

THESE - UNIVERSITE AIX-MARSEILLE

Ecole Doctorale
ED 62 Sciences de la vie et de la santé

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université d'Aix-Marseille

Spécialité
Microbiologie

**Analyse de la biodiversité bactérienne d'un sol contaminé de la zone
d'exclusion de Tchernobyl et caractérisation de l'interaction engagée
par une souche de *Microbacterium* avec l'uranium**

Nicolas Theodorakopoulos

Thèse dirigée par Catherine Berthomieu et Claire Sergeant
Encadrée par Virginie Chapon et Laureline Février
Soutenance le 20 décembre 2013

Devant le jury d'examen composé de :

Mohamed Merroun	Professeur, Université de Grenade	Rapporteur
Sylvie Nazaret	Chargée de recherche, CNRS, Université de Lyon	Rapporteur
Marie Carrière	Ingénieur chercheur, CEA, Grenoble	Examinateur
Chantal Tardif	Professeur, CNRS, Université d'Aix-Marseille	Examinateur
Laureline Février	Ingénieur chercheur, IRSN, Cadarache	Examinateur
Virginie Chapon	Ingénieur chercheur, CEA, Cadarache	Examinateur
Catherine Berthomieu	Ingénieur chercheur, CEA, Cadarache	Directrice de Thèse
Claire Sergeant	Chargée de recherche, CNRS, Bordeaux	Co-directrice de Thèse

PLAN DE THESE

INTRODUCTION GENERALE.....	1
CHAPITRE I : Etude bibliographique	5
1. Analyse de la diversité bactérienne.....	5
1.1. Les méthodes d'identification des communautés microbiennes	5
1.1.1. L'approche culturale, le fondement de l'écologie microbienne.....	5
1.1.2. Le gène codant pour l'ARNr 16S (ADNr 16S).....	7
1.1.3. Analyse de la diversité bactérienne par la DGGE.....	9
1.1.4. Analyse de la diversité bactérienne par pyroséquençage 454.....	11
1.2. La diversité bactérienne dans le sol.....	14
1.2.1. Paramètres influençant la diversité bactérienne dans le sol.....	14
1.2.2. Les bactéries dans les environnements extrêmes	17
1.2.3. Impact des radionucléides sur les communautés bactériennes.....	18
1.2.4. Impact de l'irradiation sur les communautés bactériennes	20
1.2.5. Etat de l'art des connaissances microbiologiques au niveau du site de Tchernobyl.....	21
2. Les interactions bactéries-radionucléides	23
2.1. L'uranium	23
2.1.1. Propriétés chimiques et nucléaires	23
2.1.2. Origine de l'uranium	23
2.2. Comportement de l'uranium dans les sols.....	24
2.2.1. Complexation par les anions inorganiques.....	24
2.2.2. Complexation avec la matière organique	25
2.2.3. Complexation avec la phase minérale du sol	25
2.3. Biodisponibilité et toxicité de l'uranium	26
2.4. Les mécanismes d'interaction bactéries-uranium.....	27
2.4.1. La réduction et l'oxydation de l'uranium par les bactéries.....	27
2.4.2. La biosorption de l'uranium.....	29
2.4.3. Les interactions par libération de ligands extracellulaires	31
2.4.4. L'accumulation intracellulaire	32
3. Synthèse de l'étude bibliographique et objectifs de thèse	34

CHAPITRE II: Etude de la diversité bactérienne de la tranchée T22 par l'approche culturale et la DGGE	37
1. Contexte général.....	37
2. Objectifs de l'étude et démarche expérimentale	38
3. Contribution scientifique.....	39
4. Résultats et Discussion.....	55
CHAPITRE III: Recherche de bactéries affiliées au phylum des <i>Deinococcus-Thermus</i> dans les sols de la tranchée T22.....	59
1. Contexte général.....	59
2. Objectif de l'étude et démarche expérimentale	60
3. Contribution scientifique.....	61
4. Résultats et Discussion.....	77
5. Expérience complémentaire : recherche de <i>Deinococcus-Thermus</i> dans des échantillons de Tchernobyl	77
5.1. Matériel et méthodes.....	78
5.2. Résultats et Discussion	78
CHAPITRE IV: Exploration de la diversité bactérienne des sols de la tranchée T22 par pyroséquençage.	81
1. Contexte général.....	81
2. Objectifs de l'étude	81
3. Contribution scientifique.....	81
4. Résultats et Discussion.....	83
CHAPITRE V : Etude des interactions bactéries-uranium	119
1. Contexte général.....	119
2. Objectifs de l'étude et démarche expérimentale	119
3. Résultats complémentaire : Sélection d'une souche résistante à l'uranium.....	120
3.1. Matériel et méthodes.....	120
3.2. Résultats et discussions.....	120
4. Caractérisation fine des interactions entre uranium et <i>Microbacterium</i> A9_3_sp3_-1_2.	122
4.1. Objectifs de l'étude	122
5. Contribution scientifique.....	123
6. Résultats et discussion.....	155
CHAPITRE VI : Expériences complémentaires	157

EXPERIENCE COMPLEMENTAIRE 1 : Exposition de six souches de <i>Microbacterium</i> à 10 μ M de nitrate d'uranyle et localisation sub-cellulaire.....	157
1. Introduction	157
2. Matériel et méthodes	158
3. Résultats et discussion.....	158
3.1. Survie des souches après exposition à 10 μ M de nitrate d'uranyle	158
3.2. Cinétique d'interaction.....	160
3.3. Localisation subcellulaire de l'uranium après 24 h d'exposition	161
4. Conclusion et perspectives	163
EXPERIENCE COMPLEMENTAIRE 2 : Etude de l'accumulation de ^{137}Cs par des souches de la tranchée T22	163
1. Introduction	163
2. Matériel et méthodes	164
3. Résultats et discussion.....	165
4. Conclusion et perspectives	167
CONCLUSION	169
PERSPECTIVES.....	171
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	173
LISTE DES FIGURES.....	187
LISTE DES TABLEAUX.....	188
VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE	189

INTRODUCTION GENERALE

Suite à l'explosion accidentelle du réacteur n°4 de la centrale nucléaire de Tchernobyl le 26 avril 1986 et de l'incendie qui a suivi, d'énormes rejets de produits radioactifs se sont répandus dans l'environnement proche de la centrale. Au total, ce sont près de $13,2 \cdot 10^{15}$ Becquerel (Bq) qui furent libérés dans l'environnement (Aquilina *et al.*, 2012, Gaspar et Navas 2013). Une partie de ces rejets fut dispersée sous forme d'un nuage radioactif à travers toute l'Europe. À environ 2,5 km de la centrale accidentée, dans la zone d'exclusion, des tranchées ont été creusées dès 1987 à des fins de stockage temporaire (entreposage). Elles contiennent les déchets de décontamination de la forêt Rousse, mélange de la couche superficielle du sol forestier originel, de particules de combustible et de matière organique contaminée en cours de décomposition. On estime que le volume de déchets contenu dans ces sites de stockage est de l'ordre de 10^6 m³ (Bugai *et al.*, 2005). Depuis 1999, l'IRSN, en collaboration avec deux instituts ukrainiens, l'UIAR (Institut Ukrainien de Radioécologie) et l'IGS (Institut de GéoSciences), entretient un site expérimental au niveau d'une de ces tranchées (tranchée T22). Depuis 25 ans, le contenu de la tranchée est soumis à l'infiltration des eaux de pluie qui entraîne la migration des radionucléides dans l'environnement (Bugai *et al.*, 2012a). L'IRSN dispose aujourd'hui d'informations permettant de décrire cette tranchée en termes de composition, de propriétés physico-chimiques et hydrauliques (Bugai *et al.*, 2012a, Bugai *et al.*, 2012b). Ces données alimentent des recherches sur le comportement des radionucléides dans l'environnement et notamment sur le transport de l'uranium, du césium 137, du strontium 90 et du plutonium dans la zone non saturée et l'aquifère sous-jacent.

Les principaux facteurs identifiés qui influencent le transport des radionucléides sont les suivants : la vitesse de dissolution des particules de combustible nucléaire dans la tranchée, la diffusion et la dispersion des radionucléides dans les zones non saturées et saturées, la stratification de la nappe phréatique, l'environnement géochimique et l'interaction entre radionucléides et composantes du sol (Kashparov *et al.*, 2012). Parmi ces composantes, les microorganismes telluriques peuvent jouer un rôle majeur dans le transport des radionucléides dans le sol en interagissant directement avec ces derniers, ou en modifiant l'environnement géochimique (Gadd 2010). Cependant, l'influence des microorganismes sur le transfert de radionucléides reste inconnue, notamment parce que l'on ne dispose que de très peu de données concernant la microbiologie des sols de Tchernobyl (Yablokov *et al.*, 2009) et les

interactions que ces bactéries forment avec les radionucléides présents sur le site. Les études de diversité bactérienne publiées au début de cette thèse se limitaient à l'identification de bactéries cultivables collectées en surface de sols situés dans la zone d'exclusion de Tchernobyl (Romanovskaya *et al.*, 2002, Romanovskaya *et al.*, 1996, Zavilgelsky *et al.*, 1998). Le faible nombre de données sur les bactéries des sols de Tchernobyl a constitué une des motivations principales du travail réalisé dans le cadre de cette thèse. D'une manière générale, le but de ce travail était d'identifier les communautés bactériennes du sol de la tranchée et d'analyser l'impact des radionucléides sur ces bactéries. Les résultats acquis au cours de cette étude permettront de mieux appréhender les mécanismes d'interaction entre bactéries et radionucléides, et d'améliorer à plus long terme les modèles de migration en prenant en compte la composante biotique des sols, pour mieux évaluer les conséquences écologiques d'un accident nucléaire.

Ainsi, le premier objectif de l'étude a été d'analyser la diversité bactérienne au niveau de la tranchée T22 de Tchernobyl. Afin d'acquérir une vue d'ensemble de l'état microbiologique des sols de Tchernobyl, une approche culturale et une approche moléculaire (DGGE) ont été réalisées. Cette approche moléculaire a été complétée par une analyse plus exhaustive des communautés par pyroséquençage 454. Par ailleurs, les sols contaminés par les radionucléides peuvent constituer des réservoirs de bactéries capables de survivre dans des conditions extrêmes comme une forte contamination en radionucléides ou un environnement irradiant. Depuis 1986, les bactéries de la tranchée T22 sont en effet soumises à ces conditions extrêmes. Le second objectif de l'étude a été de tester si cet environnement particulièrement irradiant a favorisé le développement d'espèces radiorésistantes affiliées au phylum des *Deinococcus-Thermus* mais aussi d'évaluer la survie de certaines bactéries en présence de radionucléides. Dans le cas de l'uranium, de nombreuses études ont montré la capacité des bactéries à séquestrer et immobiliser l'élément dans le sol. Cependant, les mécanismes mis en place par ces dernières pour survivre et se développer malgré la contamination restent encore mal connus. Le troisième objectif de l'étude a été de sélectionner une souche capable de résister à de fortes concentrations en uranium parmi les souches cultivables isolées de la tranchée et d'étudier plus finement les mécanismes de détoxification de l'uranium mis en jeu par cette souche. Plusieurs techniques microscopiques (MET-EDX) et spectroscopiques (SLRT, IRTF) complémentaires ont été utilisées afin de préciser la localisation et la spéciation de l'uranium ayant interagi avec les cellules.

Ce manuscrit est organisé en trois parties :

- La première partie est une synthèse bibliographique concernant tout d'abord les méthodes qui permettent d'accéder à la diversité bactérienne dans les sols et l'influence des paramètres physico-chimiques sur cette diversité. Un état de l'art sur les bactéries présentes dans les environnements contaminés par des radionucléides est ensuite détaillé. Enfin, l'uranium et son comportement dans le sol sont décrits ainsi que les différents types d'interactions bactéries-uranium.
- Les résultats seront présentés dans les chapitres II à VI essentiellement sous forme d'articles scientifiques. Le chapitre II concerne la présentation du site d'étude (tranchée T22), les prélèvements d'échantillons de sols ainsi que les résultats acquis grâce aux approches culturale et moléculaire (DGGE) pour la description des communautés bactériennes. Le chapitre III s'intéresse à la recherche de représentants du phylum des *Deinococcus-Thermus* dans les sols de la tranchée par la mise au point d'amorces spécifiques. Le chapitre IV présente l'analyse de la diversité des communautés bactériennes de la tranchée T22 par la technique de pyroséquençage 454. Le chapitre V aborde les interactions bactéries radionucléides à travers la sélection puis l'exposition d'une souche capable de survivre à de fortes concentrations en uranium. Enfin, le chapitre VI présente des résultats issus d'expériences complémentaires sur la caractérisation des interactions engagées par d'autres souches de *Microbacterium* avec l'uranium mais aussi sur la sélection d'espèces bactériennes accumulatrices de Cs.
- Une conclusion générale synthétise l'apport de ce travail à la connaissance fondamentale de la diversité bactérienne dans les sols de la tranchée T22 de Tchernobyl ainsi qu'à la compréhension des interactions bactérie-uranium. Les principales perspectives qui apparaissent à l'issue de cette thèse sont ensuite abordées.

CHAPITRE I : Etude bibliographique

1. Analyse de la diversité bactérienne

Le sol est un environnement hétérogène complexe qui contient une grande variété de communautés et d'espèces bactériennes (Daniel 2005). De ce fait, accéder à la diversité bactérienne de manière exhaustive constitue un des défis majeurs de ces dernières décennies en écologie microbienne et les techniques qui y sont dédiées n'ont cessé d'évoluer (Fierer et Lennon 2011). Avant le développement des techniques moléculaires, l'identification et la classification taxonomique de bactéries nécessitaient leur isolement, leur mise en culture et leur caractérisation sur la base de critères morphologiques, physiologiques, métaboliques, biochimiques et écologiques. Ces critères de classification ont rapidement trouvé leurs limites du fait de la diversité phénotypique et physiologique des bactéries mais aussi de par la simplicité de la classification engendrée. Palliant ce problème, le développement d'approches moléculaires a révolutionné le monde de l'écologie microbienne en permettant d'affiner la classification bactérienne et en augmentant de manière significative le nombre d'espèces considérées, par rapport aux méthodes basées sur les seules bactéries cultivables.

1.1. Les méthodes d'identification des communautés microbiennes

1.1.1. L'approche culturale, le fondement de l'écologie microbienne

L'approche culturale consiste à ensemencer un échantillon sur un milieu de culture afin de permettre la croissance bactérienne et la multiplication clonale. Les bactéries requièrent pour leur croissance une source de carbone, une source d'énergie et un accepteur final d'électrons qui doivent être présents dans les milieux de culture, liquides ou solides. Après croissance sur milieu solide, les bactéries sont dénombrées par comptage des colonies qui se sont formées : l'unité de comptage est alors exprimée en unité formant colonie (UFC) par gramme de sol. Le nombre d'UFCs reflète alors l'abondance. La diversité bactérienne, quant à elle, est déterminée par séquençage de l'ADNr 16S des colonies isolées. La composition des milieux de culture, le temps de croissance ou encore la température d'incubation sont des paramètres déterminants qui vont influencer le type et le nombre de bactéries qui vont être capables de se développer.

Une limite à l'utilisation de l'approche culturale est le nombre de bactéries qui vont pouvoir se développer en conditions de laboratoire. Le sol est un environnement des plus complexes et des plus hétérogènes (ex : micro-niches) et la composition des milieux de culture permet difficilement de reproduire l'environnement originel des bactéries. En 1985, en comparant le nombre de bactéries observées par microscopie (marqueur fluorescent) et le nombre de bactéries cultivables, le terme de « great plate count anomaly » fut utilisé (Staley et Konopka 1985). Ce terme illustre clairement que toutes les bactéries ne sont pas cultivables. Aujourd'hui il est admis que seule une faible proportion (0,1-10%) des bactéries de l'environnement est cultivable dans les conditions du laboratoire (Hugenholtz 2002, Rappé et Giovannoni 2003). Il existe plusieurs raisons qui expliquent les différences observées entre le nombre de bactéries présentes dans un échantillon et celles qui sont cultivables.

L'une de ces raisons est l'existence de cellules dans un état physiologique particulier décrit comme viable non cultivable (VNC). Les VNC ne poussent pas sur les milieux de culture traditionnellement utilisés en microbiologie mais se caractérisent pourtant par une activité métabolique (faible), une membrane intacte et la possibilité de « renaître ». Cet état physiologique de dormance serait la résultante d'un stress lié au changement des paramètres environnementaux et s'observe chez les bactéries Gram positives comme chez les Gram négatives (Keep *et al.*, 2006, McDougald *et al.*, 1998, Oliver 2005).

Un obstacle à la croissance de certaines bactéries en laboratoire peut être expliqué par le phénomène de « substrate accelerated death ». La croissance des bactéries initialement présentes dans des environnements pauvres en substrat sera inhibée en présence d'une concentration trop élevée de ce même substrat (Calcott et Postgate 1972). Ainsi, l'une des méthodes employées par les microbiologistes pour pallier ce problème est de réduire la concentration de substrat afin de simuler l'environnement oligotrophe des bactéries.

Une autre raison est l'absence de molécule signal. Ces molécules, impliquées par exemple dans la structuration des biofilms, peuvent s'avérer essentielles à la croissance de certaines bactéries. Par exemple, la bactérie *Micrococcus luteus* sécrète un facteur qui favorise la résurrection et la croissance des cellules dormantes, du même organisme. Ce facteur appelé « Resuscitation promoting factor » (Rpf) est une protéine, qui peut aussi s'avérer efficace pour stimuler la croissance d'autres organismes comme *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium kansasii*... (Mukamolova *et al.*, 1998). Les molécules signal présentes dans les environnements naturels apparaissent donc essentielles à la croissance de bien des bactéries et pourraient expliquer la difficulté à cultiver ces dernières en laboratoire (Nichols *et al.*, 2008).

Néanmoins, des études récentes montrent qu'en modifiant certains paramètres comme la teneur en O₂ et en CO₂ (Stevenson *et al.*, 2004) ou encore en augmentant le temps d'incubation (Janssen *et al.*, 2002) le nombre de bactéries cultivables peut être augmenté. D'autres alternatives à la culture traditionnelle sur boîtes de Pétri, comme les systèmes de culture *in situ* en chambre de diffusion, permettent d'isoler des microorganismes sur milieu solide, tout en conservant les conditions naturelles d'apport de nutriments. Lors de l'utilisation de cette technique, la majorité des isolats obtenus en chambres de diffusion (70%) n'était pas cultivable sur milieu solide classique (Bollmann *et al.*, 2007).

Bien qu'il soit difficile d'accéder de manière exhaustive à la diversité des bactéries dans un sol par l'approche culturale, celle-ci est encore largement utilisée notamment dans des études comparatives évaluant l'impact de polluants dans les sols sur des communautés bactériennes (Das *et al.*, 2012, Thorsen *et al.*, 2013).

1.1.2. Le gène codant pour l'ARNr 16S (ADNr 16S)

Les travaux de Carl Woese (1987) ont véritablement révolutionné la taxonomie et l'écologie microbienne. Ils ont démontré que les séquences d'ADN ribosomiaux (ADNr) sont des marqueurs évolutifs robustes permettant de déchiffrer la phylogénie et l'évolution des populations microbiennes au cours du temps. Toutes les cellules contiennent des ARNr. Ce sont des composants essentiels à leur fonctionnement. Les cellules eucaryotes possèdent des ARNr 28S, 18S, 5,8S et 5S tandis que les cellules procaryotes possèdent des ARNr 23S, 16S et 5S. Leurs gènes s'organisent en opérons pouvant être présents en mono- ou multi-copies dans les génomes (1 à 15 copies par génome bactérien) (Rainey *et al.*, 1996). Les ARNr sont des molécules ayant évolué plus lentement que le reste du génome et constituent de ce fait une horloge moléculaire lente (Woese 1987).

De par la qualité de l'information phylogénétique qu'ils fournissent, ce sont principalement les gènes codant pour l'ARN de la petite sous-unité du ribosome qui sont utilisés comme marqueurs phylogénétiques, c'est-à-dire le gène codant pour l'ARNr 16S chez les procaryotes ou celui de l'ARNr 18S chez les eucaryotes.

Le gène de l'ARNr 16S a l'avantage d'être constitué d'une mosaïque de domaines hautement conservés (ayant peu évolué au cours du temps) et de domaines variables, mais aussi de présenter une taille d'environ 1500 nucléotides aisément séquençable. Ces régions hautement conservées servent de cibles pour des amorces dites "universelles" servant à l'amplification *in vitro* par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) puis au séquençage. Le choix des

amorces utilisées pour la PCR est essentiel. Les amorces universelles ciblant des parties conservées de la séquence de l'ADNr 16S vont permettre d'amplifier la plupart des séquences d'ADNr 16S bactérien. Néanmoins, toutes les séquences ne sont pas reconnues par ces amorces. Le choix d'amorces ciblant des zones de l'ADNr 16S spécifiques à des groupes bactériens d'intérêt peut alors permettre d'enrichir les informations sur ces groupes. Aujourd'hui, la majorité des études de diversité des bactéries s'effectue seulement sur la base des séquences d'ARNr 16S. Quand l'ARNr 16S est utilisé pour identifier et classier les *Bacteria* et les *Archaea*, le terme d'UTO désignant l'Unité Taxonomique Opérationnelle est alors employé (OTU en anglais). Les UTOs basées sur l'identification des ARNr 16S permettent de définir une catégorie proche du rang taxonomique de l'espèce si le degré d'identité est au moins de 97%. On considère ainsi que les bactéries qui présentent plus de 97% de similarité dans leurs séquences d'ADNr 16S appartiennent à la même espèce. L'utilisation de ce gène comme biomarqueur en taxonomie a permis de révéler la biodiversité d'eucaryotes et de procaryotes dans de nombreux environnements et de pallier les limites de l'approche culturale.

