-CC Turmel, E Yergeau, F Courchesne et M St-Arnaud. 2015. « Early rhizosphere microbiome composition is related to the growth and Zn uptake of willows introduced to a former landfill. » *Environmental Microbiology* 17 (8): 3025-3038. doi:10.1111/1462-2920.12900.
- Bell, TH, S El-Din Hassan, A Lauron-Moreau, F Al-Otaibi, M Hijri, E Yergeau et M St-Arnaud. 2014a. « Linkage between bacterial and fungal rhizosphere communities in hydrocarbon-contaminated soils is related to plant phylogeny. » *ISME Journal* 8 (2): 331-343. doi:10.1038/ismej.2013.149. <http://www.nature.com/articles/ismej2013149>.
- Bell, TH, S Joly, FE Pitre et E Yergeau. 2014b. « Increasing phytoremediation efficiency and reliability using novel omics approaches. » *Trends in Biotechnology*. doi:10.1016/j.tibtech.2014.02.008.
- Bell, TH, FOP Stefani, K Abram, J Champagne, E Yergeau, M Hijri et M St-Arnaud. 2016. « A diverse soil microbiome degrades more crude oil than specialized bacterial assemblages obtained in culture. » *Applied and Environmental Microbiology* 82 (18). American Society for Microbiology: 5530-5541. doi:10.1128/AEM.01327-16. <https://aem.asm.org/content/82/18/5530>.
- Bell, TH, E Yergeau, C Martineau, D Juck, LG Whyte et CW Greer. 2011. « Identification of Nitrogen-Incorporating Bacteria in Petroleum-Contaminated Arctic Soils by Using [ 15 N]DNA-Based Stable Isotope Probing and Pyrosequencing. » *Applied and Environmental Microbiology* 77 (12): 4163-4171. doi:10.1128/AEM.00172-11. <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.00172-11>.
- Bell, TH, E Yergeau, C Maynard, D Juck, LG Whyte et CW Greer. 2013. « Predictable bacterial composition and hydrocarbon degradation in Arctic soils following diesel and nutrient disturbance. » *ISME Journal* 7 (6). Nature Publishing Group: 1200-1210. doi:10.1038/ismej.2013.1. <https://www.nature.com/articles/ismej20131>.
- Beneduzi, A, A Ambrosini et LMP Passaglia. 2012. « Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. » *Genetics and Molecular Biology*. Academic Press Inc. doi:10.1590/S1415-47572012000600020. [www.sbg.org.br](http://www.sbg.org.br).
- Bennett, AE, K Preedy, A Golubski, J Umbanhowar, SR Borrett, L Byrne, K Apostol et al. 2019. « Beyond the black box: Promoting mathematical collaborations for elucidating interactions in soil ecology. » *Ecosphere* 10 (7). Wiley-Blackwell. doi:10.1002/ecs2.2799. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ecs2.2799>.
- Berendsen, RL, CMJ Pieterse et PAHM Bakker. 2012. « The rhizosphere microbiome and plant

- health. » *Trends in Plant Science*. doi:10.1016/j.tplants.2012.04.001.
- Berg, G, K Smalla et KS G Berg. 2009. *Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere*. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol. 68. s.l.: s.n. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x.
- Bergkemper, F, S Kublik, F Lang, J Krüger, G Vestergaard, M Schloter et S Schulz. 2016. « Novel oligonucleotide primers reveal a high diversity of microbes which drive phosphorous turnover in soil. » *Journal of Microbiological Methods* 125. Elsevier B.V.: 91-97. doi:10.1016/j.mimet.2016.04.011.
- Berlemont, R et AC Martiny. 2015. « Genomic potential for polysaccharide deconstruction in bacteria. » *Applied and Environmental Microbiology* 81 (4). American Society for Microbiology: 1513-1519. doi:10.1128/AEM.03718-14. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03718-14>.<http://aem.asm.org/>.
- Bernard, L, L Chapuis-Lardy, T Razafimbelo, M Razafindrakoto, A-LL Pablo, E Legname, J Poulain, T Bröls, M O'Donohue, A Brauman, J-LL Chotte et E Blanchart. 2012. « Endogeic earthworms shape bacterial functional communities and affect organic matter mineralization in a tropical soil. » *The ISME Journal* 6 (1). Nature Publishing Group: 213-222. doi:10.1038/ismej.2011.87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21753801>.
- Beyer, WN et C Stafford. 1993. « Survey and evaluation of contaminants in earthworms and in soils derived from dredged material at confined disposal facilities in the Great Lakes Region. » *Environmental Monitoring and Assessment* 24 (2): 151-165. doi:10.1007/BF00547984.
- Blume-Werry, G, EJ Krab, J Olofsson, MK Sundqvist, M Väisänen et J Klaminder. 2020. « Invasive earthworms unlock arctic plant nitrogen limitation. » *Nature Communications* 11 (1). Nature Research: 1-10. doi:10.1038/s41467-020-15568-3. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15568-3>.
- Boeraeve, M, O Honnay et H Jacquemyn. 2018. « Effects of host species, environmental filtering and forest age on community assembly of ectomycorrhizal fungi in fragmented forests. » *Fungal Ecology* 36. Elsevier Ltd: 89-98. doi:10.1016/j.funeco.2018.08.003.
- Bonkowski, M. 2004. « Protozoa and plant growth: The microbial loop in soil revisited. » *New Phytologist*. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01066.x.
- Bonkowski, M, C Villenave et B Griffiths. 2009. « Rhizosphere fauna: The functional and structural diversity of intimate interactions of soil fauna with plant roots. » *Plant and Soil*. Springer. doi:10.1007/s11104-009-0013-2. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11104-009-0013-2>.
- Bordenstein, SSR, KRK Theis, C Woese, D Fredericks, D Relman, T Inglis, E Allen-Vercoe et al. 2015. « Host biology in light of the microbiome: Ten principles of holobionts and hologenomes. » Sous la dir. de Matthew K. Waldor. *PLoS Biology* 13 (8). Public Library of Science: e1002226. doi:10.1371/journal.pbio.1002226.
- Bouchard, DC, SC Mravik et GB Smith. 1990. « Benzene and naphthalene sorption on soil contaminated with high molecular weight residual hydrocarbons from unleaded gasoline. » *Chemosphere* 21 (8): 975-989. doi:10.1016/0045-6535(90)90120-I.
- Bouché, MB et F Al-Addan. 1997. « Earthworms, water infiltration and soil stability: Some new assessments. » *Soil Biology and Biochemistry* 29 (3-4). Pergamon: 441-452. doi:10.1016/S0038-0717(96)00272-6.
- Bray, N, J Kao-Kniffin, SD Frey, T Fahey et K Wickings. 2019. « Soil macroinvertebrate presence alters microbial community composition and activity in the rhizosphere. » *Frontiers in Microbiology* 10 (FEB). Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fmicb.2019.00256. </pmc/articles/PMC6395791/?report=abstract>.
- Brenner, S. 1974. « The genetics of *Caenorhabditis elegans*. » *Genetics* 77 (1): 71-94. <http://www.genetics.org/content/77/1/71.short>.
- Brereton, NJB, E Gonzalez, J Marleau, WG Nissim, M Labrecque, S Joly et FE Pitre. 2016.

- « Comparative transcriptomic approaches exploring contamination stress tolerance in *Salix* sp. reveal the importance for a metaorganismal de novo assembly approach for nonmodel plants. » *Plant Physiology* 171 (1): 3-24. doi:10.1104/pp.16.00090. <https://academic.oup.com/plphys/article/171/1/3-24/6114894>.
- Buchan, D, B Moeskops, N Ameloot, S De Neve et S Sleutel. 2012. « Selective sterilisation of undisturbed soil cores by gamma irradiation: Effects on free-living nematodes, microbial community and nitrogen dynamics. » *Soil Biology and Biochemistry* 47. Pergamon: 10-13. doi:10.1016/j.soilbio.2011.12.014.
- Bundy, JG, GI Paton et CD Campbell. 2002. « Microbial communities in different soil types do not converge after diesel contamination. » *Journal of Applied Microbiology* 92 (2). John Wiley & Sons, Ltd: 276-288. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01528.x. <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2672.2002.01528.x>.
- Burd, GI, DG Dixon et BR Glick. 2000. « Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. » *Canadian Journal of Microbiology* 46 (3). NRC Research Press Ottawa, Canada : 237-245. doi:10.1139/w99-143. <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/w99-143>.
- Burken, JG et JL Schnoor. 1997. « Uptake and metabolism of atrazine by poplar trees. » *Environmental Science and Technology* 31 (5). American Chemical Society: 1399-1406. doi:10.1021/es960629v. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- Burki, F, AJ Roger, MW Brown et AGB Simpson. 2020. « The New Tree of Eukaryotes. » *Trends in Ecology and Evolution*. doi:10.1016/j.tree.2019.08.008.
- Burris, RH et GP Roberts. 1993. « Biological Nitrogen Fixation. » *Annual Review of Nutrition* 13 (1). Annual Reviews Inc.: 317-335. doi:10.1146/annurev.nu.13.070193.001533. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.nu.13.070193.001533>.
- Cafaro, V, V Izzo, R Scognamiglio, E Notomista, P Capasso, A Casbarra, P Pucci et A Di Donato. 2004. « Phenol Hydroxylase and Toluene/o-Xylene Monooxygenase from *Pseudomonas stutzeri* OX1: Interplay between Two Enzymes. » *Applied and Environmental Microbiology* 70 (4). American Society for Microbiology: 2211-2219. doi:10.1128/AEM.70.4.2211-2219.2004.
- Cai, L, X Gong, X Sun, S Li et X Yu. 2018. « Comparison of chemical and microbiological changes during the aerobic composting and vermicomposting of green waste. » Sous la dir. de Andrea Franzetti. *PLOS ONE* 13 (11). Public Library of Science: e0207494. doi:10.1371/journal.pone.0207494. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0207494>.
- Cajthaml, T, M Möder, P Kačer, V Šašek et P Popp. 2002. « Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection. » *Journal of Chromatography A* 974 (1-2). Elsevier: 213-222. doi:10.1016/S0021-9673(02)00904-4.
- Callahan, BJ, PJ McMurdie, MJ Rosen, AW Han, AJA Johnson et SP Holmes. 2016. « DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. » *Nature Methods* 13 (7). Nature Publishing Group: 581-583. doi:10.1038/nmeth.3869. </pmc/articles/PMC4927377/?report=abstract>.
- Calvo, P, L Nelson et JW Kloepper. 2014. « Agricultural uses of plant biostimulants. » *Plant and Soil* 383 (1-2): 3-41. doi:10.1007/s11104-014-2131-8. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11104-014-2131-8.pdf>.
- Cameron, KD, L Smart, B Ballard, T Volk et L Abrahamson. 2010. « "Fish Creek" *Salix purpurea* by SUNY-ESF. » s.l.: s.n. [www.doublewillow.com](http://www.doublewillow.com).
- « Canadian Environmental Quality Guidelines. » 2010. s.l.: s.n. <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/en/index.html#void>.
- Cao, J, D Ji et C Wang. 2015. « Interaction between earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi on the degradation of oxytetracycline in soils. » *Soil Biology and Biochemistry* 90 (August). Elsevier Ltd: 283-292. doi:10.1016/j.soilbio.2015.08.020.

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.08.020>.
- Caporaso, JG, CL Lauber, WA Walters, D Berg-Lyons, J Huntley, N Fierer, SM Owens, J Betley, L Fraser, M Bauer, N Gormley, JA Gilbert, G Smith et R Knight. 2012. « Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. » *The ISME Journal* 6 (8). Nature Publishing Group: 1621-1624. doi:10.1038/ismej.2012.8. <http://www.nature.com/articles/ismej20128>.
- Carmona, M, MT Zamarro, B Blázquez, G Durante-Rodríguez, JF Juárez, JA Valderrama, MJL Barragán, JL García et E Díaz. 2009. « Anaerobic Catabolism of Aromatic Compounds: a Genetic and Genomic View. » *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73 (1): 71-133. doi:10.1128/mmbr.00021-08.
- Carrillo, Y, BA Ball, MA Bradford, CF Jordan et M Molina. 2011. « Soil fauna alter the effects of litter composition on nitrogen cycling in a mineral soil. » *Soil Biology and Biochemistry* 43 (7): 1440-1449. doi:10.1016/j.soilbio.2011.03.011.
- Cavé-Radet, A, S Correa-Garcia, C Monard, A El Amrani, A Salmon, M Ainouche et É Yergeau. 2020. « Phenanthrene contamination and ploidy level affect the rhizosphere bacterial communities of *Spartina* spp. » *FEMS Microbiology Ecology* 96 (10). doi:10.1093/femsec/fiaa156. <https://academic.oup.com/femsec/article/doi/10.1093/femsec/fiaa156/5895320>.
- CCME Canadian Council of Ministers of the Environment. 2008. « Canadian Soil Quality Guidelines: Carcinogenic and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons PAHs (Environmental and Human Health Effects). » *PN 1401*. s.l.: s.n.
- Cébron, A, Arsène-Ploetze, P Bauda, PN Bertin, P Billard, C Carapito, S Devin, F Goulhen-Chollet, J Poirel et C Leyval. 2014. « Rapid Impact of Phenanthrene and Arsenic on Bacterial Community Structure and Activities in Sand Batches. » *Microbial Ecology* 67 (1): 129-144. doi:10.1007/s00248-013-0313-1. <http://link.springer.com/10.1007/s00248-013-0313-1>.
- Cébron, A, T Beguiristain, P Faure, M-PP Norini, J-FF Masfaraud, C Leyval, A Cébron, T Beguiristain, P Faure, M-PP Norini, J-FF Masfaraud et C Leyval. 2009. *Influence of vegetation on the in situ bacterial community and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degraders in aged PAH-contaminated or thermal-desorption-treated soil. Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 75. s.l.: American Society for Microbiology. doi:10.1128/AEM.02862-08. <https://aem.asm.org/content/75/19/6322.short>.
- Cébron, A, B Louvel, P Faure, C France-Lanord, Y Chen, JC Murrell et C Leyval. 2011. « Root exudates modify bacterial diversity of phenanthrene degraders in PAH-polluted soil but not phenanthrene degradation rates. » *Environmental Microbiology* 13 (3). John Wiley & Sons, Ltd: 722-736. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02376.x. <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1462-2920.2010.02376.x>.
- Cébron, A, M-PP Norini, T Beguiristain, C Leyval, MNTBCL A Cébron, A Cébron, M-PP Norini, T Beguiristain et C Leyval. 2008. « Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. » *Journal of Microbiological Methods* 73 (2): 148-159. doi:10.1016/j.mimet.2008.01.009. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167701208000286>.
- Cerniglia, CE. 1992. « Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. » *Biodegradation* 3 (2-3). Kluwer Academic Publishers: 351-368. doi:10.1007/BF00129093. <http://link.springer.com/10.1007/BF00129093>.
- . 1993. « Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. » *Current Opinion in Biotechnology* 4 (3). Elsevier Current Trends: 331-338. doi:10.1016/0958-1669(93)90104-5. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0958166993901045>.
- Chang, SW, SJ Lee et CH Je. 2005. « Phytoremediation of atrazine by poplar trees: Toxicity, uptake, and transformation. » *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 40 (6). Taylor & Francis Group:



- 801-811. doi:10.1080/03601230500227483.  
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601230500227483>.
- Chen, B, J Huang, K Yuan, L Lin, X Wang, L Yang et T Luan. 2016. « Direct evidences on bacterial growth pattern regulating pyrene degradation pathway and genotypic dioxygenase expression. » *Marine Pollution Bulletin* 105 (1). Elsevier Ltd: 73-80. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.02.054. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.054>.
- Chen, S et A Polle. 2010. « Salinity tolerance of Populus. » *Plant Biology*. doi:10.1111/j.1438-8677.2009.00301.x.
- Cheng, Y, Y Jiang, BS Griffiths, D Li, F Hu et H Li. 2011. « Stimulatory effects of bacterial-feeding nematodes on plant growth vary with nematode species. » *Nematology* 13 (3): 369-372. doi:10.1163/138855410X528253.
- Chipman, JK. 1982. « Bile as a source of potential reactive metabolites. » *Toxicology*. Elsevier. doi:10.1016/0300-483X(82)90022-1.
- Chipman, JK, PC Hiron, GS Frost et P Millburn. 1981. « The biliary excretion and enterohepatic circulation of benzo (a)pyrene and its metabolites in the rat. » *Biochemical Pharmacology* 30 (9). Elsevier: 937-944. doi:10.1016/0006-2952(81)90037-X.
- Clarholm, M. 1985. « Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. » *Soil Biology and Biochemistry* 17 (2). Pergamon: 181-187. doi:10.1016/0038-0717(85)90113-0.
- Cole, L, MA Bradford, PJA Shaw et RD Bardgett. 2006. « The abundance, richness and functional role of soil meso- and macrofauna in temperate grassland-A case study. » *Applied Soil Ecology* 33 (2). Elsevier: 186-198. doi:10.1016/j.apsoil.2005.11.003.
- Contreras-Ramos, SM, D Álvarez-Bernal et L Dendooven. 2006. « Eisenia fetida increased removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. » *Environmental Pollution* 141 (3): 396-401. doi:10.1016/j.envpol.2005.08.057. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749105004653>.
- Cook, RL et D Hesterberg. 2013. « Comparison of Trees and Grasses for Rhizoremediation of Petroleum Hydrocarbons. » *International Journal of Phytoremediation* 15 (9): 844-860. doi:10.1080/15226514.2012.760518.
- Cooper, JE. 2011. « Anesthesia, analgesia, and euthanasia of invertebrates. » *ILAR Journal*. Narnia. doi:10.1093/ilar.52.2.196.
- Correa-García, S, P Pande, A Séguin, M St-Arnaud et E Yergeau. 2018. « Rhizoremediation of petroleum hydrocarbons: a model system for plant microbiome manipulation. » *Microbial Biotechnology* 11 (5): 819-832. doi:10.1111/1751-7915.13303. <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.13303>.
- Correa-García, S, K Rheault, J Tremblay, A Séguin et E Yergeau. 2021. « Soil Characteristics Constrain the Response of Microbial Communities and Associated Hydrocarbon Degradation Genes during Phytoremediation. » Sous la dir. de Isaac Cann. *Applied and Environmental Microbiology* 87 (2). Cold Spring Harbor Laboratory: e02170-20. doi:10.1128/AEM.02170-20. <https://doi.org/10.1101/2020.09.04.284042>.
- Coutiño-González, E, B Hernández-Carlos, R Gutiérrez-Ortiz et L Dendooven. 2010. « The earthworm Eisenia fetida accelerates the removal of anthracene and 9, 10-anthraquinone, the most abundant degradation product, in soil. » *International Biodeterioration and Biodegradation*. doi:10.1016/j.ibiod.2010.05.002.
- Cowie, BR, BM Greenberg et GF Slater. 2010. « Determination of Microbial Carbon Sources and Cycling during Remediation of Petroleum Hydrocarbon Impacted Soil Using Natural Abundance <sup>14</sup>C Analysis of PLFA. » *Environmental Science & Technology* 44 (7). American Chemical Society (ACS): 2322-2327. doi:10.1021/es9029717. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- Crowther, TW, L Boddy et TH Jones. 2011. « Outcomes of fungal interactions are determined by soil invertebrate grazers. » *Ecology Letters* 14 (11): 1134-1142. doi:10.1111/j.1461-

0248.2011.01682.x.

- Dagher, DJ, FE Pitre et M Hijri. 2020. « Ectomycorrhizal fungal inoculation of sphaerosporella brunnea significantly increased stem biomass of salix miyabeana and decreased lead, tin, and zinc, soil concentrations during the phytoremediation of an industrial landfill. » *Journal of Fungi* 6 (2). Multidisciplinary Digital Publishing Institute: 1-12. doi:10.3390/jof6020087. <https://www.mdpi.com/2309-608X/6/2/87>.
- Danielson, RM. 2007. « Ectomycorrhiza Formation by the Operculate Discomycete Sphaerosporella brunnea (Pezizales). » *Mycologia* 76 (3): 454. doi:10.2307/3793328.
- Davies, JI et WC Evans. 1964. « Oxidative metabolism of naphthalene by soil pseudomonads. The ring-fission mechanism. » *The Biochemical journal* 91 (2). Portland Press: 251-261. doi:10.1042/bj0910251. [/biochemj/article/91/2/251/53154/Oxidative-metabolism-of-naphthalene-by-soil](https://pubs.rsc.org/doi/10.1042/bj0910251).
- Delgado-Balbuena, L, JM Bello-López, YE Navarro-Noya, A Rodríguez-Valentín, ML Luna-Guido et L Dendooven. 2016. « Changes in the Bacterial Community Structure of Remediated Anthracene-Contaminated Soils. » Sous la dir. de Mei LI. *PLOS ONE* 11 (10). Public Library of Science: e0160991. doi:10.1371/journal.pone.0160991. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0160991>.
- Delgado-Baquerizo, M, J Grinyer, PB Reich et BK Singh. 2016. « Relative importance of soil properties and microbial community for soil functionality: insights from a microbial swap experiment. » Sous la dir. de Edith Allen. *Functional Ecology* 30 (11). Blackwell Publishing Ltd: 1862-1873. doi:10.1111/1365-2435.12674. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1365-2435.12674>.
- Delgado-Baquerizo, M, PB Reich, C Trivedi, DJ Eldridge, S Abades, FD Alfaro, F Bastida, AA Berhe, NA Cutler, A Gallardo, L García-Velázquez, SC Hart, PE Hayes, J-Z He, Z-Y Hseu, H-W Hu, M Kirchmair, S Neuhauser, CA Pérez, SC Reed, F Santos, BW Sullivan, P Trivedi, J-T Wang, L Weber-Grullon, MA Williams et BK Singh. 2020. « Multiple elements of soil biodiversity drive ecosystem functions across biomes. » *Nature Ecology & Evolution* 4 (2): 210-220. doi:10.1038/s41559-019-1084-y. <http://www.nature.com/articles/s41559-019-1084-y>.
- Desalme, D, P Binet et G Chiapusio. 2013. « Challenges in tracing the fate and effects of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbon deposition in vascular plants. » *Environmental Science and Technology* 47 (9). American Chemical Society: 3967-3981. doi:10.1021/es304964b. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- Deubel, A et W Merbach. 2005. « Influence of Microorganisms on Phosphorus Bioavailability in Soils. » In *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*, 177-191. s.l.: Springer-Verlag. doi:10.1007/3-540-26609-7\_9. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-26609-7\\_9](https://link.springer.com/chapter/10.1007/3-540-26609-7_9).
- Digel, C, A Curtsdotter, J Riede, B Klarner et U Brose. 2014. « Unravelling the complex structure of forest soil food webs: Higher omnivory and more trophic levels. » *Oikos* 123 (10). Blackwell Publishing Ltd: 1157-1172. doi:10.1111/oik.00865. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/oik.00865>.
- Ding, G-C, H Heuer et K Smalla. 2012. « Dynamics of bacterial communities in two unpolluted soils afterspiking with phenanthrene: soil type specific and common responders. » *Frontiers in Microbiology* 3 (AUG). Frontiers Research Foundation: 290. doi:10.3389/fmicb.2012.00290. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00290/abstract>.
- Doornbos, RF, LC Van Loon et PAHM Bakker. 2012. « Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. » *Agronomy for Sustainable Development*. doi:10.1007/s13593-011-0028-y.
- Doty, SL, JL Freeman, CM Cohu, JG Burken, A Firrincieli, A Simon, Z Khan, JG Isebrands, J Lukas et MJ Blaylock. 2017. « Enhanced Degradation of TCE on a Superfund Site Using