L'existence de banques spécialisées dans les séquences de gène codant les ARNr comme la base de données SILVA, disponible sur le site <http://www.arb-silva.de/>, permet d'avoir accès aux séquences des gènes d'ARNr 16S et 23S de *Bacteria* et d'*Archaea* mais également des gènes ribosomiaux eucaryotes. Le nombre de séquences disponible dans la base de données RDPII (Ribosomal Data Project) puis SILVA (Figure 1) illustre clairement l'intérêt et l'engouement des microbiologistes pour l'utilisation de ce marqueur phylogénétique.

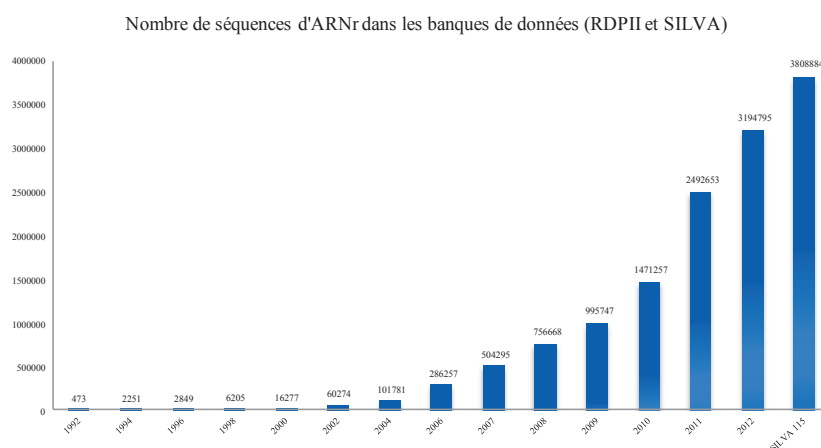


Figure 1 : Evolution du nombre de séquences d'ARNr depuis 1992 dans la base de données SSU.

A l'heure actuelle, plus de 3 millions de séquences d'ARNr 16S (taille minimale >300 pb) sont référencés dans la base de données SILVA (version 115) dans la banque SSU (Small Subunit). La grande majorité des séquences est affiliée aux *Bacteria* (3397368 séquences), puis aux *Eukarya*, et aux *Archaea*.

L'apport des techniques moléculaires a enrichi les connaissances en écologie microbienne à tel point qu'aujourd'hui, certains groupes phylogénétiques entiers n'ont aucun représentant cultivable (Rappé et Giovannoni 2003). Ces groupes bactériens qualifiés de « Candidate Division » posent problème car, sans représentant cultivable, leur rôle dans les écosystèmes est difficile à établir.

Ainsi, malgré l'essor des techniques moléculaires d'étude de la diversité qui contribuent grandement à l'apport de nouvelles séquences d'ARNr 16S, il est indispensable de maintenir les techniques traditionnelles de culture.

1.1.3. Analyse de la diversité bactérienne par la DGGE

La DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) est une technique d'empreinte moléculaire qui donne une image de la diversité des communautés microbiennes. Elle permet d'évaluer et de comparer la diversité microbienne sur la base du génotype. Elle appartient à une famille de techniques d'analyse moléculaire comme la TGGE, SSCP, TRFLP qui nécessite l'amplification préalable de gènes spécifiques par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). La technique trouve son origine dans le domaine médical pour la recherche de mutations génétiques (Borresen *et al.*, 1988) mais a rapidement été étendue à d'autres domaines scientifiques. En 1993, Muyzer *et al.* appliquent pour la première fois cette technique à l'écologie microbienne dans la caractérisation de communautés microbiennes de biofilms en amplifiant l'ADNr 16S. Ils montrent ainsi qu'il est possible de mener des approches comparatives mais également d'identifier des espèces présentes par hybridation, en utilisant des sondes spécifiques. Depuis, cette technique est largement utilisée et a permis de comparer la structure des communautés bactériennes de nombreux environnements et d'évaluer entre autres l'impact de pesticides (Cycoń *et al.*, 2013), de métaux (Li *et al.*, 2006) ou d'hydrocarbures (Viggor *et al.*, 2013).

La technique consiste à séparer des fragments d'ADN de taille identique selon leurs propriétés de fusion sur un gel de polyacrylamide contenant un agent dénaturant. Au cours d'une étape

préalable de PCR, les fragments d'ADN sont flanqués d'une amorce riche en GC qui permettra au fragment de ne pas se dénaturer totalement. Les fragments ainsi obtenus sont soumis à une électrophorèse contenant un gradient d'agent dénaturant (urée) qui va entraîner leur dénaturation progressive au fur et à mesure de la migration en fonction de leur richesse en GC. Cette dénaturation entraîne un encombrement stérique qui ne permet plus au fragment de migrer dans le gel d'acrylamide. Le fragment en question se retrouve ainsi « piégé dans les mailles du filet ». Pour une même teneur en agent dénaturant, un fragment riche en GC se dénaturera moins vite qu'un fragment riche en liaisons AT (du fait du nombre de liaisons hydrogène inter brin) et migrera donc plus loin sur le gel. D'un point de vue théorique, chaque bande visualisée sur le gel correspond à une espèce bactérienne. La DGGE permet en effet de séparer les fragments d'ADN ne se différenciant que par une seule paire de bases (Casamayor *et al.*, 2000). Le nombre de bandes correspond à la diversité et l'intensité de ces bandes à l'abondance relative.

A travers la comparaison des empreintes obtenues pour chaque échantillon, la DGGE permet donc d'évaluer la diversité et l'abondance relative des bactéries d'un échantillon. L'analyse du gel se fait en notant le nombre de bandes par piste, leurs positions mais aussi l'intensité de chaque bande.

Un moyen d'évaluer le degré de similarité des profils de DGGE est le calcul de la distance de Bray-Curtis, dérivée de l'indice de similarité de Sorenson selon la formule « $S = 2c/(a + b)$ » avec a et b le nombre de bandes respectives de deux échantillons A et B et c le nombre de bandes commune aux deux échantillons A et B. Une valeur de 0 indique que les échantillons sont complètement différents et une valeur de 1 indique qu'ils sont identiques. La matrice de distance ainsi obtenue est utilisée pour la construction d'un dendrogramme.

La DGGE présente un intérêt indéniable en écologie microbienne. Cette technique rapide et peu coûteuse permet d'avoir accès à plusieurs niveaux d'analyse, le premier étant la comparaison de multiples profils. De plus, l'utilisation d'amorces « groupe spécifiques » permet de cibler des groupes bactériens d'intérêt (Mühling *et al.*, 2008, Muyzer 1999). Enfin, l'identification d'espèces est également possible par hybridation de sondes spécifiques, mais aussi par le découpage de bandes du gel, extraction, amplification puis séquençage des fragments d'ADNr 16S ainsi obtenus.

Une des limites de la PCR-DGGE est la co-migration de certains fragments d'ADNr 16S (Sekiguchi *et al.*, 2001). Une bande sur le profil DGGE peut ainsi correspondre non pas à une

séquence d'ADNr 16S, mais à plusieurs. Ce problème de co-migration peut entraîner une sous-évaluation de la diversité apparente mais aussi entraîner des biais liés à l'interprétation de l'intensité des bandes DGGE. Certains biais sont inhérents à la PCR préalable qui va privilégier l'amplification des séquences issues des groupes majoritaires dans une communauté bactérienne complexe (Casamayor *et al.*, 2000). Il apparaît ainsi difficile de détecter une population bactérienne si elle occupe moins de 0,5 à 1% de la communauté bactérienne totale par la DGGE (Casamayor *et al.*, 2000, Murray *et al.*, 1996). Le nombre de copies d'ADNr 16S présent chez les bactéries, la formation de chimères ou d'hétéroduplex peuvent également engendrer des biais dans l'interprétation des résultats.

Malgré ces limites, la PCR-DGGE est une technique d'analyse particulièrement intéressante, que ce soit pour l'analyse de l'évolution de populations bactériennes au cours du temps, ou pour évaluer l'impact de polluants sur les communautés bactériennes.

1.1.4. Analyse de la diversité bactérienne par pyroséquençage 454

Depuis quelques années, de nouvelles techniques de séquençage ont fait leur apparition dans le monde de l'écologie microbienne. Ces techniques, désignées par les termes séquençage haut débit (HTS pour *high-throughput sequencing*), aussi appelé NGS pour *next-generation sequencing*, constituent un ensemble de méthodes apparues à partir de 2005 permettant le séquençage de centaines de milliers de fragments simultanément, à faible coût et en quelques heures. Elles permettent de s'affranchir des étapes de clonage et de constitution de banques génomiques. Leur utilisation en écologie microbienne trouve de nombreuses applications. D'une façon plus générale, ces dernières années ont vu le développement d'approches systématiques dont la métagénomique, la métatranscriptomique, la métaprotéomique et la métabolomique pour analyser le contenu en ADN, ARN, protéines et métabolites de microorganismes présents dans un écosystème. Le pyroséquençage 454 fait partie de ces techniques « omiques » qui trouvent leurs applications en écologie microbienne de par l'exhaustivité des informations acquises.

La technique du pyroséquençage 454 permet d'identifier plusieurs milliers d'UOTs au sein d'une population microbienne complexe (Margulies *et al.*, 2005). En 2009, le « GS FLX TitaniumSeries » permettait de séquencer un million de fragments de 400 pb en moyenne. Aujourd'hui et dans le futur, la taille de ces fragments et/ou leur nombre augmenteront (Hirsch *et al.*, 2010). La technologie 454 trouve son application en écologie microbienne à

travers le séquençage de génomes bactériens, l'analyse de diversité de métagénomes sur la base de gènes de référence ou l'analyse de gènes de fonction d'un métagénome. L'avantage de la technique 454 par rapport aux autres techniques de séquençage à haut débit est la taille des séquences (400 pb), plus longue et mieux adaptée à l'identification des espèces et aux attentes en écologie microbienne (Claesson *et al.*, 2010).

La technologie 454, conçue en 2005 par l'équipe de Jonathan Rothberg, regroupe plusieurs techniques de pointe : le pyroséquençage, les technologies des plaques en fibre optique picotitré (1,6 million de puits), la PCR en émulsion dans des microréacteurs ainsi que les technologies d'imagerie et d'informatiques nécessaires au traitement des données (Margulies *et al.*, 2005).

La première étape de cette technique est l'obtention de fragments simple brin (sb) par fragmentation de l'ADN génomique (ex : par nébulisation) ou PCR d'ADNr 16S. Deux adaptateurs (A et B) sont fixés par ligation aux deux extrémités de ces fragments. Ensuite, les fragments d'ADNsb sont mis en contact avec des microbilles qui possèdent en surface des amorces complémentaires à un des adaptateurs et vont ainsi permettre de fixer une molécule d'ADNsb à la fois. Les microbilles porteuses des brins d'ADNsb sont mises en émulsion en présence des réactifs pour PCR (Dressman *et al.*, 2003). Chaque goutte (microréacteur) englobe une microbille et donc une molécule d'ADN, ce qui permet une amplification clonale de chaque fragment. L'étape suivante est la PCR en émulsion (emPCR), qui consiste à isoler les billes dans des bulles qui servent de microréacteurs. Ainsi, chaque bille sera couverte par une amplification clonale d'un seul fragment à séquencer. Après l'emPCR, des millions de séquences identiques recouvrent ainsi chaque bille. Après amplification, les microgouttelettes (microréacteurs) sont dissociées, et les microbilles porteuses de l'ADN simple brin largement amplifié sont transférées dans une plaque en fibre optique contenant 1,4 million de puits. Les puits possèdent un diamètre qui assure le dépôt d'une microbille par puits. Avec ce système, 400 000 réactions de séquençage peuvent être réalisées en parallèle. C'est au sein de chacun de ces puits que va se réaliser la réaction de pyroséquençage. Contrairement à un séquençage de type Sanger, les types de nucléotides (A, T, C, G) seront rajoutés de manière séquentielle et ce plusieurs fois de suite définissant ainsi le « flow cycle ». Après chaque ajout d'un nucléotide, un traitement par une apyrase permet d'éliminer le surplus, puis le nucléotide suivant est incorporé et ainsi de suite. La détermination de la séquence repose sur la détection d'une émission de lumière résultant de l'incorporation d'un ou plusieurs nucléotides lors de la polymérisation de l'ADN en utilisant le brin d'ADN fixé sur la bille comme matrice. Le

second adaptateur est utilisé pour initier cette polymérisation. Si le nucléotide ajouté correspond à celui devant être intégré, il y a libération de pyrophosphate inorganique (PPi). Celui-ci est alors utilisé par l'ATP sulfurylase pour produire de l'ATP. La luciférase utilise cet ATP et la luciférine pour produire de l'oxyluciférine et de la lumière (Figure 2).

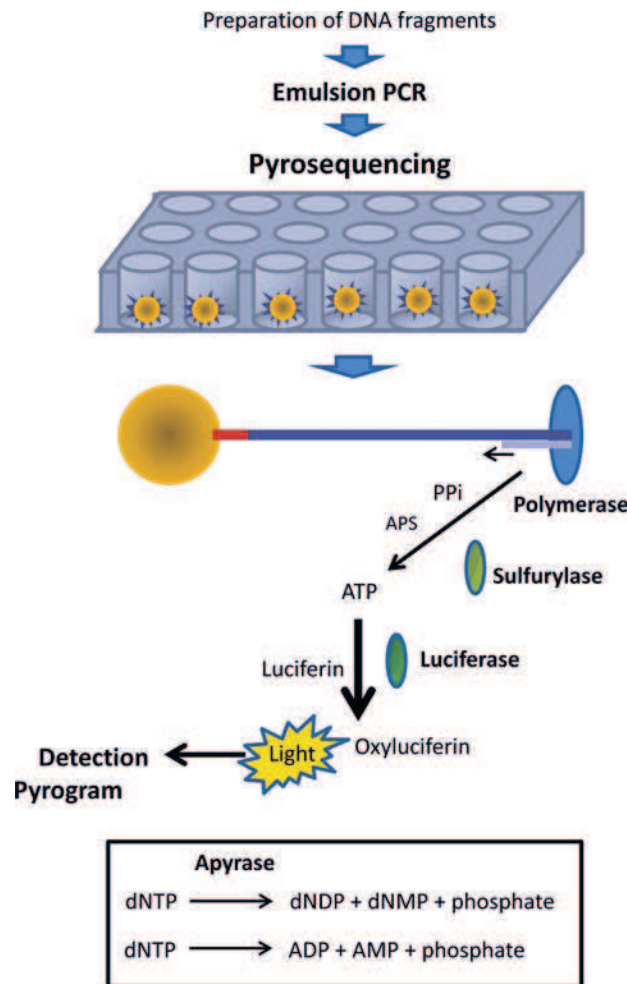


Figure 2: Résumé des principales étapes de séquençage par la technologie 454 (Siqueira *et al.*, 2012).

Le signal lumineux est capté par un capteur CCD (Charge-Coupled Device) et les résultats sont présentés sous forme d'un pyrogramme. Connaissant l'ordre dans lequel les 4 nucléotides sont ajoutés automatiquement, l'analyse des différentes images capturées permet la déduction de la séquence des différents fragments d'ADN.

Le pyroséquençage présente des limites liées d'une part à la technique mais aussi à l'étape de PCR. Un des problèmes principaux lié à la technologie 454 est l'apparition d'homopolymères (Shendure et Ji 2008) qui vont directement influencer sur la qualité de lecture des séquences. Ces homopolymères résultent de l'absence de nucléotides terminaux servant à empêcher plusieurs

incorporations consécutives pour un cycle donné. Le risque lors de l'analyse des données est de considérer ces séquences comme des UOT rares, et ainsi, de mal estimer la richesse bactérienne de l'échantillon (Siqueira *et al.*, 2012). Lors de l'analyse du jeu de données, les séquences présentant 8 homopolymères sont généralement écartées du jeu de données.

Comme nous venons de le voir, toutes les techniques décrites présentent des avantages mais aussi des inconvénients. Une caractérisation de la diversité bactérienne au moyen de multiples techniques d'analyse est donc une approche pertinente qui permet de pallier les inconvénients inhérents aux différentes techniques.

1.2. La diversité bactérienne dans le sol

Le sol est un environnement extrêmement riche qui abrite une multitude de microorganismes. Parmi ces microorganismes, les bactéries sont de loin les plus abondantes à la fois en termes de biomasse et de diversité taxonomique (Buckley et Schmidt 2002). En 1990, par observation microscopique en utilisant l'acridine orange (fluorochrome qui se fixe sur les acides nucléiques), Torsvik *et al.*, (1990) ont estimé qu'un gramme de sol forestier naturel contient près de $1,5 \cdot 10^{10}$ bactéries. Plus tard, Torsvik *et al.*, (1998) ont extrapolé des données issues d'hybridation ADN:ADN et estimé qu'un gramme de sol forestier se compose de près de 6000 génomes bactériens. Dans cette même étude, les auteurs soulignent la limite des approches culturales qui, dans ce même gramme de sol révèlent la présence de 35 génomes bactériens (chiffre établi à partir de la taille du génome d'*E. coli* : $4,1 \cdot 10^6$ pb). Plus récemment, l'étude de métagénomés de sols contrastés en termes de caractéristiques physico-chimiques et géographiques a permis d'estimer entre 2000 et 10000 le nombre d'espèces bactériennes (et donc de génomes) par gramme de sol (Roesch *et al.*, 2007). D'une manière générale, on considère aujourd'hui qu'un gramme de sol héberge, en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques, plusieurs milliers d'espèces et que l'abondance de ces espèces peut varier de 10^8 à 10^{11} cellules par gramme de sol (Curtis *et al.*, 2002, Roesch *et al.*, 2007).

1.2.1. Paramètres influençant la diversité bactérienne dans le sol

La diversité microbienne est exprimée par le nombre d'espèces différentes ainsi que par leur abondance relative dans la microflore du sol (Kennedy et Smith 1995). La diversité des

espèces dans un écosystème local est considérée comme la diversité alpha. La variation de la diversité alpha des écosystèmes dans un même environnement est considérée comme la diversité bêta, et, lorsqu'elle est mesurable, la diversité gamma représente la richesse en espèces à l'échelle régionale et mondiale. La diversité gamma est sensible principalement à des phénomènes qui ont un impact environnemental à l'échelle mondiale (par exemple des changements majeurs sur le climat), par opposition aux impacts à l'échelle locale. La diversité bactérienne peut donc s'observer à différentes échelles, révélant d'une part la complexité des communautés bactériennes dans le sol mais aussi la conservation de certaines caractéristiques.

Le pH apparaît ainsi comme un paramètre qui influence de manière majeure la structure et la diversité des communautés bactériennes dans les sols. L'analyse de 88 échantillons de sol a permis de montrer une corrélation entre la diversité des bactéries et le pH de ces sols (Figure 3) (Lauber *et al.*, 2009). L'analyse de la structure des communautés bactériennes montre que l'abondance relative de certains phylums bactériens comme par exemple les *Actinobacteria*, les *Bacteroidetes* et les *Acidobacteria*, est corrélée au pH.

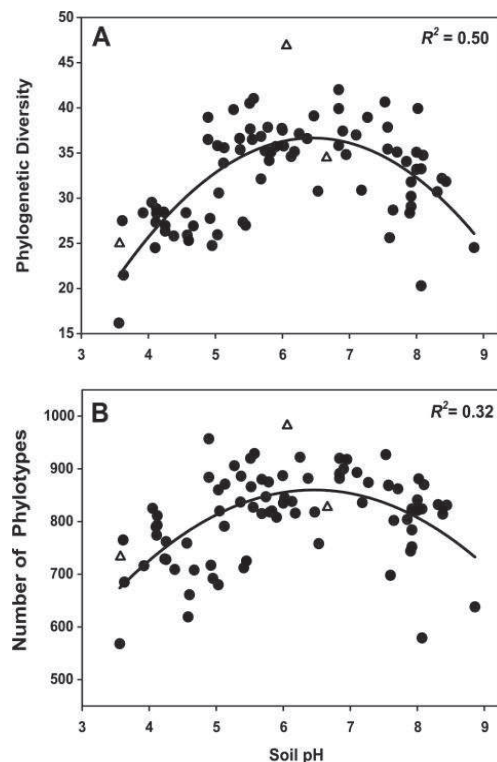


Figure 3 : Relation entre le pH des sols et la diversité bactérienne, en utilisant la diversité phylogénétique (A) et le nombre de phylotypes (B) défini à 97% de similarité. La courbe

pleine représente la courbe de tendance. Les indices de diversité ont été calculés en utilisant 1200 séquences par sol (Lauber *et al.*, 2009).

Cette corrélation entre pH et structure s'explique par le fait que le pH est directement corrélé à plusieurs paramètres du sol comme la disponibilité des nutriments, la solubilité des cations métalliques, la teneur en carbone organique, l'humidité et la salinité. Une seconde explication à cette corrélation est que le pH impose directement une contrainte physiologique sur les bactéries du sol.

Outre le pH, la structure du sol, la teneur en matière organique et la végétation influencent la diversité et l'abondance des bactéries. L'étude métagénomique des sols montre que quelle que soit la méthode d'analyse, certains phylums bactériens prédominent. C'est en tout cas le constat fait par Janssen et son équipe en 2006, qui se sont intéressés à l'analyse de différentes banques de séquences d'ADNr 16S provenant de sols différents (prairies, forêts, sols arides, agricoles...). Le résultat de cette étude montre que malgré les différences entre sols, certains phylums sont systématiquement dominants (Figure 4).

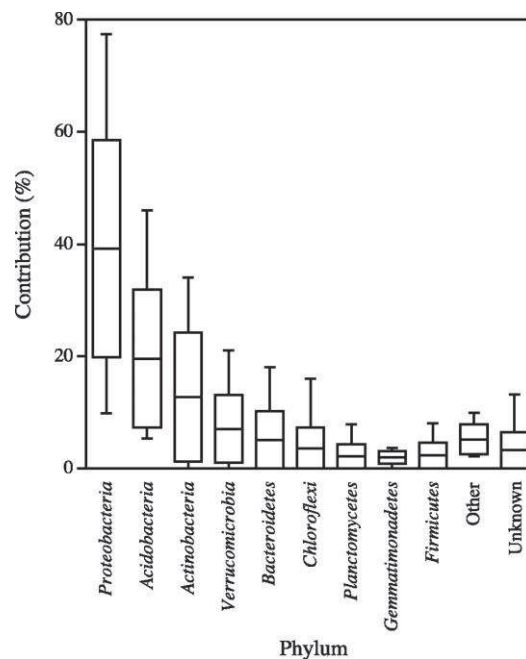


Figure 4 : Contribution des séquences d'ARNr 16S bactériens aux phylums les mieux représentés dans le sol. Les données ont été compilées à partir de 21 banques (2920 clones) de clones d'ARNr 16S obtenus par amplification à partir d'ADN du sol. La barre horizontale représente le pourcentage moyen de séquences attribuées au phylum, le rectangle représente l'écart type et les barres verticales représentent les valeurs maximales et minimales (North *et al.*, 2004).

En moyenne, 40% des séquences identifiées dans des échantillons de sol appartiennent aux *Proteobacteria*, 20% aux *Acidobacteria* et 13% aux *Actinobacteria*. Ce résultat a pu être retrouvé dans d'autres études (Delmont *et al.*, 2012, Roesch *et al.*, 2007).

1.2.2. Les bactéries dans les environnements extrêmes

Cette vaste diversité bactérienne se retrouve dans les environnements les plus extrêmes de la planète. Les dénominations thermophiles, psychrophiles, halophiles, acidophiles sont autant de termes qui qualifient l'extraordinaire capacité de ces procaryotes à s'adapter aux conditions extrêmes sur terre. Dans les sols arides, comme les déserts, les *Bacteria* et les *Archaea* sont sous l'influence de paramètres environnementaux extrêmes qui se caractérisent par des fluctuations importantes de température, des radiations UV élevées, une faible teneur en nutriment et une faible teneur en eau (Andrew *et al.*, 2012). L'environnement désertique supposé être hostile à la vie, abrite pourtant une flore microbienne abondante. Le désert de Tataouine par exemple présente une diversité de bactéries et d'archées importante (Chanal *et al.*, 2006). Parmi les bactéries isolées au niveau de sites extrêmes, certaines présentent des capacités de résistance à la dessiccation et ont développé des mécanismes moléculaires de résistance adéquats, comme certaines bactéries appartenant au phylum des *Deinococcus-Thermus* (Paulino-Lima *et al.*, 2013, Rainey *et al.*, 2005). Dans d'autres types d'environnements soumis à des froids extrêmes, les bactéries et les archées ont également réussi à mettre en place des mécanismes de résistance comme la modification de la composition lipidique de leur membrane ou la modification structurale de certaines enzymes (Koga 2012, Nichols *et al.*, 2004) qui leur permettent de survivre. Les environnements comme les sources chaudes et les sources hydrothermales profondes hébergent aussi une diversité de bactéries et d'archées importante avec des microorganismes capables de survivre et de se développer jusqu'à une température de 121°C (Kashefi et Lovley 2003). De par leurs pH extrêmes (~1), les drainages acides miniers constituent là encore un environnement extrême où peu de vie subsiste. Mais malgré l'acidité, des bactéries et des archées sont capables de survivre par la mise en place de mécanismes de maintien intracellulaire du pH.

Les environnements contaminés par les radionucléides constituent également des environnements extrêmes sur la planète. Leur présence dans le sol entraîne à la fois une chimiotoxicité mais aussi une radiotoxicité qui peut modifier la structure et l'abondance des communautés bactériennes. Dans la suite de l'étude, nous étudierons les bactéries présentes

dans les sites contaminés par les radionucléides et l'impact de ces derniers sur les communautés bactériennes.

1.2.3. Impact des radionucléides sur les communautés bactériennes

L'étude de la diversité bactérienne dans des environnements contaminés par les radionucléides a été réalisée sur site ou en laboratoire. La majorité des études s'est consacrée à évaluer l'impact de l'uranium sur les communautés bactériennes.

L'influence de l'uranium sur la structure des communautés bactériennes a été étudiée dans des environnements naturellement riches en uranium (Villard et Vénachat) dans le Limousin (France) (Mondani *et al.*, 2011) en comparant la diversité d'échantillons de sols riches en uranium avec des échantillons de sol contrôle prélevés à proximité. Bien que l'analyse de la diversité des communautés bactériennes par une approche culturale montre que l'uranium n'affecte pas le nombre d'UFC par gramme de sol, la comparaison de profils DGGE des sols riches en U (2,4-255 g/kg) et des sols contrôle montre que la structure des communautés est impactée, avec le développement de communautés bactériennes spécifiques dans les sols uranifères. L'étude par clonage et séquençage de bandes obtenues sur les profils DGGE caractérisant le sol uranifère de Villard montre une communauté abondante de *Proteobacteria*, d'*Acidobacteria*, mais permet également de détecter des espèces affiliées aux *Chloroflexi*, *Firmicutes*, *Nitrospirae*, *Actinobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Elusimicrobia* et *Verrucomicrobi*. La dominance des *Proteobacteria* et des *Acidobacteria* dans les environnements contaminés par l'uranium a pu être établie dans d'autres études sur des sols impactés par les activités minières d'extraction d'uranium (Satchanska *et al.*, 2004, Selenska-Pobell 2002).

Les *Proteobacteria* sont connues pour survivre dans des environnements oligotrophes, pour leur capacité à réduire des métaux, pour y résister et sont ainsi fréquemment détectées au cours d'expériences de biostimulation bactérienne d'environnements contaminés en uranium (Akob *et al.*, 2007, Brodie *et al.*, 2006). C'est le cas sur le site d'Oak Ridge où de nombreuses études ont été réalisées en injectant différents substrats (ex : ethanol, acétate...) pour biostimuler les communautés bactériennes réductrices d'uranium. Des espèces bactériennes réductrices d'U(VI) affiliées aux *Proteobacteria* comme *Desulfomicrobium*, *Desulfatamaculum*, *Desulfovibrio*, *Pseudomonas*, *Geobacter* et *Shewanella* sont ainsi fréquemment détectées dans ces environnements bio-stimulés (Fields *et al.*, 2005, North *et al.*, 2004, Wall et Krumholz 2006).

L'occurrence des *Acidobacteria* quant à elle peut s'expliquer par leur capacité de résistance à des conditions extrêmes comme la contamination métallique ou l'acidité qui caractérisent ces environnements uranifères. Cependant, leur capacité métabolique et leur rôle dans les environnements contaminés en uranium restent méconnus du fait du faible nombre de bactéries cultivables (Barns *et al.*, 2007). Outre les *Proteobacteria* et les *Acidobacteria*, les bactéries affiliées aux *Firmicutes* sont également fréquemment détectées dans les environnements impactés par les activités minières. L'étude par une approche moléculaire des bactéries présentes au niveau d'un gisement d'uranium au Nord-est de l'Inde a montré une abondance importante de ce phylum qui représente 51% de la diversité bactérienne en présence d'uranium (20-100 mg/kg) (Kumar *et al.*, 2013).

Les résultats acquis sur ces environnements riches en uranium montrent donc que l'abondance, comme la structure des populations bactériennes, sont impactées par la présence d'uranium dans le sol. Au regard des différentes études menées, un consensus sur les communautés bactériennes présentes dans ces environnements est difficile à établir. En effet, ces sites se caractérisent par de fortes concentrations en uranium mais aussi par la présence d'autres métaux lourds comme le Pb, le Ni, le Fe ou l'As qui peuvent avoir des effets drastiques sur la diversité (Fields *et al.*, 2005, Rastogi *et al.*, 2010).

De plus, la plupart de ces études utilisent des banques de clones inférieures à 400 séquences, or cette profondeur d'analyse est insuffisante et ne permet de révéler que les phylums majoritaires (Janssen 2006). Cependant l'utilisation d'autres techniques indépendantes de l'approche culturale, comme les puces à ADN, permet d'avoir accès à une information taxonomique plus importante. En 2010, une étude menée sur deux environnements contaminés en uranium (site de North cave hills et site d'Edgmont) a permis de démontrer l'efficacité de cette technique par rapport à l'utilisation de banques de clones (Rastogi *et al.*, 2010). L'utilisation de puces à ADN permet d'accéder à une diversité beaucoup plus importante. Un total de 1346 UOTs (57 UOTs dans la banque de clones) pour le site d'Edgmont et 1715 pour le site de North cave hills (85 UOTs dans la banque de clones) ont pu être détectés, résultat qui souligne une nouvelle fois la diversité bactérienne dans ces environnements contaminés. Néanmoins, l'approche par construction de banques de clones n'en reste pas moins intéressante puisque la plupart des phylums détectés le sont également par les puces à ADN.

1.2.4. Impact de l'irradiation sur les communautés bactériennes

Dans les sols de Tchernobyl, la contamination se caractérise par la présence d'uranium mais aussi d'autres radionucléides comme le ^{137}Cs ou le ^{90}Sr qui entraînent quant à eux une radiotoxicité (émission de rayonnements γ et β).

Pour évaluer l'impact des rayonnements sur les communautés bactériennes des sols, des expériences d'irradiation à fortes doses ont été réalisées. McNamara *et al.*, (2007) ont exposé un sol forestier à 0, 1, 5 et 10 kGy et ont suivi les changements dans les communautés bactériennes et fongiques par des approches à la fois culturale et moléculaire durant 56 jours après l'irradiation. Alors que peu de changements sont observables à 1 kGy, leurs résultats montrent que l'irradiation à des doses de l'ordre de 5 à 10 kGy entraîne une diminution des populations fongiques en parallèle d'une recolonisation rapide par les communautés bactériennes. Les auteurs postulent que la diminution des populations fongiques libère de nouvelles niches écologiques pour les bactéries. Les bactéries qui recolonisent le milieu après l'irradiation sont affiliées principalement aux *Beta* et *Gamma-Proteobacteria*. Après irradiation à 5 kGy, et 56 jours de croissance, une bande dominante dans le profil du gel DGGE est attribuée à la présence de *Chloroflexi*.

Dans une autre étude, l'irradiation de sol argileux à des doses allant de 1 à 10 kGy montre une modification des communautés bactériennes dépendante du type de sol (cultivé, non cultivé, contaminé par des hydrocarbures). Dans le cas d'un sol argileux cultivé, les auteurs ont également montré par DGGE de fortes modifications post-irradiation, avec un enrichissement en *Chloroflexi* après irradiation à 4 kGy (El-Sayed et Ghanem 2009). A ces fortes doses d'irradiation, des changements drastiques dans les communautés bactériennes sont visualisables. Cependant les débits de dose utilisés dans ces expériences (6,66 kGy/h) sont assez éloignés des valeurs environnementales qui peuvent être mesurées dans des environnements contaminés par des radionucléides (cf. Chapitre III).

Certaines études se sont donc intéressées à des débits de doses plus faibles, plus proches des valeurs environnementales mesurées sur des sites contaminés par les radionucléides. Au cours de trois études successives, Niedrée et ses collaborateurs ont cherché à évaluer l'impact d'une contamination radioactive équivalente à celle mesurée à Tchernobyl sur les communautés bactériennes. Les auteurs ont aussi cherché à déterminer les capacités des microorganismes à maintenir certaines fonctions dans le sol comme la dégradation d'un herbicide ou la

minéralisation de paille (Niedrée *et al.*, 2012, Niedrée *et al.*, 2013b). La contamination des microcosmes par du ^{137}Cs et du ^{90}Sr (~500 Bq/g) et le suivi de la structure des communautés bactériennes par DGGE ont permis de montrer que la communauté bactérienne à des débits de dose similaires à ceux de Tchernobyl subit de légères modifications structurales mais que les capacités des communautés bactériennes à assurer leurs fonctions de dégradation dans le sol ne sont que faiblement affectées. Les auteurs de l'étude concluent ainsi que les fonctions des sols agricoles autour de la zone d'exclusion de Tchernobyl (présentant des débits de doses plus faibles) ne sont pas affectées par la contamination radioactive (Niedrée *et al.*, 2013a, Niedrée *et al.*, 2012, Niedrée *et al.*, 2013b). Cependant, ces études présentent des limites dans leurs interprétations car elles sont réalisées en utilisant des sols *ex-situ* de Tchernobyl, en microcosmes, durant de courtes périodes (plusieurs semaines).

1.2.5. Etat de l'art des connaissances microbiologiques au niveau du site de Tchernobyl

Au niveau du site de Tchernobyl, de nombreuses études se sont intéressées à l'impact de la radioactivité sur les plantes et les animaux (Møller et Mousseau 2006). Ces études ont mis en évidence des effets néfastes de l'irradiation chronique et de la présence des radionucléides sur l'abondance, la distribution, les traits d'histoire de vie (reproduction, croissance,...) mais également les taux de mutations chez ces organismes (Geras'kin *et al.*, 2008). Comme nous allons le voir, en ce qui concerne les communautés bactériennes, peu d'études ont été réalisées.

L'analyse microbiologique des sols autour de la centrale nucléaire de Tchernobyl (dans une zone de 10 km de la CNPP) a été réalisée 7 ans après l'accident (au printemps, été, automne) au niveau de la surface des sols (0-2 cm) par une approche culturale (Romanovskaya *et al.*, 1996). Les auteurs ont découvert que le nombre total de bactéries hétérotrophes, ainsi que le nombre d'espèces de bactéries trouvées est moindre dans des échantillons contaminés que dans des échantillons contrôles. Leurs résultats montrent que la contamination radioactive affecte négativement l'abondance des bactéries fixatrices d'azote, des bactéries cellulolytiques, des bactéries ferri-oxydantes, nitrifiantes et sulfato-réductrices. La conclusion de cette étude est que l'irradiation chronique exerce une pression de sélection sur les bactéries présentes au niveau du site, en modifiant à la fois leur abondance et leur diversité. Les sols de Tchernobyl renferment également des bactéries capables de survivre à de fortes doses

d'irradiation. Ainsi, autour de la centrale nucléaire, des bactéries radiorésistantes ont pu être isolées notamment *Methylobacterium extorquens*, *Methylobacterium mesophilicum* et *Bacillus subtilis* (Romanovskaya *et al.*, 2002, Zavljelsky *et al.*, 1998).

En 2010, une étude s'intéresse aux nombres de bactéries cultivables associées aux plumes d'oiseaux (*Hirunda rustica*) au niveau du site de Tchernobyl. L'étude met en évidence une corrélation négative entre la radioactivité mesurée sur le site (entre 0,02 et 2,9 $\mu\text{Sv/h}$) et le nombre de bactéries cultivables associées aux plumes d'oiseaux (Czirjak *et al.*, 2010).

L'étude de la diversité bactérienne de biofilms formés sur des poteaux soumis à différents niveaux d'irradiation (0,35-25 $\mu\text{Sv/h}$) au niveau du site de Tchernobyl montre qu'elle n'est pas affectée par le niveau d'irradiation (Ragon *et al.*, 2011). Comme le soulignent les auteurs, le biofilm exposé à la plus forte dose d'irradiation présente de manière inattendue la plus forte diversité. Les principaux phylums identifiés au niveau de ces biofilms sont les *Actinobacteria*, les *Alphaproteobacteria*, les *Bacteroidetes*, les *Acidobacteria* et les *Deinococcales*. Au-delà de la diversité des bactéries, les auteurs se sont intéressés à l'effet de l'irradiation sur la fréquence des mutations en comparant le taux de mutation dans les régions non codantes ITS (espaces intergéniques) versus les régions codantes de l'ADNr16S (hautement conservées). L'étude de ces régions révèle que la fréquence des mutations augmente avec les niveaux de radioactivité auxquels sont soumis les biofilms.

Ainsi, au niveau du site de Tchernobyl, aucune étude exhaustive au niveau des sols contaminés n'a été réalisée. Comme nous le verrons par la suite, au niveau de ces sols, la présence de particules de combustible et leur dissolution progressive assurent la libération et la persistance de la contamination radioactive. Les communautés bactériennes sont donc soumises à une contamination chronique depuis 1986. L'étude de la diversité bactérienne dans les sols contaminés de Tchernobyl est un enjeu majeur en matière d'écologie.

Comme nous allons le voir dans la seconde partie de l'étude bibliographique, les bactéries jouent aussi un rôle clef dans le devenir des radionucléides dans le sol. L'identification des acteurs microbiens présents au niveau du site de Tchernobyl est donc aussi nécessaire pour d'une part, évaluer les capacités d'interactions de ces bactéries avec les radionucléides mais aussi, à plus long terme, comprendre les processus de migration des radionucléides dans le sol.

2. Les interactions bactéries-radionucléides

Dans l'environnement, les bactéries vont interagir avec les radionucléides au même titre que les métaux, à travers des mécanismes actifs et passifs qui vont avoir une influence sur la spéciation et donc sur la mobilité des radionucléides dans le sol (Gadd 2010). Dans le chapitre qui suit, nous illustrerons une partie de ces mécanismes d'interactions bactéries-radionucléides à travers ceux décrits pour l'uranium. Revenons tout d'abord sur l'uranium et son comportement dans le sol.

2.1. L'uranium

2.1.1. Propriétés chimiques et nucléaires

L'uranium est un élément radioactif, naturel et ubiquiste qui peut se trouver sous différents degrés d'oxydation (de +III à +VI), les valences IV et VI étant les plus répandues dans l'environnement. Les conditions de passage de la valence IV à la valence VI dépendent du potentiel d'oxydoréduction du milieu; elles sont voisines des conditions de passage du fer ferreux au fer ferrique. L'uranium hexavalent est beaucoup plus soluble que l'uranium tétravalent et constitue de ce fait la forme la plus toxique de l'élément. L'uranium possède trois principaux isotopes naturels (^{234}U , ^{235}U , ^{238}U), qui se désintègrent en émettant des rayonnements α et γ , et plusieurs isotopes artificiels. L'uranium naturel tel qu'il est extrait de son minerai contient 99,275% de ^{238}U , 0,719% de ^{235}U et 0,0057% de ^{234}U .

2.1.2. Origine de l'uranium

L'origine de ce radioélément est exclusivement naturelle avec une redistribution liée aux activités anthropiques. L'uranium est présent dans les roches, les sols, et les eaux. Dans la croûte terrestre où sa teneur moyenne varie de 2 à 4 $\mu\text{g/g}$ (Bonin et Blanc 2001, Ribera *et al.*, 1996), l'uranium est un constituant trace. Dans les sols, sa concentration médiane en Europe est de 2 $\mu\text{g/g}$ avec des valeurs qui fluctuent entre 0,2 et 50 $\mu\text{g/g}$ (DeVos et Tarvainen 2006). Quatre sources principales d'activité industrielle enrichissent en uranium certains compartiments de la biosphère :

- Le cycle du combustible nucléaire, depuis l'exploitation de mines uranifères jusqu'au traitement des déchets,

- L'utilisation militaire d'uranium appauvri (uranium naturel dont le contenu en ^{235}U a été réduit de 0,7 à 0,2%). Le métal est utilisé pour ses propriétés pyrophoriques et les sites bombardés par ce type d'armes sont enrichis en fines particules d' UO_2 déposées à proximité des lieux d'explosion,
- L'utilisation de charbon dont la combustion conduit à l'émission atmosphérique d'uranium,
- L'utilisation agricole d'engrais phosphatés issus de phosphates naturels particulièrement riches en ^{238}U .