- Endophyte-Assisted Poplar Tree Phytoremediation. » *Environmental Science and Technology* 51 (17). American Chemical Society: 10050-10058. doi:10.1021/acs.est.7b01504. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- Doube, BM, PM Stephens, CW Davoren et MH Ryder. 1994. « Interactions between earthworms, beneficial soil microorganisms and root pathogens. » *Applied Soil Ecology* 1 (1): 3-10. doi:10.1016/0929-1393(94)90018-3.
- Dunlevy, SR, DR Singleton et MD Aitken. 2013. « Biostimulation reveals functional Redundancy of anthracene-degrading bacteria in polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. » *Environmental Engineering Science* 30 (11). Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA: 697-705. doi:10.1089/ees.2013.0067. <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ees.2013.0067>.
- Eaton, RW et PJ Chapman. 1992. « Bacterial metabolism of naphthalene: Construction and use of recombinant bacteria to study ring cleavage of 1,2-dihydroxynaphthalene and subsequent reactions. » *Journal of Bacteriology* 174 (23). American Society for Microbiology Journals: 7542-7554. doi:10.1128/jb.174.23.7542-7554.1992. <http://jb.asm.org/>.
- Eckenwalder, JE. 1996. « Systematics and evolution of Populus. » In *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation Part I*, sous la dir. de RF Stettler, Jr Bradshaw, PE Heilman, et TM Hinckley, 539. Ottawa: NRC Research Press Ottawa, Canada.
- Edgar, RC, BJ Haas, JC Clemente, C Quince et R Knight. 2011. « UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. » *Bioinformatics* 27 (16). Oxford University Press: 2194-2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381. <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/27/16/2194/255262>.
- Edwards, CA. 1997. *Earthworm Ecology*. *Earthworm Ecology*. s.l.: CRC Press. doi:10.1201/9781482285246.
- Edwards, NT. 1983. « Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH's) in the Terrestrial Environment— A Review. » *Journal of Environmental Quality* 12 (4). Wiley: 427-441. doi:10.2134/jeq1983.00472425001200040001x. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2134/jeq1983.00472425001200040001x>.
- Eisenstadt, E, AJ Warren, J Porter, D Atkins et JH Miller. 1982. « Carcinogenic epoxides of benzo[a]pyrene and cyclopenta[cd]pyrene induce base substitutions via specific transversions. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (6 I). National Academy of Sciences: 1945-1949. doi:10.1073/pnas.79.6.1945. <https://www.pnas.org/content/79/6/1945>.
- Van Elsas, JD et MJ Bailey. 2002. « The ecology of transfer of mobile genetic elements. » *FEMS Microbiology Ecology*. doi:10.1016/S0168-6496(02)00373-2.
- Ely, CS et BF Smets. 2017. « Bacteria from wheat and cucurbit plant roots metabolize PAHs and aromatic root exudates: Implications for rhizodegradation. » *International Journal of Phytoremediation* 19 (10): 877-883. doi:10.1080/15226514.2017.1303805. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28318300>.
- Emmerling, C et D Paulsch. 2001. « Improvement of earthworm (Lumbricidae) community and activity in mine soils from open-cast coal mining by the application of different organic waste materials. » *Pedobiologia* 45 (5): 396-407. doi:10.1078/0031-4056-00095.
- Endlweber, K, L Ruess et S Scheu. 2009. « Collembola switch diet in presence of plant roots thereby functioning as herbivores. » *Soil Biology and Biochemistry* 41 (6). Pergamon: 1151-1154. doi:10.1016/j.soilbio.2009.02.022.
- Endlweber, K et S Scheu. 2006. « Effects of Collembola on root properties of two competing ruderal plant species. » *Soil Biology and Biochemistry* 38 (8). Pergamon: 2025-2031. doi:10.1016/j.soilbio.2006.01.004.
- Eriksson, M, G Dalhammar et WW Mohn. 2002. « Bacterial growth and biofilm production on

- pyrene. » *FEMS Microbiology Ecology* 40 (1): 21-27. doi:10.1111/j.1574-6941.2002.tb00932.x. <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00932.x>.
- Erktan, A, D Or et S Scheu. 2020a. « The physical structure of soil: Determinant and consequence of trophic interactions. » *Soil Biology and Biochemistry* 148. Elsevier Ltd: 107876. doi:10.1016/j.soilbio.2020.107876.
- Erktan, A, M Rillig, A Carminati, A Jousset et S Scheu. 2019. « Fungal and bacterial predator-prey systems influence soil aggregate formation and stabilisation. » In *EGU General Assembly Conference Abstracts*, 7005. EGU General Assembly Conference Abstracts. s.l.: s.n.
- . 2020b. « Bacterial and fungal predator – prey interactions modulate soil aggregation. » *Biogeosciences Discussions*: 1-31. doi:10.5194/bg-2020-48. <https://doi.org/10.5194/bg-2020-48>.
- Erstfeld, KM et J Snow-Ashbrook. 1999. « Effects of chronic low-level PAH contamination on soil invertebrate communities. » *Chemosphere* 39 (12). Pergamon: 2117-2139. doi:10.1016/S0045-6535(98)00421-4.
- Esperschütz, J, F Buegger, JB Winkler, JC Munch, M Schloter et A Gattinger. 2009. « Microbial response to exudates in the rhizosphere of young beech trees (*Fagus sylvatica* L.) after dormancy. » *Soil Biology and Biochemistry* 41 (9): 1976-1985. doi:10.1016/j.soilbio.2009.07.002.
- Eulberg, D, LA Golovleva et M Schlömann. 1997. « Characterization of catechol catabolic genes from *Rhodococcus erythropolis* 1CP. » *Journal of Bacteriology* 179 (2). Wiley-VCH Verlag: 370-381. doi:10.1128/jb.179.2.370-381.1997. <http://jb.asm.org/>.
- Falkowski, PG. 2002. « The Ocean's Invisible Forest. » *Scientific American* 287 (2). Scientific American Inc.: 54-61. doi:10.1038/scientificamerican0802-54. <https://www.scientificamerican.com/article/the-oceans-invisible-fore/>.
- Faucon, MP, D Houben et H Lambers. 2017. « Plant Functional Traits: Soil and Ecosystem Services. » *Trends in Plant Science* 22 (5). Elsevier Ltd: 385-394. doi:10.1016/j.tplants.2017.01.005.
- Ferris, H, RC Venette et SS Lau. 1997. « Population energetics of bacterial-feeding nematodes: Carbon and nitrogen budgets. » *Soil Biology and Biochemistry* 29 (8): 1183-1194. doi:10.1016/S0038-0717(97)00035-7. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071797000357>.
- Fetzner, S. 2012. « Ring-cleaving dioxygenases with a cupin fold. » *Applied and Environmental Microbiology* 78 (8). American Society for Microbiology: 2505-2514. doi:10.1128/AEM.07651-11.
- Fierer, N. 2017. « Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. » *Nature Reviews Microbiology* 15 (10): 579-590. doi:10.1038/nrmicro.2017.87. <http://www.nature.com/articles/nrmicro.2017.87>.
- Fierer, N et RB Jackson. 2006. « The diversity and biogeography of soil bacterial communities. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (3). National Academy of Sciences: 626-631. doi:10.1073/pnas.0507535103. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507535103](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507535103).
- Firdaus-e-Bareen, M Shafiq et S Jamil. 2012. « Role of plant growth regulators and a saprobic fungus in enhancement of metal phytoextraction potential and stress alleviation in pearl millet. » *Journal of Hazardous Materials* 237-238. Elsevier: 186-193. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.08.033.
- Fox, J et S Weisberg. 2019. *An {R} Companion to Applied Regression*, Third. Thousand Oaks: SAGE Publications Ltd.
- Fry, EL, JR De Long, L Álvarez Garrido, N Alvarez, Y Carrillo, L Castañeda-Gómez, M Chomel,

- M Dondini, JE Drake, S Hasegawa, S Hortal, BG Jackson, M Jiang, JM Lavallee, BE Medlyn, J Rhymes, BK Singh, P Smith, IC Anderson, RD Bardgett, EM Baggs et D Johnson. 2019. « Using plant, microbe, and soil fauna traits to improve the predictive power of biogeochemical models. » *Methods in Ecology and Evolution*. British Ecological Society. doi:10.1111/2041-210X.13092. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/2041-210X.13092>.
- Fuchs, G. 2008. « Anaerobic metabolism of aromatic compounds. » In *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125:82-99. s.l.: Blackwell Publishing Inc. doi:10.1196/annals.1419.010.
- Fuenmayor, SL, M Wild, AL Boyes et PA Williams. 1998. « A Gene Cluster Encoding Steps in Conversion of Naphthalene to Gentisate in *Pseudomonas* sp. Strain U2. » *Journal of Bacteriology* 180 (9). American Society for Microbiology: 2522-2530. doi:10.1128/JB.180.9.2522-2530.1998. <http://jb.asm.org/>.
- Futagawa, M, DE Wedge et FE Dayan. 2002. « Physiological factors influencing the antifungal activity of zopfiellin. » *Pesticide Biochemistry and Physiology* 73 (2). Academic Press: 87-93. doi:10.1016/S0048-3575(02)00023-8.
- Gamerding, AP, RS Achin et RW Traxler. 1997. « Approximating the Impact of Sorption on Biodegradation Kinetics in Soil-Water Systems. » *Soil Science Society of America Journal* 61 (6). Soil Science Society of America: 1618. doi:10.2136/sssaj1997.03615995006100060012x. <https://www.soils.org/publications/sssaj/abstracts/61/6/SS0610061618>.
- Gao, Y, L Ren, W Ling, S Gong, B Sun et Y Zhang. 2010. « Desorption of phenanthrene and pyrene in soils by root exudates. » *Bioresource Technology* 101 (4). Elsevier: 1159-1165. doi:10.1016/J.BIORTECH.2009.09.062. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409012772>.
- Gao, Y, Y Yang, W Ling, H Kong et X Zhu. 2011. « Gradient Distribution of Root Exudates and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Rhizosphere Soil. » *Soil Science Society of America Journal* 75 (5): 1694. doi:10.2136/sssaj2010.0244. <https://www.soils.org/publications/sssaj/abstracts/75/5/1694>.
- Gaskin, SE et RH Bentham. 2010. « Rhizoremediation of hydrocarbon contaminated soil using Australian native grasses. » *Science of the Total Environment* 408 (17). Elsevier: 3683-3688. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.05.004. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969710004602>.
- Gebremikael, MT, J De Waele, D Buchan, GE Soboksa et S De Neve. 2015. « The effect of varying gamma irradiation doses and soil moisture content on nematodes, the microbial communities and mineral nitrogen. » *Applied Soil Ecology* 92. Elsevier: 1-13. doi:10.1016/j.apsoil.2015.03.003.
- Geisen, S. 2016. « The bacterial-fungal energy channel concept challenged by enormous functional versatility of soil protists. » *Soil Biology and Biochemistry* 102. Elsevier Ltd: 22-25. doi:10.1016/j.soilbio.2016.06.013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.06.013>.
- Geisen, S, E Lara, EAD Mitchell, E Volcker et V Krashevskaya. 2020. « Soil protist life matters! » *Soil organisms* 92 (3): 189-196. doi:<https://doi.org/10.25674/so92iss3pp189>.
- Geisen, S, EAD Mitchell, S Adl, M Bonkowski, M Dunthorn, F Ekelund, LD Fernández, A Jousset, V Krashevskaya, D Singer, FW Spiegel, J Walochnik et E Lara. 2018. « Soil protists: A fertile frontier in soil biology research. » *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press. doi:10.1093/femsre/fuy006. <https://academic.oup.com/femsre/article/42/3/293/4855940>.
- Geissen, V, P Gomez-Rivera, E Huerta Lwanga, RB Mendoza, AT Narcías et EB Marcías. 2008. « Using earthworms to test the efficiency of remediation of oil-polluted soil in tropical Mexico. » *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71 (3): 638-642. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.02.015.
- Ghaley, BB, JR Porter et HS Sandhu. 2014. « Soil-based ecosystem services: A synthesis of

- nutrient cycling and carbon sequestration assessment methods. » *International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services and Management* 10 (3). Taylor and Francis Ltd.: 177-186. doi:10.1080/21513732.2014.926990.
- Ghazali, FM, RNZA Rahman, AB Salleh et M Basri. 2004. « Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. » *International Biodeterioration and Biodegradation* 54 (1): 61-67. doi:10.1016/j.ibiod.2004.02.002.
- Gibson, DT et RE Parales. 2000. « Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. » *Current Opinion in Biotechnology*. Current Biology Ltd. doi:10.1016/S0958-1669(00)00090-2.
- Gleba, D, N V. Borisjuk, LG Borisjuk, R Kneer, A Poulev, M Skarzhinskaya, S Dushenkov, S Logendra, YY Gleba et I Raskin. 1999. « Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (11): 5973-5977. doi:10.1073/pnas.96.11.5973.
- Glick, BR. 2003. « Phytoremediation: Synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. » *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/S0734-9750(03)00055-7.
- Glick, BR. 2005. « Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. » *FEMS Microbiology Letters*. doi:10.1016/j.femsle.2005.07.030.
- Glick, BR, D Penrose et J Li. 1998. « A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. » *Journal of theoretical biology* 190 (1): 63-8. doi:10.1006/jtbi.1997.0532. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9473391>.
- González-Chávez, MC, R Carrillo-González, SF Wright et KA Nichols. 2004. « The role of glomalin, a protein produced by arbuscular mycorrhizal fungi, in sequestering potentially toxic elements. » *Environmental Pollution* 130 (3). Elsevier: 317-323. doi:10.1016/j.envpol.2004.01.004.
- Gonzalez, E, NJB Brereton, J Marleau, W Guidi Nissim, M Labrecque, FE Pitre et S Joly. 2015. « Meta-transcriptomics indicates biotic cross-tolerance in willow trees cultivated on petroleum hydrocarbon contaminated soil. » *BMC Plant Biology* 15 (1): 246. doi:10.1186/s12870-015-0636-9. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/15/246>.
- Gonzalez, E, FE Pitre, AP Pagé, J Marleau, W Guidi Nissim, M St-Arnaud, M Labrecque, S Joly, E Yergeau et NJB Brereton. 2018. « Trees, fungi and bacteria: tripartite metatranscriptomics of a root microbiome responding to soil contamination. » *Microbiome* 6 (1): 53. doi:10.1186/s40168-018-0432-5. <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-018-0432-5>.
- Goyal, AK et GJ Zylstra. 1997. « Genetics of naphthalene and phenanthrene degradation by *Comamonas testosteroni*. » *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 19 (5-6). Springer: 401-407. doi:10.1038/sj.jim.2900476. <https://link.springer.com/article/10.1038/sj.jim.2900476>.
- Grenier, V, FE Pitre, W Guidi Nissim et M Labrecque. 2015. « Genotypic differences explain most of the response of willow cultivars to petroleum-contaminated soil. » *Trees - Structure and Function* 29 (3): 871-881. doi:10.1007/s00468-015-1168-5.
- Van Groenigen, JW, IM Lubbers, HMJ Vos, GG Brown, GB De Deyn et KJ Van Groenigen. 2014. « Earthworms increase plant production: a meta-analysis. » *Scientific Reports* 4 (2). Nature Publishing Group: 1-7. doi:10.1038/srep06365. [www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports).
- Guillen, M, P Sopelana et M Partearroyo. 1997. « Food as a source of polycyclic aromatic carcinogens. » *Reviews on Environmental Health* 12: 133-146.
- Guo, M, Z Gong, R Miao, C Jia, J Rookes, D Cahill et J Zhuang. 2018. « Enhanced polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in rhizosphere soil planted with tall fescue: Bacterial community and functional gene expression mechanisms. » *Chemosphere* 212. Elsevier Ltd: 15-23. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.08.057.
- Guo, M, Z Gong, R Miao, J Rookes, D Cahill et J Zhuang. 2017a. « Microbial mechanisms controlling the rhizosphere effect of ryegrass on degradation of polycyclic aromatic

- hydrocarbons in an aged-contaminated agricultural soil. » *Soil Biology and Biochemistry* 113. Elsevier Ltd: 130-142. doi:10.1016/j.soilbio.2017.06.006. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071717301888>.
- Guo, M, Z Gong, R Miao, D Su, X Li, C Jia et J Zhuang. 2017b. « The influence of root exudates of maize and soybean on polycyclic aromatic hydrocarbons degradation and soil bacterial community structure. » *Ecological Engineering* 99. Elsevier B.V.: 22-30. doi:10.1016/j.ecoleng.2016.11.018.
- Gurska, J, W Wang, KE Gerhardt, AM Khalid, DM Isherwood, XD Huang, BR Glick et BM Greenberg. 2009. « Three year field test of a plant growth promoting rhizobacteria enhanced phytoremediation system at a land farm for treatment of hydrocarbon waste. » *Environmental Science and Technology* 43 (12): 4472-4479. doi:10.1021/es801540h.
- Gutiérrez-Mañero, FJ, B Ramos-Solano, A Probanza, J Mehouchi, FR Tadeo et M Talon. 2001. « The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. » *Physiologia Plantarum* 111 (2): 206-211. doi:10.1034/j.1399-3054.2001.1110211.x.
- Guzik, U, K Hupert-Kocurek et D Wojcieszysk. 2013. « Intradiol Dioxygenases — The Key Enzymes in Xenobiotics Degradation. » In *Biodegradation of Hazardous and Special Products*. s.l.: s.n. doi:10.5772/56205.
- Habe, H et T Omori. 2003. « Genetics of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism in diverse aerobic bacteria. » *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67 (2): 225-243. doi:10.1271/bbb.67.225. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.67.225>.
- Haichar, F el Z, C Marol, O Berge, JI Rangel-Castro, JI Prosser, J Balesdent, T Heulin, W Achouak et CMOBJR-CJPJB F el Zahar Haichar. 2008. « Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. » *The ISME Journal* 2 (12): 1221-1230. doi:10.1038/ismej.2008.80. <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/ismej.2008.80>.
- Hainaut, P et GP Pfeifer. 2001. « Patterns of p53→T transversions in lung cancers reflect the primary mutagenic signature of DNA-damage by tobacco smoke. » *Carcinogenesis* 22 (3). *Carcinogenesis*: 367-374. doi:10.1093/carcin/22.3.367. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11238174/>.
- Hamdi, H, S Benzarti, L Manusadžianas, I Aoyama et N Jedidi. 2007. « Solid-phase bioassays and soil microbial activities to evaluate PAH-spiked soil ecotoxicity after a long-term bioremediation process simulating landfarming. » *Chemosphere* 70 (1): 135-143. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.06.043.
- Hamel, C. 2007. *Mycorrhizae in Crop Production*. Sous la dir. de Chantal Hamel. *Mycorrhizae in Crop Production*, 1st éd. Boca Raton: CRC Press. doi:10.1201/9781482277845. <https://www.taylorfrancis.com/books/9781482277845>.
- Haque, E. 2018. « Effects of Collembola of Soil aggregate formation and stabilization: A trait-based approach. »
- Harayama, S, M Kok et EL Neidle. 1992. « Functional and Evolutionary Relationships Among Diverse Oxygenases. » *Annual Review of Microbiology* 46: 565-601. doi:10.1146/annurev.micro.46.1.565.
- Haritash, AKK et CPP Kaushik. 2009. « Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. » *Journal of Hazardous Materials* 169 (1-3). Elsevier: 1-15. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.03.137. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389409005494>.
- Harms, H, D Schlosser et LY Wick. 2011. « Untapped potential: Exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. » *Nature Reviews Microbiology*. doi:10.1038/nrmicro2519.
- Hartmann, A, M Schmid, D van Tuinen et G Berg. 2009. « Plant-driven selection of microbes. » *Plant and Soil*. doi:10.1007/s11104-008-9814-y.
- Harvey, RG. 1982. « Polycyclic Hydrocarbons and Cancer: Certain common environmental pollutants are converted by mammalian cells into metabolites that can induce cancer through

- their reactions with cellular nucleic acids on JSTOR. » *American Scientist* 70 (4): 386-393. [https://www.jstor.org/stable/27851546?seq=1#metadata\\_info\\_tab\\_contents](https://www.jstor.org/stable/27851546?seq=1#metadata_info_tab_contents).
- Harwood, CS et RE Parales. 1996. « THE  $\beta$ -KETOADIPATE PATHWAY AND THE BIOLOGY OF SELF-IDENTITY. » *Annual Review of Microbiology* 50 (1): 553-590. doi:10.1146/annurev.micro.50.1.553.
- Hassan, SED, TH Bell, FOP Stefani, D Denis, M Hijri et M St-Arnaud. 2014. « Contrasting the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi from hydrocarbon-contaminated and uncontaminated soils following willow (*Salix* spp. L.) planting. » *PLoS ONE* 9 (7). doi:10.1371/journal.pone.0102838.
- Haubert, D, MM Häggblom, S Scheu et L Ruess. 2008. « Effects of temperature and life stage on the fatty acid composition of Collembola. » *European Journal of Soil Biology* 44 (2). Elsevier Masson: 213-219. doi:10.1016/j.ejsobi.2007.09.003.
- Heinaru, E, M Merimaa, S Viggor, M Lehiste, I Leito, J Truu et A Heinaru. 2005. « Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol- and oil-polluted area. » *FEMS Microbiology Ecology* 51 (3): 363-373. doi:10.1016/j.femsec.2004.09.009. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16329884>.
- Hernández-Castellanos, B, A Ortíz-Ceballos, S Martínez-Hernández, JC Noa-Carrazana, M Luna-Guido, L Dendooven et SM Contreras-Ramos. 2013. « Removal of benzo (a) pyrene from soil using an endogeic earthworm *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857). » *Applied Soil Ecology*. doi:10.1016/j.apsoil.2013.04.009.
- Hickman, ZA et BJ Reid. 2008. « Earthworm assisted bioremediation of organic contaminants. » *Environment International* 34 (7). Pergamon: 1072-1081. doi:10.1016/J.ENVINT.2008.02.013. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412008000342>.
- Hiltner, L. 1904. « Ober neuere Erfahrungen und problem auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter plant symbiots. » *Nature Reviews Microbiology* 98: 59-78. [https://scholar.google.com/scholar?q=Hiltner+L+%281904%29+Über+neuere+Erfahrungen+und+Probleme+auf+dem+Gebiete+der+Bodenbakteriologie+unter+besonderer+Berücksichtigung+der+Gründung+und+Brache.+Arb+DLG+98%3A59-78&btnG=&hl=en&as\\_sdt=0%2C5#1](https://scholar.google.com/scholar?q=Hiltner+L+%281904%29+Über+neuere+Erfahrungen+und+Probleme+auf+dem+Gebiete+der+Bodenbakteriologie+unter+besonderer+Berücksichtigung+der+Gründung+und+Brache.+Arb+DLG+98%3A59-78&btnG=&hl=en&as_sdt=0%2C5#1).
- Hong, Y, D Liao, J Chen, S Khan, J Su et H Li. 2015. « A comprehensive study of the impact of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination on salt marsh plants *Spartina alterniflora*: Implication for plant-microbe interactions in phytoremediation. » *Environmental Science and Pollution Research* 22 (9). Springer Verlag: 7071-7081. doi:10.1007/s11356-014-3912-6.
- Hooper, DUU, FSS Chapin, JJJ Ewel, A Hector, P Inchausti, S Lavorel, JHH Lawton, DMM Lodge, M Loreau, S Naeem, B Schmid, H Setälä, AJJ Symstad, J Vandermeer et DAA Wardle. 2005. « Effects of biodiversity on ecosystem functioning: A consensus of current knowledge. » *Ecological Monographs* 75 (1). Ecological Society of America: 3-35. doi:10.1890/04-0922.
- Hoppe, B, D Krüger, T Kahl, T Arnstadt, F Buscot, J Bauhus et T Wubet. 2015. « A pyrosequencing insight into sprawling bacterial diversity and community dynamics in decaying deadwood logs of *Fagus sylvatica* and *Picea abies*. » *Scientific Reports*. doi:10.1038/srep09456.
- Hormisch, D, I Brost, GW Kohring, F Giffhorn, RM Kroppenstedt, E Stackebrandt, P Färber et WH Holzappel. 2004. « *Mycobacterium fluoranthivorans* sp. nov., a fluoranthene and aflatoxin B1 degrading bacterium from contaminated soil of a former coal gas plant. » *Systematic and Applied Microbiology* 27 (6). Elsevier GmbH: 653-660. doi:10.1078/0723202042369866.
- Howsam, M et KC Jones. 1998. « Sources of PAHs in the Environment. » In , 137-174. s.l.: Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-49697-7\_4. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-49697-7\\_4](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-49697-7_4).