Dans les sols de Tchernobyl, l'origine de l'uranium est liée à la présence de particules de combustibles formées d'oxyde d'uranium et d'oxyde mixte d'uranium et de zirconium qui ont été disséminées suite à l'explosion et l'incendie qui ont suivi (Yanase *et al.*, 2002). Les particules les plus grosses se sont déposées à proximité du site alors que les plus fines ont été disséminées à plusieurs centaines de kilomètres (Devell *et al.*, 1986). Sous l'influence des paramètres environnementaux (pH, eaux de pluie...), la dissolution de ces particules de combustible a contribué à la redistribution progressive de certains radioéléments dans l'environnement.

2.2. Comportement de l'uranium dans les sols

La spéciation de l'uranium est complexe car elle dépend de différents paramètres comme le potentiel d'oxydo-réduction, le pH, la nature et la teneur en ligands complexants organiques et inorganiques.

2.2.1. Complexation par les anions inorganiques

D'une manière générale, dans un environnement acide, oxydant et dépourvu de tout complexant, l'uranium à de faibles concentrations ($< 0,1 \mu\text{M}$) se trouve de manière prépondérante sous forme d'ion uranyle UO_2^{2+} et d'hydroxyde d'uranium UO_2OH^+ . A pH neutre, les complexes hydroxylés $(\text{UO}_2)(\text{OH})_2(\text{aq})$ et $(\text{UO}_2)(\text{OH})_3^-$ dominent la spéciation du milieu. En revanche, à de fortes concentrations d'uranium ($> 10 \mu\text{M}$), des espèces polynucléaires, telles que $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$, $(\text{UO}_2)_2(\text{OH})_2^{2+}$ ou $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_7^-$, prédominent.

En présence de carbonates, les espèces d'uranium formées à des pH supérieurs à 5 sont neutres ou chargées négativement ($(\text{UO}_2)\text{CO}_3(\text{aq})$, $(\text{UO}_2)_2\text{CO}_3(\text{OH})_3^-$, $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_2^{2-}$, $\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3^{4-}$ entraînant ainsi une baisse de la sorption de l'uranium dans le sol. En présence de calcium et de carbonate (cas des milieux calcaires), le complexe $\text{Ca}_2\text{UO}_2(\text{CO}_3)_3(\text{aq})$ particulièrement stable devient majoritaire et renforce la solubilité de l'uranium.

L'ion uranyle en phase aqueuse peut aussi se complexer avec d'autres ligands inorganiques comme les ions phosphates et former, selon le pH, les espèces $\text{UO}_2\text{H}_2\text{PO}_4^+$, $\text{UO}_2\text{HPO}_4(\text{aq})$ et UO_2PO_4^- . Les complexes formés constituent alors des espèces très stables, peu solubles dans la phase aqueuse, pouvant entraîner la précipitation de l'uranium pour des pH entre 3,5 et 7. L'uranium va aussi se complexer dans les sols avec les ions sulfates et nitrates mais avec une affinité moindre.

2.2.2. Complexation avec la matière organique

La matière organique joue un rôle majeur dans la distribution de l'uranium dans les sols. Issue de la décomposition de tissus d'animaux et de plantes, la matière organique du sol constitue un réservoir important de ligands pour complexer l'uranium. Elle se compose essentiellement d'acides humiques et fulviques qui sont des amalgames de molécules organiques de poids moléculaires différents présentant de nombreux groupes fonctionnels chargés négativement (énolate, amine, carboxylate, hydroxyle...). L'uranium forme des complexes urano-humiques chargés négativement entre pH 3 et 7 (Beneš *et al.*, 1998). Les acides fulviques contiennent plus de fonctions carboxyliques que les acides humiques, expliquant ainsi que la complexation de l'uranium soit plus importante avec les acides humiques (Lenhart *et al.*, 2000). La matière organique particulaire entraîne un piégeage de l'uranium permettant en général de l'immobiliser. Au contraire, les complexes U-fulviques, U-humiques ou les molécules de petites tailles comme les composés azotés (acides aminés, sucres aminés), les sucres ou les lipides présents dans l'eau interstitielle du sol vont quant à eux favoriser la mobilité de l'élément.

2.2.3. Complexation avec la phase minérale du sol

Les oxydes de fer et oxyhydroxydes retrouvés sous la forme d'hématite (Fe_2O_3), de goéthite ($\alpha\text{-FeO}(\text{OH})$), de ferrihydrite et d'oxyhydroxydes ferriques amorphes adsorbent de manière

importante l'uranium (Stubbs *et al.*, 2006). Les oxydes de manganèse sont fréquents dans les sols et sont également connus pour leurs fortes capacités d'adsorption et de piégeage des éléments (Shahandeh et Hossner 2002). D'autres phases minéralogiques sont également connues pour leurs propriétés de sorption. Ainsi, l'uranium peut être adsorbé sur les silicates, les minéraux argileux, tels que la montmorillonite (Catalano et Brown Jr 2005) ou la kaolinite (Payne *et al.*, 2004), et la pyrite (Fein et Powell 2013).

Ces données sur le comportement de l'uranium dans le sol montrent que la spéciation de l'uranium et donc sa biodisponibilité sont fortement dépendantes du type de sol étudié.

2.3. Biodisponibilité et toxicité de l'uranium

L'uranium est largement reconnu comme étant un élément toxique dans l'environnement. Cette toxicité provient d'une part de sa chimiotoxicité (toxicité liée à la chimie de l'élément) mais aussi à sa radiotoxicité (toxicité liée à sa radioactivité). La contribution de ces deux modes d'action est inégale et l'uranium est surtout considéré comme un élément chimiotoxique.

En fixant les principaux paramètres expérimentaux comme le pH et la concentration en uranium, des études ont clairement démontré que la spéciation de l'uranium influence sa toxicité. Ces études indiquent que les espèces UO_2^{2+} et UO_2OH^+ sont les principales formes biodisponibles de l'U et donc les plus toxiques. Les complexes formés avec des ligands inorganiques tels que les carbonates ou les phosphates réduisent la biodisponibilité de l'U (Markich 2002).

La toxicité de l'uranium chez les bactéries pourrait résulter, comme pour d'autres métaux, du déplacement et / ou de la substitution d'ions essentiels au fonctionnement cellulaire ou du blocage des groupes fonctionnels de molécules biochimiques importantes (Nies 1999, Nies 2003).

Une étude visant à explorer la toxicité de l'ion uranyle et sa bioaccumulation chez une souche de *Pseudomonas* dégradant la cellulose en produisant des carbonates a été réalisée (VanEngelen *et al.*, 2010). Dans un milieu à faible taux de bicarbonate, la présence d'espèces hydroxylées d'uranium chargées positivement (ex : $(\text{UO}_2)_3(\text{OH})_5^+$, $\text{UO}_2(\text{OH})^+$) explique à la fois la plus grande sensibilité de l'isolat à l'uranium, mais aussi sa capacité à accumuler

d'importantes quantités d'uranium. A l'inverse, dans un milieu riche en bicarbonate, la présence exclusive de complexes carbonatés d'uranium chargés négativement explique la sensibilité réduite de l'isolat à l'uranium et sa capacité limitée à accumuler l'uranium. Le même constat a pu être établi dans une autre étude visant à évaluer l'impact de l'uranium sur la souche *Desulfovibrio desulfuricans* G20. Les auteurs ont montré que la toxicité de l'uranium dépend du milieu de culture de la souche et que la présence de bicarbonate dans le milieu diminue la toxicité (Sani *et al.*, 2006).

A travers ces études, il apparaît donc clairement que la toxicité de l'uranium et les interactions bactéries-uranium dépendent en grande partie de la spéciation de l'uranium. Cette spéciation régie par les conditions du milieu et la présence de complexants est donc à prendre en considération.

2.4. Les mécanismes d'interaction bactéries-uranium

L'uranium est donc sensible à l'influence des composants abiotiques du sol qui vont largement influencer sa spéciation, sa mobilité et sa biodisponibilité. Outre l'intervention du compartiment abiotique, les micro-organismes telluriques et notamment les bactéries vont influencer cette spéciation dans les sols. L'uranium, contrairement à d'autres métaux, est un élément toxique qui n'est pas essentiel au fonctionnement des cellules (Gadd 2010). Parmi les processus induits par les bactéries les mieux décrits se trouvent la réduction de l'U(VI) en U(IV) ou la formation de minéraux d'U(VI) comme l'autunite ou la meta-autunite.

Dans ce paragraphe, nous décrirons les différents mécanismes d'interaction entre bactérie et uranium. Nous verrons que les voies d'interactions bactérie-uranium impliquent généralement des mécanismes passifs mais aussi des mécanismes actifs qui parfois peuvent permettre à la bactérie de tirer profit de cette interaction.

2.4.1. La réduction et l'oxydation de l'uranium par les bactéries

Les recherches menées sur l'implication du compartiment biotique dans la spéciation et la séquestration de l'uranium dans les sols ont démontré que certaines bactéries ont la capacité de réduire cet élément en anaérobiose. Historiquement, la réduction de l'U(VI) fut mise en évidence avec la souche *Veillonella alcalescens* (Woolfolk et Whiteley 1962) puis plus tard sur *Geobacter metallireducens* et *Shewanella putrefaciens* (Lovley *et al.*, 1991). Depuis, des

études ont démontré que d'autres espèces bactériennes appartenant à la famille des DMRB (Dissimilatory Metal-Reducing Bacteria), des ferri-réductrices, des sulfato-réductrices, des dénitrifiantes ou encore des Archaea (Kashefi et Lovley 2000) peuvent réduire l'U(VI) (Wall et Krumholz 2006). Pour certaines de ces espèces bactériennes, comme *G. metallireducens* ou *S. oneidensis*, la réduction de l'U(VI) est couplée à la production d'énergie (réduction dissimilatrice) alors que pour d'autres espèces comme *Desulfovibrio*, la réduction constituerait un mécanisme de détoxification leur permettant de survivre en présence du métal. La réduction de l'U(VI) va entraîner généralement la formation d'uraninite (UO₂), minéral d'U(IV) insoluble, ce qui a pour effet d'immobiliser l'uranium dans les sols de manière durable. D'autres formes réduites de l'uranium ont également pu être mises en évidence comme la ningyoite ou U₂O(PO₄)₂ (Bernier-Latmani *et al.*, 2010). La réduction par la souche *Geobacter sulfurreducens* provient de l'action d'enzymes de la chaîne respiratoire qui assurent le transfert des électrons : les cytochromes de type C (Shelobolina *et al.*, 2007). La localisation de l'U(IV) est alors liée à l'emplacement de ces cytochromes, c'est-à-dire au niveau de la paroi. Récemment, l'implication des pili de la souche *Geobacter sulfurreducens* dans la réduction de l'U(VI) a pu être mise en évidence. Ces organites protègent les fonctions vitales et préservent la viabilité des cellules en présence d'U(VI) en le réduisant à distance (Figure 5).

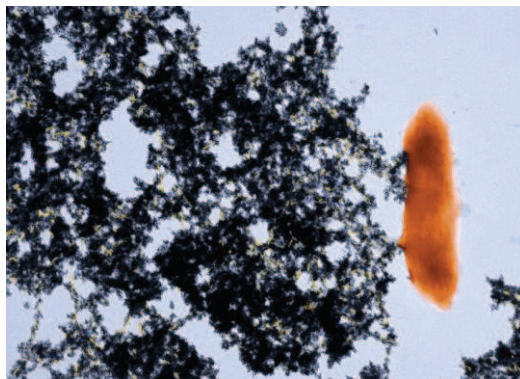


Figure 5 : Image TEM (Microscopie électronique à transmission) : micrographie d'une cellule de *Geobacter sulfurreducens* (orange) avec son pili (jaune) impliqué dans l'immobilisation de l'uranium (précipité noir). Image de Dena Cologgi et Gemma Reguera, Université de Michigan State.

L'intervention des pili dans la réduction de l'uranium constitue donc un avantage adaptatif écologique de la bactérie (Cologgi *et al.*, 2011). La complexation de l'uranium avec des ligands organiques peut modifier la capacité de réduction d'une souche bactérienne vis-à-vis

de l'U(VI). Par exemple, les capacités de réduction de l'U(VI) par la souche ferri-réductrice *Shewanella algaestrain* BrY augmentent lorsque l'U(VI) est complexé à des ligands organiques multidentates. A l'inverse, le taux de réduction de l'U(VI) par la souche sulfato-réductrice *D. desulfuricans* est diminué par ces mêmes complexes (Ganesh *et al.*, 1997). Les concentrations en bicarbonate, en nitrate et en sulfate vont également influencer les capacités de réduction des souches bactériennes. La réduction de l'U(VI) par la souche *D. desulfuricans* est diminuée lorsque la concentration en bicarbonate augmente de 30 à 100 mM (Phillips *et al.*, 1995). La vitesse et le degré d'élimination de l'U(VI) en solution par *D. desulfuricans* décroissent en présence de sulfate (SO_4^{2-}) ou de nitrate (NO_3^-). La réduction bactérienne de l'U(VI) est également inhibée par la présence d'accepteurs d'électrons compétitifs tels que les (hydr)-oxydes de fer (III) et par la présence d'oxydants géochimiques, tels que les oxydes de manganèse (IV).

La découverte de la bioréduction de l'U(VI) est à la base de nombreuses recherches en bioremédiation visant à stimuler et utiliser le compartiment biotique comme frein au transfert de l'uranium soluble dans l'environnement (Williams *et al.*, 2012).

Néanmoins, face à cette réduction qui tend à immobiliser l'uranium dans les sols, l'oxydation biotique ou abiotique de ce dernier peut aussi être observée. L'oxydation bactérienne de l'U(IV) est essentiellement un phénomène indirect lié à l'activité des bactéries qui réduisent les nitrates en nitrites (généralement concomitant à la présence d'uranium dans les sols) et qui, de ce fait, modifient le potentiel d'oxydo/réduction de leur milieu, créant ainsi des conditions favorable à l'oxydation de l'uranium. Cependant, l'oxydation directe de l'U(IV) par des bactéries a aussi été rapportée, l'uranium servirait de donneur d'électrons exclusif comme pour la souche bactérienne *Pseudogulbenkiana* sp. 2002 (Weber *et al.*, 2011).

2.4.2. La biosorption de l'uranium

La biosorption de l'uranium est avant tout un processus rapide, réversible et dépendant du pH, qui se définit comme la capacité d'une structure biologique à fixer et accumuler un métal de la phase aqueuse de manière totalement passive. Dans le cas des bactéries, cette définition implique que toute structure biologique bactérienne vivante ou morte qui présente des groupements affins pour l'uranium peut potentiellement servir de support à ce phénomène (Tabak *et al.*, 2005). Etant donnée la présence de nombreux groupements fonctionnels chargés négativement (carboxyliques, amines, phosphates...) à la surface des cellules bactériennes, la

biosorption bactérienne de métaux comme l'uranium a fait l'objet de nombreuses études et est proposée comme un procédé de bioremédiation (Prakash *et al.*, 2013).

La paroi des bactéries Gram positives est formée d'une seule couche de peptidoglycane de 20 à 80 nm d'épaisseur située du côté externe de la membrane plasmique. Le peptidoglycane est une structure composée de dérivés de sucres et d'acides aminés particulièrement riches en groupements carboxyliques. Les acides teichoïques, formés de polymères de glycérol et de ribitol reliés par des groupements phosphate, s'intercalent dans la paroi des bactéries Gram positives et contribuent à l'apport de charges négatives tout comme les acides teichuroniques.

La paroi des bactéries Gram négatives est plus complexe et se compose d'une couche de peptidoglycane de 2 à 7 nm d'épaisseur entourée par une membrane externe de 7 à 8 nm d'épaisseur. Au niveau de la membrane externe, se trouvent des lipopolysaccharides (LPS). Les LPS constituent le site de fixation privilégié d'éléments cationiques comme l'uranium, du fait de la présence de groupements phosphates et carboxyliques (Barkleit *et al.*, 2008).

Théoriquement, toutes les bactéries sont capables de biosorber l'uranium ; néanmoins, au vu des disparités de structure (par exemple entre les Gram positives et les Gram négatives), il est légitime de s'interroger sur les capacités de biosorption des différentes espèces bactériennes. Nakajima et Tsuruta (2004) ont testé les capacités de biosorption de l'uranium par 18 souches bactériennes. Leurs résultats montrent que toutes les souches bactériennes sont loin d'avoir les mêmes capacités d'adsorption. En effet, pour une même concentration en cellule (15 mg de masse sèche), certaines souches séquestraient 15 $\mu\text{mol U / g}$ de cellules et d'autres 289 $\mu\text{mol U / g}$ de cellules.

Chez les bactéries Gram positives, la complexation de surface avec l'uranium intervient préférentiellement avec les phosphates organiques des acides teichoïques. Les complexes entre l'uranium et les phosphates sont particulièrement stables et peuvent conduire à la formation de précipités très peu solubles. Par contraste, les bactéries Gram négatives apparaissent moins capables de sorber l'uranium du fait du manque de cette structure (Tabak *et al.*, 2005).

Une structure particulière interagit aussi avec l'uranium de manière efficace. Cette structure para-cristalline appelée la couche-S est présente chez de nombreuses bactéries (Gram positives, négatives et *Archaea*) et se compose de glycoprotéines (Messner *et al.*, 2008). Elle joue un rôle dans la protection des cellules face à divers stress environnementaux (pH,

fluctuations ioniques, stress osmotique...). La structure de la couche-S est formée de nombreux groupements carboxyle ou phosphorylés qui vont piéger l'uranium et prévenir son entrée dans la cellule. L'interaction de cette couche de protéines avec l'uranium a pu être mise en évidence chez l'espèce *B. sphaericus* JG-A12 (Merroun *et al.*, 2005). La localisation de l'uranium dans ce cas se situe entre le peptidoglycane et la couche interne des couches-S (Figure 6).

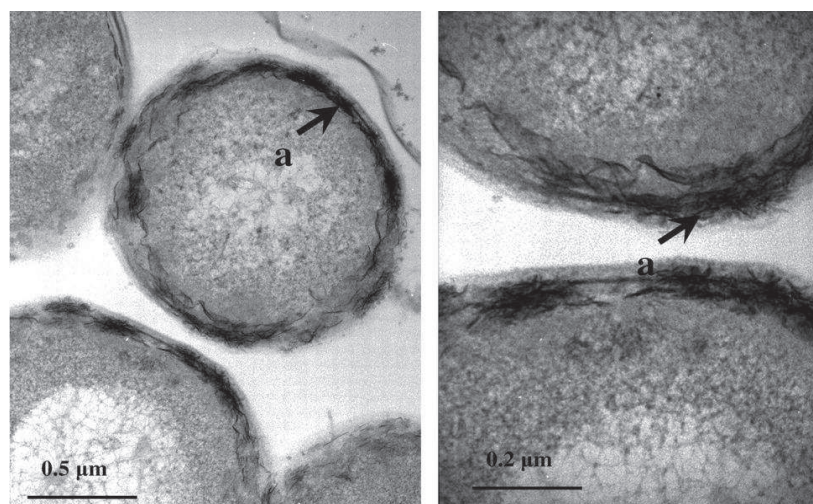


Figure 6 : Observation en MET de cellules de *B. sphaericus* JG-A12 (bactérie Gram positive). Le métal est accumulé à la surface de la cellule (a) (Merroun *et al.*, 2005)

2.4.3. Les interactions par libération de ligands extracellulaires

Les bactéries peuvent influencer l'environnement qui les entoure en excréant des ligands organiques et inorganiques qui vont entraîner la précipitation extracellulaire des métaux en solution (biominéralisation). Contrairement à la réduction bactérienne de l'uranium, qui nécessite des conditions anaérobies, la biominéralisation peut se produire en aérobiose, ce qui rend ce processus intéressant pour des stratégies d'assainissement des radionucléides dans les eaux souterraines contaminées oxygénées (Beazley *et al.*, 2007). Les radionucléides peuvent être précipités par la libération par les bactéries de ligands comme les phosphates, les sulfates, les carbonates ou les oxalates. La forte concentration de ligands autour de la cellule entraîne la formation de complexes avec l'uranium. La surface cellulaire sert alors de site de nucléation (Renshaw *et al.*, 2007).

Parmi ces processus, l'excrétion de phosphates est le mécanisme le plus couramment rencontré. C'est notamment le cas pour les deux souches *Bacillus* et *Rahnella* qui produisent du phosphate par l'action enzymatique d'une phosphatase. Cette libération extracellulaire de phosphate permet de précipiter jusqu'à 95% de l'uranium soluble sous la forme de minéraux de type autunite/méta-autunite (Beazley *et al.*, 2007). La libération de phosphates peut provenir de l'hydrolyse d'un substrat présent dans le milieu (ex : glycerol-phosphate) ou de l'hydrolyse de structures de réserve chez les bactéries (ex : granule de polyphosphate). Au cours de l'interaction engagée par la souche *Cellulomonas* sp. avec l'uranium, deux mécanismes ont été mis en évidence, la réduction de l'uranium et la bioprécipitation par libération de phosphate dans le milieu extracellulaire suite à l'hydrolyse des polyphosphates (Sivaswamy *et al.*, 2011). Chez *Citrobacter*, une phosphatase acide membranaire est impliquée dans la précipitation de l'uranium au niveau du périplasme et dans le milieu extracellulaire. Le phosphate complexe le métal et forme des précipités insolubles de NaUO_2PO_4 ou $\text{NH}_4\text{UO}_2\text{PO}_4$ (Macaskie *et al.*, 2000).

Les bactéries peuvent également libérer dans leur milieu des molécules de faibles poids moléculaire comme les sidérophores. L'induction de la production de sidérophores chez des cyanobactéries a pu être mise en évidence en présence d'uranium (Rashmi *et al.*, 2013). Ces molécules impliquées dans l'acquisition du Fe chélatent aussi l'uranium et tendent ainsi à influencer sa disponibilité (Gadd 1996).

2.4.4. L'accumulation intracellulaire

L'exposition à l'uranium de biofilms provenant d'un futur site de stockage de déchets radioactifs en Finlande montre que certaines bactéries accumulent l'uranium à l'intérieur des cellules en association avec du phosphore et du calcium (Krawczyk-Bärsch *et al.*, 2012). L'observation par microscopie électronique à transmission (MET) de cellules de *Sphingomonas* sp. préalablement exposées à du nitrate d'uranyle (500 μM) durant 48h montre une accumulation intracellulaire d'uranium sous la forme de granules denses (Merroun *et al.*, 2006). Ce type de structure réfractaire au passage des électrons a aussi été trouvé chez d'autres bactéries Gram négatives comme *Halomonas* sp. ou *P. migulae* CIP 105470 et semble être associé à la présence de polyphosphate dans les cellules (Francis *et al.*, 2004, Merroun et Selenska-Pobell 2008) (Figure 7). Bien que l'uranium accumulé par les cellules d'*A. ferrooxidans* soit situé principalement au niveau des polysaccharides extracellulaires et

sur la paroi de la cellule, l'observation en MET révèle aussi la présence d'uranium sous forme de granules de polyphosphates (Merroun *et al.*, 2003). Certaines études ont rapporté des précipités d'uranium sous forme d'oursins ou de paillettes (« needle like structure »). Cette accumulation intracellulaire sous forme de fibrilles en forme d'aiguilles, de tailles différentes, a été observée dans le cytoplasme d'isolats tels qu'*Arthrobacter sp.*, *D. äspönensis* ou *Sphingomonas sp.* S15-S1 (Merroun *et al.*, 2006). Comme le montre la figure 7, les cellules de *Stenotrophomonas maltophilia* JG-2, souche isolée à partir de déchets miniers d'uranium, l'accumulent de manière importante sous cette forme de cristaux. L'exposition de la souche *Pseudomonas sp.* EPS-5028 à 100 μM d'uranium entraîne une interaction rapide qui résulte en l'accumulation intracellulaire de l'élément dans la cellule (Marqués *et al.*, 1991).

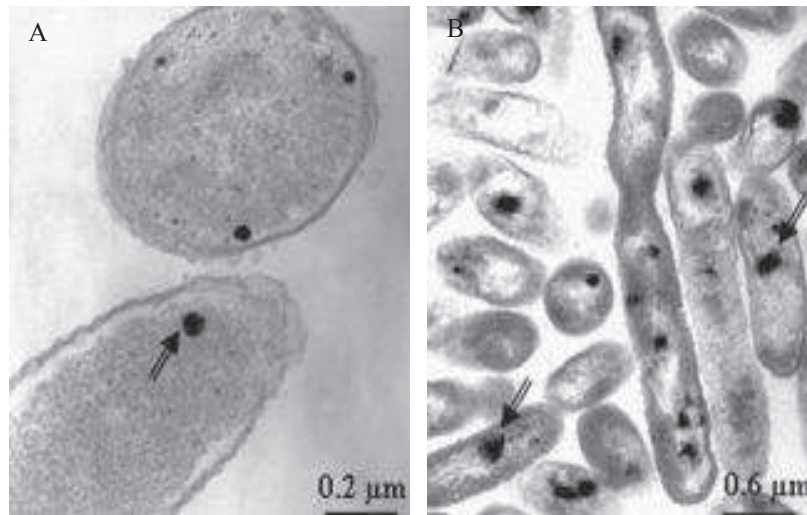


Figure 7: Image en MET des cellules de *P. migulae* CIP 105470 (A) et de *S. maltophilia* JG-2 (B) traitées avec de l'uranium. Les flèches indiquent la présence d'uranium (Merroun et Selenska-Pobell 2008).

L'accumulation intracellulaire d'uranium a aussi pu être observée en anaérobiose chez certaines bactéries (Ray *et al.*, 2011).

Les auteurs posent alors la question des mécanismes d'entrée de l'uranium dans la cellule. L'uranium entre-t-il dans la cellule par un mécanisme actif ou passif ?

Selon Francis (2006) l'accumulation intracellulaire implique l'intervention d'un transporteur initialement dédié au passage d'ions essentiels au métabolisme cellulaire. Selon d'autres

auteurs, l'entrée d'uranium est un mécanisme totalement passif qui résulte d'une déstabilisation des membranes liée à la toxicité de l'uranium (DiSpirito *et al.*, 1983, Suzuki et Banfield 1999). Les voies d'entrée de l'uranium dans les cellules bactériennes restent encore inexplicées. Suite à l'entrée de métaux à des concentrations toxiques, les cellules ont la possibilité de les excréter via des systèmes d'efflux (Zn, Cd, Cu) (Nies 1995, Nies 1999). Mais là encore, aucun système d'efflux bactérien dédié à ou utilisé par l'uranium n'a pu être mis en évidence.

3. Synthèse de l'étude bibliographique et objectifs de thèse

Au cours de ce chapitre nous avons pu voir que :

- les techniques d'étude de la diversité bactérienne présentent toutes des avantages et des limites et que, pour une description la plus précise possible, il est nécessaire de combiner des approches complémentaires entre elles. Bien que les avancées technologiques permettent aujourd'hui d'accéder à une diversité bactérienne exhaustive, il reste primordial de maintenir les méthodes traditionnelles de culture et d'isolement qui sont indispensables à l'établissement et à l'interprétation des données générées par les nouvelles méthodes haut débit (ex : pyroséquençage 454).
- L'état de l'art sur les connaissances acquises sur les bactéries présentes dans les environnements contaminés par les radionucléides montre que la plupart des études se sont intéressées principalement aux bactéries présentes dans des environnements uranifères. Très peu ont traité de l'impact de l'irradiation ou de la présence d'autres radionucléides sur la diversité microbienne des sols et encore moins se sont intéressées aux sols de Tchernobyl.
- Les interactions bactérie-uranium sont nombreuses et mettent en jeu différents mécanismes (biosorption, biominéralisation...), qui peuvent avoir lieu en condition aérobie et/ou anaérobie. Ces interactions entraînent une modification de la spéciation, de la mobilité et donc la toxicité de l'uranium dans les sols. Néanmoins, les mécanismes fins d'interactions bactéries-uranium restent encore largement inexplicés et la toxicité de l'élément pour les cellules est rarement prise en compte.

Les deux objectifs majeurs de cette thèse sont :

- (i) d'étudier la diversité bactérienne dans une tranchée de stockage de déchets contaminés par des radionucléides, à l'échelle de la communauté, au moyen de différentes techniques (approche culturale, DGGE et pyroséquençage) et à l'échelle individuelle en étudiant plus particulièrement la présence d'espèces radiorésistantes ou résistantes à certains radionucléides
- (ii) d'évaluer, à travers la sélection d'une souche bactérienne résistante à l'uranium, les interactions engagées avec ce radioélément, en utilisant des méthodes microscopiques et spectroscopiques permettant de préciser la localisation et la spéciation de l'uranium ayant réagi avec la souche.

CHAPITRE II : Etude de la diversité bactérienne de la tranchée T22 par l'approche culturelle et la DGGE

1. Contexte général

Parmi les tranchées creusées pour enterrer les déchets contaminés, l'une d'entre elles fait l'objet d'un suivi par l'IRSN en collaboration avec deux instituts ukrainiens (IGS et UIAR) depuis 1999. Cette tranchée est la tranchée T22 (longueur : 70 m, largeur : 8 à 10 m et profondeur : 2 à 2,5 m) (Figure 8).

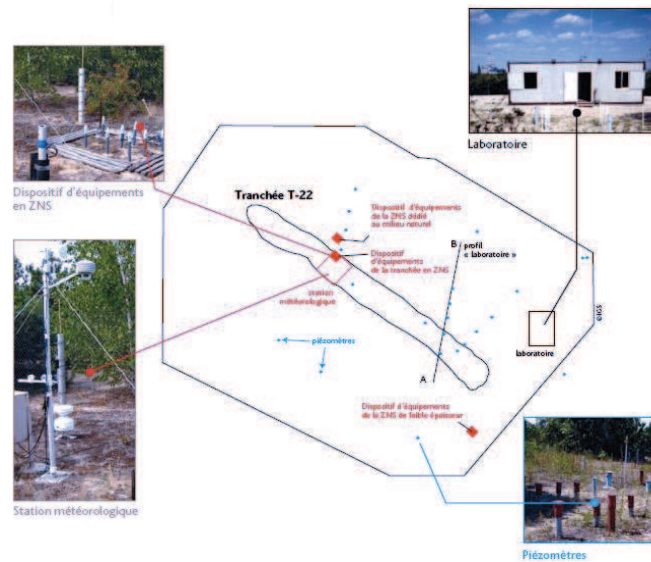


Figure 8 : Schéma général du site expérimental de Tchernobyl (source IRSN)

Comme décrit dans l'introduction, elle se situe au voisinage de la centrale accidentée, dans la zone d'exclusion et contient de nombreux déchets de décontamination de la forêt Rousse notamment des particules de combustible expulsées du réacteur lors de l'explosion. Depuis 25 ans, les matériaux de cette tranchée sont soumis à l'infiltration des eaux de pluie. L'IRSN dispose aujourd'hui d'informations permettant de décrire cette tranchée en termes de composition, de propriétés physico-chimiques et hydrauliques. Ces données alimentent des recherches sur le comportement des radionucléides dans l'environnement et notamment sur le transport du ^{90}Sr , du ^{137}Cs , de l'uranium et du plutonium dans la zone non saturée et l'aquifère

sous-jacent. Les microorganismes sont fortement pressentis pour avoir un impact sur le transfert des radionucléides dans le sol. Néanmoins, comme le souligne l'étude bibliographique, très peu de données sont disponibles sur la microbiologie des sols de Tchernobyl. Il est donc impératif de caractériser les communautés bactériennes indigènes des sols de la tranchée pour identifier les souches ayant résisté à la présence de forts rayonnements ionisants et de radionucléides et d'améliorer la compréhension des effets à long terme des radionucléides sur les communautés bactériennes du sol.

C'est dans ce contexte que les laboratoires impliqués dans cette thèse sont associés et soutenus par le GNR CNRS/IRSN TRASSE (Transferts des Radionucléides dans le Sol, le Sous-sol et vers les Ecosystèmes ; actions 2008-1C (2008-2010) et 2009-1A (2009-2011)) sur des recherches concernant cet aspect microbiologique des sols de Tchernobyl.

2. Objectifs de l'étude et démarche expérimentale

Le premier objectif de l'étude a été d'évaluer par deux approches complémentaires (DGGE, approche culturale) la diversité des bactéries au niveau de la tranchée T22 de Tchernobyl. Pour ce faire, une approche comparative a été réalisée. Elle consistait à analyser les communautés bactériennes des échantillons de sols fortement contaminés prélevés directement au niveau de la tranchée (sols 1, 3, 4, 8, 10, 12) et des échantillons « contrôles » prélevés hors tranchée qui présentent une faible contamination radioactive (sols 13, 14, 20). Trois campagnes de terrain ont été effectuées, en Octobre 2008, Avril et Octobre 2009. Les prélèvements consistaient à carotter le sol à une profondeur de 50 cm, soit sous la couche de sable qui recouvre la tranchée et à prélever une partie du sol situé au cœur de la carotte (Figure 9).



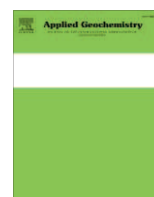
Figure 9 : Carottage des sols au niveau de la tranchée de Tchernobyl et collecte des échantillons pour les analyses microbiologiques.

Ces échantillons de sols ont servi à la fois à l'extraction de l'ADN métagénomique et à la constitution d'une collection de bactéries cultivables. Les échantillons d'ADN métagénomique ont servi de matrice pour l'analyse DGGE. Au cours de celle-ci, la région de l'ADNr 16S a été amplifiée par PCR avec des amorces universelles (Bacteria) et groupes spécifiques (spécifiques aux groupes des *Alpha*, *Beta*, *Gamma-Proteobacteria*, aux *Firmicutes* et aux *Actinobacteria*). Les bactéries cultivables ont été obtenues après mise en culture sur deux milieux de culture différents : Tryptic Soy Broth, dilué au 10^e (TSB 0,1X) et AEM1 (composition selon DSMZ), favorables à la croissance de nombreuses bactéries. Certaines de ces bactéries ont ensuite été identifiées par séquençage de leur ADNr 16S. Enfin, une caractérisation des principaux paramètres physico-chimiques des sols aux différents points de prélèvement a été réalisée, afin d'analyser l'effet de ces paramètres sur la biodiversité bactérienne.

Un traitement statistique a été utilisé afin d'évaluer d'une part la corrélation entre les différents paramètres physico-chimiques mesurés, mais aussi entre ces derniers et la diversité bactérienne. La comparaison des profils bactériens issus des gels DGGE a été réalisée par construction de dendrogrammes, comme décrit dans l'étude bibliographique (cf. 1.1.3).

3. Contribution scientifique

Chapon V., Piette L., Vesvres M.-H., Coppin F., Le Marrec C., Christen R., Theodorakopoulos N., Février L., Levchuk S., Martin-Garin A., Berthomieu C., Sergeant C., 2012. Microbial diversity in contaminated soils along the T22 trench of the Chernobyl experimental platform. *Applied Geochemistry* 27, 1375-1383.



Microbial diversity in contaminated soils along the T22 trench of the Chernobyl experimental platform

Virginie Chapon^{a,b,c,*}, Laurie Piette^{a,b,c}, Marie-Hélène Vesvres^d, Frédéric Coppin^e, Claire Le Marrec^f, Richard Christen^{g,h}, Nicolas Theodorakopoulos^{a,b,c,d,e}, Laureline Février^e, Sviatoslav Levchukⁱ, Arnaud Martin-Garin^e, Catherine Berthomieu^{a,b,c}, Claire Sergeant^d

^aCEA, DSV, IBEB, SBVME, LIPM, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France

^bCNRS, UMR 6191, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France

^cUniversité d'Aix-Marseille, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France

^dUniversité de Bordeaux 1/CNRS-IN2P3, UMR 5797, CENBG, POB 120, F-33175 Gradignan cedex, France

^eIRSN, DEI/SECRE/LRE-Bât 186, B.P.3, Cadarache Center, F-13115 Saint-Paul-lez-Durance cedex, France

^fISVV, UMR 1219, Institut Polytechnique de Bordeaux/INRA, POB 50008, F-33882 Villenave d'Ornon, France

^gUniversité de Nice-Sophia-Antipolis, Centre de Biochimie, Parc Valrose, F-06108 Nice, France

^hCNRS, UMR 6543, Centre de Biochimie, Parc Valrose, F-06108 Nice, France

ⁱUkrainian Institute of Agricultural Radiology, UIAR, NUBiP of Ukraine, Mashinobudivnykiv Str. 7, Chabany, Kyiv-Svjatoshin Distr., Kyiv Reg. 08162, Ukraine

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 7 September 2011

ABSTRACT

The diversity of bacterial communities exposed to radioactive contamination in Chernobyl soils was examined by a combination of molecular and culture-based approaches. A set of six radioactive soil samples, exhibiting high levels of ¹³⁷Cs contamination, were collected from the T22 trench. Three samples were also collected in nearby soils with low contamination. Complex bacterial community structures were observed in both highly and weakly contaminated samples, using a molecular approach targeting the 16S rRNA gene. However, the presence of specific populations within samples from highly contaminated soils could not be revealed by statistical analysis of the DGGE profiles. More than 200 culturable isolates, representative of dominant morphotypes, were grouped into 83 Operational Taxonomic Units (OTUs) and affiliated to *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-Proteobacteria* and *Bacteroidetes*. No specific pattern linked to contamination was observed for these culturable bacteria. The results show that both highly and weakly contaminated soils host a wide diversity of bacteria, suggesting that long term exposure to radionuclides does not lead to the extinction of bacterial diversity.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Shortly after the Chernobyl accident in April 1986, radioactively contaminated soil and other debris (including vegetation from the Red Forest) were buried in several trenches in an area approximately 2.5 km from the Chernobyl Nuclear Power Plant (CNPP) and then covered with a layer of fine sand. In this area, trench no. 22 (T22) has been a pilot site for the study of radionuclide (RN) migration behavior since 1999 (Bugai et al., 2005). Different RN are present in this trench, including ¹³⁷Cs, ⁹⁰Sr, ⁶⁰Co, ¹⁵⁴Eu, ²³⁸, ²³⁹, ²⁴⁰Pu, ²⁴¹Am and ^{235,238}U.

Although the consequences of the accident, which include chronic radiation exposure to eukaryotic organisms, have been extensively studied (Kovalchuk et al., 2000; Møller and Mousseau, 2006; Dighton et al., 2008; Yablokov et al., 2009), very few studies

have examined the effect of RN contamination on bacterial communities inhabiting Chernobyl soils (Yablokov, 2009). In one such study, Romanovskaya et al. (1998) worked with soil surface samples collected within a 10 km zone of the CNPP. Their results showed that radioactive contamination still had a negative impact on the abundance of N-fixing, cellulolytic, heterotrophic Fe-oxidizing, nitrifying and SO₄-reducing culturable bacteria, 7–9 years after the accident. They also reported that spore-formers were retrieved from all contaminated soil samples. They concluded that chronic radiation exerts selective pressure on bacteria, altering both their abundance and diversity. Some other data have been obtained on bacterial isolates retrieved from the Chernobyl soils. Zaviļgesky et al. (1998) showed that several Chernobyl isolates related to *Bacillus* were resistant to DNA-damaging conditions (X-rays, UV-radiation, 4-nitroquinoline 1-oxide). In addition, resistance to UV- and γ-radiation, desiccation, and hydrogen peroxide has been documented for *Methylobacterium* and *Bacillus* strains. However, this resistance phenotype was observed irrespective of the zone from which the bacteria were isolated (either around or outside

* Corresponding author at: Université d'Aix-Marseille, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France. Tel.: +33 442 253 478; fax: +33 442 252 625.

E-mail address: virginie.chapon@cea.fr (V. Chapon).

the CNPP zone) (Romanovskaya et al., 1998, 2002). These data suggest that survival of bacteria in the RN-contaminated soils of Chernobyl relies on effective DNA repair mechanisms.

The aim of this work was to analyze the diversity of bacterial communities which have been evolving in the T22 Chernobyl environment over the past 25 years, by a combination of molecular and culture-based approaches. Furthermore, the potential impact of long-term radioactive contamination on bacterial communities has been assessed through a comparative study of soil samples with high and low RN contamination.

2. Materials and methods

2.1. Experimental site and sample collection

Trench T22 has previously been described in detail by Bugai et al. (2005). Briefly, the site is located 2.5 km from the CNPP, and contains clean-up waste from the Red Forest and other radioactively contaminated debris dating since 1987. Nine samples from sandy soils (numbered 1, 3, 4, 8, 10, 12, 13, 14 and 20) were collected in and outside the trench with a soil core sampler at a depth of 50–60 cm during three successive campaigns in October 2008, April 2009, and October 2009 (exceptionally, sample 20 was only sampled in 2009; see Fig. 1). The internal part of the core was removed with a sterile spatula and stored in sterile tubes for subsequent DNA extraction, bacteria isolation, and measurements of pH, water content, ^{137}Cs and organic C.

2.2. pH, water content, organic carbon and RN measurements

The pH was measured on a 1:5 soil:water suspension. Two g soil samples were combined in a polypropylene tube with 10 mL of 18 M Ω water. Suspensions were shaken for 30 min, and after decantation and 2 h atmosphere equilibration, the pH of the supernatant was measured. To determine water content (%), a 10 g soil sample was subjected to oven-drying at 105 °C until the weight remained constant, and the change in weight was calculated. Soil NaOH-extractable organic C ($C_{\text{org(NaOH)}}$) was measured, based on the International Humic Substances Society (IHSS) protocol (as described in Coppin et al., 2006). 0.15 g of soil sample was mixed with 1.5 mL of NaOH (0.1 mol L $^{-1}$) and shaken overnight. After centrifugation (10 min at 10,000g) the solution was removed and three appropriate dilutions were made to measure the absorbance at 280 nm (A_{280}) (BioPhotometer[®], Eppendorf). The A_{280} /total organic C (mg L $^{-1}$) calibration was made with humic acid solutions of known concentrations (3–60 mg L $^{-1}$).

The ^{137}Cs specific activity in the samples was measured under laboratory conditions, using a gamma-spectrometer ADCAM-300 (ORTEC, USA) equipped with a high purity germanium GEM-30185 detector. For each sample, 50 g of soil were measured for 1 h.