- Huang, XF, JM Chaparro, KF Reardon, R Zhang, Q Shen et JM Vivanco. 2014. « Rhizosphere interactions: Root exudates, microbes, and microbial communities1. » *Botany*. doi:10.1139/cjb-2013-0225.
- Hubbard, M, JJ Germida et V Vujanovic. 2014. « Fungal endophyte colonization coincides with altered DNA methylation in drought-stressed wheat seedlings. » *Canadian Journal of Plant Science* 94 (2): 223-234. doi:10.4141/cjps2012-111. <http://pubs.aic.ca/doi/abs/10.4141/cjps2012-111>.
- Huling, SG et BE Pivetz. 2006. « In-situ chemical oxidation. » Cincinnati: s.n. <https://apps.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/a507297.pdf>.
- Hultgren, J, L Pizzul, MDP Castillo et U Granhall. 2010. « Degradation of pah in a creosote-contaminated soil. A comparison between the effects of willows (*Salix Viminalis*), wheat straw and a nonionic surfactant. » *International Journal of Phytoremediation* 12 (1): 54-66. doi:10.1080/15226510902767122.
- Hünninghaus, M, R Koller, S Kramer, S Marhan, E Kandeler et M Bonkowski. 2017. « Changes in bacterial community composition and soil respiration indicate rapid successions of protist grazers during mineralization of maize crop residues. » *Pedobiologia* 62. Elsevier GmbH: 1-8. doi:10.1016/j.pedobi.2017.03.002. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031405616301822>.
- Ifeoluwa, SE, TE Theophilus, AE Ogunware, YE Oyende et AO Onakomaiya. 2020. « Degradation of Phenanthrene and some selected Petroleum Hydrocarbons by *Lysinibacillus fusiformis* (ALSL 5). » *Journal of Experimental Sciences*. TathQeef Scientific Publishing: 5-10. doi:10.25081/jes.2020.v11.6192. <http://updatepublishing.com/journal/index.php/jes>.
- Iffis, B, M St-Arnaud et M Hijri. 2016. « Petroleum hydrocarbon contamination, plant identity and arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) community determine assemblages of the AMF spore-associated microbes. » *Environmental microbiology*. doi:10.1111/1462-2920.13438.
- . 2017. « Petroleum contamination and plant identity influence soil and root microbial communities while AMF spores retrieved from the same plants possess markedly different communities. » *Frontiers in Plant Science*. doi:10.3389/fpls.2017.01381.
- Innocenti, G et MA Sabatini. 2018. « Collembola and plant pathogenic, antagonistic and arbuscular mycorrhizal fungi: a review. » *Bulletin of Insectology* 71 (1): 71-76.
- Jacques, RJS, BC Okeke, FM Bento, AS Teixeira, MCR Peralba et FAO Camargo. 2008. « Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. » *Bioresource Technology* 99 (7): 2637-2643. doi:10.1016/j.biortech.2007.04.047.
- Jager, T. 1998. « Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (oligochaeta). » *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (10): 2080-2090. doi:10.1897/1551-5028(1998)017<2080:MAFEBO>2.3.CO;2.
- James, SW et TR Seastedt. 1986. « Nitrogen mineralization by native and introduced earthworms: effects on big bluestem growth. » *Ecology* 67 (4): 1094-1097. doi:10.2307/1939833.
- Jeffrey, AM, HJC Yeh, DM Jerina, TR Patel, JF Davey et DT Gibson. 1975. « Initial Reactions in the Oxidation of Naphthalene by *Pseudomonas Putida*. » *Biochemistry* 14 (3). American Chemical Society: 575-584. doi:10.1021/bi00674a018. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00674a018>.
- Jeon, CO, W Park, WC Ghiorse et EL Madsen. 2004. « *Polaromonas naphthalenivorans* sp. nov., a naphthalene-degrading bacterium from naphthalene-contaminated sediment. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (1). Microbiology Society: 93-97. doi:10.1099/ijs.0.02636-0. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijs.0.02636-0>.
- Jha, CK, K Annapurna et M Saraf. 2012. « Isolation of Rhizobacteria from *Jatropha curcas* and characterization of produced ACC deaminase. » *Journal of Basic Microbiology* 52 (3):

- 285-295. doi:10.1002/jobm.201100113.
- Jiang, L, M Song, C Luo, D Zhang et G Zhang. 2015. « Novel phenanthrene-degrading bacteria identified by DNA-stable isotope probing. » Sous la dir. de Stephen J. Johnson. *PLoS ONE* 10 (6). Public Library of Science: e0130846. doi:10.1371/journal.pone.0130846.
- Jing, Y, Y Li, Z Liu, Y Zhang, P Liu, M Sun et J Luo. 2017. « Effects of Bacterial-Feeding Nematodes and Glucose on Phenanthrene Removal by *Pseudomonas putida*. » *Pedosphere* 27 (1). Soil Science Society of China: 165-171. doi:10.1016/S1002-0160(15)60103-5. [http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(15\)60103-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(15)60103-5).
- Johns, NI, T Blazejewski, AL Gomes et HH Wang. 2016. « Principles for designing synthetic microbial communities. » *Current Opinion in Microbiology*. NIH Public Access. doi:10.1016/j.mib.2016.03.010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27084981>.
- Johnson, D, M Krsek, EMH Wellington, AW Stott, L Cole, RD Bardgett, DJ Read et JR Leake. 2005. « Soil invertebrates disrupt carbon flow through fungal networks. » *Science* 309 (5737). American Association for the Advancement of Science: 1047. doi:10.1126/science.1114769. [www.sciencemag.org/cgi/content/full/309/5737/1047/](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/309/5737/1047/).
- Joner, EJ, A Johansen, AP Loibner, MA Dela Cruz, OHJ Szolar, JM Portal et C Leyval. 2001. « Rhizosphere effects on microbial community structure and dissipation and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in spiked soil. » *Environmental Science and Technology* 35 (13): 2773-2777. doi:10.1021/es000288s.
- Jones, DL. 1998. « Organic acids in the rhizosphere - A critical review. » *Plant and Soil*. doi:10.1023/A:1004356007312. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023/A:1004356007312.pdf>.
- Jones, DL, A Hodge et Y Kuzyakov. 2004. « Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. » *New Phytologist* 163 (3). Blackwell Science Ltd: 459-480. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01130.x. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-8137.2004.01130.x>.
- Jones, KC, JA Stratford, KS Waterhouse, ET Furlong, W Giger, RA Hites, C Schaffner et AE Johnston. 1989. « Increases in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of an agricultural soil over the last century. » *Environmental Science and Technology* 23 (1). American Chemical Society: 95-101. doi:10.1021/es00178a012. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es00178a012>.
- Jonsson, FA. 2012. « The Industrial Revolution in the Anthropocene. » *Journal of Modern History*. University of Chicago Press Chicago, IL. doi:10.1086/666049.
- Jürgens, K, H Arndt et H Zimmermann. 1997. « Impact of metazoan and protozoan grazers on bacterial biomass distribution in microcosm experiments. » *Aquatic Microbial Ecology* 12 (2): 131-138. doi:10.3354/ame012131.
- Jusselme, MD, F Poly, T Lebeau, C Rouland-lefèvre et E Miambi. 2015. « Effects of earthworms on the fungal community and microbial activity in root-adhering soil of *Lantana camara* during phytoextraction of lead. » *Applied Soil Ecology* 96. Elsevier B.V.: 151-158. doi:10.1016/j.apsoil.2015.07.011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.07.011>.
- Kadri, T, T Rouissi, S Kaur Brar, M Cledon, S Sarma et M Verma. 2017. « Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. » *Journal of Environmental Sciences (China)* 51. Chinese Academy of Sciences: 52-74. doi:10.1016/j.jes.2016.08.023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2016.08.023>.
- Kanaly, RA, S Harayama et SH RA Kanaly. 2000. *Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 182. s.l.: American Society for Microbiology. doi:10.1128/JB.182.8.2059-2067.2000.
- Kang, B, L Osburn, D Kopsell, GA Tuskan et ZM Cheng. 2009. « Micropropagation of *Populus trichocarpa* "Nisqually-1": The genotype deriving the *Populus* reference genome. » *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 99 (3): 251-257. doi:10.1007/s11240-009-9596-9.
- Karigar, CS et SS Rao. 2011. « Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. » *Enzyme Research*. Hindawi. doi:10.4061/2011/805187.

- Kauppi, B, K Lee, E Carredano, RE Parales, DT Gibson, H Eklund et S Ramaswamy. 1998. « Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase – naphthalene 1,2-dioxygenase. » *Structure* 6 (5): 571-586. doi:10.1016/S0969-2126(98)00059-8. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0969212698000598>.
- Kawamura, Y, E Kamata, Y Ogawa, T Kaneko, S Uchiyama et Y Saito. 1988. « The Effect of Various Foods on the Intestinal Absorption of Benzo(a)pyrene in Rats. » *Journal of the Food Hygienic Society of Japan* 29 (1). Japanese Society for Food Hygiene and Safety: 21. doi:10.3358/shokueishi.29.21. <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/shokueishi1960/29.21?from=CrossRef>.
- Keith, LH. 2015. « The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants. » *Polycyclic Aromatic Compounds* 35 (2-4): 147-160. doi:10.1080/10406638.2014.892886.
- Khan, N et A Bano. 2016. « Modulation of phytoremediation and plant growth by the treatment with PGPR, Ag nanoparticle and untreated municipal wastewater. » *International Journal of Phytoremediation* 18 (12): 1258-1269. doi:10.1080/15226514.2016.1203287.
- Khan, Z, D Roman, T Kintz, M delas Alas, R Yap et S Doty. 2014. « Degradation, Phytoprotection and Phytoremediation of Phenanthrene by Endophyte *Pseudomonas putida*, PD1. » *Environmental Science & Technology* 48 (20). American Chemical Society: 12221-12228. doi:10.1021/es503880t. <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/es503880t>.
- Kielak, AM, TR Scheublin, LW Mendes, JA van Veen et EE Kuramae. 2016. « Bacterial community succession in pine-wood decomposition. » *Frontiers in Microbiology* 7 (MAR). Frontiers Media S.A.: 231. doi:10.3389/fmicb.2016.00231. [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org).
- Kim, K-H, SA Jahan, E Kabir et RJC Brown. 2013. « A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. » *Environment International* 60. Elsevier Ltd: 71-80. doi:10.1016/j.envint.2013.07.019. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0160412013001633>.
- Kizilkaya, R. 2009. « Nitrogen fixation capacity of *Azotobacter* spp. strains isolated from soils in different ecosystems and relationship between them and the microbiological properties of soils. » *Journal of Environmental Biology* 30 (1): 73-82. <http://www.jeb.co.in/info@jeb.co.in>.
- Kloepper, JW et MN Schroth. 1978. « Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. » In *Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria*, 2:879-882. Tours, France: s.n.
- Kohl, SD et JA Rice. 1999. « Contribution of lipids to the nonlinear sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to soil organic matter. » In *Organic Geochemistry*, 30:929-936. s.l.: Pergamon. doi:10.1016/S0146-6380(99)00076-5.
- Košnář, Z, F Mercl et P Tlustoš. 2020. « Long-term willows phytoremediation treatment of soil contaminated by fly ash polycyclic aromatic hydrocarbons from straw combustion. » *Environmental Pollution* 264. Elsevier Ltd: 114787. doi:10.1016/j.envpol.2020.114787.
- Kowalchuk, GA, DS Buma, W De Boer, PGL Klinkhamer et JA Van Veen. 2002. « Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. » *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* 81 (1-4): 509-520. doi:10.1023/A:1020565523615.
- Krauss, M, W Wilcke et W Zech. 2000. « Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) to earthworms in urban soils. » *Environmental Science and Technology* 34 (20): 4335-4340. doi:10.1021/es001137s.
- Kucab, JE, X Zou, S Morganella, M Joel, AS Nanda, E Nagy, C Gomez, A Degasperi, R Harris, SP Jackson, VM Arlt, DH Phillips et S Nik-Zainal. 2019. « A Compendium of Mutational Signatures of Environmental Agents. » *Cell* 177 (4). Cell Press: 821-836.e16. doi:10.1016/j.cell.2019.03.001.
- Kuhn, A, HJ Ballach et R Wittig. 2004. « Studies in the Biodegradation of 5 PAHs (Phenanthrene, Pyrene, Fluoranthene, Chrysene und Benzo(a)pyrene) in the Presence of Rooted Poplar Cuttings. » *Environmental Science and Pollution Research* 11 (1). Springer Verlag: 22-32.

- doi:10.1065/espr2003.11.178. <https://link.springer.com/article/10.1065/espr2003.11.178>.
- Kuiper, I, EL Lagendijk, G V. Bloemberg et BJJ Lugtenberg. 2004. « Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction. » *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17 (1). The American Phytopathological Society : 6-15. doi:10.1094/MPMI.2004.17.1.6. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI.2004.17.1.6>.
- Kuppusamy, S, T Palanisami, M Megharaj, K Venkateswarlu et R Naidu. 2016. « Ex-situ remediation technologies for environmental pollutants: A critical perspective. » In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 236:117-192. s.l.: Springer New York LLC. doi:10.1007/978-3-319-20013-2\_2. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-20013-2\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-20013-2_2).
- Kuppusamy, S, P Thavamani, K Venkateswarlu, YB Lee, R Naidu et M Megharaj. 2017. « Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. » *Chemosphere*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.10.115.
- Kuramae, EE, E Yergeau, LC Wong, AS Pijl, JA Van Veen et GA Kowalchuk. 2012. « Soil characteristics more strongly influence soil bacterial communities than land-use type. » *FEMS Microbiology Ecology*. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01192.x.
- Kuypers, MMMM, HK Marchant et B Kartal. 2018. « The microbial nitrogen-cycling network. » *Nature Reviews Microbiology* 16 (5): 263-276. doi:10.1038/nrmicro.2018.9. [www.nature.com/nrmicro](http://www.nature.com/nrmicro).
- Kuzovkina, YA et TA Volk. 2009. « The characterization of willow (*Salix L.*) varieties for use in ecological engineering applications: Co-ordination of structure, function and autecology. » *Ecological Engineering* 35 (8). Elsevier: 1178-1189. doi:10.1016/j.ecoleng.2009.03.010. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925857409000810>.
- Kuzyakov, Y et E Blagodatskaya. 2015. « Microbial hotspots and hot moments in soil: Concept & review. » *Soil Biology and Biochemistry*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.soilbio.2015.01.025.
- Kuzyakov, Y et K Mason-Jones. 2018. « Viruses in soil: Nano-scale undead drivers of microbial life, biogeochemical turnover and ecosystem functions. » *Soil Biology and Biochemistry*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.soilbio.2018.09.032.
- de la Porte, A, R Schmidt, É Yergeau et P Constant. 2020. « A Gaseous Milieu: Extending the Boundaries of the Rhizosphere. » *Trends in Microbiology*. doi:10.1016/j.tim.2020.02.016.
- Labrecque, M et SL Lajeunesse. 2017. « Guide de production de saules en culture intensive sur courtes rotations. » *Réseau des plantes bio-industrielles du Québec*. s.l.: s.n. [https://www.agrireseau.net/documents/Document\\_96859.pdf](https://www.agrireseau.net/documents/Document_96859.pdf).
- Ladino-Orjuela, G, E Gomes, R da Silva, C Salt et JR Parsons. 2016. « Metabolic pathways for degradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. » In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 237:105-121. s.l.: s.n. doi:10.1007/978-3-319-23573-8\_5.
- Lareen, A, F Burton et P Schäfer. 2016. « Plant root-microbe communication in shaping root microbiomes. » *Plant Molecular Biology* 90 (6): 575-587. doi:10.1007/s11103-015-0417-8.
- Larsen, J, J Alexander, H Atrup, S Barlow, R Crebelli, D Gott, A Knaap, C Lambre, F van Leeuwen, E Menichini, J Schlatter, R Walker et D Yates. 2002. « Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. » *SCF/CS/CNTM/PAH/29 Final*. s.l.: s.n. [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com\\_scf\\_out153\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out153_en.pdf).
- Larsson, BK. 1985. « Polycyclic aromatic hydrocarbons and lead in roadside lettuce and rye grain. » *Journal of the Science of Food and Agriculture* 36 (6). John Wiley & Sons, Ltd: 463-470. doi:10.1002/jsfa.2740360607. <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2740360607>.
- Lauber, CL, M Hamady, R Knight et N Fierer. 2009. « Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. » *Applied and Environmental Microbiology* 75 (15). American Society for Microbiology: 5111-5120. doi:10.1128/AEM.00335-09. <http://aem.asm.org/>.

- Laurent, C, C Feidt, E Lichtfouse, N Grova, F Laurent et G Rychen. 2001. « Milk-blood transfer of <sup>14</sup>C-tagged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in pigs. » *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (5). American Chemical Society: 2493-2496. doi:10.1021/jf0014011. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- Lavelle, P et A V Spain. 2001. *Soil ecology*. s.l.: Springer Science & Business Media.
- Lee, S-HH, W-SS Lee, C-HH Lee et J-GG Kim. 2008. « Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. » *Journal of Hazardous Materials* 153 (1-2). Elsevier: 892-898. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.09.041. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389407013313>.
- Leininger, S, T Urich, M Schloter, L Schwark, J Qi, GW Nicol, JI Prosser, SC Schuster et C Schleper. 2006. « Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. » *Nature* 442 (7104): 806-809. doi:10.1038/nature04983. <http://www.nature.com/articles/nature04983>.
- Lemaire, J, M Buès, T Kabeche, K Hanna et MO Simonnot. 2013. « Oxidant selection to treat an aged PAH contaminated soil by in situ chemical oxidation. » *Journal of Environmental Chemical Engineering* 1 (4). Elsevier: 1261-1268. doi:10.1016/j.jece.2013.09.018.
- Li, J, C Luo, D Zhang, X Cai, L Jiang, X Zhao et G Zhang. 2019. « Diversity of the active phenanthrene degraders in PAH-polluted soil is shaped by ryegrass rhizosphere and root exudates. » *Soil Biology and Biochemistry* 128 (March 2018). Elsevier: 100-110. doi:10.1016/j.soilbio.2018.10.008. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.10.008>.
- Li, J, D Zhang, M Song, L Jiang, Y Wang, C Luo, G Zhang, DZMSLJYWCL J Li, J Li, D Zhang, M Song, L Jiang, Y Wang, C Luo et G Zhang. 2017. « Novel bacteria capable of degrading phenanthrene in activated sludge revealed by stable-isotope probing coupled with high-throughput sequencing. » *Biodegradation* 28 (5-6). Springer Netherlands. doi:10.1007/s10532-017-9806-9.
- Li, S-W, Y-X Huang et M-Y Liu. 2020. « Transcriptome profiling reveals the molecular processes for survival of *Lysinibacillus fusiformis* strain 15-4 in petroleum environments. » *Ecotoxicology and Environmental Safety* 192. Academic Press: 110250. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.110250. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651320300890>.
- Li, X, Z Lin, C Luo, J Bai, Y Sun et Y Li. 2015. « Enhanced microbial degradation of pentachlorophenol from soil in the presence of earthworms: Evidence of functional bacteria using DNA-stable isotope probing. » *Soil Biology and Biochemistry* 81: 168-177. doi:10.1016/j.soilbio.2014.11.011.
- Li, X, Y Wang, S Wu, L Qiu, L Gu, J Li, B Zhang et W Zhong. 2014. « Peculiarities of metabolism of anthracene and pyrene by laccase-producing fungus *Pycnoporus sanguineus* H1. » *Biotechnology and Applied Biochemistry* 61 (5). Wiley-Blackwell Publishing Ltd: 549-554. doi:10.1002/bab.1197. <http://doi.wiley.com/10.1002/bab.1197>.
- Limmer, M et J Burken. 2016. « Phytovolatilization of Organic Contaminants. » *Environmental Science and Technology*. American Chemical Society. doi:10.1021/acs.est.5b04113. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.
- Lin, H, S Tao, Q Zuo et RM Coveney. 2007. « Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons by maize plants. » *Environmental Pollution* 148 (2). Elsevier: 614-619. doi:10.1016/j.envpol.2006.11.026.
- Ling, N, W Zhang, D Wang, J Mao, Q Huang, S Guo et Q Shen. 2013. « Root Exudates from Grafted-Root Watermelon Showed a Certain Contribution in Inhibiting *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum. » *PLoS ONE* 8 (5). doi:10.1371/journal.pone.0063383.
- Liu, L, X Huang, J Zhao, J Zhang et Z Caia. 2019. « Characterizing the key agents in a disease-suppressed soil managed by reductive soil disinfestation. » *Applied and Environmental Microbiology* 85 (7). American Society for Microbiology. doi:10.1128/AEM.02992-18. <https://doi.org/10.1128/AEM>.

- Liu, R, Y Dai et L Sun. 2015. « Effect of rhizosphere enzymes on phytoremediation in PAH-contaminated soil using five plant species. » Sous la dir. de Rita Grosch. *PLoS ONE* 10 (3). Public Library of Science: e0120369. doi:10.1371/journal.pone.0120369. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0120369>.
- Liu, T, L Yu, J Xu, X Yan, H Li, JK Whalen et F Hu. 2017. « Bacterial traits and quality contribute to the diet choice and survival of bacterial-feeding nematodes. » doi:10.1016/j.soilbio.2017.09.014. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.09.014>.
- Liu, W, J Hou, Q Wang, L Ding et Y Luo. 2014. « Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria and their effects on phytoremediation of petroleum-contaminated saline-alkali soil. » *Chemosphere* 117. Pergamon: 303-308. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2014.07.026. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653514008868>.
- Lladó, S, R López-Mondéjar et P Baldrian. 2017. « Forest Soil Bacteria: Diversity, Involvement in Ecosystem Processes, and Response to Global Change. » *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. doi:10.1128/mmb.00063-16.
- Louca, S, MF Polz, F Mazel, MBN Albright, JA Huber, MI O'Connor, M Ackermann, AS Hahn, DS Srivastava, SA Crowe, M Doebeli et LW Parfrey. 2018. « Function and functional redundancy in microbial systems. » *Nature Ecology and Evolution* 2 (6): 936-943. doi:10.1038/s41559-018-0519-1.
- Louvel, B, A Cébron et C Leyval. 2011. « Root exudates affect phenanthrene biodegradation, bacterial community and functional gene expression in sand microcosms. » *International Biodeterioration and Biodegradation* 65 (7). Elsevier Ltd: 947-953. doi:10.1016/j.ibiod.2011.07.003. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0964830511001399>.
- Lu, L, J Zhang et C Peng. 2019. « Shift of Soil Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Dissipation Pattern and Microbial Community Composition due to Rhamnolipid Supplementation. » *Water, Air, and Soil Pollution* 230 (5). Springer International Publishing. doi:10.1007/s11270-019-4118-9.
- Lu, Y-F et M Lu. 2015. « Remediation of PAH-contaminated soil by the combination of tall fescue, arbuscular mycorrhizal fungus and epigeic earthworms. » *Journal of Hazardous Materials* 285. Elsevier B.V.: 535-541. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.07.021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.07.021>.
- Lu, Y-F, M Lu, F Peng, Y Wan et M-H Liao. 2014. « Remediation of polychlorinated biphenyl-contaminated soil by using a combination of ryegrass, arbuscular mycorrhizal fungi and earthworms. » *Chemosphere* 106. Pergamon: 44-50. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653514000265>.
- Lubrano, L. 1992. « Micropropagation of Poplars (*Populus* spp.). » In *Biotechnology in agriculture and forestry 18: High-Tech and Micropropagation II*, sous la dir. de Y. P. S. Bajaj, 151-178. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-76422-6\_8.
- Luepromchai, E, AC Singer, C-H Yang et DE Crowley. 2002. « Interactions of earthworms with indigenous and bioaugmented PCB-degrading bacteria. » *FEMS Microbiology Ecology* 41 (3): 191-197. doi:10.1111/j.1574-6941.2002.tb00980.x. <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00980.x>.
- Lumactud, R, SY Shen, M Lau et R Fulthorpe. 2016. « Bacterial endophytes isolated from plants in natural oil seep soils with chronic hydrocarbon contamination. » *Frontiers in Microbiology* 7 (MAY). doi:10.3389/fmicb.2016.00755.
- Lundberg, DS, SL Lebeis, S Herrera Paredes, S Yourstone, J Gehring, S Malfatti, J Tremblay, A Engelbrekton, V Kunin, T Glavina del Rio, RC Edgar, T Eickhorst, RE Ley, P Hugenholtz, SG Tringe et JL Dangl. 2012. « Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. » *Nature* 488 (7409). Nature Publishing Group: 86-90. doi:10.1038/nature11237. <http://dx.doi.org/10.1038/nature11237>.

- Luo, J, S Qi, XWS Gu, J Wang et X Xie. 2016. « Evaluation of the phytoremediation effect and environmental risk in remediation processes under different cultivation systems. » *Journal of Cleaner Production* 119. Elsevier Ltd: 25-31. doi:10.1016/j.jclepro.2016.01.043. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.01.043>.
- Luo, Z Bin, D Janz, X Jiang, C Göbel, H Wildhagen, Y Tan, H Rennenberg, I Feussner et A Polle. 2009. « Upgrading root physiology for stress tolerance by ectomycorrhizas: Insights from metabolite and transcriptional profiling into reprogramming for stress anticipation. » *Plant Physiology* 151 (4): 1902-1917. doi:10.1104/pp.109.143735.
- Ma, B, Y He, H Chen, J Xu et Z Rengel. 2010. « Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the rhizosphere: Synthesis through meta-analysis. » *Environmental Pollution* 158 (3). Elsevier: 855-861. doi:10.1016/J.ENVPOL.2009.09.024. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749109004758>.
- Ma, WC, A Van Kleunen, J Immerzeel et P Gert-Jan De Maagd. 1998. « Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by earthworms: Assessment of equilibrium partitioning theory in in situ studies and water experiments. » *Environmental Toxicology and Chemistry* 17 (9): 1730-1737. doi:10.1002/etc.5620170913.
- Maaß, S, T Caruso et MC Rillig. 2015. « Functional role of microarthropods in soil aggregation. » *Pedobiologia* 58 (2-3): 59-63. doi:10.1016/j.pedobi.2015.03.001.
- Mackay, D et D Calcott. 1998. « Partitioning and Physical Chemical Properties of PAHs. » In *PAHs and Related Compounds. The Handbook of Environmental Chemistry (Anthropogenic Compounds)*, sous la dir. de A H Neilson, 325-345. s.l.: Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-49697-7\_8. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-49697-7\\_8](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-49697-7_8).
- Madsen, EL et M Alexander. 1982. « Transport of Rhizobium and Pseudomonas through Soil. » *Soil Science Society of America Journal* 46 (3): 557-560. doi:10.2136/sssaj1982.03615995004600030023x.
- Mahé, F, C De Vargas, D Bass, L Czech, A Stamatakis, E Lara, D Singer, J Mayor, J Bunge, S Sernaker, T Siemensmeyer, I Trautmann, S Romac, C Berney, A Kozlov, EAD Mitchell, CVW Seppey, E Egge, G Lentendu, R Wirth, G Trueba et M Dunthorn. 2017. « Parasites dominate hyperdiverse soil protist communities in Neotropical rainforests. » *Nature Ecology and Evolution*. doi:10.1038/s41559-017-0091.
- Mallick, S, J Chakraborty et TK Dutta. 2011. « Role of oxygenases in guiding diverse metabolic pathways in the bacterial degradation of low-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. » *Critical Reviews in Microbiology* 37 (1): 64-90. doi:10.3109/1040841X.2010.512268. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/1040841X.2010.512268>.
- Mallick, S et TK Dutta. 2008. « Kinetics of phenanthrene degradation by Staphylococcus sp. strain PN/Y involving 2-hydroxy-1-naphthoic acid in a novel metabolic pathway. » *Process Biochemistry* 43 (9): 1004-1008. doi:10.1016/j.procbio.2008.04.022.
- Mallon, CA, X Le Roux, GS van Doorn, F Dini-Andreote, F Poly et JF Salles. 2018. « The impact of failure: unsuccessful bacterial invasions steer the soil microbial community away from the invader's niche. » *The ISME Journal*. Nature Publishing Group: 1. doi:10.1038/s41396-017-0003-y. <http://www.nature.com/articles/s41396-017-0003-y>.
- Manschadi, AM, J Christopher, P deVoil et GL Hammer. 2006. « The role of root architectural traits in adaptation of wheat to water-limited environments. » *Functional Plant Biology* 33 (9). CSIRO PUBLISHING: 823. doi:10.1071/FP06055. <http://www.publish.csiro.au/?paper=FP06055>.
- Marcial Gomes, NC, O Fagbola, R Costa, N Gouvea Rumjanek, A Buchner, L Mendona-Hagler et K Smalla. 2003. « Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics. » *Applied and Environmental Microbiology* 69 (7). American Society for Microbiology: 3758-3766. doi:10.1128/AEM.69.7.3758-3766.2003.

- <http://aem.asm.org/content/69/7/3758.short>.
- Maron, P-A, A Sarr, A Kaisermann, J Lévêque, O Mathieu, J Guigue, B Karimi, L Bernard, S Dequiedt, S Terrat, A Chabbi et L Ranjard. 2018. « High Microbial Diversity Promotes Soil Ecosystem Functioning. » Sous la dir. de Harold L. Drake. *Applied and Environmental Microbiology* 84 (9). American Society for Microbiology. doi:10.1128/AEM.02738-17. /pmc/articles/PMC5930326/?report=abstract.
- Marschner, P et Z Rengel. 2007. *Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems. Soil Biology*. Vol. 10. s.l.: s.n. doi:10.1007/978-3-540-68027-7.
- Martin, BC, SJ George, CA Price, MH Ryan et M Tibbett. 2014. « The role of root exuded low molecular weight organic anions in facilitating petroleum hydrocarbon degradation: Current knowledge and future directions. » *Science of the Total Environment*. Elsevier. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.11.050.
- Martin, F, S Torelli, D Le Paslier, A Barbance, F Martin-Laurent, D Bru, R Geremia, G Blake, Y Jouanneau, STDPABFM-LDB F Martin, F Martin, S Torelli, D Le Paslier, A Barbance, F Martin-Laurent, D Bru, R Geremia, G Blake et Y Jouanneau. 2012. « Betaproteobacteria dominance and diversity shifts in the bacterial community of a PAH-contaminated soil exposed to phenanthrene. » *Environmental Pollution* 162. Elsevier Ltd: 345-353. doi:10.1016/j.envpol.2011.11.032. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2011.11.032>.
- Martin, KJ et PT Rygielwicz. 2005. « Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. » *BMC Microbiology* 5 (1). BioMed Central: 28. doi:10.1186/1471-2180-5-28.
- Mayak, S, T Tirosh et BR Glick. 2004. « Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. » *Plant Science* 166 (2): 525-530. doi:10.1016/j.plantsci.2003.10.025.
- McGuire, KL et KK Treseder. 2010. « Microbial communities and their relevance for ecosystem models: Decomposition as a case study. » *Soil Biology and Biochemistry*. Pergamon. doi:10.1016/j.soilbio.2009.11.016.
- McNamara, NP, HIJ Black, NA Beresford et NR Parekh. 2003. « Effects of acute gamma irradiation on chemical, physical and biological properties of soils. » *Applied Soil Ecology* 24 (2). Elsevier: 117-132. doi:10.1016/S0929-1393(03)00073-8.
- Meador, JP, JE Stein, WL Reichert et U Varanasi. 1995. « Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. » *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer, New York, NY. doi:10.1007/978-1-4612-2542-3\_4. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-2542-3\\_4](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-2542-3_4).
- Mebes, KH et J Filser. 1998. « Does the species composition of Collembola affect nitrogen turnover? » *Applied Soil Ecology* 9 (1-3): 241-247. doi:10.1016/S0929-1393(97)00051-6.
- Medina-Sauza, RM, M Álvarez-Jiménez, A Delhal, F Reverchon, M Blouin, JA Guerrero-Analco, CR Cerdán, R Guevara, L Villain et I Barois. 2019. « Earthworms building up soil microbiota, a review. » *Frontiers in Environmental Science*. Frontiers Media S.A. doi:10.3389/fenvs.2019.00081. [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org).
- Megharaj, M et R Naidu. 2017. « Soil and brownfield bioremediation. » *Microbial Biotechnology*. doi:10.1111/1751-7915.12840.
- Meier, S, F Borie, N Bolan et P Cornejo. 2012. « Phytoremediation of metal-polluted soils by arbuscular mycorrhizal fungi. » *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 42 (7). Taylor & Francis Group: 741-775. doi:10.1080/10643389.2010.528518. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10643389.2010.528518>.
- Mench, M, N Lepp, V Bert, J-PPP Schwitzguébel, SWW Gawronski, P Schröder et J Vangronsveld. 2010. « Successes and limitations of phytotechnologies at field scale: outcomes, assessment and outlook from COST Action 859. » *Journal of Soils and Sediments* 10 (6): 1039-1070. doi:10.1007/s11368-010-0190-x. <http://link.springer.com/10.1007/s11368-010-0190-x>.



- de Menezes, ABB, MTT Prendergast-Miller, LMM Macdonald, P Toscas, G Baker, M Farrell, T Wark, AEE Richardson, PHH Thrall, AB de Menezes, MTT Prendergast-Miller, LMM Macdonald, P Toscas, G Baker, M Farrell, T Wark, AEE Richardson et PHH Thrall. 2018. « Earthworm-induced shifts in microbial diversity in soils with rare versus established invasive earthworm populations. » *FEMS microbiology ecology* 94 (5). Oxford University Press: 1-14. doi:10.1093/femsec/fiy051.
- Menzie, CA, BB Potocki et S Joseph. 1992. « Exposure to Carcinogenic PAHs in The Environment. » *Environmental Science and Technology* 26 (7). American Chemical Society: 1278-1284. doi:10.1021/es00031a002. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es00031a002>.
- Menzie, CA, BB Potocki, S Joseph, SR Dunlevy, DR Singleton, MD Aitken, A Ruf et al. 2016. « Fungal and bacterial predator-prey systems influence soil aggregate formation and stabilisation. » Sous la dir. de Stephen J. Johnson. *Soil Biology and Biochemistry* 10 (1). EGU General Assembly Conference Abstracts. Elsevier Ltd: 1-7. doi:10.15177/see-for.14-18. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250811000362>.
- Messias, JM, BZ da Costa, VMG de Lima, RFH Dekker, MI Rezende, N Krieger et AM Barbosa. 2009. « Screening Botryosphaeria species for lipases: Production of lipase by Botryosphaeria ribis EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. » *Enzyme and Microbial Technology* 45 (6-7). Elsevier: 426-431. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.08.013.
- Miller, ML, K Vasunia, G Talaska, A Andringa, J De Boer et K Dixon. 2000. « The tumor promoter TPA enhances benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene diolepoxide mutagenesis in Big Blue® mouse skin. » *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35 (4). John Wiley & Sons, Ltd: 319-327. doi:10.1002/1098-2280(2000)35:4<319::AID-EM6>3.0.CO;2-H. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1098-2280%282000%2935%3A4%3C319%3A%3AAID-EM6%3E3.0.CO%3B2-H>.
- Montpetit, É et E Lachapelle. 2015. « Can policy actors learn from academic scientists? » *Environmental Politics* 24 (5): 661-680. doi:10.1080/09644016.2015.1027058.
- . 2016. « Information, values and expert decision-making: the case of soil decontamination. » *Policy Sciences*. doi:10.1007/s11077-015-9225-x.
- Mrozik, A et Z Piotrowska-Seget. 2010. « Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. » *Microbiological Research* 165 (5). Urban & Fischer: 363-375. doi:10.1016/j.micres.2009.08.001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19735995>.
- Mukhopadhyay, S, J George et RE Masto. 2017. « Changes in Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Soil Biological Parameters in a Revegetated Coal Mine Spoil. » *Land Degradation and Development* 28 (3): 1047-1055. doi:10.1002/ldr.2593.
- Murray, JR et TM Penning. 2018. « Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. » In *Comprehensive Toxicology*, 87-153. s.l.: Elsevier. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.95691-5.
- Nadeem, SM, M Ahmad, ZA Zahir, A Javaid et M Ashraf. 2014. « The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. » *Biotechnology Advances* 32 (2). Elsevier: 429-448. doi:10.1016/J.BIOTECHADV.2013.12.005. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073497501300222X>.
- Nandillon, R, M Lebrun, F Miard, M Gaillard, S Sabatier, D Morabito et S Bourgerie. 2019. « Contrasted tolerance of *Agrostis capillaris* metallicolous and non-metallicolous ecotypes in the context of a mining technosol amended by biochar, compost and iron sulfate. » *Environmental Geochemistry and Health*. doi:10.1007/s10653-019-00447-8. <https://doi.org/10.1007/s10653-019-00447-8>.
- Nannipieri, P, L Giagnoni, L Landi et G Renella. 2011. « Role of Phosphatase Enzymes in Soil. » In , 215-243. s.l.: Springer, Berlin, Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-15271-9\_9. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-15271-9\\_9](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-15271-9_9).

- Nechitaylo, TY, MM Yakimov, M Godinho, KN Timmis, E Belogolova, BA Byzov, A V. Kurakov, DL Jones et PN Golyshin. 2010. « Effect of the Earthworms *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa* on Bacterial Diversity in Soil. » *Microbial Ecology* 59 (3). Springer: 574-587. doi:10.1007/s00248-009-9604-y. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19888626>.
- Neher, DA, TR Weicht, ST Bates, JW Leff et N Fierer. 2013. « Changes in Bacterial and Fungal Communities across Compost Recipes, Preparation Methods, and Composting Times. » *PLOS ONE* 8 (11): e79512. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079512>.
- Ngosong, C, E Gabriel et L Ruess. 2014. « Collembola grazing on arbuscular mycorrhiza fungi modulates nutrient allocation in plants. » *Pedobiologia* 57 (3). Urban und Fischer Verlag Jena: 171-179. doi:10.1016/j.pedobi.2014.03.002.
- Nie, M, H Nie, W Cao, X Wang, Y Guo, X Tian, X Yin et Y Wang. 2016. « Phenanthrene Metabolites from a New Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterium *Aeromonas salmonicida* subsp. *Achromogenes* Strain NY4. » *Polycyclic Aromatic Compounds* 36 (2). Taylor & Francis: 132-151. doi:10.1080/10406638.2014.957406.
- Nielsen, T, HE Jørgensen, JC Larsen et M Poulsen. 1996. « City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens: Occurrence, sources and health effects. » *Science of the Total Environment* 189-190. Elsevier B.V.: 41-49. doi:10.1016/0048-9697(96)05189-3.
- Nielsen, UN, DH Wall et J Six. 2015. « Soil Biodiversity and the Environment. » *Annual Review of Environment and Resources* 40: 63-90. doi:10.1146/annurev-environ-102014-021257.
- Niepceron, M, J Beguet, F Portet-Koltalo, F Martin-Laurent, L Quillet et J Bodilis. 2014. « Low impact of phenanthrene dissipation on the bacterial community in grassland soil. » *Environmental Science and Pollution Research* 21 (4): 2977-2987. doi:10.1007/s11356-013-2258-9.
- Nota, B, M Bosse, B Ylstra, NM van Straalen et D Roelofs. 2009. « Transcriptomics reveals extensive inducible biotransformation in the soil-dwelling invertebrate *Folsomia candida* exposed to phenanthrene. » *BMC Genomics* 10 (1). BioMed Central. doi:10.1186/1471-2164-10-236. <https://link.springer.com/articles/10.1186/1471-2164-10-236>.
- Novo, LAB, PML Castro, P Alvarenga et EF da Silva. 2017. « Phytomining of rare and valuable metals. » In *Phytoremediation: Management of Environmental Contaminants, Volume 5*, 469-486. s.l.: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-52381-1\_18. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-52381-1\\_18](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-52381-1_18).
- Novotný, Č, K Svobodová, P Erbanová, T Cajthaml, A Kasinath, E Lang et V Šašek. 2004. « Ligninolytic fungi in bioremediation: Extracellular enzyme production and degradation rate. » In *Soil Biology and Biochemistry*, 36:1545-1551. s.l.: Pergamon. doi:10.1016/j.soilbio.2004.07.019.
- O'Toole, JC et WL Bland. 1987. « Genotypic Variation in Crop Plant Root Systems. » *Advances in Agronomy* 41. Academic Press: 91-145. doi:10.1016/S0065-2113(08)60803-2. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065211308608032>.
- Oburger, E et H Schmidt. 2016. « New Methods To Unravel Rhizosphere Processes. » *Trends in Plant Science* 21 (3). Elsevier Ltd: 243-255. doi:10.1016/j.tplants.2015.12.005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2015.12.005>.
- Oksanen, J, FG Blanchet, M Friendly, R Kindt, P Legendre, D McGlenn, PR Minchin, RB O'Hara, GL Simpson, P Solymos, MHH Stevens, E Szoecs et H Wagner. 2019. « vegan: Community Ecology Package. » <https://cran.r-project.org/package=vegan>.
- Olanrewaju, OS, BR Glick et OO Babalola. 2017. « Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. » *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Springer Netherlands. doi:10.1007/s11274-017-2364-9.
- Oliverio, AM, S Geisen, M Delgado-Baquerizo, FT Maestre, BL Turner et N Fierer. 2020. « The global-scale distributions of soil protists and their contributions to belowground systems. » *Science Advances* 6 (4). American Association for the Advancement of Science.

- doi:10.1126/sciadv.aax8787.
- Van Opstal, EJ et SR Bordenstein. 2015. « Rethinking heritability of the microbiome. » *Science*. doi:10.1126/science.aab3958.
- Orchard, BJ, WJ Doucette, JK Chard et B Bugbee. 2000. « Uptake of trichloroethylene by hybrid poplar trees grown hydroponically in flow-through plant growth chambers. » *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (4 I). SETAC Press: 895-903. doi:10.1002/etc.5620190416. <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.5620190416>.
- Pagé, AP, É Yergeau et CW Greer. 2015. « *Salix purpurea* stimulates the expression of specific bacterial xenobiotic degradation genes in a soil contaminated with hydrocarbons. » Sous la dir. de Andrew C. Singer. *PLoS ONE* 10 (7): 1-16. doi:10.1371/journal.pone.0132062. <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0132062>.
- Parales, RE. 2010. « Hydrocarbon Degradation by Betaproteobacteria. » In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, sous la dir. de Kenneth N Timmis, 1715-1724. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-540-77587-4\_121. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4\\_121](https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_121).
- Parales, RE et SM Resnick. 2004. « Aromatic Hydrocarbon Dioxygenases. » In *Biodegradation and Bioremediation*, 175-195. s.l.: s.n. doi:10.1007/978-3-662-06066-7\_8.
- Pastor, J, MJ Gutiérrez-Ginés et AJ Hernández. 2015. « Heavy-Metal Phytostabilizing Potential of *Agrostis castellana* Boiss. & Reuter. » *International Journal of Phytoremediation* 17 (10). Taylor and Francis Inc.: 988-998. doi:10.1080/15226514.2014.1003786. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/15226514.2014.1003786>.
- Patten, CL et BR Glick. 1996. « Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. » *Canadian Journal of Microbiology* 42 (3): 207-220. doi:10.1139/m96-032. <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/m96-032>.
- Pawlik, M, B Cania, S Thijs, J Vangronsveld et Z Piotrowska-Seget. 2017. « Hydrocarbon degradation potential and plant growth-promoting activity of culturable endophytic bacteria of *Lotus corniculatus* and *Oenothera biennis* from a long-term polluted site. » *Environmental Science and Pollution Research* 24 (24). Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/s11356-017-9496-1. <http://link.springer.com/10.1007/s11356-017-9496-1>.
- Peijnenburg, W, E Capri, C Kula, M Liess, R Luttk, M Montforts, K Nienstedt, J Römbke, JP Sousa et J Jensen. 2012. « Evaluation of Exposure Metrics for Effect Assessment of Soil Invertebrates. » *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 42 (17). Taylor & Francis Group: 1862-1893. doi:10.1080/10643389.2011.574100. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10643389.2011.574100>.
- Peña-Castro, JM, BE Barrera-Figueroa, L Fernández-Linares, R Ruiz-Medrano et B Xoconostle-Cázares. 2006. « Isolation and identification of up-regulated genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon* L.) grown under petroleum hydrocarbon stress. » *Plant Science* 170 (4). Elsevier: 724-731. doi:10.1016/J.PLANTSCI.2005.11.004. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945205004115>.
- Peng, RH, AS Xiong, Y Xue, XY Fu, F Gao, W Zhao, YS Tian et QH Yao. 2008. « Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. » *FEMS Microbiology Reviews*. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00127.x.
- Perera, FP, K Wheelock, Y Wang, D Tang, AE Margolis, G Badia, W Cowell, RL Miller, V Rauh, S Wang et JB Herbstman. 2018. « Combined effects of prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and material hardship on child ADHD behavior problems. » *Environmental Research* 160. Academic Press Inc.: 506-513. doi:10.1016/j.envres.2017.09.002.
- Pérez-Cadahía, B, B Laffon, E Pásaro et J Méndez. 2004. « Evaluation of PAH bioaccumulation and DNA damage in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to spilled Prestige crude oil. » *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 138 (4). Elsevier Inc.: 453-460. doi:10.1016/j.cca.2004.08.001.

- Phillips, DH. 1999. « Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. » *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 443 (1-2). Elsevier: 139-147. doi:10.1016/S1383-5742(99)00016-2.
- Pierzynski, GM, M Lambert, BAD Hetrick, DW Sweeney et LE Erickson. 2002. « Phytostabilization of metal mine tailings using tall fescue. » *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management* 6 (4). American Society of Civil Engineers: 212-217. doi:10.1061/(ASCE)1090-025X(2002)6:4(212). <http://ascelibrary.org/doi/10.1061/%28ASCE%291090-025X%282002%296%3A4%28212%29>.
- Pilon-Smits, E. 2005. « Phytoremediation. » *Annual Review of Plant Biology* 56 (1). Annual Reviews: 15-39. doi:10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144214>.
- Pizarro-Tobias, P, JL Niqui, A Roca, J Solano, M Fernandez, F Bastida, C Garcia et JL Ramos. 2015. « Field trial on removal of petroleum-hydrocarbon pollutants using a microbial consortium for bioremediation and rhizoremediation. » *Environmental Microbiology Reports* 7 (1): 85-94. doi:10.1111/1758-2229.12174.
- Polle, A, D Janz, T Teichmann et V Lipka. 2013. « Poplar genetic engineering: Promoting desirable wood characteristics and pest resistance. » *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-013-4940-8.
- Potapov, AM, AA Goncharov, EE Semenina, AY Korotkevich, SM Tsurikov, OL Rozanova, AE Anichkin, AG Zuev, ES Samoylova, II Semenyuk, I V. Yevdokimov et A V. Tiunov. 2017. « Arthropods in the subsoil: Abundance and vertical distribution as related to soil organic matter, microbial biomass and plant roots. » *European Journal of Soil Biology* 82. Elsevier Masson SAS: 88-97. doi:10.1016/j.ejsobi.2017.09.001.
- Pumphrey, GM et EL Madsen. 2007. « Naphthalene metabolism and growth inhibition by naphthalene in *Polaromonas naphthalenivorans* strain CJ2. » *Microbiology* 153 (11). Microbiology Society: 3730-3738. doi:10.1099/mic.0.2007/010728-0. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2007/010728-0>.
- Qin, F, M Kakimoto, Y Sakuma, K Maruyama, Y Osakabe, LSP Tran, K Shinozaki et K Yamaguchi-Shinozaki. 2007. « Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. » *Plant Journal* 50 (1): 54-69. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03034.x. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17346263>.
- Quast, C, E Pruesse, P Yilmaz, J Gerken, T Schweer, P Yarza, J Peplies et FO Glöckner. 2013. « The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. » *Nucleic Acids Research* 41 (D1). Nucleic Acids Res. doi:10.1093/nar/gks1219. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23193283/>.
- Quintella, CM, AMT Mata et LCP Lima. 2019. « Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils. » *Journal of Environmental Management*. doi:10.1016/j.jenvman.2019.04.019.
- Quiza, L, M St-Arnaud et E Yergeau. 2015. « Harnessing phytomicrobiome signaling for rhizosphere microbiome engineering. » *Frontiers in Plant Science* 6 (July): 1-11. doi:10.3389/fpls.2015.00507. <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2015.00507/abstract>.
- R Core Team. 2020. « R: A Language and Environment for Statistical Computing. » Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>.
- Rajkumar, M, S Sandhya, MNV Prasad et H Freitas. 2012. « Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. » *Biotechnology Advances*. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.04.011.
- Ramin, KI et SD Allison. 2019. « Carbon Cycle Implications of Soil Microbial Interactions. » In *Understanding Terrestrial Microbial Communities*, sous la dir. de Christon J. Hurst, 1-29. s.l.: Springer, Cham. doi:10.1007/978-3-030-10777-2\_1.