The U content and U isotopic ratio ($^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$) of soil samples were measured by Inductively Coupled Plasma Mass Spectroscopy (ICP-MS, Agilent 7500 Cx) after a dry “ashing” procedure, followed by a mineralization step. Ten g of oven-dried soil samples (105 °C) were placed in a muffle furnace (550 °C) for 20 h to destroy the combustible organic portion of the sample by thermal decomposition. After cooling in a desiccator, 100 mL of concentrated HNO $_3$ (8 mol L $^{-1}$) were added and heated to near-boiling temperature, while mixing for 1 h. The supernatant was then filtered and analyzed by ICP-MS after a 1:20 dilution to obtain a 2% HNO $_3$ solution. Radiofrequency power was set to 1600 W, and samples were introduced using a CETAC ASX 500 autosampler with a peristaltic pump (flow rate 1 mL min $^{-1}$). Signal optimization and mass calibration were performed using a 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ multielemental reference solution (Analab, in 2% HNO $_3$). Signal acquisition was performed in continuous signal mode. Bismuth and Thallium were used as internal standards at 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ for each sample. Determination of U was performed by external calibration on each U isotope. The limit of quantification (LOQ) was 2–2.5 ng $^{238}\text{U L}^{-1}$.

2.3. DNA extraction and PCR-DGGE analysis

The soil samples were processed at Chernobyl within 18 h of collection. DNA was extracted with the PowerSoil[™] DNA Isolation Kit (MO Bio, USA) in several replicates (two from October 2008, one from April 2009, and three from October 2009; 1 g of soil per extraction). For DGGE analysis, total DNA extracted from soil samples was used as a template for the PCR amplification of a fragment of the 16S rRNA gene, using appropriate primers. For *Bacteria* community analysis, the universal primers set P1-GC and COM2 was used (Table S1, Supplementary material). A nested approach was used for group analysis: 16S rRNA genes were first amplified using specific primers for *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gamma-Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Firmicutes* and re-amplified to generate DGGE-compatible fragments. Experimental conditions for PCR reactions and DGGE are detailed in the Supplementary material. DGGE profiles were analyzed by the Genetools software (SYNGENE, England) to obtain densitometric curves and subsequently similarity indices using the Bray–Curtis distance measure. Dendrograms were created using the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) at 1% tolerance.

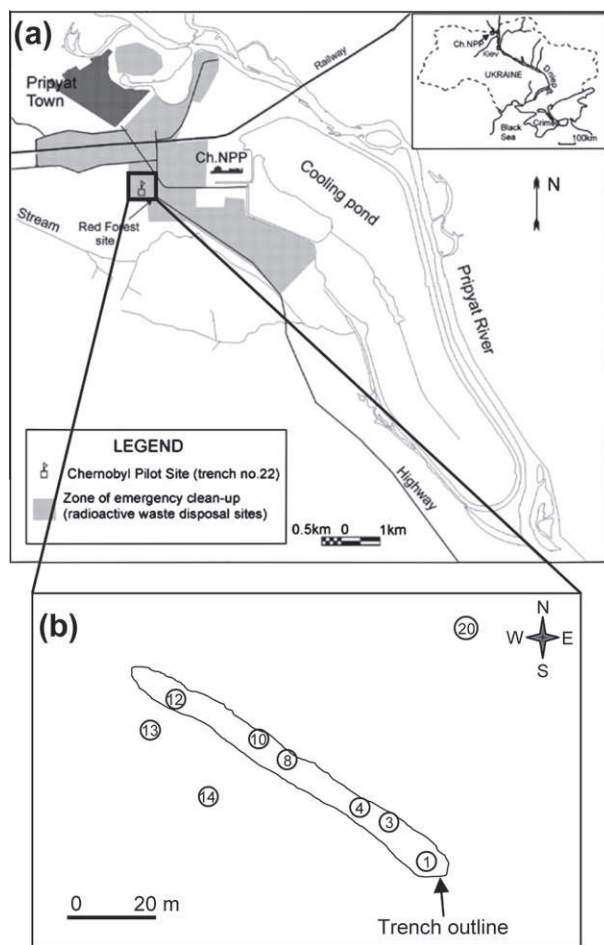


Fig. 1. General map of the Chernobyl trench 22 (a) (Bugai et al., 2005) and a focus on the location of the sampling points (b).

2.4. Isolation of culturable bacteria and subsequent 16S rRNA gene sequencing

Samples were processed within 18 h of collection, and culturable bacteria were recovered by two distinct methods to improve the yield. Thus for one method, soil (1 g) was resuspended in 1 mL of 0.1× tryptic soy broth (TSB, Difco Laboratories), and homogenized for 5 min under strong agitation. Dilutions of the resulting supernatant were spread on 0.1× TSB-agar plates. For the second method, an aerobic medium (AEM1) for aerobic organotrophic microorganisms, was prepared according to the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) recommendations (<http://www.dsmz.de/>). After 1 h agitation of soil in contact with physiological water 1/5 (v/v), the dilutions were spread on agar plates. To isolate sporulating bacteria, the soil suspension was then incubated for 10 min at 80 °C and dilutions were spread on agar plates. Plates were incubated at room temperature for 2 days (in Chernobyl), then at 30 °C in the laboratory. One isolate representative of each dominant morphotype was selected.

For the 229 isolates recovered from 0.1 × TSB agar plates, a 1500 bp fragment of the 16S rRNA gene was amplified with the universal primers fD1 (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') and S17 (5'-GTTACCTGTTACGACTT-3') and partially sequenced using the fD1 primer. Alternatively, for the 74 isolates cultured on AEM1 plates, the universal primers fD1 and 1492r (5'-TACGGYTACCTGTACGACTT-3') were used and the PCR product was partially sequenced with the primer 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3').

2.5. Phylogenetic analyses of 16S rRNA gene sequences

Each sequence (about 650 bp) was compared to reference sequences of the Silva ribosomal RNA database (version 102, released in February 2010) by BLAST, from which the five most similar sequences were retrieved. These sequences and the clone sequences were then aligned using Muscle (Edgar, 2004), followed by a final manual check using SeaView (Gouy et al., 2010). For each phylogenetic analysis, distances were calculated using the Kimura 2-parameters distance correction as implemented in SeaView. Only domains that were present in each sequence of the data set were used; positions with obvious homoplasy or that were difficult to align were excluded. Trees were computed using BIONJ (Gascuel, 1997) as implemented in SeaView, and were used for taxonomic assignment of the new sequences.

For OTUs (operational taxonomic units), uclust 3.0.617 was used to cluster sequences as indicated in the uclust manual and using a distance of 97%. The representative (seed) sequence of each cluster was used to build the final tree.

2.6. Statistical analyses

The dependence between ^{137}Cs and $\text{C}_{\text{org}(\text{NaOH})}$ contents was assessed using a linear mixed model. The dependant variable was “ ^{137}Cs concentration”, whereas “ $\text{C}_{\text{org}(\text{NaOH})}$ concentration” and “time” were the explanatory variables. The fixed effect variable was “concentration”, whereas “time” was a random effect variable. The effect of the contamination (i.e. ^{137}Cs content) on the number of OTU and CFU was assessed by Poisson Generalized Linear Mixed Models (Poisson GLMMs). Regarding the number of CFU, the initial model used the “condition” variable (contaminated/control) as a fixed effect, and “sampling site” and “time” (2009/2008) as random effect variables. As for the number of OTU, the initial model contained three fixed effect variables: the “phylum” (*Bacteroidetes/Actinobacteria/Proteobacteria/Firmicutes*), the “condition” (contaminated/control) and the interaction “phylum × condition”, and one random effect variable: the sampling site.

In all cases, the significance of the fixed effect was assessed with a nested modelling approach, where significance level (α risk) was fixed at 5%. Statistical analyses were calculated with R software (R Development Core Team, 2009). GLMM was performed with the “lme4” library (Bates and Maechler, 2009), and linear mixed models used the “nlme” library (Pinheiro et al., 2009).

3. Results and discussion

3.1. Sampling and physicochemical analysis of soils

Bugai et al. (2005) have previously characterized the distribution of radioactivity in trench 22. Based on their report, soil samples with high RN contamination were collected all along trench 22, at positions indicated in Fig. 1. A set of weakly contaminated control samples was also collected outside of the trench.

Various parameters that could influence bacterial diversity were then measured in these samples (Table 1). The pH values ranged from 4.4 to 6.1 and soil water content ranged from 2.2% to 7.3%. The NaOH extractable organic C content ($\text{C}_{\text{org}(\text{NaOH})}$) (measured only in 2009) was within the same range for all samples (average = 2.25 mg g⁻¹), except for samples 4, 13, and 14 which were lower in content (0.1–0.88 mg g⁻¹).

As expected, high ^{137}Cs content was observed in the six samples collected from the trench (1, 3, 4, 8, 10 and 12), with activities ranging from 61 to 750 Bq g⁻¹. The ^{137}Cs content showed variability between the different campaigns, likely due to soil heterogeneity. This heterogeneity is probably linked to the presence of radioactive debris. For these six samples, a significant linear dependence between the ^{137}Cs concentration and $\text{C}_{\text{org}(\text{NaOH})}$ was observed (p -value = 0.03). By comparison, the three samples collected outside the trench showed much lower ^{137}Cs activity (with values ranging from 0.35 to 1.5 Bq g⁻¹). Several analyses of the U content also reveal a clear difference between soil samples collected within and outside the trench. First, the level of ^{238}U was higher for soils sampled from within the trench (Table 1). Second, the $^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$ ratio is elevated for trench samples (with values ranging from 0.98% to 1.17%), while it is low (0.72%) for samples collected outside of the trench. The high ratio for trench samples signifies soil contamination by radioactive fuel particles disseminated during the accident, while the value measured outside the trench corresponds to the natural U ratio. These results show that the samples collected outside the trench constitute suitable control soil samples.

3.2. Molecular diversity of bacterial communities

Bacterial community diversity was analyzed in the six highly contaminated samples and three weakly contaminated controls collected in October 2008, April 2009, and October 2009 (one of the controls was only sampled in 2009). The PCR-DGGE reproducibility was assessed for each soil sample by a comparative analysis of DGGE profiles (Fig. 2). DNA templates were obtained from two independent extractions in October 2008 and three in October 2009. PCR-DGGE was then performed with a universal primer set targeting the V3–V5 region of the bacterial 16S rRNA gene. As shown in Fig. 2, the DGGE profiles of replicates were similar, demonstrating the reproducibility of the method (complete results are provided in Fig. S1).

To assess the impact of RN contamination on bacterial community structure, a comparative study was performed of DGGE profiles from high and low contaminated soils collected in April and October 2009. Only a single DNA sample was processed for each series, in order to load all samples on the same DGGE gel. A cluster analysis of DGGE profiles was performed by the construction of a

Table 1
 ^{137}Cs activity, ^{238}U content and uranium ($^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$) isotopic ratio, physico-chemical parameters and abundance of culturable bacteria of soil samples collected in and outside the trench 22 in Chernobyl. Contaminated samples are indicated with an asterisk.

Soil samples	^{137}Cs (Bq g^{-1})		^{238}U ($\mu\text{g g}^{-1}$ of soil)		$^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$ (%)		$C_{\text{org}}(\text{NaOH})$ (mg g^{-1} of soil)		pH		Water content (%)				CFU (g^{-1} of soil sample) ($0.1 \times \text{TSB}$ agar)	
	October 2008	April 2009	October 2009	April 2009	April 2009	October 2009	October 2008	April 2009	October 2008	April 2009	October 2008	October 2009	April 2009	October 2008	April 2009	October 2008
1*	290	420	420	43	1.17	2.61	nd	2.56	5.6	5.1	4.8	7.2	5.8	9×10^5	2.6×10^5	
3*	340	300	750	18	1.07	1.77	nd	1.48	5.5	5.6	5.0	5	5.7	6×10^5	2×10^5	
4*	170	61	140	11	1.08	0.88	nd	0.49	5.6	5.4	4.8	2.2	3.5	10^5	4×10^4	
8*	410	640	670	81	1.26	2.93	nd	4.12	5.0	5.2	4.5	4.1	6.2	1.5×10^5	8×10^4	
10*	450	290	710	26	0.98	2.77	nd	2.15	5.2	4.7	4.9	2.9	4.9	8×10^4	5×10^4	
12*	150	260	370	29	1.15	1.48	nd	1.16	5.4	5.4	4.4	4.6	3.7	1.2×10^5	7×10^5	
13	0.95	0.37	1.5	5	0.73	0.12	nd	0.16	5.0	6.1	4.3	3.4	2.2	10^4	2×10^4	
14	0.65	0.91	0.79	5	0.72	0.34	nd	0.10	5.2	6.1	4.8	3.7	2.5	6×10^3	3×10^4	
20	-	0.35	0.54	5	0.72	1.96	-	1.99	-	5.4	4.5	-	4.7	-	6×10^4	

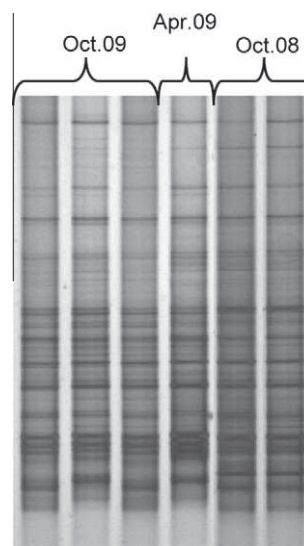


Fig. 2. DGGE profiles of bacterial communities retrieved from soil sample no. 4. Total DNA was extracted from two independent samples in October 2008, from one sample in April 2009 and from three samples in October 2009. Universal primers P1-GC and Com2, targeting bacterial 16S rRNA gene were used.

similarity dendrogram (Fig. 3). Bacterial communities exhibited high apparent diversity, even in the most contaminated samples (demonstrated by the presence of 24–36 discernible bands and a high number of unresolved bands in the separation profiles). There were slight variations in the community structure of samples 1, 4, 8, 13 and 14 between April and October, as observed in the corresponding DGGE profiles with similarity values ranging from 65% to 73%. In contrast, samples 3, 10, 12 and 20 exhibited greater variations between April and October, with similarity values varying from 51% to 35%. The similarity dendrogram revealed two major clusters at the 27% similarity level (Fig. 3). The first cluster consists of the highly contaminated samples 1, 3, 4, 8, 10 grouping at 35%, whereas the other cluster includes the control soils 13, 14, 20 and the contaminated sample 12, grouping at 30%. The bacterial patterns from contaminated samples exhibited low similarity and were not grouped in the same cluster, indicating a high degree of phylogenetic heterogeneity among the communities. The DGGE analysis did not reveal the presence of any specific bacterial community in RN-rich samples.

To complement these results, a DGGE analysis of several taxonomic groups was performed on the samples collected in October 2009 using *Actinobacteria*, *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-Proteobacteria* and *Firmicutes* specific primers. For each primer set, the PCR products were separated on the same gel using an appropriate denaturing gradient and similarity dendrograms were constructed to compare the profiles (Fig. 4). As observed for *Bacterial* communities, the apparent diversity of *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-proteobacteria*, and *Firmicutes* was high in all profiles, with an average of 28, 25, 20 and 30 visible bands, respectively, whereas the *Actinobacteria* profiles were less diverse with an average of 13 bands (Fig. 4). Compared to controls, the apparent diversity was not reduced in the highly contaminated samples (Fig. S2). The dendrograms exhibited various topologies; however none of them revealed any obvious associations between community structure and RN content.

Taken together, these results demonstrate that long term RN exposure at activities ranging from 61 to 750 Bq g^{-1} did not lead to extinction of bacterial diversity. In fact, the Chernobyl T22 trench hosts a wide diversity of bacteria, after 25 years of contamination with RN. Furthermore, profile comparison by the construction of similarity dendrograms did not indicate the presence of specific community fingerprints related to contamination

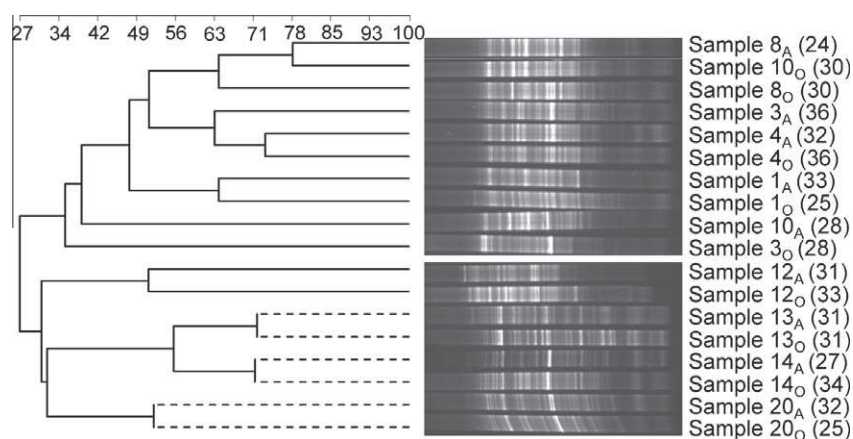


Fig. 3. DGGE analysis of bacterial communities from Chernobyl soils. DGGE profiles of total bacterial communities in soil samples collected in April and October 2009 and the corresponding similarity dendrogram are shown. Universal primers targeting bacterial 16S rRNA genes were used (see Supplementary material for details). The number of discernible bands on the DGGE profiles is indicated in parentheses for each sample. Dotted lines correspond to control soil samples (nos. 13, 14 and 20). Scale bar indicates percent similarity. Sample_A: collected in April 2009; sample_O: collected in October 2009.

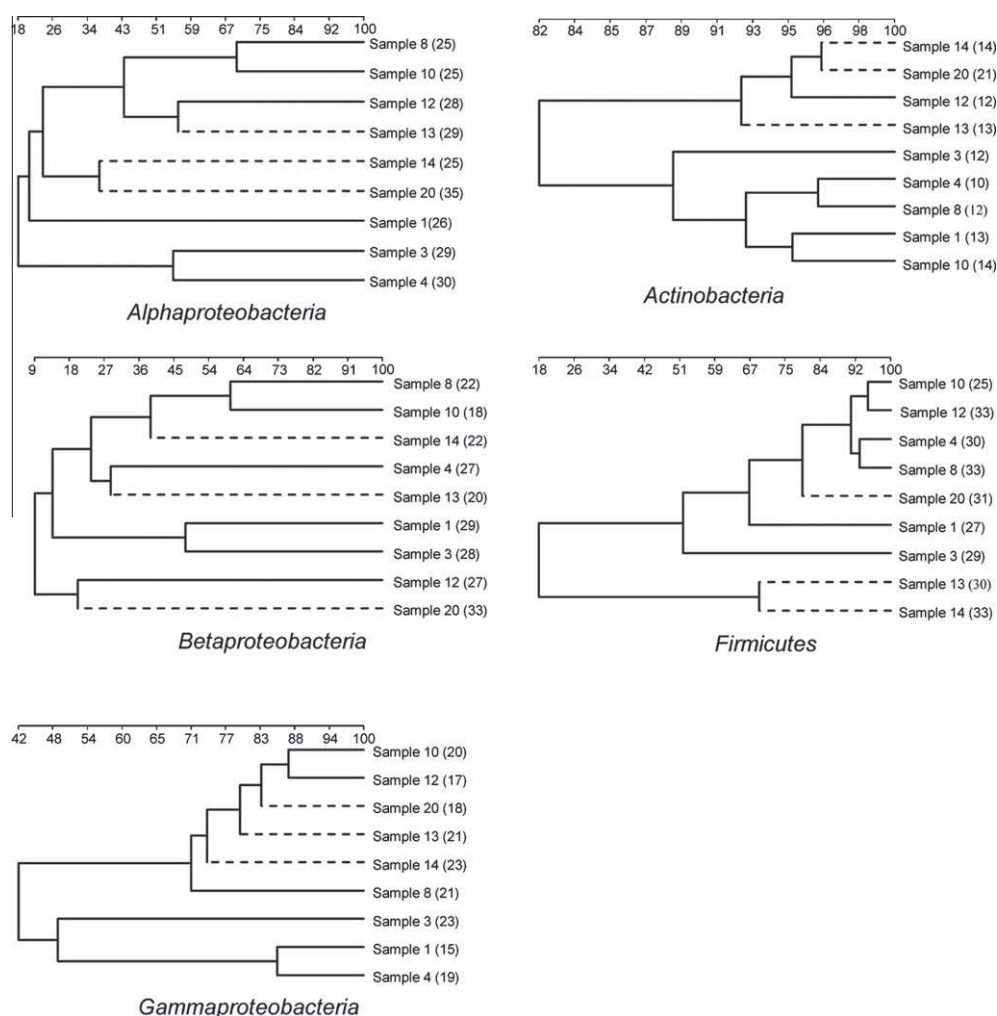


Fig. 4. Clustering analysis of DGGE profiles of different taxonomic groups. Clustering analysis of *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*-Proteobacteria, *Firmicutes*, *Actinobacteria* in soil samples collected in October 2009. Primers targeting these different taxonomic groups were used (for details, see Supplementary material). The number of discernible bands on the profiles is indicated in parentheses. Dotted lines correspond to control soil samples (nos. 13, 14 and 20). Scale bar indicates percent similarity.

level. These results suggest that a diverse set of microorganisms could potentially respond to RN stress and that RN content is likely not the sole factor influencing bacterial community structure.