- [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-10777-2\\_1](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-10777-2_1).
- Raut, V, I Shaikh, B Naphade, K Prashar et N Adhasure. 2017. « Plant growth promotion using microbial IAA producers in conjunction with azolla: A novel approach. » *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 4 (1). doi:10.1186/S40538-016-0083-3.
- Ravindra, K, R Sokhi et R Van Grieken. 2008. « Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. » *Atmospheric Environment* 42 (13). Pergamon: 2895-2921. doi:10.1016/j.atmosenv.2007.12.010. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1352231007011351>.
- Reddell, P et A V. Spain. 1991. « Earthworms as vectors of viable propagules of mycorrhizal fungi. » *Soil Biology and Biochemistry* 23 (8): 767-774. doi:10.1016/0038-0717(91)90147-C.
- Reddy, BR et N Sethunathan. 1983. « Mineralization of Parathion in the Rice Rhizosphere. » *Applied and Environmental Microbiology* 45 (3).
- Reed, HE et JBH Martiny. 2007. « Testing the functional significance of microbial composition in natural communities. » *FEMS Microbiology Ecology* 62 (2). Oxford Academic: 161-170. doi:10.1111/j.1574-6941.2007.00386.x. <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2007.00386.x>.
- Reed, M et B Glick. 2005. « Growth of canola (*Brassica napus*) in the presence of plant growth-promoting bacteria and either copper or polycyclic aromatic hydrocarbons. » *Canadian Journal of Microbiology* 51 (6): 425-429. doi:10.1007/s00284-005-4584-8.
- Rheault, K, D Lachance, M-J Morency, É Thiffault, N Isabel, C Martineau et A Séguin. 2020. « Plant Genotype Influences Physicochemical Properties of Substrate as well as Bacterial and Fungal Assemblages in the Rhizosphere of Balsam Poplar. » *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory: 2020.06.19.161398. doi:10.1101/2020.06.19.161398. <https://doi.org/10.1101/2020.06.19.161398>.
- Richardson, AE et RJ Simpson. 2011. « Soil microorganisms mediating phosphorus availability. » *Plant Physiology* 156 (3). American Society of Plant Biologists: 989-996. doi:10.1104/pp.111.175448. [www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.111.175448](http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.111.175448).
- Robinson, DA, F Seaton, K Sharps, A Thomas, F Parry Roberts, M van der Ploeg, L Jones, J Stolte, M Puig de la Bellacasa, P Harrison, B Emmett, DA Robinson, F Seaton, K Sharps, A Thomas, F Parry Roberts, M van der Ploeg, L Jones, J Stolte, M Puig de la Bellacasa, P Harrison et B Emmett. 2017. « Soil Resources, the Delivery of Ecosystem Services and Value. » In *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science*. s.l.: Oxford University Press. doi:10.1093/acrefore/9780199389414.013.375. <https://oxfordre.com/environmentalscience/view/10.1093/acrefore/9780199389414.001.0001/acrefore-9780199389414-e-375>.
- Rodríguez-Campos, J, A Perales-García, J Hernández-Carballo, F Martínez-Rabelo, B Hernández-Castellanos, I Barois et SM Contreras-Ramos. 2019. « Bioremediation of soil contaminated by hydrocarbons with the combination of three technologies: bioaugmentation, phytoremediation, and vermiremediation. » *Journal of Soils and Sediments*. doi:10.1007/s11368-018-2213-y.
- Rodríguez, H et R Fraga. 1999. « Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. » *Biotechnology Advances* 17 (4-5). Elsevier Science Ltd: 319-339. doi:10.1016/S0734-9750(99)00014-2.
- Roelofs, D, RC Bicho, TE de Boer, MP Castro-Ferreira, K Montagne-Wajer, CAM van Gestel, AMVM Soares, NM van Straalen et MJB Amorim. 2016. « Mechanisms of phenanthrene toxicity in the soil invertebrate, *Enchytraeus crypticus*. » *Environmental Toxicology and Chemistry* 35 (11). Wiley Blackwell: 2713-2720. doi:10.1002/etc.3433. <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.3433>.
- Rohrbacher, F et M St-Arnaud. 2016. « Root Exudation: The Ecological Driver of Hydrocarbon Rhizoremediation. » *Agronomy* 6 (1). MDPI AG: 19. doi:10.3390/agronomy6010019. <http://www.mdpi.com/2073-4395/6/1/19>.

- Rolli, E, R Marasco, G Vigani, B Ettoumi, F Mapelli, ML Deangelis, C Gandolfi, E Casati, F Previtali, R Gerbino, F Pierotti Cei, S Borin, C Sorlini, G Zocchi et D Daffonchio. 2015. « Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. » *Environmental Microbiology* 17 (2): 316-331. doi:10.1111/1462-2920.12439.
- Rosenberg, E, G Sharon et I Zilber-Rosenberg. 2009. « The hologenome theory of evolution contains Lamarckian aspects within a Darwinian framework. » *Environmental Microbiology* 11 (12): 2959-2962. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01995.x.
- Rosenberg, E et I Zilber-Rosenberg. 2016. « Bacterial Bleaching of Corals Leads to Hologenome Concept. » *Microbe Magazine* 11 (1). asm Pub2Web: 27-31. doi:10.1128/microbe.11.27.1. <http://www.asmscience.org/content/journal/microbe/10.1128/microbe.11.27.1>.
- Ryu, CM, MA Farag, CH Hu, MS Reddy, JW Kloepper et PW Paré. 2004. « Bacterial volatiles induce systemic resistance in Arabidopsis. » *Plant Physiology*. doi:10.1104/pp.103.026583.
- Sannigrahi, P, AJ Ragauskas et GA Tuskan. 2010. « Poplar as a feedstock for biofuels: A review of compositional characteristics. » *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. doi:10.1002/bbb.206.
- Sarkar, A, J Bhagat, M Saha Sarker, DCS Gaitonde et S Sarker. 2017. « Evaluation of the impact of bioaccumulation of PAH from the marine environment on DNA integrity and oxidative stress in marine rock oyster (*Saccostrea cucullata*) along the Arabian sea coast. » *Ecotoxicology* 26 (8). Springer New York LLC: 1105-1116. doi:10.1007/s10646-017-1837-9. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10646-017-1837-9>.
- Sawulski, P, B Boots, N Clipson et E Doyle. 2015. « Differential degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures by indigenous microbial assemblages in soil. » *Letters in Applied Microbiology* 61 (2). Blackwell Publishing Ltd: 199-207. doi:10.1111/lam.12446. <http://doi.wiley.com/10.1111/lam.12446>.
- Sawulski, P, N Clipson et E Doyle. 2014. « Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on microbial community structure and PAH ring hydroxylating dioxygenase gene abundance in soil. » *Biodegradation* 25 (6). Kluwer Academic Publishers: 835-847. doi:10.1007/s10532-014-9703-4. <http://link.springer.com/10.1007/s10532-014-9703-4>.
- Schaefer, M et F Juliane. 2007. « The influence of earthworms and organic additives on the biodegradation of oil contaminated soil. » *Applied Soil Ecology* 36 (1): 53-62. doi:10.1016/j.apsoil.2006.11.002.
- Schmitz, OJ et SJ Leroux. 2020. « Food Webs and Ecosystems: Linking Species Interactions to the Carbon Cycle. » *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. Annual Reviews. doi:10.1146/annurev-ecolsys-011720-104730. <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-ecolsys-011720-104730>.
- Seemayer, NH et N Manojlovic. 1980. « Cytotoxic effects of air pollutants on mammalian cells in vitro. » *Toxicology* 17 (2). Elsevier: 177-182. doi:10.1016/0300-483X(80)90091-8.
- Sen, S et JM Field. 2013. « Genotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Metabolites: Radical Cations and Ketones. » In *Advances in Molecular Toxicology*, 7:83-127. s.l.: Elsevier B.V. doi:10.1016/B978-0-444-62645-5.00003-1.
- Sentchilo, V, AP Mayer, L Guy, R Miyazaki, SG Tringe, K Barry, S Malfatti, A Goessmann, M Robinson-Rechavi et JR Van Der Meer. 2013. « Community-wide plasmid gene mobilization and selection. » *ISME Journal* 7 (6): 1173-1186. doi:10.1038/ismej.2013.13.
- Setälä, H, MP Berg et TH Jones. 2005. « Trophic structure and functional redundancy in soil communities. » In *Biological Diversity and Function in Soils*, sous la dir. de Richard D Bardgett, Michael B Usher, et David W Hopkins, 236-249. Cambridge: Cambridge University Press. doi:10.1017/CBO9780511541926.014. <https://www.researchgate.net/publication/281392510>.
- Shabir, G, M Arslan, K Fatima, I Amin, QM Khan et M Afzal. 2016. « Effects of Inoculum Density on Plant Growth and Hydrocarbon Degradation. » *Pedosphere*. Elsevier.

- doi:10.1016/S1002-0160(15)60084-4.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1002016015600844>.
- Shipitalo, MJ et RC Le Bayon. 2004. « Quantifying the effects of earthworms on soil aggregation and porosity. » In *Earthworm Ecology, Second Edition*, 183-200. s.l.: s.n. doi:10.1201/9781420039719.
- Simonnot, M-O et V Croze. 2008. « Procédés de traitements physiques et chimiques des sols pollués. » *Techniques de l'Ingénieur* 33 (tableau 1). Professeur en Génie des procédés à l'Institut national polytechnique de Lorraine (Nancy): Editions T.I.: 1-18. see\_the\_document\_in\_the\_desktop\_folder\_Techniques\_de\_lingenieur.
- Singer, AC, DE Crowley et IP Thompson. 2003. « Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. » *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/S0167-7799(02)00041-0.
- Singha, LP et P Pandey. 2020. « Rhizobacterial community of *Jatropha curcas* associated with pyrene biodegradation by consortium of PAH-degrading bacteria. » *Applied Soil Ecology* 155. Elsevier B.V.: 103685. doi:10.1016/j.apsoil.2020.103685. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0929139320306144>.
- Singleton, DR, PF Hendrix, DC Coleman et WB Whitman. 2003. « Identification of uncultured bacteria tightly associated with the intestine of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Lumbricidae; Oligochaeta). » *Soil Biology and Biochemistry* 35 (12): 1547-1555. doi:10.1016/S0038-0717(03)00244-X.
- Sinsabaugh, RL, S Manzoni, DL Moorhead et A Richter. 2013. « Carbon use efficiency of microbial communities: Stoichiometry, methodology and modelling. » *Ecology Letters*. doi:10.1111/ele.12113.
- Sipilä, TP, AK Keskinen, ML Åkerman, C Fortelius, K Haahtela et K Yrjälä. 2008. « High aromatic ring-cleavage diversity in birch rhizosphere: PAH treatment-specific changes of I.E.3 group extradiol dioxygenases and 16S rRNA bacterial communities in soil. » *ISME Journal* 2 (9): 968-981. doi:10.1038/ismej.2008.50.
- Sipilä, TP, H Riisio et K Yrjälä. 2006. « Novel upper meta-pathway extradiol dioxygenase gene diversity in polluted soil. » *FEMS Microbiology Ecology* 58 (1): 134-144. doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00140.x.
- Smalla, K, G Wieland, A Buchner, A Zock, J Parzy, S Kaiser, N Roskot, H Heuer et G Berg. 2001. « Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-Dependent Enrichment and Seasonal Shifts Revealed. » *Applied and Environmental Microbiology* 67 (10): 4742-4751. doi:10.1128/AEM.67.10.4742-4751.2001.
- Smith, S et D Read. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. Mycorrhizal Symbiosis. s.l.: s.n. doi:10.1016/B978-0-12-370526-6.X5001-6.
- Somtrakoon, K et W Chouychai. 2013. « Phytotoxicity of single and combined polycyclic aromatic hydrocarbons toward economic crops. » *Russian Journal of Plant Physiology* 60 (1). Springer: 139-148. doi:10.1134/S1021443712060155. <https://link.springer.com/article/10.1134/S1021443712060155>.
- Song, K, Y Sun, Q Qin, L Sun, X Zheng, W Terzaghi, W Lv et Y Xue. 2020. « The Effects of Earthworms on Fungal Diversity and Community Structure in Farmland Soil With Returned Straw. » *Frontiers in Microbiology*. doi:10.3389/fmicb.2020.594265.
- Spaepen, S et J Vanderleyden. 2011. « Auxin and plant-microbe interactions. » *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (4): 1-13. doi:10.1101/cshperspect.a001438.
- Spain, A V., P Lavelle et A Mariotti. 1992. « Stimulation of plant growth by tropical earthworms. » *Soil Biology and Biochemistry* 24 (12): 1629-1633. doi:10.1016/0038-0717(92)90161-P.
- Spiers, GA, D Gagnon, GE Nason, EC Packee et JD Lousier. 1986. « Effects and importance of indigenous earthworms on decomposition and nutrient cycling in coastal forest ecosystems. » *Canadian Journal of Forest Research* 16 (5). NRC Research Press Ottawa, Canada: 983-989. doi:10.1139/x86-172.

- Spriggs, T, MK Banks et P Schwab. 2005. « Phytoremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Manufactured Gas Plant-Impacted Soil. » *Journal of Environmental Quality* 34 (5). Wiley: 1755-1762. doi:10.2134/jeq2004.0399. <http://doi.wiley.com/10.2134/jeq2004.0399>.
- Springett, J et R Gray. 1997. « The interaction between plant roots and earthworm burrows in pasture. » *Soil Biology and Biochemistry* 29 (3-4): 621-625. doi:10.1016/S0038-0717(96)00235-0.
- Starkey, RL. 1938. « Some influences of the development of higher plants upon the microorganisms in the soil: VI. Microscopic examination of the rhizosphere. » *Soil Science* 45 (3). LWW: 207-249. doi:10.1097/00010694-193803000-00005.
- Steffan, SA et PS Dharampal. 2019. « Undead food-webs: Integrating microbes into the food-chain. » *Food Webs*. Elsevier Inc. doi:10.1016/j.fooweb.2018.e00111.
- Storey, S, MM Ashaari, G McCabe, M Harty, R Dempsey, O Doyle, N Clipson et EM Doyle. 2014. « Microbial community structure during fluoranthene degradation in the presence of plants. » *Journal of Applied Microbiology* 117 (1). Blackwell Publishing Ltd: 74-84. doi:10.1111/jam.12518.
- Stubbendieck, RM, C Vargas-Bautista et PD Straight. 2016. « Bacterial communities: Interactions to scale. » *Frontiers in Microbiology*. Frontiers. doi:10.3389/fmicb.2016.01234. <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01234/abstract>.
- Štursová, M, L Žiřčáková, MB Leigh, R Burgess et P Baldrian. 2012. « Cellulose utilization in forest litter and soil: identification of bacterial and fungal decomposers. » *FEMS Microbiology Ecology* 80 (3). Oxford Academic: 735-746. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01343.x. <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2012.01343.x>.
- Sun, M, H Chao, X Zheng, S Deng, M Ye et F Hu. 2020. « Ecological role of earthworm intestinal bacteria in terrestrial environments: A review. » *Science of the Total Environment* 740. Elsevier B.V.: 140008. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140008.
- Sun, M, K Liu, Y Zhao, D Tian, M Ye, M Liu, J Jiao et X Jiang. 2017. « Effects of Bacterial-Feeding Nematode Grazing and Tea Saponin Addition on the Enhanced Bioremediation of Pyrene-Contaminated Soil Using Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacterial Strain. » *Pedosphere* 27 (6). Soil Science Society of China: 1062-1072. doi:10.1016/S1002-0160(17)60451-X. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S100201601760451X>.
- Sun, T-RR, L Cang, Q-YY Wang, D-MM Zhou, J-MM Cheng et H Xu. 2010. « Roles of abiotic losses, microbes, plant roots, and root exudates on phytoremediation of PAHs in a barren soil. » *Journal of Hazardous Materials* 176 (1-3). Elsevier: 919-925. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389409019244>.
- Sundin, P, A Valeur, S Olsson et G Odham. 1990. « Interactions between bacteria-feeding nematodes and bacteria in the rape rhizosphere: effects on root exudation and distribution of bacteria. » *FEMS Microbiology Letters* 73 (1): 13-22. doi:10.1016/0378-1097(90)90719-7.
- Suttle, CA. 1994. « The significance of viruses to mortality in aquatic microbial communities. » *Microbial Ecology* 28 (2). Springer-Verlag: 237-243. doi:10.1007/BF00166813. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00166813>.
- Taghavi, S, T Barac, B Greenberg, B Borremans, J Vangronsveld et D Van Der Lelie. 2005. « Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene. » *Applied and Environmental Microbiology* 71 (12). American Society for Microbiology: 8500-8505. doi:10.1128/AEM.71.12.8500-8505.2005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16332840>.
- Tang, M, H Chen, JC Huang et ZQ Tian. 2009. « AM fungi effects on the growth and physiology of Zea mays seedlings under diesel stress. » *Soil Biology and Biochemistry* 41 (5). Pergamon: 936-940. doi:10.1016/J.SOILBIO.2008.11.007. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071708004008>.
- Tardif, S, É Yergeau, J Tremblay, P Legendre, LG Whyte et CW Greer. 2016. « The Willow



- Microbiome Is Influenced by Soil Petroleum-Hydrocarbon Concentration with Plant Compartment-Specific Effects. » *Frontiers in Microbiology* 7: 1363. doi:10.3389/fmicb.2016.01363.  
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2016.01363/abstract>.
- Teuben, A et HA Verhoef. 1992. « Direct contribution by soil arthropods to nutrient availability through body and faecal nutrient content. » *Biology and Fertility of Soils* 14 (2): 71-75. doi:10.1007/BF00336253.
- Theis, KR, NM Dheilly, JL Klassen, RM Brucker, JF Baines, TCG Bosch, JF Cryan, SF Gilbert, CJ Goodnight, EA Lloyd, J Sapp, P Vandenkoornhuys, I Zilber-Rosenberg, E Rosenberg et SR Bordenstein. 2016. « Getting the Hologenome Concept Right: an Eco-Evolutionary Framework for Hosts and Their Microbiomes. » *mSystems* 1 (2): e00028-16. doi:10.1128/mSystems.00028-16.  
<http://msystems.asm.org/lookup/doi/10.1128/mSystems.00028-16>.
- Thomas, F, A Cébron et AC F Thomas. 2016. « Short-term rhizosphere effect on available carbon sources, phenanthrene degradation, and active microbiome in an aged-contaminated industrial soil. » *Frontiers in Microbiology* 7 (FEB). Frontiers Media S.A.: 92. doi:10.3389/fmicb.2016.00092.
- Thomas, F, E Corre et A Cébron. 2019. « Stable isotope probing and metagenomics highlight the effect of plants on uncultured phenanthrene-degrading bacterial consortium in polluted soil. » *The ISME Journal* 13 (7). Nature Publishing Group: 1814-1830. doi:10.1038/s41396-019-0394-z. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0394-z>.
- Thomassin-Lacroix, E, M Eriksson, K Reimer et W Mohn. 2002. « Biostimulation and bioaugmentation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. » *Applied Microbiology and Biotechnology* 59 (4-5): 551-556. doi:10.1007/s00253-002-1038-0.
- Thygesen, RS et S Trapp. 2002. « Phytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to willow trees. » *Journal of Soils and Sediments* 2 (2): 77-82. doi:10.1007/BF02987875.
- Timm, CM, DA Pelletier, SS Jawdy, LE Gunter, JA Henning, N Engle, J Aufrecht, E Gee, I Nookaew, Z Yang, T-Y Lu, TJ Tschaplinski, MJ Doktycz, GA Tuskan et DJ Weston. 2016. « Two poplar-associated bacterial isolates induce additive favorable responses in a constructed plant-microbiome system. » *Frontiers in Plant Science* 7 (APR2016): 1-10. doi:10.3389/fpls.2016.00497.  
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fpls.2016.00497/abstract>.
- Timmusk, S et EG Wagner. 1999. « The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. » *Molecular plant-microbe interactions: MPMI* 12 (11): 951-959. doi:10.1094/MPMI.1999.12.11.951.
- Tiralerdpanich, P, P Sonthiphand, E Luepromchai, O Pinyakong et P Pokethitiyook. 2018. « Potential microbial consortium involved in the biodegradation of diesel, hexadecane and phenanthrene in mangrove sediment explored by metagenomics analysis. » *Marine Pollution Bulletin* 133. Elsevier Ltd: 595-605. doi:10.1016/j.marpolbul.2018.06.015.
- Tiunov, A V. et TG Dobrovolskaya. 2002. « Fungal and bacterial communities in *Lumbricus terrestris* burrow walls: a laboratory experiment. » *Pedobiologia* 46 (6). Urban & Fischer: 595-605. doi:10.1078/0031-4056-00162.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031405604701717>.
- Tláškal, V, J Voříšková et P Baldrian. 2016. « Bacterial succession on decomposing leaf litter exhibits a specific occurrence pattern of cellulolytic taxa and potential decomposers of fungal mycelia. » *FEMS Microbiology Ecology*. doi:10.1093/femsec/fiw177.
- Tognacchini, A, T Rosenkranz, A van der Ent, GE Machinet, G Echevarria et M Puschenreiter. 2020. « Nickel phytomining from industrial wastes: Growing nickel hyperaccumulator plants on galvanic sludges. » *Journal of Environmental Management* 254. Academic Press: 109798. doi:10.1016/j.jenvman.2019.109798.

- Top, EM et D Springael. 2003. « The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. » *Current Opinion in Biotechnology*. doi:10.1016/S0958-1669(03)00066-1.
- Toyama, T, T Furukawa, N Maeda, D Inoue, K Sei, K Mori, S Kikuchi et M Ike. 2011. « Accelerated biodegradation of pyrene and benzo[a]pyrene in the *Phragmites australis* rhizosphere by bacteria–root exudate interactions. » *Water Research* 45 (4). Elsevier Ltd: 1629-1638. doi:10.1016/j.watres.2010.11.044. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21196023>.
- Trap, J, M Bonkowski, C Plassard, C Villenave et E Blanchart. 2016. « Ecological importance of soil bacterivores for ecosystem functions. » *Plant and Soil*. doi:10.1007/s11104-015-2671-6.
- Tremblay, J et E Yergeau. 2019. « Systematic processing of ribosomal RNA gene amplicon sequencing data. » *GigaScience* 8 (12). doi:10.1093/gigascience/giz146. <https://academic.oup.com/gigascience/article/doi/10.1093/gigascience/giz146/5670612>.
- Trivedi, C, M Delgado-Baquerizo, K Hamonts, K Lai, PB Reich et BK Singh. 2019. « Losses in microbial functional diversity reduce the rate of key soil processes. » *Soil Biology and Biochemistry* 135. Elsevier Ltd: 267-274. doi:10.1016/j.soilbio.2019.05.008.
- Trivedi, P, IC Anderson et BK Singh. 2013. « Microbial modulators of soil carbon storage: Integrating genomic and metabolic knowledge for global prediction. » *Trends in Microbiology*. doi:10.1016/j.tim.2013.09.005.
- Tsitonaki, A, B Petri, M Crimi, H Mosbk, RL Siegrist et PL Bjerg. 2010. « In situ chemical oxidation of contaminated soil and groundwater using persulfate: A review. » *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. Taylor & Francis Group. doi:10.1080/10643380802039303. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10643380802039303>.
- Tuskan, GA, S DiFazio, S Jansson, J Bohlmann, I Grigoriev, U Hellsten, M Putnam et al. 2006. « The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). » *Science* 313 (5793): 1596-1604. doi:10.1126/science.1128691.
- Ukalska-Jaruga, A, B Smreczak et A Klimkowicz-Pawlas. 2019. « Soil organic matter composition as a factor affecting the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons. » *Journal of Soils and Sediments* 19 (4). Springer Verlag: 1890-1900. doi:10.1007/s11368-018-2214-x. <https://doi.org/10.1007/s11368-018-2214-x>.
- Vacca, DJ, WF Bleam et WJ Hickey. 2005. « Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic acid-sorbed phenanthrene. » *Applied and Environmental Microbiology* 71 (7). American Society for Microbiology: 3797-3805. doi:10.1128/AEM.71.7.3797-3805.2005.
- Venables, WN et BD Ripley. 2002. *Modern Applied Statistics with S*, Fourth. New York: Springer-Verlag New York. <https://www.springer.com/gp/book/9780387954578>.
- Vervaeke, P, S Luysaert, J Mertens, E Meers, FM. Tack et N Lust. 2003. « Phytoremediation prospects of willow stands on contaminated sediment: a field trial. » *Environmental Pollution* 126 (2). Elsevier Ltd: 275-282. doi:10.1016/S0269-7491(03)00189-1. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749103001891>.
- Voss, JD, JC Leon, N V. Dhurandhar et FT Robb. 2015. « Pawnobiome: Manipulation of the Hologenome within one host generation and beyond. » *Frontiers in Microbiology* 6 (JUN). doi:10.3389/fmicb.2015.00697.
- De Vries, FT et A Shade. 2013. « Controls on soil microbial community stability under climate change. » *Frontiers in Microbiology* 4 (SEP). Frontiers Research Foundation. doi:10.3389/fmicb.2013.00265. [/pmc/articles/PMC3768296/?report=abstract](https://www.frontiersin.org/articles/PMC3768296/?report=abstract).
- Wagg, C, SF Bender, F Widmer et MGA Van Der Heijden. 2014. « Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (14). National Academy of Sciences: 5266-5270. doi:10.1073/pnas.1320054111. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1320054111](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1320054111).
- Walker, BH. 1992. « Biodiversity and Ecological Redundancy. » *Conservation Biology* 6 (1):

- 18-23. doi:10.1046/j.1523-1739.1992.610018.x. <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1523-1739.1992.610018.x>.
- Wallace, SJ, SR de Solla, JA Head, P V. Hodson, JL Parrott, PJ Thomas, A Berthiaume et VS Langlois. 2020. « Polycyclic aromatic compounds (PACs) in the Canadian environment: Exposure and effects on wildlife. » *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.envpol.2020.114863.
- Wang, L, D Hou, Z Shen, J Zhu, X Jia, YS Ok, FMG Tack et J Rinklebe. 2020. « Field trials of phytomining and phytoremediation: A critical review of influencing factors and effects of additives. » *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 50 (24). Taylor and Francis Inc.: 2724-2774. doi:10.1080/10643389.2019.1705724. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10643389.2019.1705724>.
- Wang, L, B Ji, Y Hu, R Liu et W Sun. 2017. « A review on in situ phytoremediation of mine tailings. » *Chemosphere*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.06.025.
- Wang, Q, GM Garrity, JM Tiedje, JR Cole et GGJTJC Q Wang. 2007. « Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. » *Applied and Environmental Microbiology* 73 (16). Appl Environ Microbiol: 5261-5267. doi:10.1128/AEM.00062-07. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17586664/>.
- Wang, Y, Q Jiang, C Zhou, B Chen, W Zhao, J Song, R Fang, J Chen et M Xiao. 2014. « In-situ remediation of contaminated farmland by horizontal transfer of degradative plasmids among rhizosphere bacteria. » *Soil Use and Management* 30 (2). doi:10.1111/sum.12105. <http://doi.wiley.com/10.1111/sum.12105>.
- Watts, AW, TP Ballesteros et KH Gardner. 2006. « Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in salt marsh plants *Spartina alterniflora* grown in contaminated sediments. » *Chemosphere* 62 (8). Elsevier Ltd: 1253-1260. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.07.006.
- Weis, LM, AM Rummel, SJ Masten, JE Trosko et BL Upham. 1998. *Bay or baylike regions of polycyclic aromatic hydrocarbons were potent inhibitors of gap junctional intercellular communication*. *Environmental Health Perspectives*. Vol. 106. s.l.: Public Health Services, US Dept of Health and Human Services. doi:10.1289/ehp.9810617. <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.9810617>.
- Weissenfels, WD, HJ Klewer et J Langhoff. 1992. « Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. » *Applied Microbiology and Biotechnology* 36 (5). Springer-Verlag: 689-696. doi:10.1007/BF00183251.
- Weyens, N, D Van Der Lelie, T Artois, K Smeets, S Taghavi, L Newman, R Carleer et J Vangronsveld. 2009. « Bioaugmentation with engineered endophytic bacteria improves contaminant fate in phytoremediation. » *Environmental Science and Technology* 43 (24): 9413-9418. doi:10.1021/es901997z.
- Wickham, H, M Averick, J Bryan, W Chang, LD McGowan, R François, G Grolemond, A Hayes, L Henry, J Hester, M Kuhn, TL Pedersen, E Miller, SM Bache, K Müller, J Ooms, D Robinson, DP Seidel, V Spinu, K Takahashi, D Vaughan, C Wilke, K Woo et H Yutani. 2019. « Welcome to the {tidyverse}. » *Journal of Open Source Software* 4 (43): 1686. doi:10.21105/joss.01686.
- Widdowson, MA, S Shearer, RG Andersen et JT Novak. 2005. « Remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in groundwater using poplar trees. » *Environmental Science and Technology* 39 (6): 1598-1605. doi:10.1021/es0491681.
- Wilcke, W. 2007. « Global patterns of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil. » *Geoderma* 141 (3-4). Elsevier: 157-166. doi:10.1016/j.geoderma.2007.07.007. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016706107002182>.
- Withey, JR, J Shedden, FPC Law et S Abedini. 1992. « Distribution to the fetus and major organs of the rat following inhalation exposure to pyrene. » *Journal of Applied Toxicology* 12 (3). John Wiley & Sons, Ltd: 223-231. doi:10.1002/jat.2550120313. <http://doi.wiley.com/10.1002/jat.2550120313>.

- Wolkovich, EM. 2016. « Reticulated channels in soil food webs. » *Soil Biology and Biochemistry* 102. Elsevier Ltd: 18-21. doi:10.1016/j.soilbio.2016.06.021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.06.021>.
- Wright, DA, K Killham, LA Glover et JI Prosser. 1995. « Role of Pore Size Location in Determining Bacterial Activity during Predation by Protozoa in Soil. » *Applied and Environmental Microbiology* 61 (10).
- Xun, F, B Xie, S Liu et C Guo. 2015. « Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation. » *Environmental Science and Pollution Research* 22 (1): 598-608. doi:10.1007/s11356-014-3396-4.
- Yachi, S et M Loreau. 1999. « Biodiversity and ecosystem productivity in a fluctuating environment: The insurance hypothesis. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (4). National Academy of Sciences: 1463-1468. doi:10.1073/pnas.96.4.1463. [www.pnas.org](http://www.pnas.org).
- Yang, H, M Mazur-Melnyk, JG De Boer et BW Glickman. 1999. « A comparison of mutational specificity of mutations induced by S9-activated B[a]P and benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide at the endogenous aprt gene in CHO cells. » *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 423 (1-2). *Mutat Res*: 23-32. doi:10.1016/S0027-5107(98)00221-8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10029669/>.
- Yang, J, JW Kloepper et CM Ryu. 2009. « Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. » *Trends in Plant Science* 14 (1). Elsevier Current Trends: 1-4. doi:10.1016/j.tplants.2008.10.004. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138508002902>.
- Yang, P et JD van Elsas. 2018. « Mechanisms and ecological implications of the movement of bacteria in soil. » *Applied Soil Ecology*. doi:10.1016/j.apsoil.2018.04.014.
- Yang, S. 2020. « otuSummary: Summarizing OTU Table Regarding the Composition, Abundance and Beta Diversity of Abundant and Rare Biospheres. »
- Yasmin, S et D D'Souza. 2010. « Effects of Pesticides on the Growth and Reproduction of Earthworm: A Review. » *Applied and Environmental Soil Science* 2010: 1-9. doi:10.1155/2010/678360. <http://www.hindawi.com/journals/aess/2010/678360/>.
- Yeates, GW. 2007. « Abundance, diversity, and resilience of nematode assemblages in forest soils. » In *Canadian Journal of Forest Research*, 37:216-225. s.l.: s.n. doi:10.1139/X06-172.
- Yen, KM, CM Serdar et IC Gunsalus. 1988. « Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonads. » *Critical Reviews in Microbiology* 15 (3). Informa Healthcare: 247-268. doi:10.3109/10408418809104459. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10408418809104459>.
- Yergeau, E, M Arbour, R Brousseau, D Juck, JR Lawrence, L Masson, LG Whyte et CW Greer. 2009a. « Microarray and real-time PCR analyses of the responses of high-arctic soil bacteria to hydrocarbon pollution and bioremediation treatments. » *Applied and Environmental Microbiology* 75 (19): 6258-6267. doi:10.1128/AEM.01029-09.
- Yergeau, E, TH Bell, J Champagne, C Maynard, S Tardif, J Tremblay et CW Greer. 2015a. « Transplanting soil microbiomes leads to lasting effects on willow growth, but not on the rhizosphere microbiome. » *Frontiers in Microbiology* 6 (DEC). doi:10.3389/fmicb.2015.01436. <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fmicb.2015.01436/abstract>.
- Yergeau, E, C Maynard, S Sanschagrin, J Champagne, D Juck, K Lee et CW Greer. 2015b. « Microbial community composition, functions, and activities in the gulf of mexico 1 year after the deepwater horizon accident. » *Applied and Environmental Microbiology* 81 (17): 5855-5866. doi:10.1128/AEM.01470-15.
- Yergeau, E, S Sanschagrin, D Beaumier et CW Greer. 2012. « Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated canadian high arctic soils. » *PLoS ONE* 7 (1).

- doi:10.1371/journal.pone.0030058.
- Yergeau, E, S Sanschagrín, C Maynard, M St-Arnaud et CW Greer. 2014. « Microbial expression profiles in the rhizosphere of willows depend on soil contamination. » *The ISME Journal* 8 (2). Nature Publishing Group: 344-358. doi:10.1038/ismej.2013.163. <http://www.nature.com/articles/ismej2013163>.
- Yergeau, E, SA Schoondermark-Stolk, EL Brodie, S Déjean, TZ DeSantis, O Gonçalves, YM Piceno, GL Andersen et GA Kowalchuk. 2009b. « Environmental microarray analyses of Antarctic soil microbial communities. » *The ISME Journal* 3 (3): 340-351. doi:10.1038/ismej.2008.111. <http://www.nature.com/articles/ismej2008111>.
- Yergeau, E, J Tremblay, S Joly, M Labrecque, C Maynard, FE Pitre, M St-Arnaud et CW Greer. 2018. « Soil contamination alters the willow root and rhizosphere metatranscriptome and the root–rhizosphere interactome. » *The ISME Journal* 12 (3). Nature Publishing Group: 869-884. doi:10.1038/s41396-017-0018-4. <https://doi.org/10.1038/s41396-017-0018-4>.
- Zalesny, RS, EO Bauer, RB Hall, JA Zalesny, J Kunzman, CJ Rog et DE Riemenschneider. 2005. « Clonal variation in survival and growth of hybrid poplar and willow in an in situ trial on soils heavily contaminated with petroleum hydrocarbons. » *International Journal of Phytoremediation* 7 (3): 177-197. doi:10.1080/16226510500214632.
- Zavala-Cruz, J, F Trujillo-C, GC Ortiz-Ceballos, AI Ortiz-Ceballos, J Zavala-Cru, F Trujillo-C, GC Ortiz-Ceballos et AI Ortiz-Ceballos. 2013. « Tropical Endogeic Earthworm Population in a Pollution Gradient with Weathered Crude Oil. » *Research Journal of Environmental Sciences* 7 (1): 15-26. doi:10.3923/rjes.2013.15.26. <http://www.scialert.net/abstract/?doi=rjes.2013.15.26>.
- Zeb, A, S Li, J Wu, J Lian, W Liu et Y Sun. 2020. « Insights into the mechanisms underlying the remediation potential of earthworms in contaminated soil: A critical review of research progress and prospects. » *Science of the Total Environment*. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140145.
- De Zelicourt, A, M Al-Yousif et H Hirt. 2013. « Rhizosphere microbes as essential partners for plant stress tolerance. » *Molecular Plant* 6 (2): 242-245. doi:10.1093/mp/ss028.
- Zhang, S, Y Ning, X Zhang, Y Zhao, X Yang, K Wu, S Yang, G La, X Sun et X Li. 2015. « Contrasting characteristics of anthracene and pyrene degradation by wood rot fungus *Pycnoporus sanguineus* H1. » *International Biodeterioration and Biodegradation* 105. Elsevier Ltd: 228-232. doi:10.1016/j.ibiod.2015.09.012.
- Zhang, X, X Li, Y Jing, X Fang, X Zhang, B Lei et Y Yu. 2017. « Transplacental transfer of polycyclic aromatic hydrocarbons in paired samples of maternal serum, umbilical cord serum, and placenta in Shanghai, China. » *Environmental Pollution* 222. Elsevier Ltd: 267-275. doi:10.1016/j.envpol.2016.12.046.
- Zhou, J, D Chen, R Huang, G Huang, Y Yuan et H Fan. 2019. « Effects of bacterial-feeding nematodes on soil microbial activity and the microbial community in oil-contaminated soil. » *Journal of Environmental Management* 234. Academic Press: 424-430. doi:10.1016/j.jenvman.2019.01.021.
- Zhou, NY, J Al-Dulayymi, MS Baird et PA Williams. 2002. « Salicylate 5-hydroxylase from *Ralstonia* sp. strain U2: A monooxygenase with close relationships to and shared electron transport proteins with naphthalene dioxygenase. » *Journal of Bacteriology* 184 (6). American Society for Microbiology Journals: 1547-1555. doi:10.1128/JB.184.6.1547-1555.2002. <http://jb.asm.org/>.
- Zilber-Rosenberg, I et E Rosenberg. 2008. « Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: The hologenome theory of evolution. » *FEMS Microbiology Reviews*. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00123.x.
- Zimmerman, JR, U Ghosh, RN Millward, TS Bridges et RG Luthy. 2004. « Addition of carbon sorbents to reduce PCB and PAH bioavailability in marine sediments: Physicochemical tests. » *Environmental Science and Technology* 38 (20). American Chemical Society:

5458-5464. doi:10.1021/es034992v. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>.



## 7 ANNEXE I : MATERIEL SUPPLEMENTAIRE DE LA PUBLICATION DU CHAPITRE 3

Tableau Suppl. 1 Physicochemical characteristics from agricultural and forest mix soils

Nutrient and chemical composition		Agricultural soil	Forest mix
pH		4.6	5.6
pH buffer		5.7	6.0
%	<b>Organic matter</b>	6.1	6.5
	<b>P</b>	31	81
	<b>K</b>	178	123
kg/ha	<b>Ca</b>	1951	3338
	<b>Mg</b>	130	134
ppm	<b>Al</b>	1328	1598
ISP	<b>P/Al</b>	1.0	2.3
	<b>Mn</b>	20.0	20.0
	<b>Cu</b>	1.34	0.83
ppm	<b>Zn</b>	3.16	1.96
	<b>B</b>	<0.1	0.15
	<b>S</b>	-	-
	<b>Fe</b>	280	301
%	<b>N total</b>	0.24	0.17
	<b>C/N</b>	12.3	20.4
ppm	<b>N-NH<sub>4</sub></b>	17.7	9.9
ppm	<b>N-NO<sub>3</sub></b>	19.02	24.67
<b>Soil physical results: Granulometry</b>		<b>Agricultural soil</b>	<b>Forestry Mix</b>
	<b>Sand</b>	47.6	87.4
%	<b>Silt</b>	23.0	5.0
	<b>Clay</b>	29.5	7.64
<b>Texture classification</b>		Clay loam	Loamy sand
<b>Soil type</b>		Light	Light



**Tableau Suppl. 2 Summary of the three-way analysis of the variance (ANOVA) on the relative abundances of the ITS region OTUs identified at the class level of fungi. Values in bold indicate significant effects. Df, degrees of freedom. SumsOfSqs, sum of squares. MeanSqs, Mean squares.**

<i>Tremellomycetes</i>	Df	SumOfSqs	MeanOfSqs	F	P value
soil	1	0.011	0.011	3.673	0.059
contamination	1	0.005	0.005	1.817	0.181
<b>plant</b>	<b>1</b>	<b>0.132</b>	<b>0.132</b>	<b>45.529</b>	<b>&lt;0.001</b>
block	1	0.008	0.008	2.874	0.094
<b>soil:contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.017</b>	<b>0.017</b>	<b>5.747</b>	<b>0.019</b>
soil:plant	1	0.010	0.010	3.495	0.065
contamination:plant	1	0.003	0.003	0.891	0.348
soil:contamination:plant	1	0.011	0.011	3.789	0.055
Residuals	86	0.250	0.003		
<i>Pezizomycetes</i>	Df	SumOfSqs	MeanOfSqs	F	P value
soil	1	0.000	0.000	0.021	0.886
contamination	1	0.027	0.027	2.06	0.155
<b>plant</b>	<b>1</b>	<b>15.506</b>	<b>15.506</b>	<b>1186.035</b>	<b>&lt;0.001</b>
block	1	0.022	0.022	1.663	0.201
soil:contamination	1	0.023	0.023	1.753	0.189
soil:plant	1	0.001	0.001	0.055	0.816
contamination:plant	1	0.012	0.012	0.954	0.331
soil:contamination:plant	1	0.017	0.017	1.312	0.255
Residuals	86	1.124	0.013		
<i>Mortierellomycotina</i>	Df	SumOfSqs	MeanOfSqs	F	P value
<b>soil</b>	<b>1</b>	<b>0.504</b>	<b>0.504</b>	<b>48.379</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	1	0.001	0.001	0.053	0.818
<b>plant</b>	<b>1</b>	<b>1.373</b>	<b>1.373</b>	<b>131.763</b>	<b>&lt;0.001</b>
block	1	0.017	0.017	1.599	0.210
<b>soil:contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.049</b>	<b>0.049</b>	<b>4.697</b>	<b>0.033</b>
<b>soil:plant</b>	<b>1</b>	<b>0.287</b>	<b>0.287</b>	<b>27.518</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination:plant	1	0.000	0.000	0.036	0.851
soil:contamination:plant	1	0.059	0.059	5.702	0.019
Residuals	86	0.896	0.010		
<i>Leotiomycetes</i>	Df	SumOfSqs	MeanOfSqs	F	P value
<b>soil</b>	<b>1</b>	<b>0.090</b>	<b>0.090</b>	<b>5.194</b>	<b>0.025</b>
contamination	1	0.002	0.002	0.125	0.724
<b>plant</b>	<b>1</b>	<b>0.450</b>	<b>0.450</b>	<b>26.133</b>	<b>&lt;0.001</b>
block	1	0.002	0.002	0.141	0.708
soil:contamination	1	0.017	0.017	0.956	0.331

soil:plant	1	0.006	0.006	0.335	0.564
contamination:plant	1	0.024	0.024	1.409	0.238
soil:contamination:plant	1	0.018	0.018	1.048	0.309
Residuals	86	1.482	0.017		
<b>Agaricomycetes</b>	<b>Df</b>	<b>SumOfSq</b>	<b>MeanOfSq</b>	<b>F</b>	<b>P value</b>
<b>soil</b>	<b>1</b>	<b>0.074</b>	<b>0.074</b>	<b>34.734</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	1	0.001	0.001	0.258	0.613
<b>plant</b>	<b>1</b>	<b>0.146</b>	<b>0.146</b>	<b>68.675</b>	<b>&lt;0.001</b>
block	1	0.000	0.000	0.047	0.829
soil:contamination	1	0.000	0.000	0.025	0.875
<b>soil:plant</b>	<b>1</b>	<b>0.032</b>	<b>0.032</b>	<b>15.072</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination:plant	1	0.001	0.001	0.313	0.578
soil:contamination:plant	1	0.000	0.000	0.053	0.819
Residuals	86	0.182	0.002		

**Tableau Suppl. 3** Statistically significant Pearson's coefficients of correlation *r* between the relative abundance of bacterial and fungal OTUs or PAH bacterial degraders ASVs identified at the genus level and the quantity of phenanthrene (mg kg<sup>-1</sup>) found in soil.

Positive Pearson's correlations				
	Phylum	Genus	P value	Pearson's r
Fungi	<i>Ascomycota</i>	<i>Aspergillus</i>	<.0.001	0.834
	<i>Ascomycota</i>	<i>Acrodontium</i>	<.0.001	0.831
	<i>Basidiomycota</i>	<i>Imleria</i>	<.0.001	0.830
	<i>Basidiomycota</i>	<i>Postia</i>	<.0.001	0.811
	<i>Zygomycota</i>	<i>Umbelopsis</i>	<.0.001	0.790
	<i>Ascomycota</i>	<i>Acrophialophora</i>	<.0.001	0.780
	<i>Basidiomycota</i>	<i>Postia</i>	<.0.001	0.775
	<i>Ascomycota</i>	<i>Wilcoxina</i>	<.0.001	0.758
	<i>Basidiomycota</i>	NA	<.0.001	0.756
	<i>Ascomycota</i>	<i>Leptodontidium</i>	<.0.001	0.744
Bacterial community	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Polaromonas</i>	<.0.001	0.923
	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Novosphingobium</i>	<.0.001	0.832
	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>OPB35 soil groupCL</i>	<.0.001	0.824
	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylorosula</i>	<.0.001	0.843
	<i>Ignavibacteriae</i>	<i>BSV26FA</i>	<.0.001	0.879
	<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Methylorosula</i>	<.0.001	0.880
	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Prostheco bacter</i>	<.0.001	0.845
	<i>Deltaproteobacteria</i>	<i>Bacteriovorax</i>	<.0.001	0.869
	<i>Firmicutes</i>	<i>Fonticella</i>	<.0.001	0.877
	<i>Acidobacteria</i>	<i>HolophagaceaeFA</i>	<.0.001	0.838
PAH-RHD $\alpha$ GN degraders	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Delftia</i>	<.0.001	0.537
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Delftia</i>	<.0.001	0.534
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Delftia</i>	<.0.001	0.531
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Delftia</i>	<.0.001	0.530
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Delftia</i>	<.0.001	0.522
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Delftia</i>	<.0.001	0.520
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Delftia</i>	<.0.001	0.518
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Delftia</i>	<.0.001	0.518
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Delftia</i>	<.0.001	0.517
	<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Delftia</i>	<.0.001	0.515
PAH-RHD $\alpha$ GP	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium</i>	<.0.001	0.599
	<i>Actinobacteria</i>	NA	<.0.001	0.551
	<i>Actinobacteria</i>	NA	<.0.001	0.550

	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium</i>	<.0.001	0.548
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria-undef</i>	<.0.001	0.527
	<i>Actinobacteria</i>	NA	<.0.001	0.521
	<i>Actinobacteria</i>	NA	<.0.001	0.518
	<i>Bacteria</i>	NA	<.0.001	0.509
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Microbacterium</i>	<.0.001	0.507
	<i>Actinobacteria</i>	NA	<.0.001	0.505
<b>Negative Pearson's correlations</b>				
	<b>Phylum</b>	<b>Genus</b>	<b>P value</b>	<b>Pearson's r</b>
<b>Fungi</b>	<i>Ascomycota</i>	<i>Archaeorhizomyces</i>	0.008	-0.386
	<i>Ascomycota</i>	<i>Coniosporium</i>	0.008	-0.384
	<i>Ascomycota</i>	<i>Bionectria</i>	0.008	-0.384
	<i>Zygomycota</i>	<i>Mortierella</i>	0.011	-0.371
	<i>Ascomycota</i>	<i>Sphaerosporella</i>	0.012	-0.368
	<i>Ascomycota</i>	NA	0.013	-0.365
	<i>Ascomycota</i>	<i>Chloridium</i>	0.013	-0.365
	<i>Ascomycota</i>	<i>Spirosphaera</i>	0.013	-0.364
	<i>Ascomycota</i>	<i>Chloridium</i>	0.013	-0.364
	<i>Ascomycota</i>	NA	0.013	-0.364
<b>Bacterial community</b>	<i>Acidobacteria</i>	<i>uncultured-Acidobacteriaceae (Subgroup 1)</i>	<.0.001	-0.677
	<i>Acidobacteria</i>	<i>uncultured-Acidobacteriaceae (Subgroup 1)</i>	<.0.001	-0.642
	<i>Verrucomicrobia</i>	<i>DA101 soil groupFA</i>	<.0.001	-0.598
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Acidicaldus</i>	<.0.001	-0.597
	<i>Chloroflexi</i>	<i>TK10CL</i>	<.0.001	-0.594
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Luedemannella</i>	<.0.001	-0.587
	<i>Proteobacteria</i>	<i>SC-I-84OR</i>	<.0.001	-0.585
	<i>Acidobacteria</i>	<i>Subgroup 6CL</i>	<.0.001	-0.582
	<i>Proteobacteria</i>	<i>DA111FA</i>	<.0.001	-0.579
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Reyrannella</i>	<.0.001	-0.573
<b>PAH-RHD<math>\alpha</math> GN degraders</b>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Ralstonia</i>	0.003	-0.426
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Ralstonia</i>	0.004	-0.421
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Comamonas</i>	0.005	-0.410
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Comamonas</i>	0.005	-0.409
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Comamonas</i>	0.005	-0.408
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Comamonas</i>	0.005	-0.408
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Comamonas</i>	0.005	-0.408
	<i>Proteobacteria</i>	<i>Comamonas</i>	0.005	-0.404

**PAH-RHD $\alpha$  GP degraders**

<i>Proteobacteria</i>	<i>Comamonas</i>	0.005	-0.404
<i>Proteobacteria</i>	<i>Comamonas</i>	0.006	-0.398

No statistically significant negative Pearson's correlations found

Tableau Suppl. 4 Summary of the three-way analysis of the variance (ANOVA) on the relative abundances of the 16S rRNA gene OTUs identified at the phylum level of bacteria. Values in bold indicate significant effects. Df, degrees of freedom. SumsOfSqs, sum of squares. MeanSqs, Mean squares.