3.3. Phylogeny of culturable bacteria

Aerobic heterotrophs inhabiting the Chernobyl soils were isolated by cultivation-based methods. The statistical analysis of

colony forming units (CFU) revealed a significant condition (contaminated/control) effect (p -value = 0.008), indicating that highly contaminated samples contained significantly higher amounts of culturable bacteria than the controls (Table 1). Importantly, this demonstrates that the presence of contamination does not decrease the abundance of culturable bacteria. This observed abundance is likely linked to the high level of organic C found in these samples (Table 1) indicating that organic C content in the soil is a determinant factor controlling this parameter. However, this result does not refute Romanovskaya et al. (1998), who reported a decrease in culturable bacteria in the years immediately following the accident. Indeed, in their conditions, only natural soils were considered while a large amount of organic matter was buried in the trench.

To estimate phylogenetic diversity, the 16S rRNA gene was partially sequenced from 303 isolates representative of dominant morphotypes retrieved on plates, and phylogenetic trees were constructed (Figs. 5 and 6). These sequences were affiliated with four bacterial phyla, which cluster in 83 operational taxonomic units (OTUs) at 97% sequence identity: *Firmicutes* (197 isolates, including 15 retrieved with a protocol for selection of sporulating bacteria; see Materials and methods), *Proteobacteria* (62 isolates), *Actinobacteria* (39 isolates) and *Bacteroidetes* (5 isolates). Seventy OTUs were represented in the RN contaminated soils, whereas 37 OTUs were detected in the controls (including 24 OTUs in common). The statistical analysis of OTU distribution according to these four phyla revealed that only the “phylum” effect was significant (p -value < $1e-5$); neither the interaction “phylum \times condition”

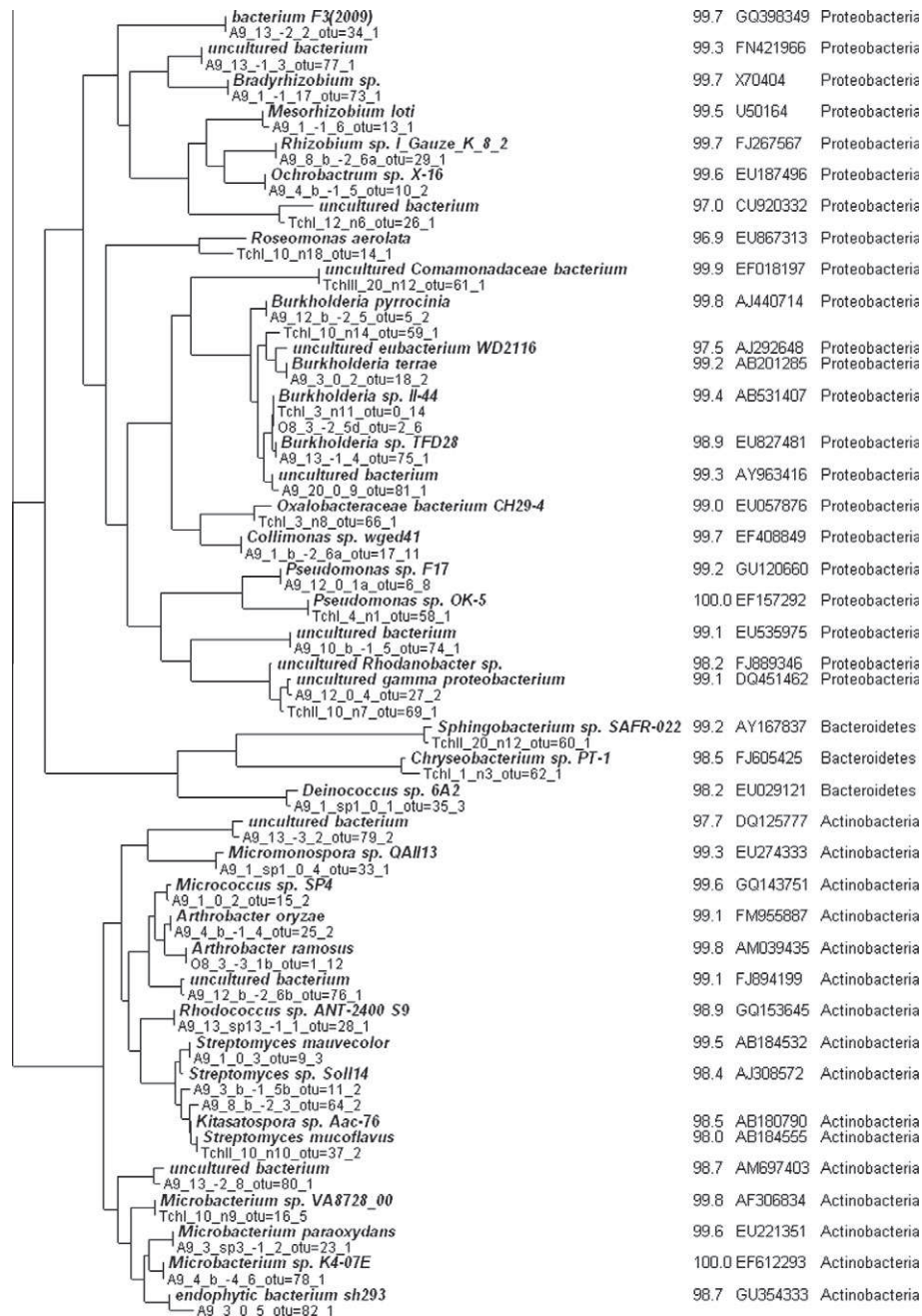


Fig. 5. Unrooted phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences from *Firmicutes*-related isolates. The tree includes one sequence per OTU and the most similar sequence retrieved from public databases.

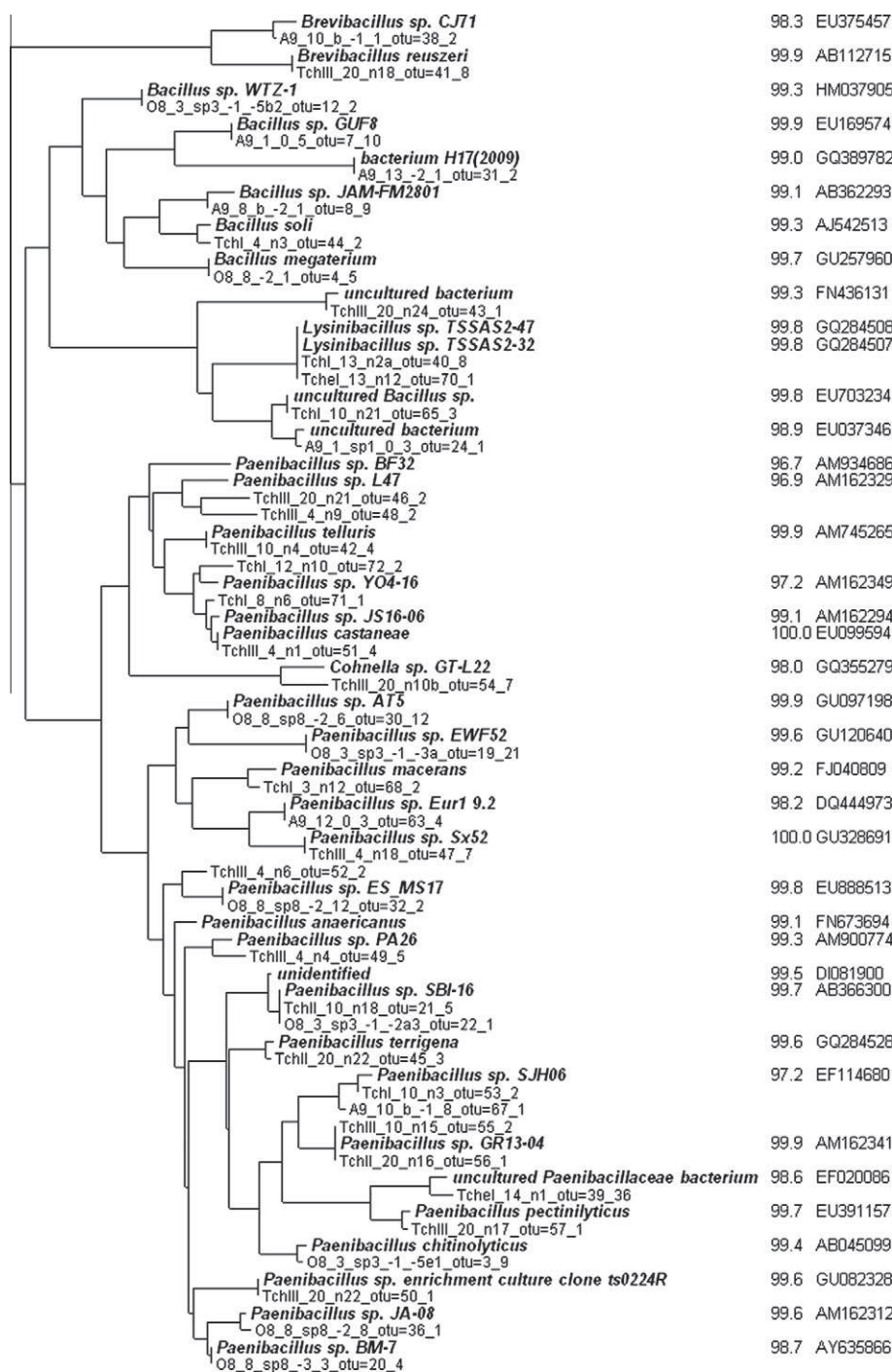


Fig. 6. Unrooted phylogenetic tree of 16S rRNA gene sequences from *Actinobacteria*-, *Bacteroidetes* and *Proteobacteria*-related isolates. The tree includes one sequence per OTU and the most similar sequence retrieved from public databases.

(p -value = 0.89) nor the “condition” effect (p -value = 0.12) were significant (Fig. 7). Thus, the number of OTU according to the four phyla differed globally, although they did not correlate with the contamination level of the soil samples. By using two different culture media, the isolation of diverse bacteria was enhanced: 35 OTUs were recovered from TSB agar plates, 26 OTUs were retrieved from AEM1 plates, and 22 OTUs were recovered from both. *Firmicutes* is the dominant group, representing 65% of the culturable population, and clustered in 41 OTUs with isolates related to the genera *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Cohnella*, *Lysinibacillus*, *Paenibacillus*, *Sporosarcina* and *Staphylococcus* (Fig. 5). The presence of *Bacillus*

as an important population in Chernobyl soils has previously been described (Romanovskaya et al., 1998; Zaviļgesky et al., 1998). The distribution of the different OTUs related to *Firmicutes* in soil samples from Chernobyl was heterogeneous, and did not correlate with contamination (Fig. S3). Members of *Paenibacillus*, *Bacillus*, *Brevibacillus*, and *Lysinibacillus* are common inhabitants of soil, in which their key role in the degradation of organic matter is linked to the production of extracellular hydrolytic enzymes such as cellulases and xylanases. They are also able to form spores, a cellular structure that provides considerable protection from drastic environmental conditions. In Chernobyl, this population of

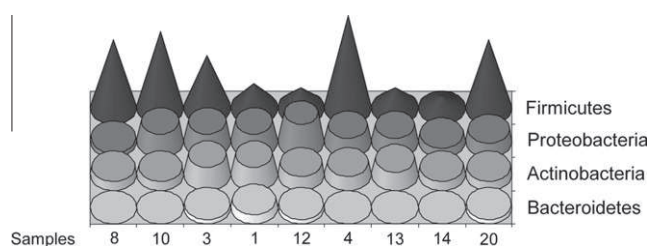


Fig. 7. Repartition of the OTUs (97% cut-off value) in the different phyla retrieved from high- and low-contaminated soil samples of Chernobyl. Soil samples are ordered from left to right according to decreasing ^{137}Cs content.

spore-forming bacteria was largely dominated by *Paenibacillus* (144 isolates), which were retrieved from every soil sample. Previously, a high frequency of *Paenibacillus* has been reported in various contaminated environments such as heavy metal- and RN-waste areas (Petrie et al., 2003; Gao et al., 2010). Furthermore, *Paenibacillus jamilae* and *Paenibacillus polymyxa* have been shown to produce either Pb- or Cd-binding exopolysaccharides, respectively (Morillo et al., 2006; Mokaddem et al., 2009). Other *Firmicutes* which have been isolated from a U mine site and RN-contaminated soil were shown to chelate RN (Selenska-Pobell et al., 1999), or bioprecipitate U (Martinez et al., 2007). Thus, *Firmicutes* isolated from Chernobyl likely possess similar features to handle the challenges of high RN concentration in the soils, and so may represent an interesting source of new metal-binding molecules.

Proteobacteria was the second most represented phylum, with 20% of the isolates clustered into 23 OTUs, which were affiliated to the alpha (9 isolates), beta (40 isolates) and gamma (13 isolates) subdivisions. As observed for *Firmicutes*, there was no correlation between the abundance of the different genera of *Proteobacteria* and the level of soil contamination (Fig. S4). Sequences belonging to OTUs 5, 6, 18, 29, 58 and 66 exhibited high identity (97–100%) to sequences retrieved from various heavy-metal contaminated environments, or corresponding to metal-resistant bacteria (see Table S2). The *Betaproteobacteria* group was largely dominated by *Burkholderia*-related isolates (27) while the representation of *Gammaproteobacteria* was dominated by *Pseudomonas* (9 isolates). These two genera constitute ubiquitous groups of bacteria which are able to colonize a wide range of habitats, and can exhibit extreme nutritional versatility. In particular, *Pseudomonas* and *Burkholderia* are common in metal-contaminated environments (Akob et al., 2008; Fredrickson et al., 2004; Lazzaro et al., 2008; Palmroth et al., 2007; Radeva and Selenska-Pobell, 2005; Zhang and Min, 2010), and heavy metal/RN resistant/accumulating species have also been described (Jones et al., 1997; Jiang et al., 2003; Ruggiero et al., 2005; Li et al., 2007; Choi et al., 2009; Kazy et al., 2009; Choudhary and Sar, 2011). Here, nine *Alphaproteobacteria*-related species were isolated, which belong to six genera including *Methylobacterium* and *Rhodobacter*. *Methylobacterium* species were previously detected in Chernobyl soils, and exhibited a γ -radiation resistant phenotype (Romanovskaya et al., 1998).

Actinobacteria were represented by 39 isolates clustered in 16 OTUs and affiliated to the genera *Arthrobacter*, *Kitasatospora*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Micromonospora*, *Rhodococcus*, and *Streptomyces*. OTU sequences 15, 23, 25, 28, 33, 78 and 79 exhibited high similarity with sequences originating from heavy-metal contaminated environments, or from metal or oxidative-stress resistant species (Table S2). *Actinobacteria* (formerly called high-GC Gram-positive bacteria) are common soil inhabitants and have been detected as a major group in radioactive waste contaminated sediments (Fredrickson et al., 2004). Actinobacterial species related to the genera *Arthrobacter*, *Streptomyces* and *Microbacterium* are

heavy-metal tolerant (Martinez et al., 2006; Nedelkova et al., 2007; Schmidt et al., 2007) or radioresistant (Mao et al., 2007).

Finally, three OTUs related to *Bacteroidetes* were detected. They were affiliated to *Sphingobacterium*, *Chryseobacterium* and *Hymenobacter*. Interestingly, the closest Genbank relative of the *Hymenobacter*-related isolates was retrieved by Fredrickson et al. (2008) from irradiated soils (accession number: EU029121 mistakenly annotated as a *Deinococcus* strain in the Genbank database).

4. Conclusions

Based on the analysis of bacterial diversity using both molecular- and culture-based approaches, the results demonstrate that RN contaminated soils from the Chernobyl T22 trench host a wide diversity of bacteria which is dominated by *Firmicutes*, and similar to that observed in nearby control soils bearing a much lower RN content. These data illustrate that 25 years exposure to RN did not lead to extinction of bacterial diversity. No dominant community fingerprint related to RN content was found, suggesting that a diverse set of microorganisms is potentially responding to the contamination. This does not preclude potential effects of RN on bacteria. Additional factors, such as organic C content linked to the presence of vegetable debris buried in the trench, could have an important impact on community structure. Moreover, it is possible that phenotypic adaptations not observed in the diversity studies could have occurred in response to RN contamination. In line with this hypothesis, the large collection of culturable isolates from Chernobyl that were constructed may be a promising source of RN-accumulating species and RN-chelating molecules. Analysis of bacteria–RN interactions using this collection should provide a better understanding of mechanisms controlling RN migration in the trench.

Acknowledgments

This work is financially supported by the CNRS and IRSN through the GNR TRASSE (Research Action Number 2008-1C) and corresponds to the GNR TRASSE Contribution Number 2011-08. The authors thank all members of the IRSN, UIAR and IGS, especially Pierre Dick, Vannapha Phrommavanh, Caroline Simonucci, Denise Stammose, Nathalie Van Meir, Valentin Protsak and Vasily Yoschenko for their precious help during the sampling campaigns in Chernobyl. They also thank Claire Della Vedova (Biostatistician, Magelis Group) for her help in statistical analysis, Sandrine Frelon for uranium measurements and Brandon Loveall for English proof-reading of the manuscript. The PhD Grant of Nicolas Theodorakopoulos is co-funded by IRSN and the Provence-Alpes-Côte d'Azur regional council.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.apgeochem.2011.08.011.

References

- Akob, D.M., Mills, H.J., Gihring, T.M., Kerkhof, L., Stucki, J.W., Anastácio, A.S., Chin, K.J., Küsel, K., Palumbo, A.V., Watson, D.B., Kostka, J.E., 2008. Functional diversity and electron donor dependence of microbial populations capable of U(VI) reduction in radionuclide-contaminated subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 3159–3170.
- Bates, D., Maechler, M., 2009. lme4: Linear Mixed-effects Models Using Eigen and SVD. R Package Version 0.999375-32.
- Bugai, D., Kashparov, V., Dewiere, L., Khomutinin, Yu., Levchuk, S., Yoschenko, V., 2005. Characterization of subsurface geometry and radioactivity distribution in the trench containing Chernobyl clean-up wastes. *Environ. Geol.* 47, 869–881.
- Choi, J., Lee, J.Y., Yang, J.S., 2009. Biosorption of heavy metals and uranium by starfish and *Pseudomonas putida*. *J. Hazard. Mater.* 161, 157–162.