<i>Acidobacteria</i>	Df	SumOfSqs	MeanOfSqs	F	P value
soil	1	<b>0.15681</b>	<b>0.15681</b>	<b>59.017</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	1	0.00299	0.00299	1.127	0.291
plant	1	0.00024	0.00024	0.090	0.765
block	1	0.00044	0.00044	0.165	0.686
soil:contamination	1	0.00312	0.00312	1.174	0.282
soil:plant	<b>1</b>	<b>0.02612</b>	<b>0.02612</b>	<b>9.830</b>	<b>0.002</b>
contamination:plant	1	0.00018	0.00018	0.067	0.796
soil:contamination:plant	1	0.00015	0.00015	0.056	0.813
Residuals	87	0.23117	0.00266		
<i>Actinobacteria</i>	Df	SumOfSqs	MeanOfSqs	F	P value
soil	1	0.00060	0.00060	0.606	0.438
contamination	1	0.00106	0.00106	1.065	0.305
plant	<b>1</b>	<b>0.02038</b>	<b>0.02038</b>	<b>20.577</b>	<b>&lt;0.001</b>
block	1	0.00279	0.00279	2.817	0.097
soil:contamination	1	0.00037	0.00037	0.371	0.544
soil:plant	<b>1</b>	<b>0.00350</b>	<b>0.00350</b>	<b>3.534</b>	<b>0.064</b>
contamination:plant	1	0.00014	0.00014	0.138	0.711
soil:contamination:plant	1	0.00012	0.00012	0.118	0.732
Residuals	87	0.08618	0.00099		
<i>Alphaproteobacteria</i>	Df	SumOfSqs	MeanOfSqs	F	P value
soil	<b>1</b>	<b>0.02187</b>	<b>0.02187</b>	<b>32.006</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	1	0.00162	0.00162	2.374	0.127
plant	<b>1</b>	<b>0.00416</b>	<b>0.00416</b>	<b>6.092</b>	<b>0.016</b>
block	1	0.00050	0.00050	0.734	0.394
soil:contamination	<b>1</b>	<b>0.00404</b>	<b>0.00404</b>	<b>5.911</b>	<b>0.017</b>
soil:plant	<b>1</b>	<b>0.00721</b>	<b>0.00721</b>	<b>10.557</b>	<b>0.002</b>
contamination:plant	1	0.00002	0.00002	0.026	0.873
soil:contamination:plant	1	0.00108	0.00108	1.577	0.213
Residuals	87	0.05945	0.00068		
<i>Bacteroidetes</i>	Df	SumOfSqs	MeanOfSqs	F	P value
soil	<b>1</b>	<b>0.10442</b>	<b>0.10442</b>	<b>275.678</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	<b>1</b>	<b>0.00137</b>	<b>0.00137</b>	<b>3.607</b>	<b>0.061</b>
plant	<b>1</b>	<b>0.00471</b>	<b>0.00471</b>	<b>12.433</b>	<b>0.001</b>

<b>block</b>	<b>1</b>	<b>0.00232</b>	<b>0.00232</b>	<b>6.119</b>	<b>0.015</b>
<b>soil:contamination</b>	1	0.00007	0.00007	0.184	0.669
<b>soil:plant</b>	<b>1</b>	<b>0.00663</b>	<b>0.00663</b>	<b>17.503</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>contamination:plant</b>	1	0.00000	0.00000	0.009	0.926
<b>soil:contamination:plant</b>	1	0.00025	0.00025	0.654	0.421
<b>Residuals</b>	87	0.03295	0.00038		
<b><i>Betaproteobacteria</i></b>	<b>Df</b>	<b>SumOfSq</b>	<b>MeanOfSq</b>	<b>F</b>	<b>P value</b>
<b>soil</b>	<b>1</b>	<b>0.23470</b>	<b>0.23467</b>	<b>41.812</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>contamination</b>	1	0.00010	0.00006	0.010	0.919
<b>plant</b>	<b>1</b>	<b>0.03190</b>	<b>0.03187</b>	<b>5.678</b>	<b>0.019</b>
<b>block</b>	1	0.00290	0.00292	0.521	0.472
<b>soil:contamination</b>	1	0.00010	0.00010	0.019	0.892
<b>soil:plant</b>	<b>1</b>	<b>0.12150</b>	<b>0.12150</b>	<b>21.648</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>contamination:plant</b>	1	0.00170	0.00168	0.300	0.585
<b>soil:contamination:plant</b>	1	0.00850	0.00846	1.508	0.223
<b>Residuals</b>	87	0.48830	0.00561		
<b><i>Chloroflexi</i></b>	<b>Df</b>	<b>SumOfSq</b>	<b>MeanOfSq</b>	<b>F</b>	<b>P value</b>
<b>soil</b>	<b>1</b>	<b>0.25941</b>	<b>0.25941</b>	<b>548.362</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>contamination</b>	1	0.00097	0.00097	2.052	0.156
<b>plant</b>	<b>1</b>	<b>0.00152</b>	<b>0.00152</b>	<b>3.211</b>	<b>0.077</b>
<b>block</b>	1	0.00029	0.00029	0.604	0.439
<b>soil:contamination</b>	1	0.00011	0.00011	0.237	0.627
<b>soil:plant</b>	1	0.00030	0.00030	0.632	0.429
<b>contamination:plant</b>	1	0.00000	0.00000	0.009	0.923
<b>soil:contamination:plant</b>	1	0.00006	0.00006	0.120	0.730
<b>Residuals</b>	87	0.04116	0.00047		
<b><i>Deltaproteobacteria</i></b>	<b>Df</b>	<b>SumOfSq</b>	<b>MeanOfSq</b>	<b>F</b>	<b>P value</b>
<b>soil</b>	<b>1</b>	<b>0.00529</b>	<b>0.00529</b>	<b>42.913</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>contamination</b>	1	0.00009	0.00009	0.717	0.399
<b>plant</b>	1	0.00014	0.00014	1.148	0.287
<b>block</b>	1	0.00036	0.00036	2.930	0.091
<b>soil:contamination</b>	1	0.00014	0.00014	1.164	0.284
<b>soil:plant</b>	1	0.00020	0.00020	1.617	0.207
<b>contamination:plant</b>	1	0.00004	0.00004	0.287	0.594
<b>soil:contamination:plant</b>	1	0.00003	0.00003	0.247	0.620
<b>Residuals</b>	87	0.01072	0.00012		
<b><i>Firmicutes</i></b>	<b>Df</b>	<b>SumOfSq</b>	<b>MeanOfSq</b>	<b>F</b>	<b>P value</b>
<b>soil</b>	<b>1</b>	<b>0.0026</b>	<b>0.0026</b>	<b>28.414</b>	<b>&lt;0.001</b>

contamination	1	<b>0.0006</b>	<b>0.0006</b>	<b>6.677</b>	<b>0.011</b>
plant	1	0.0002	0.0002	2.403	0.125
block	1	0.0000	0.0000	0.007	0.934
soil:contamination	<b>1</b>	<b>0.0005</b>	<b>0.0005</b>	<b>5.148</b>	<b>0.026</b>
soil:plant	1	0.0001	0.0001	0.936	0.336
contamination:plant	<b>1</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0003</b>	<b>3.260</b>	<b>0.075</b>
soil:contamination:plant	1	0.0000	0.0000	0.445	0.506
Residuals	87	0.0080	0.0001		
<b><i>Gammaproteobacteria</i></b>	<b>Df</b>	<b>SumOfSq</b>	<b>MeanOfSq</b>	<b>F</b>	<b>P value</b>
soil	<b>1</b>	<b>0.0152</b>	<b>0.0152</b>	<b>73.862</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	<b>1</b>	<b>0.0011</b>	<b>0.0011</b>	<b>5.283</b>	<b>0.024</b>
plant	1	0.0000	0.0000	0.053	0.819
block	1	0.0000	0.0000	0.191	0.663
soil:contamination	<b>1</b>	<b>0.0008</b>	<b>0.0008</b>	<b>3.918</b>	<b>0.051</b>
soil:plant	1	0.0000	0.0000	0.059	0.808
contamination:plant	1	0.0004	0.0004	1.809	0.182
soil:contamination:plant	1	0.0000	0.0000	0.060	0.806
Residuals	87	0.0179	0.0002		
<b><i>Gemmatimonadetes</i></b>	<b>Df</b>	<b>SumOfSq</b>	<b>MeanOfSq</b>	<b>F</b>	<b>P value</b>
soil	<b>1</b>	<b>0.0024</b>	<b>0.0024</b>	<b>29.953</b>	<b>&lt;0.001</b>
contamination	<b>1</b>	<b>0.0011</b>	<b>0.0011</b>	<b>14.454</b>	<b>&lt;0.001</b>
plant	1	0.0000	0.0000	0.140	0.709
block	1	0.0000	0.0000	0.184	0.669
soil:contamination	1	0.0000	0.0000	0.222	0.639
soil:plant	1	0.0002	0.0002	2.701	0.104
contamination:plant	1	0.0000	0.0000	0.072	0.789
soil:contamination:plant	1	0.0003	0.0003	3.239	0.075
Residuals	87	0.0069	0.0001		
<b><i>Planctomycetes</i></b>	<b>Df</b>	<b>SumOfSq</b>	<b>MeanOfSq</b>	<b>F</b>	<b>P value</b>
soil	<b>1</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0003</b>	<b>5.550</b>	<b>0.021</b>
contamination	<b>1</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0003</b>	<b>5.978</b>	<b>0.017</b>
plant	<b>1</b>	<b>0.0004</b>	<b>0.0004</b>	<b>8.910</b>	<b>0.004</b>
block	1	0.0000	0.0000	0.039	0.844
soil:contamination	1	0.0001	0.0001	2.353	0.129
soil:plant	<b>1</b>	<b>0.0003</b>	<b>0.0003</b>	<b>7.238</b>	<b>0.009</b>
contamination:plant	1	0.0000	0.0000	0.465	0.497
soil:contamination:plant	1	0.0001	0.0001	1.937	0.168
Residuals	87	0.0041	0.0000		



Others	Df	SumOfSq	MeanOfSq	F	P value
<b>soil</b>	<b>1</b>	<b>0.0014</b>	<b>0.0014</b>	<b>36.033</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>contamination</b>	1	0.0000	0.0000	1.214	0.274
<b>plant</b>	1	0.0000	0.0000	0.073	0.787
<b>block</b>	1	0.0000	0.0000	0.322	0.572
<b>soil:contamination</b>	1	0.0001	0.0001	1.252	0.266
<b>soil:plant</b>	1	0.0000	0.0000	0.166	0.685
<b>contamination:plant</b>	1	0.0000	0.0000	0.712	0.401
<b>soil:contamination:plant</b>	1	0.0001	0.0001	2.251	0.137
<b>Residuals</b>	87	0.0035	0.0000		

**Tableau Suppl. 5 Read counts reports por whole bacterial and fungi communities (OTUs) and for PAH Gram-negative and Gram-positive bacterial communities (ASVs).**

	16S rRNA	ITS region	PAH-RHD GN	PAH-RHD GP
<b>total_reads</b>	18,877,788	16,168,948	10,559,056	7,055,496
<b>contaminants_reads</b>	11,066	557,756	631,164	2,961,494
<b>phix_reads</b>	2,136	892	1,458	2,872
<b>non_contam_non_phix_reads</b>	18,864,586	15,610,300	9,926,434	4,091,130
<b>non_contam_non_phix_reads_1</b>	9,432,293	7,805,150	4,963,217	2,045,565
<b>non_contam_non_phix_reads_2</b>	9,432,293	7,805,150	4,121,810	819,318
<b>assembled_reads</b>	9,305,398	5,981,093		
<b>assembled_reads_QC_passed</b>	8,535,756	5,529,429		
	4,646,772	5,245,486	3,543,681	538,575
<b>Clustered</b>	sequences in 21,182 clusters	sequences in 3,464 clusters	sequences in 1,438 clusters	sequences in 3,019 clusters
	4,646,766	5,240,163	3,543,681	538,513
<b>Classified clusters</b>	sequences packed in 21,181 cluster	sequences packed in 3,327 cluster	sequences packed in 1,438 cluster	sequences packed in 3,017 cluster



## 8 ANNEXE II : MATERIEL SUPPLEMENTAIRE DE LA PUBLICATION DU CHAPITRE 4

---

Tableau Suppl. 6 Read counts report for whole *Bacteria*, *Archaea* and *Fungi* communities and for PAH Gram-negative (GN) and Gram-positive (GP) bacterial degraders (ASV).

	16S rRNA	ITS region	PAH RHD GN	PAH RHD GP
<b>total_reads</b>	16,172,736	23,079,526	31,702,674	25,928,318
<b>contaminants_reads</b>	42,614	34,708	11,408,476	999,512
<b>phix_reads</b>	706	630	28,342	4,856
<b>non_contam_non_phix_reads</b>	16,129,614	23,044,188	20,265,856	24,923,950
<b>non_contam_non_phix_reads_1</b>	8,064,807	11,522,093	10,132,928	12,461,975
<b>assembled_reads_QC_passed</b>	7,795,754	6,946,010	6,715,225	4,165,994

**Tableau Suppl. 7 Summary of the three-way analysis of the variance (ANOVA) on the species richness (considered as the observed number of ASVs) of the ITS region for fungi, the 16S rRNA gene for total bacterial and archaea, and the PAH-RHD $\alpha$  genes for Gram-negative and Gram-positive bacterial degraders.**

<b>Species Richness (observed number of ASVs)</b>					
<b><i>Fungi</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
<b>SFWC</b>	<b>7</b>	<b>38155</b>	<b>5451</b>	<b>2.139</b>	<b>0.042 *</b>
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>21696</b>	<b>21696</b>	<b>8.514</b>	<b>0.004 **</b>
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>149020</b>	<b>149020</b>	<b>58.475</b>	<b>&lt;0.001 ***</b>
SFWC:contamination	7	6511	930	0.365	0.921
SFWC:compartment	7	11908	1701	0.668	0.699
contamination:compartment	1	5240	5240	2.056	0.154
SFWC:contamination:compartment	7	11737	1677	0.658	0.707
Residuals	160	407751	2548		
<b><i>Bacteria and Archaea</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
SFWC	7	138038	19720	1.512	0.167
contamination	1	34220	34220	2.624	0.107
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>407971</b>	<b>407971</b>	<b>31.289</b>	<b>&lt;0.001 ***</b>
SFWC:contamination	7	30557	4365	0.335	0.937
SFWC:compartment	7	74778	10683	0.819	0.573
contamination:compartment	1	1852	1852	0.142	0.707
SFWC:contamination:compartment	7	47881	6840	0.525	0.815
Residuals	159	2E+06	13039		
<b><i>PAH-RHD Gram Negative</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
SFWC	7	1495	214	0.621	0.738
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>8365</b>	<b>8365</b>	<b>24.342</b>	<b>&lt;0.001 ***</b>
compartment	1	22	22	0.065	0.799
SFWC:contamination	7	1545	221	0.642	0.720
SFWC:compartment	7	3996	571	1.661	0.122
contamination:compartment	1	546	546	1.588	0.209
<b>SFWC:contamination:compartment</b>	<b>7</b>	<b>6647</b>	<b>950</b>	<b>2.763</b>	<b>0.010 **</b>
Residuals	159	54641	344		
<b><i>PAH-RHD Gram Positive</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
<b>SFWC</b>	<b>7</b>	<b>87335</b>	<b>12476</b>	<b>1.94</b>	<b>0.067 .</b>
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>557019</b>	<b>557019</b>	<b>86.626</b>	<b>&lt;0.001 ***</b>
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>708810</b>	<b>708810</b>	<b>110.23</b>	<b>&lt;0.001 ***</b>
SFWC:contamination	7	36370	5196	0.808	0.582
<b>SFWC:compartment</b>	<b>7</b>	<b>103251</b>	<b>14750</b>	<b>2.294</b>	<b>0.030 *</b>
<b>contamination:compartment</b>	<b>1</b>	<b>51018</b>	<b>51018</b>	<b>7.934</b>	<b>0.005 **</b>

SFWC:contamination:compartment	7	15093	2156	0.335	0.937
Residuals	157	1E+06	6430		

<sup>a</sup> Values in bold indicate significant or marginally significant effects. Df, degrees of freedom; F, variance ratio; Pr(>F), P value.

**Tableau Suppl. 8 Summary of the three-way analysis of the variance (ANOVA) on the relative abundance of the ITS region ASVs identified at the genus level of *Fungi*<sup>a</sup>.**

<i>Alternaria</i>	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>10.454</b>	<b>0.001</b>	<b>**</b>
compartment	1	0.000	0.000	0.826	0.365	
SFWC	7	0.002	0.000	1.447	0.190	
contamination:compartment	1	0.000	0.000	1.973	0.162	
<b>contamination:SFWC</b>	<b>7</b>	<b>0.002</b>	<b>0.000</b>	<b>1.765</b>	<b>0.098</b>	<b>.</b>
compartment:SFWC	7	0.001	0.000	0.603	0.752	
contamination:compartment:SFWC	7	0.001	0.000	0.518	0.820	
Residuals	159	0.030	0.000			
<i>Chaetomium</i>	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
contamination	1	0.013	0.012	1.156	0.284	
compartment	1	0.008	0.008	0.759	0.385	
<b>SFWC</b>	<b>7</b>	<b>0.316</b>	<b>0.045</b>	<b>4.184</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
contamination:compartment	1	0.017	0.017	1.595	0.209	
contamination:SFWC	7	0.112	0.016	1.490	0.174	
<b>compartment:SFWC</b>	<b>7</b>	<b>0.133</b>	<b>0.019</b>	<b>1.765</b>	<b>0.098</b>	<b>.</b>
contamination:compartment:SFWC	7	0.024	0.003	0.315	0.946	
Residuals	159	1.714	0.011			
<i>Cladosporium</i>	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.010</b>	<b>0.010</b>	<b>5.710</b>	<b>0.018</b>	<b>*</b>
compartment	1	0.002	0.002	1.122	0.291	
SFWC	7	0.020	0.003	1.694	0.114	
<b>contamination:compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.006</b>	<b>0.006</b>	<b>3.304</b>	<b>0.071</b>	<b>.</b>
contamination:SFWC	7	0.004	0.001	0.366	0.921	
compartment:SFWC	7	0.004	0.001	0.378	0.914	
contamination:compartment:SFWC	7	0.008	0.001	0.677	0.691	
Residuals	159	0.270	0.002			
<i>Cystobasidium</i>	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>5.551</b>	<b>0.020</b>	<b>*</b>
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.004</b>	<b>0.004</b>	<b>7.331</b>	<b>0.008</b>	<b>**</b>
<b>SFWC</b>	<b>7</b>	<b>0.007</b>	<b>0.001</b>	<b>1.764</b>	<b>0.098</b>	<b>.</b>
contamination:compartment	1	0.001	0.001	2.250	0.136	
contamination:SFWC	7	0.007	0.001	1.711	0.110	
compartment:SFWC	7	0.005	0.001	1.203	0.304	
contamination:compartment:SFWC	7	0.004	0.001	1.023	0.417	
Residuals	159	0.087	0.001			
<i>Gibberella</i>	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	

<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.016</b>	<b>0.016</b>	<b>3.777</b>	<b>0.054</b>	.
compartment	1	0.003	0.003	0.682	0.410	
SFWC	7	0.043	0.006	1.428	0.198	
contamination:compartment	1	0.000	0.000	0.012	0.911	
contamination:SFWC	7	0.035	0.005	1.171	0.323	
compartment:SFWC	7	0.018	0.003	0.604	0.752	
contamination:compartment:SFWC	7	0.033	0.005	1.084	0.376	
Residuals	159	0.681	0.004			
<b><i>Mortierella</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>7.841</b>	<b>0.006</b>	**
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>11.637</b>	<b>&lt;0.001</b>	***
SFWC	7	0.002	0.000	1.585	0.143	
contamination:compartment	1	0.000	0.000	2.183	0.142	
contamination:SFWC	7	0.001	0.000	0.787	0.599	
compartment:SFWC	7	0.001	0.000	0.771	0.612	
contamination:compartment:SFWC	7	0.001	0.000	0.672	0.696	
Residuals	159	0.024	0.000			
<b><i>Other Ascomycota</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.008</b>	<b>0.008</b>	<b>5.626</b>	<b>0.019</b>	*
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.016</b>	<b>0.016</b>	<b>10.480</b>	<b>0.001</b>	**
<b>SFWC</b>	<b>7</b>	<b>0.019</b>	<b>0.003</b>	<b>1.822</b>	<b>0.086</b>	.
contamination:compartment	1	0.000	0.000	0.001	0.978	
contamination:SFWC	7	0.009	0.001	0.851	0.547	
compartment:SFWC	7	0.006	0.001	0.553	0.793	
contamination:compartment:SFWC	7	0.009	0.001	0.828	0.566	
Residuals	159	0.237	0.001			
<b><i>Other Fungi</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.019</b>	<b>0.019</b>	<b>8.480</b>	<b>0.004</b>	**
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.025</b>	<b>0.025</b>	<b>11.395</b>	<b>&lt;0.001</b>	***
<b>SFWC</b>	<b>7</b>	<b>0.031</b>	<b>0.004</b>	<b>2.014</b>	<b>0.056</b>	.
contamination:compartment	1	0.004	0.004	1.791	0.183	
contamination:SFWC	7	0.005	0.001	0.328	0.940	
compartment:SFWC	7	0.009	0.001	0.591	0.763	
contamination:compartment:SFWC	7	0.010	0.001	0.651	0.713	
Residuals	159	0.348	0.002			
<b><i>Other Ostropales</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.008</b>	<b>0.008</b>	<b>10.862</b>	<b>0.001</b>	**
compartment	1	0.000	0.000	0.307	0.580	
SFWC	7	0.005	0.001	0.918	0.494	
contamination:compartment	1	0.000	0.000	0.549	0.460	



contamination:SFWC	7	0.002	0.000	0.501	0.833
compartment:SFWC	7	0.004	0.001	0.868	0.533
contamination:compartment:SFWC	7	0.004	0.001	0.902	0.507
Residuals	159	0.113	0.001		

<b>Platygramme</b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
contamination	1	0.003	0.003	0.207	0.649
compartment	1	0.000	0.000	0.019	0.891
SFWC	7	0.124	0.018	1.445	0.191
contamination:compartment	1	0.019	0.019	1.577	0.211
contamination:SFWC	7	0.087	0.012	1.019	0.420
compartment:SFWC	7	0.064	0.009	0.750	0.630
contamination:compartment:SFWC	7	0.010	0.001	0.115	0.997
Residuals	159	1.941	0.012		

<b>Pseudofabrea</b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
contamination	1	0.005	0.005	1.835	0.177
compartment	1	0.003	0.003	1.207	0.274
SFWC	7	0.020	0.003	1.093	0.370
contamination:compartment	1	0.003	0.002	0.962	0.328
contamination:SFWC	7	0.021	0.003	1.130	0.347
compartment:SFWC	7	0.015	0.002	0.836	0.559
contamination:compartment:SFWC	7	0.015	0.002	0.831	0.563
Residuals	159	0.413	0.003		

<b>Rhodotorula</b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>5.631</b>	<b>0.019</b> *
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>4.312</b>	<b>0.039</b> *
SFWC	7	0.004	0.001	1.285	0.261
<b>contamination:compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>4.379</b>	<b>0.038</b> *
contamination:SFWC	7	0.004	0.001	1.115	0.356
compartment:SFWC	7	0.003	0.000	1.048	0.400
contamination:compartment:SFWC	7	0.003	0.000	0.851	0.547
Residuals	159	0.072	0.000		

<b>Sphaerosporella</b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>2.403</b>	<b>2.403</b>	<b>23.075</b>	<b>&lt;0.001</b> ***
compartment	1	0.045	0.045	0.436	0.510
<b>SFWC</b>	<b>7</b>	<b>1.892</b>	<b>0.270</b>	<b>2.595</b>	<b>0.015</b> *
contamination:compartment	1	0.235	0.235	2.254	0.135
contamination:SFWC	7	0.495	0.071	0.679	0.690
compartment:SFWC	7	0.170	0.024	0.234	0.977
contamination:compartment:SFWC	7	0.160	0.023	0.220	0.980
Residuals	159	16.557	0.104		

<i>Zopfiella</i>	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.044</b>	<b>0.044</b>	<b>3.905</b>	<b>0.050</b>	*
compartment	1	0.006	0.006	0.538	0.464	
<b>SFWC</b>	<b>7</b>	<b>0.229</b>	<b>0.033</b>	<b>2.936</b>	<b>0.006</b>	**
contamination:compartment	1	0.011	0.011	1.009	0.317	
contamination:SFWC	7	0.085	0.012	1.093	0.371	
compartment:SFWC	7	0.010	0.001	0.126	0.996	
contamination:compartment:SFWC	7	0.017	0.002	0.213	0.982	
Residuals	159	1.773	0.011			

<sup>a</sup> Values in bold indicate significant or marginally significant effects. Df, degrees of freedom; F, variance ratio; Pr(>F), P value.

**Tableau Suppl. 9** Summary of the three-way analysis of the variance (ANOVA) on the relative abundance of the 16S rRNA gene ASVs identified at the phylum level of *Bacteria*.

ANOVA test results						
<b><i>Acidobacteriota</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>2.37E-03</b>	<b>2.37E-03</b>	<b>22.536</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>4.75E-04</b>	<b>4.75E-04</b>	<b>4.526</b>	<b>0.035</b>	<b>*</b>
SFWC	7	5.41E-04	7.72E-05	0.736	0.642	
contamination:compartment	1	9.50E-05	9.53E-05	0.908	0.342	
contamination:SFWC	7	8.08E-04	1.15E-04	1.1	0.366	
compartment:SFWC	7	6.24E-04	8.91E-05	0.849	0.549	
contamination:compartment:SFWC	7	3.19E-04	4.56E-05	0.435	0.879	
Residuals	159	1.67E-02	1.05E-04			
<b><i>Actinobacteriota</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>1.64E-02</b>	<b>1.63E-02</b>	<b>15.628</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>2.18E-02</b>	<b>2.18E-02</b>	<b>20.848</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
SFWC	7	9.13E-03	1.31E-03	1.247	0.280	
contamination:compartment	1	6.10E-04	6.06E-04	0.58	0.448	
<b>contamination:SFWC</b>	<b>7</b>	<b>1.29E-02</b>	<b>1.84E-03</b>	<b>1.757</b>	<b>0.100</b>	<b>.</b>
compartment:SFWC	7	5.79E-03	8.27E-04	0.79	0.596	
contamination:compartment:SFWC	7	3.96E-03	5.66E-04	0.541	0.803	
Residuals	159	1.66E-01	1.05E-03			
<b><i>Alphaproteobacteria</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>1.30E-01</b>	<b>1.30E-01</b>	<b>58.382</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>1.94E-02</b>	<b>1.94E-02</b>	<b>8.668</b>	<b>0.004</b>	<b>**</b>
SFWC	7	3.40E-03	4.90E-04	0.22	0.980	
<b>contamination:compartment</b>	<b>1</b>	<b>8.00E-03</b>	<b>8.00E-03</b>	<b>3.583</b>	<b>0.060</b>	<b>.</b>
contamination:SFWC	7	5.80E-03	8.30E-04	0.372	0.918	
compartment:SFWC	7	1.00E-02	1.42E-03	0.637	0.725	
contamination:compartment:SFWC	7	8.20E-03	1.17E-03	0.525	0.814	
Residuals	159	3.55E-01	2.23E-03			
<b><i>Bacteroidota</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>1.00E-01</b>	<b>1.00E-01</b>	<b>72.515</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
compartment	1	1.20E-03	1.20E-03	0.868	0.353	
SFWC	7	6.72E-03	9.60E-04	0.694	0.677	
contamination:compartment	1	2.54E-03	2.54E-03	1.835	0.178	
<b>contamination:SFWC</b>	<b>7</b>	<b>1.71E-02</b>	<b>2.44E-03</b>	<b>1.764</b>	<b>0.098</b>	<b>.</b>
compartment:SFWC	7	1.36E-02	1.95E-03	1.408	0.205	
contamination:compartment:SFWC	7	5.03E-03	7.20E-04	0.52	0.819	
Residuals	159	2.20E-01	1.38E-03			
<b><i>Bdellovibrionota</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
contamination	1	1.00E-06	8.10E-07	0.035	0.853	
compartment	1	2.10E-05	2.11E-05	0.905	0.343	

SFWC	7	2.33E-04	3.33E-05	1.428	0.197	
contamination:compartment	1	1.00E-05	1.00E-05	0.429	0.514	
contamination:SFWC	7	1.36E-04	1.94E-05	0.832	0.563	
contamination:compartment:SFWC	7	5.40E-05	7.66E-06	0.328	0.94	
compartment:SFWC	7	8.10E-05	1.16E-05	0.498	0.835	
Residuals	159	3.71E-03	2.33E-05			
<b><i>Chloroflexota</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>6.18E-02</b>	<b>6.18E-02</b>	<b>152.645</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>5.32E-03</b>	<b>5.32E-03</b>	<b>13.132</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
SFWC	7	1.71E-03	2.40E-04	0.602	0.753	
contamination:compartment	1	1.60E-04	1.60E-04	0.389	0.534	
contamination:SFWC	7	4.23E-03	6.00E-04	1.493	0.173	
compartment:SFWC	7	2.73E-03	3.90E-04	0.965	0.459	
contamination:compartment:SFWC	7	5.60E-04	8.00E-05	0.196	0.986	
Residuals	159					
<b><i>Firmicutes</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
contamination	1	1.20E-04	1.20E-04	0.208	0.649	
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>5.86E-03</b>	<b>5.86E-03</b>	<b>10.175</b>	<b>0.002</b>	<b>**</b>
SFWC	7	6.35E-03	9.07E-04	1.575	0.146	
contamination:compartment	1	1.41E-03	1.41E-03	2.454	0.119	
contamination:SFWC	7	2.21E-03	3.16E-04	0.549	0.796	
compartment:SFWC	7	1.79E-03	2.56E-04	0.444	0.873	
contamination:compartment:SFWC	7	3.75E-03	5.36E-04	0.931	0.485	
Residuals	159	9.16E-02	5.76E-04			
<b><i>Gammaproteobacteria</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>9.54E-02</b>	<b>9.54E-02</b>	<b>41.855</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
compartment	1	0.00E+00	2.00E-05	0.007	0.934	
SFWC	7	1.22E-02	1.74E-03	0.762	0.620	
contamination:compartment	1	2.00E-04	2.00E-04	0.089	0.766	
contamination:SFWC	7	1.49E-02	2.13E-03	0.933	0.483	
compartment:SFWC	7	8.60E-03	1.23E-03	0.538	0.805	
contamination:compartment:SFWC	7	3.70E-03	5.30E-04	0.234	0.976	
Residuals	159	3.62E-01	2.28E-03			
<b><i>Gemmatimonadota</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>1.77E-03</b>	<b>1.77E-03</b>	<b>27.93</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>1.06E-03</b>	<b>1.06E-03</b>	<b>16.681</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
SFWC	7	3.51E-04	5.02E-05	0.791	0.596	
<b>contamination:compartment</b>	<b>1</b>	<b>3.57E-04</b>	<b>3.57E-04</b>	<b>5.621</b>	<b>0.019</b>	<b>*</b>
contamination:SFWC	7	4.65E-04	6.64E-05	1.047	0.401	
compartment:SFWC	7	5.01E-04	7.16E-05	1.128	0.348	
contamination:compartment:SFWC	7	4.20E-04	5.99E-05	0.945	0.474	
Residuals	159	1.01E-02	6.35E-05			
<b><i>Myxococcota</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	

contamination	1	1.26E-04	1.26E-04	0.876	0.351	
compartment	1	1.00E-06	1.23E-06	0.009	0.926	
SFWC	7	1.67E-03	2.39E-04	1.665	0.121	
contamination:compartment	1	6.90E-05	6.87E-05	0.48	0.49	
contamination:SFWC	7	1.11E-03	1.59E-04	1.108	0.361	
compartment:SFWC	7	2.43E-04	3.48E-05	0.243	0.974	
contamination:compartment:SFWC	7	5.50E-04	7.86E-05	0.548	0.797	
Residuals	159	2.28E-02	1.43E-04			
<b><i>Planctomycetota</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
contamination	1	2.00E-06	1.80E-06	0.027	0.869	
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>7.24E-04</b>	<b>7.24E-04</b>	<b>10.69</b>	<b>0.001</b>	<b>**</b>
SFWC	7	6.13E-04	8.76E-05	1.294	0.257	
contamination:compartment	1	1.00E-06	1.00E-06	0.015	0.904	
contamination:SFWC	7	4.95E-04	7.07E-05	1.044	0.403	
compartment:SFWC	7	6.23E-04	8.90E-05	1.314	0.247	
contamination:compartment:SFWC	7	4.12E-04	5.89E-05	0.87	0.532	
Residuals	159	1.08E-02	6.77E-05			
<b><i>Verrucomicrobiota</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
contamination	1	3.26E-04	3.26E-04	1.966	0.163	
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>3.78E-03</b>	<b>3.78E-03</b>	<b>22.764</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
SFWC	7	1.03E-03	1.47E-04	0.887	0.519	
contamination:compartment	1	1.49E-04	1.49E-04	0.894	0.346	
contamination:SFWC	7	7.35E-04	1.05E-04	0.632	0.729	
compartment:SFWC	7	3.44E-04	4.90E-05	0.296	0.955	
<b>contamination:compartment:SFWC</b>	<b>7</b>	<b>2.20E-03</b>	<b>3.14E-04</b>	<b>1.892</b>	<b>0.074</b>	<b>.</b>
Residuals	159	2.64E-02	1.66E-04			

<sup>a</sup> Values in bold indicate significant or marginally significant effects. Df, degrees of freedom; F, variance ratio; Pr(>F), P value.

**Tableau Suppl. 10 Summary of the three-way analysis of the variance (ANOVA) on the relative abundance of the PAH-RHD $\alpha$  Gram-negative gene ASVs identified at the genus level of *Bacteria*.**

<b><i>Aeromonas</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.004</b>	<b>0.004</b>	<b>5.668</b>	<b>0.019</b>	<b>*</b>
compartment	1	0.001	0.001	2.16	0.144	
SFWC	7	0.003	0	0.629	0.731	
contamination:compartment	1	0	0	0.005	0.945	
contamination:SFWC	7	0.001	0	0.322	0.943	
compartment:SFWC	7	0.005	0.001	1.201	0.305	
contamination:compartment:SFWC	7	0.003	0	0.607	0.75	
Residuals	151	0.096	0.001			
<b><i>Bacillus</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.007</b>	<b>0.007</b>	<b>4.984</b>	<b>0.027</b>	<b>*</b>
compartment	1	0.003	0.003	2.391	0.124	
SFWC	7	0.01	0.001	1.058	0.394	
<b>contamination:compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.004</b>	<b>0.004</b>	<b>3.019</b>	<b>0.084</b>	<b>.</b>
contamination:SFWC	7	0.01	0.001	1.076	0.381	
compartment:SFWC	7	0.006	0.001	0.642	0.721	
contamination:compartment:SFWC	7	0.003	0	0.36	0.924	
Residuals	151	0.205	0.001			
<b><i>Comamonas</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>3.864</b>	<b>3.864</b>	<b>29.762</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.535</b>	<b>0.535</b>	<b>4.122</b>	<b>0.044</b>	<b>*</b>
SFWC	7	0.353	0.05	0.389	0.908	
contamination:compartment	1	0.154	0.154	1.19	0.277	
contamination:SFWC	7	1.013	0.145	1.114	0.357	
compartment:SFWC	7	0.66	0.094	0.726	0.65	
contamination:compartment:SFWC	7	0.232	0.033	0.256	0.97	
Residuals	151	19.604	0.13			
<b><i>Delftia</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>9.226</b>	<b>9.226</b>	<b>93.241</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>1.168</b>	<b>1.168</b>	<b>11.803</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
SFWC	7	0.185	0.026	0.268	0.966	
contamination:compartment	1	0.269	0.269	2.718	0.101	
contamination:SFWC	7	0.807	0.115	1.166	0.326	
compartment:SFWC	7	0.403	0.058	0.582	0.77	
contamination:compartment:SFWC	7	0.096	0.014	0.138	0.995	
Residuals	151	14.941	0.099			
<b><i>Enterobacter</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	

<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.005</b>	<b>0.005</b>	<b>5.119</b>	<b>0.025</b>	*
compartment	1	0	0	0.199	0.656	
SFWC	7	0.003	0	0.423	0.887	
contamination:compartment	1	0	0	0.397	0.53	
contamination:SFWC	7	0.004	0.001	0.544	0.8	
compartment:SFWC	7	0.008	0.001	1.047	0.401	
contamination:compartment:SFWC	7	0.005	0.001	0.729	0.647	
Residuals	151	0.16	0.001			
<b><i>Gammaproteobacteriota undef.</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
contamination	1	0.016	0.016	1.705	0.194	
compartment	1	0.012	0.012	1.24	0.267	
SFWC	7	0.037	0.005	0.564	0.784	
contamination:compartment	1	0.008	0.008	0.863	0.354	
contamination:SFWC	7	0.055	0.008	0.831	0.563	
compartment:SFWC	7	0.064	0.009	0.97	0.456	
contamination:compartment:SFWC	7	0.064	0.009	0.965	0.459	
Residuals	151	1.424	0.009			
<b><i>Martelella</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.008</b>	<b>0.008</b>	<b>5.67</b>	<b>0.019</b>	*
compartment	1	0.001	0.001	0.533	0.467	
SFWC	7	0.006	0.001	0.594	0.76	
contamination:compartment	1	0	0	0.095	0.758	
contamination:SFWC	7	0.004	0.001	0.449	0.87	
compartment:SFWC	7	0.012	0.002	1.26	0.274	
contamination:compartment:SFWC	7	0.003	0	0.342	0.933	
Residuals	151	0.211	0.001			
<b><i>Other Bacteria</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>7.064</b>	<b>0.009</b>	**
compartment	1	0.001	0.001	1.917	0.168	
SFWC	7	0.002	0	0.683	0.686	
contamination:compartment	1	0	0	0.411	0.522	
contamination:SFWC	7	0.001	0	0.477	0.85	
compartment:SFWC	7	0.002	0	0.692	0.678	
contamination:compartment:SFWC	7	0.002	0	0.771	0.613	
Residuals	151	0.061	0			
<b><i>Other Proteobacteriota</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.005</b>	<b>0.005</b>	<b>9.285</b>	<b>0.003</b>	**
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>3.739</b>	<b>0.055</b>	.
SFWC	7	0.003	0	0.837	0.558	
contamination:compartment	1	0.001	0.001	2.098	0.15	

contamination:SFWC	7	0.001	0	0.367	0.92
compartment:SFWC	7	0.002	0	0.564	0.784
contamination:compartment:SFWC	7	0.002	0	0.602	0.753
Residuals	151	0.084	0.001		

<b><i>Pseudomonas</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
contamination	1	0.007	0.007	1.655	0.2
compartment	1	0.002	0.002	0.391	0.532
SFWC	7	0.026	0.004	0.851	0.547
contamination:compartment	1	0.002	0.002	0.424	0.516
contamination:SFWC	7	0.027	0.004	0.883	0.521
compartment:SFWC	7	0.032	0.005	1.027	0.415
contamination:compartment:SFWC	7	0.032	0.005	1.052	0.397
Residuals	151	0.664	0.004		

<b><i>Rahnella</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
contamination	1	0.003	0.003	0.813	0.369
compartment	1	0.003	0.003	0.611	0.436
SFWC	7	0.022	0.003	0.764	0.618
contamination:compartment	1	0.011	0.011	2.698	0.103
contamination:SFWC	7	0.034	0.005	1.163	0.327
compartment:SFWC	7	0.027	0.004	0.904	0.505
contamination:compartment:SFWC	7	0.019	0.003	0.657	0.708
Residuals	151	0.633	0.004		

<b><i>Ralstonia</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
contamination	1	0.028	0.028	2.6	0.109
compartment	1	0	0	0.037	0.849
SFWC	7	0.056	0.008	0.742	0.637
contamination:compartment	1	0	0	0.039	0.843
contamination:SFWC	7	0.047	0.007	0.629	0.732
compartment:SFWC	7	0.085	0.012	1.129	0.348
contamination:compartment:SFWC	7	0.065	0.009	0.863	0.538
Residuals	151	1.616	0.011		

<b><i>Shewanella</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.005</b>	<b>0.005</b>	<b>6.755</b>	<b>0.01</b> *
compartment	1	0.001	0.001	0.873	0.352
SFWC	7	0.003	0	0.588	0.765
contamination:compartment	1	0	0	0.019	0.89
contamination:SFWC	7	0.001	0	0.201	0.985
compartment:SFWC	7	0.007	0.001	1.359	0.227
contamination:compartment:SFWC	7	0.003	0	0.594	0.76
Residuals	151	0.11	0.001		



<sup>a</sup> Values in bold indicate significant or marginally significant effects. Df, degrees of freedom; F, variance ratio; Pr(>F), P value.

Tableau Suppl. 11 Summary of the three-way analysis of the variance (ANOVA) on the relative abundance of the PAH-RHD $\alpha$  Gram-positive gene ASVs identified at the genus level of *Bacteria*.

<b><i>Other Bacteria</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.243</b>	<b>0.243</b>	<b>61.471</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
compartment	1	0.002	0.002	0.442	0.507	
<b>SFWC</b>	<b>7</b>	<b>0.049</b>	<b>0.007</b>	<b>1.777</b>	<b>0.096</b>	<b>.</b>
contamination:compartment	1	0.001	0.001	0.197	0.658	
contamination:SFWC	7	0.045	0.006	1.631	0.131	
compartment:SFWC	7	0.041	0.006	1.492	0.174	
contamination:compartment:SFWC	7	0.036	0.005	1.285	0.261	
Residuals	153	0.605	0.004			
<b><i>Other Actinobacteriota</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.129</b>	<b>0.129</b>	<b>52.503</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
compartment	1	0.003	0.003	1.063	0.304	
SFWC	7	0.006	0.001	0.375	0.916	
contamination:compartment	1	0.005	0.005	2.080	0.151	
contamination:SFWC	7	0.017	0.002	0.965	0.459	
<b>compartment:SFWC</b>	<b>7</b>	<b>0.035</b>	<b>0.005</b>	<b>2.007</b>	<b>0.058</b>	<b>.</b>
contamination:compartment:SFWC	7	0.025	0.004	1.450	0.189	
Residuals	153	0.376	0.002			
<b><i>Actinobacteria undef.</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.004</b>	<b>0.004</b>	<b>17.667</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.012</b>	<b>0.012</b>	<b>56.827</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
SFWC	7	0.000	0.000	0.188	0.988	
contamination:compartment	1	0.000	0.000	0.197	0.658	
contamination:SFWC	7	0.001	0.000	0.981	0.447	
compartment:SFWC	7	0.002	0.000	1.161	0.328	
<b>contamination:compartment:SFWC</b>	<b>7</b>	<b>0.004</b>	<b>0.001</b>	<b>2.437</b>	<b>0.022</b>	<b>*</b>
Residuals	153	0.032	0.000			
<b><i>Mycobacterium</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.026</b>	<b>0.026</b>	<b>44.519</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
compartment	1	0.001	0.001	2.021	0.157	
SFWC	7	0.002	0.000	0.506	0.829	
contamination:compartment	1	0.002	0.002	2.713	0.102	
contamination:SFWC	7	0.002	0.000	0.607	0.749	
compartment:SFWC	7	0.001	0.000	0.263	0.967	
contamination:compartment:SFWC	7	0.001	0.000	0.138	0.995	
Residuals	153	0.089	0.001			
<b><i>Microbacterium</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	

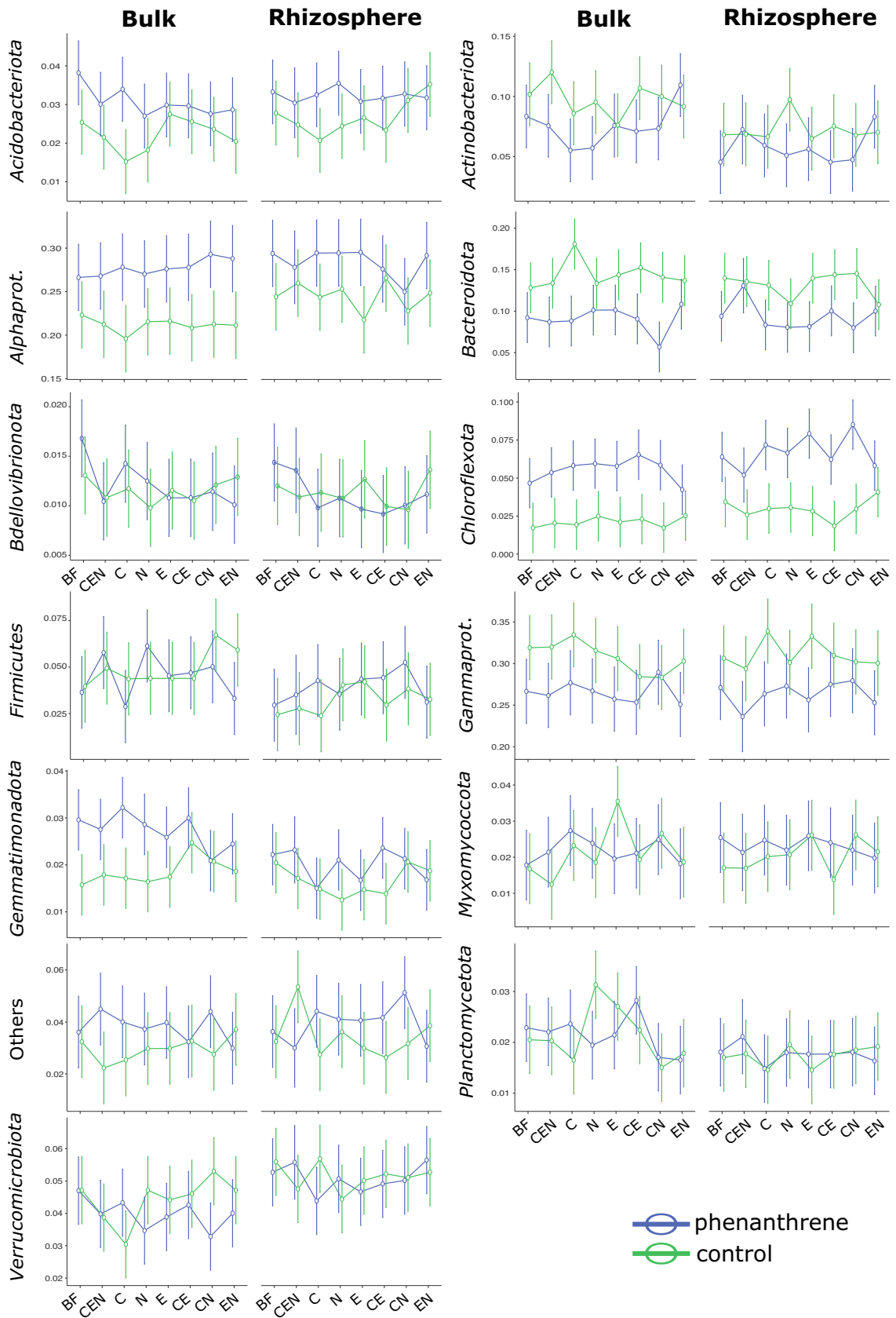
contamination	1	0.008	0.008	1.981	0.161
compartment	1	0.001	0.001	0.318	0.574
SFWC	7	0.033	0.005	1.105	0.363
contamination:compartment	1	0.008	0.008	1.810	0.181
contamination:SFWC	7	0.024	0.003	0.789	0.598
compartment:SFWC	7	0.026	0.004	0.863	0.537
contamination:compartment:SFWC	7	0.031	0.004	1.048	0.400
Residuals	153	0.652	0.004		

<b><i>Other Proteobacteriota</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.007</b>	<b>0.007</b>	<b>41.720</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.003</b>	<b>0.003</b>	<b>17.525</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
SFWC	7	0.001	0.000	0.827	0.566	
<b>contamination:compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>13.868</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
contamination:SFWC	7	0.001	0.000	0.664	0.702	
compartment:SFWC	7	0.000	0.000	0.381	0.912	
contamination:compartment:SFWC	7	0.000	0.000	0.400	0.901	
Residuals	153	0.025	0.000			

<b><i>Other Micrococcales</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.001</b>	<b>0.001</b>	<b>13.452</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
<b>compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>3.446</b>	<b>0.065</b>	<b>.</b>
SFWC	7	0.000	0.000	0.348	0.930	
contamination:compartment	1	0.000	0.000	0.294	0.588	
contamination:SFWC	7	0.000	0.000	0.321	0.944	
compartment:SFWC	7	0.000	0.000	0.467	0.857	
contamination:compartment:SFWC	7	0.000	0.000	0.452	0.868	
Residuals	153	0.007	0.000	9.000		

<b><i>Others</i></b>	<b>Df</b>	<b>Sum Sq</b>	<b>Mean Sq</b>	<b>F value</b>	<b>Pr(&gt;F)</b>	
<b>contamination</b>	<b>1</b>	<b>0.005</b>	<b>0.005</b>	<b>17.183</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>***</b>
compartment	1	0.002	0.002	7.899	0.006	<b>**</b>
SFWC	7	0.002	0.000	0.767	0.616	
<b>contamination:compartment</b>	<b>1</b>	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>7.101</b>	<b>0.009</b>	<b>**</b>
contamination:SFWC	7	0.002	0.000	0.871	0.531	
compartment:SFWC	7	0.001	0.000	0.462	0.860	
contamination:compartment:SFWC	7	0.001	0.000	0.615	0.743	
Residuals	153	0.048	0.000			

<sup>a</sup> Values in bold indicate significant or marginally significant effects. Df, degrees of freedom; F, variance ratio; Pr(>F), P value.



**Figure Suppl. 1**      **Relative abundance of individual bacterial phyla by soil food web complexity treatment and compartment**