- Choudhary, S., Sar, P., 2011. Uranium biomineralization by a metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from contaminated mine waste. *J. Hazard. Mater.* 186, 336–343.
- Coppin, F., Chabroulet, C., Martin-Garin, A., Balesdent, J., Gaudet, J.P., 2006. Methodological approach to assess the effect of soil ageing on selenium behaviour: first results concerning mobility and solid fractionation of selenium. *Biol. Fert. Soils* 42, 379–386.
- Dighton, J., Tugay, T., Zhdanova, N., 2008. Fungi and ionizing radiation from radionuclides. *FEMS Microbiol. Lett.* 281, 109–120.
- Edgar, R.C., 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucl. Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Fredrickson, J.K., Li, S.M., Gaidamakova, E.K., Matrosova, V.Y., Zhai, M., Sulloway, H.M., Scholten, J.C., Brown, M.G., Balkwill, D.L., Daly, M.J., 2008. Protein oxidation: key to bacterial desiccation resistance? *ISME J.* 2, 393–403.
- Fredrickson, J.K., Zachara, J.M., Balkwill, D.L., Kennedy, D., Li, S.W., Kostandarites, H.M., Daly, M.J., Romine, M.F., Brockman, F.J., 2004. Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford Site, Washington State. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4230–4241.
- Gao, W.M., Gentry, T.J., Mehlhorn, T.L., Carroll, S.L., Jardine, P.M., Zhou, J.Z., 2010. Characterization of Co(III)EDTA-reducing bacteria in metal- and radionuclide-contaminated groundwater. *Geomicrobiol. J.* 27, 93–100.
- Gascuel, O., 1997. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol. Biol. Evol.* 14, 685–695.
- Gouy, M., Guindon, S., Gascuel, O., 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27, 221–224.
- Jiang, C.Y., Sheng, X.F., Qian, M., Wang, Q.Y., 2003. Isolation and characterization of a heavy metal-resistant *Burkholderia* sp. from heavy metal-contaminated paddy field soil and its potential in promoting plant growth and heavy metal accumulation in metal-polluted soil. *Chemosphere* 72, 157–164.
- Jones, A.L., DeShazer, D., Woods, D.E., 1997. Identification and characterization of a two-component regulatory system involved in invasion of eukaryotic cells and heavy-metal resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Infect. Immun.* 65, 4972–4977.
- Kazy, S.K., D'Souza, S.F., Sar, P., 2009. Uranium and thorium sequestration by a *Pseudomonas* sp.: mechanism and chemical characterization. *J. Hazard. Mater.* 163, 65–72.
- Kovalchuk, O., Dubrova, Y.E., Arkhipov, A., Hohn, B., Kovalchuk, I., 2000. Wheat mutation rate after Chernobyl. *Nature* 407, 583–584.
- Lazzaro, A., Widmer, F., Sperisen, C., Frey, B., 2008. Identification of dominant bacterial phylotypes in a cadmium-treated forest soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63, 143–155.
- Li, W.C., Ye, Z.H., Wong, M.H., 2007. Effects of bacteria on enhanced metal uptake of the Cd/Zn-hyperaccumulating plant, *Sedum alfredii*. *J. Exp. Bot.* 58, 4173–4182.
- Mao, J., Tang, Q., Zhang, Z., Wang, W., Wei, D., Huang, Y., Liu, Z., Shi, Y., Goodfellow, M., 2007. *Streptomyces Radiopugnans* sp. nov., a radiation-resistant actinomycete isolated from radiation-polluted soil in China. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2578–2582.
- Martinez, R.J., Beazley, M.J., Taillefert, M., Arakaki, A.K., Skolnick, J., Sobecky, P.A., 2007. Aerobic uranium (VI) bioprecipitation by metal-resistant bacteria isolated from radionuclide- and metal-contaminated subsurface soils. *Environ. Microbiol.* 9, 3122–3133.
- Martinez, W., Wang, Y., Raimondo, M.A., Coombs, J.M., Barkay, T., Sobecky, P.A., 2006. Horizontal gene transfer of PIB-type ATPases among bacteria isolated from radionuclide- and metal-contaminated subsurface soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3111–3118.
- Mokaddem, H., Sadaoui, Z., Boukhelata, N., Azouaou, N., Kaci, Y., 2009. Removal of Cadmium from aqueous solution by polysaccharide produced from *Paenibacillus polymyxa*. *J. Hazard. Mater.* 172, 1150–1155.
- Møller, A.P., Mousseau, T.A., 2006. Biological consequences of Chernobyl: 20 years on. *Trends Ecol. Evol.* 21, 200–207.
- Morillo, J.A., Aguilera, M., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sánchez, M., 2006. Production of a metal-binding exopolysaccharide by *Paenibacillus jamilae* using two-phase olive-mill waste as fermentation substrate. *Curr. Microbiol.* 53, 189–193.
- Nedelkova, M., Merroun, M.L., Rossberg, A., Hennig, C., Selenska-Pobell, S., 2007. Microbacterium isolates from the vicinity of a radioactive waste depository and their interactions with uranium. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59, 694–705.
- Palmroth, M.R.T., Koskinen, P.E.P., Kaksanen, A.H., Münster, U., Pichtel, J., Puhakka, J.A., 2007. Metabolic and phylogenetic analysis of microbial communities during phytoremediation of soil contaminated with weathered hydrocarbons and heavy metals. *Biodegradation* 18, 769–782.
- Petrie, L., North, N.N., Dollhopf, S.L., Balkwill, D.L., Kostka, J.E., 2003. Enumeration and characterization of iron(III)-reducing microbial communities from acidic subsurface sediments contaminated with uranium(VI). *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 7467–7479.
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., R Core Team, 2009. nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R Package Version 3.1-96.
- R Development Core Team, 2009. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. <<http://www.R-project.org>>.
- Radeva, G., Selenska-Pobell, S., 2005. Bacterial diversity in water samples from uranium wastes as demonstrated by 16S rDNA and ribosomal intergenic spacer amplification retrievals. *Can. J. Microbiol.* 51, 910–923.
- Romanovskaya, V.A., Rokitko, P.V., Mikheev, A.N., Gushcha, N.I., Malashenko, Y.R., Chernaya, N.A., 2002. The effect of γ -radiation and desiccation on the viability of the soil bacteria isolated from the alienated zone around the Chernobyl Nuclear Power Plant. *Microbiology* 71, 608–613.
- Romanovskaya, V.A., Sokolov, I.G., Rokitko, P.V., Chernaya, N.A., 1998. Effect of radioactive contamination on soil bacteria in the 10-km zone around the Chernobyl Nuclear Power Plant. *Microbiology* 67, 226–231.
- Ruggiero, C.E., Boukhalfa, H., Forsythe, J.H., Lack, J.G., Hersman, L.E., Neu, M.P., 2005. Actinide and metal toxicity to prospective bioremediation bacteria. *Environ. Microbiol.* 7, 88–97.
- Schmidt, A., Schmidt, A., Haferburg, G., Kothe, E., 2007. Superoxide dismutases of heavy metal resistant streptomycetes. *J. Basic Microbiol.* 47, 56–62.
- Selenska-Pobell, S., Panak, P., Miteva, V., Boudakov, I., Bernhard, G., Nitsche, H., 1999. Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains, *B. cereus*, *B. megaterium* and *B. sphaericus* from drain waters of a uranium waste pile. *FEMS Microbiol. Ecol.* 29, 59–67.
- Yablokov, A.V., 2009. Chernobyl's Radioactive Impact on Microbial Biota. New York Academy of Sciences, New York, NY.
- Yablokov, A.V., Nesterenko, V.B., Nesterenko, A.V., 2009. Chernobyl: Consequences of the Catastrophe for People and Nature. New York Academy of Sciences, New York, NY.
- Zavilgesky, G.B., Abilev, S.K., Sukhodolets, V.V., Ahmad, S.I., 1998. Isolation and analysis of UV and radio-resistant bacteria from Chernobyl. *J. Photochem. Photobiol. B – Biol.* 43, 152–157.
- Zhang, J.H., Min, H., 2010. Characterization of a multimetal resistant *Burkholderia fungorum* isolated from an e-waste recycling area for its potential in Cd sequestration. *World J. Microbiol. Technol.* 26, 371–374.

Table S1. Primers used for the taxonomic group-specific PCR amplification and for the PCR-DGGE nested approach. AT: annealing temperature. Nucleotide sequences of the primers used for the semi-nested PCR amplification and the GC clamp are: 518f, CCAGCAGCCGCGGTAAT (Muyzer *et al.*, 1993); GC clamp (*), CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGG (Muyzer *et al.*, 1993).

Primers used for group-specific PCR			Primer used for the semi-nested PCR amplification		Linear gradient of denaturant agent	Target group	References
Primers	Primer Sequence (5'-3')	AT (°C)	Primers	AT (°C)			
P1 Com2	CCTACGGGAGGCAGCAG CCGTCAATTCCTTTGAGTTTT	55°C	P1* Com2	55°C	40 - 70	Bacteria	Muyzer <i>et al.</i> , (1993) Schwieger <i>et al.</i> , (1998)
Alf28f Alf684r	ARCGAACGCTGGCGGCA TACGAATTTYACCTCTACA	56°C	P1* Alf684r	56°C	30 - 60	Alphaproteobacteria	Mühling <i>et al.</i> , (2008)
Beta359f Beta682r	GGGGAATTTGGACAATGGG ACGCATTTCACTGCTACACG	60°C	518f* Beta682r	60°C	40 - 60	Betaproteobacteria	Mühling <i>et al.</i> , (2008)
Gamma395f Gamma871r	CMATGCCGCGTGTGTGAA ACTCCCCAGGCGGTCDACTTA	56°C	518f* Gamma871r	56°C	30 - 60	Gammaproteobacteria	Mühling <i>et al.</i> , (2008)
Firm814r Firm350f	ACACYTAGYACTCATCGTTT GGCAGCAGTRGGGAATCTTC	57°C	518f* Firm814r	56°C	40 - 60	Firmicutes	Mühling <i>et al.</i> , (2008)
Act-235-a-S-20 Act-878-a-A-19	CGCGGCCTATCAGCTTGTTG CCGTACTCCCCAGGCGGGG	72°C	518f* Act-878-a-A-19	60°C	45 - 65	Actinobacteria	Stach <i>et al.</i> , (2003)

Mühling M, Woolven-Allen J, Murrell JC, Joint I. 2008. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME Journal*. 2: 379-392

Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 695-700

Schwieger F, Tebbe CC. 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 4870-4876

Stach JE, Maldonado LA, Ward AC, Goodfellow M, Bull AT. 2003. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environmental Microbiology*. 5: 828-841

PCR and DGGE experiments:

With the exception of the group “Bacteria”, the PCR-DGGE bacterial community analysis was performed by a nested approach. Environmental DNA extracted from soil samples was used as a template for a group-specific PCR amplification of 16S rRNA genes. The fragments were then re-amplified for *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria* and *Firmicutes* using GC-clamp specific primers to generate DGGE compatible fragments (Table S1). The PCR amplification reaction mixture (50 µl final) contained 1× PCR buffer, 2 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each dNTP, 0.5 µM of each primer, 20 ng of template DNA and 1.25 U of GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega). For PCR amplification, an initial denaturation step (94°C for 5 min) was followed with 30 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s and 72°C for a time depending on the primer set used (1 min per kb), with a final extension step at 72°C for 5 min. For DGGE analysis, PCR products generated from each sample were applied to 10% (w/v) polyacrylamide-bisacrylamide (37.5:1) gels prepared in 1x TAE buffer with different linear denaturant gradient (100% denaturant equals 40% (v/v) formamide and 7M urea) depending on the fragments to be separated. Gels were run in 1x TAE at 120 V and 60°C for 18 h using the DCode Universal Mutation System (Bio-Rad Laboratories, France). DGGE gels were then stained with Sybr Green (Sigma, Aldrich) for 30 min or with silver nitrate. High resolution gels images were captured with the U:Genius System (SYNGENE, England). Analysis of DGGE profiles by the software Genetools (SYNGENE, England) was used to produce densitometric curves and subsequently similarity indices. Dendrograms were created by the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) with 1% tolerance.

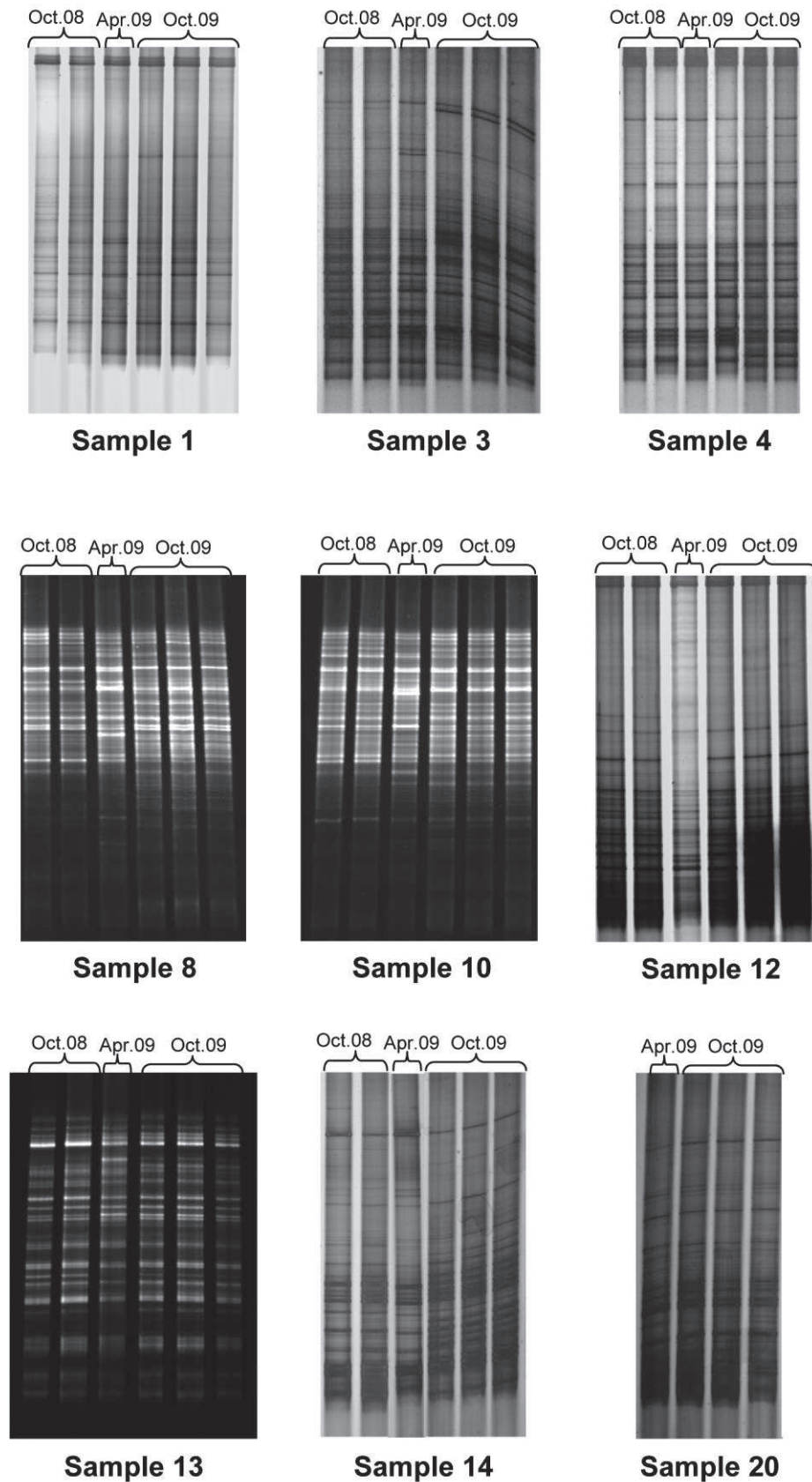


Figure S1. DGGE profiles of bacterial communities inhabiting Chernobyl soil samples collected in October 2008, April 2009, and October 2009. Universal primers P1-GC and Com2, targeting bacterial 16S rRNA gene, were used.

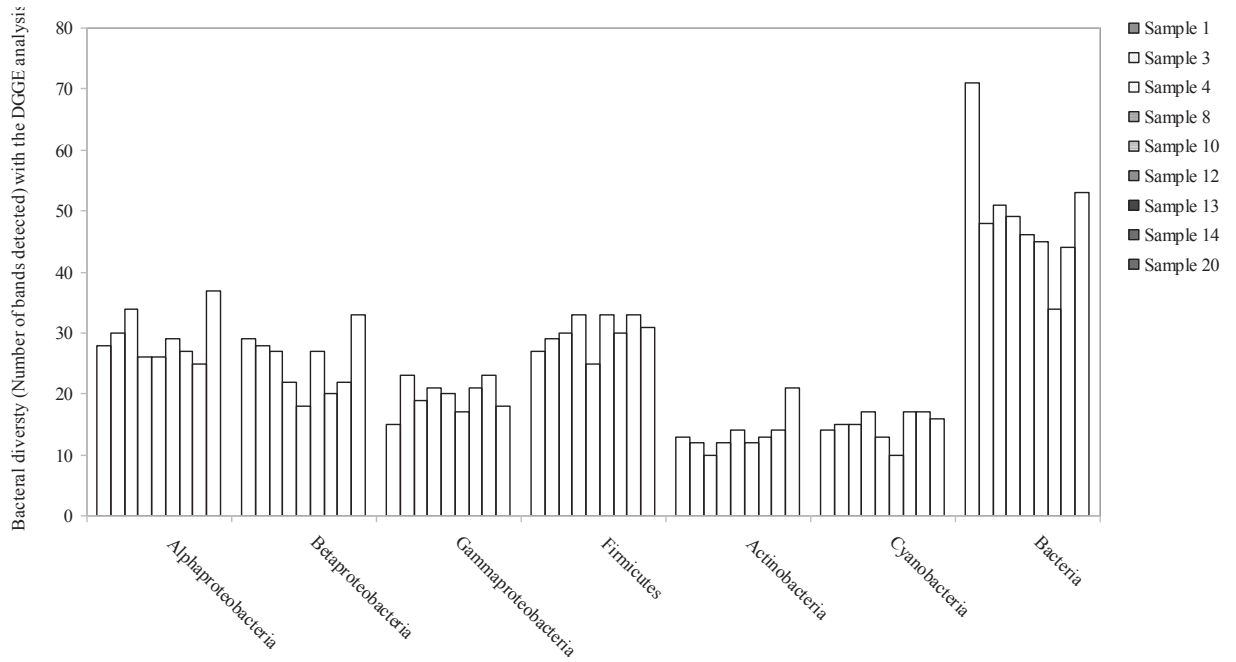


Figure S2. Apparent diversity (number of discernible bands) observed in the DGGE profiles for the different taxonomic groups studied. Radioactive samples 1-12 and non-radioactive samples 13-20 are compared.

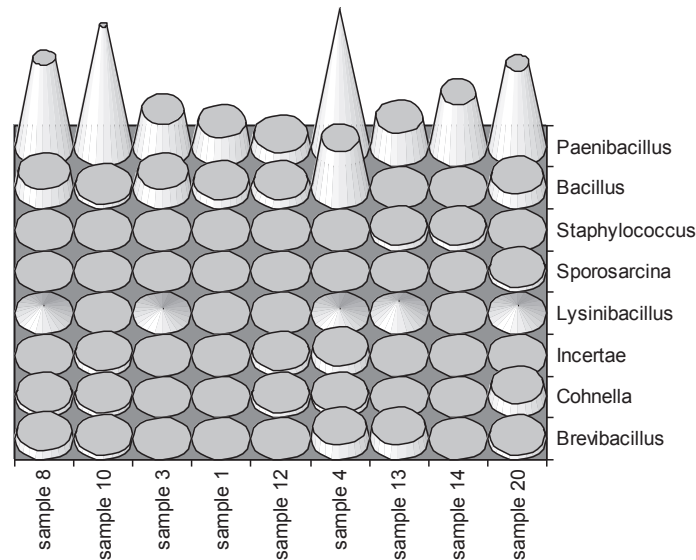


Figure S3. Repartition of the *Firmicutes* in the different genera retrieved from high- and low-contaminated soil samples of Chernobyl. Soil samples are ordered from the left to the right according to decreasing ^{137}Cs content.

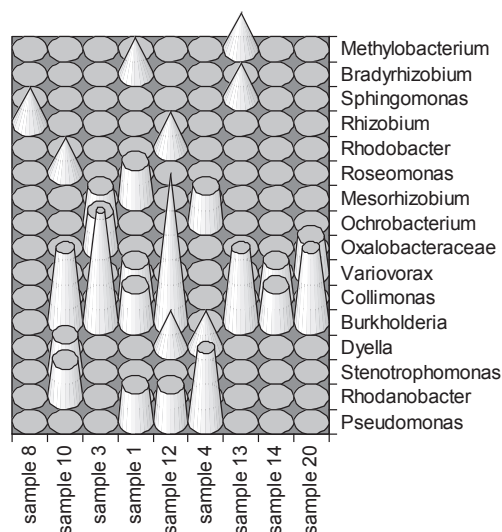


Figure S4. Repartition of the *Proteobacteria* in the different genera retrieved from high- and low-contaminated soil samples of Chernobyl. Soil samples are ordered from the left to the right according to decreasing ^{137}Cs content.

Table S2. Culturable isolates from Chernobyl exhibiting relationships with bacteria from heavy-metal contaminated environments or metal resistant strains.

OTU number	Taxonomy	Accession number (Genbank relative)	% identity	Origin or phenotype
OTU 5	Proteobacteria <i>Burkholderia</i>	GQ 468397	99	metal tolerant bacteria from uranium rich sites
OTU 6	<i>Pseudomonas</i>	AY 524557	99	uranium contaminated sediment
OTU 18	<i>Burkholderia</i>	FJ 624875	97	acidic uranium contaminated aquifer
OTU 29	<i>Rhizobium</i>	FM 866278	99	lead contaminated forest soil
OTU 58	<i>Pseudomonas</i>	GU 471205	99	uranium mining wastes
OTU 66	<i>Oxalobacteraceae</i>	AY 622269	99	lead-zinc resistant endophytic bacteria from a mine
OTU 15	Actinobacteria <i>Micrococcus</i>	CP 001628	99	acidic uranium contaminated aquifer
OTU 23	<i>Microbacterium</i>	HQ 331136	99	metal sequestering strain
OTU 25	<i>Arthrobacter</i>	AY 452081	99	metal resistant endophytic bacteria
OTU 28	<i>Rhodococcus</i>	EF 612316	98.9	lead-zinc mine tailings
OTU 33	<i>Micromonospora</i>	DQ 125928	99	lead-zinc mine tailings
OTU 78	<i>Microbacterium</i>	EF 612293	99	semi-arid lead zinc mine tailing site
OTU 79	<i>Nocardioideaceae</i>	DQ 125777	97.7	uranium contaminated sediment
OTU 35	Bacteroidetes <i>Hymenobacter</i>	EU 029121	98.2	uranium contaminated sediment
				radionuclide contaminated soil

4. Résultats et Discussion

Les différents paramètres physico-chimiques mesurés au cours de cette étude démontrent que la tranchée T22 se caractérise par une forte contamination en radionucléides et ce, à la fois par les valeurs de ^{137}Cs , de ^{238}U ou du ratio $^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$ qui révèle l'origine non naturelle de l'uranium présent dans la tranchée. La contamination apparaît néanmoins hétérogène. En effet, les six échantillons prélevés dans la tranchée (1, 3, 4, 8, 10 et 12) sont caractérisés par des activités en ^{137}Cs comprises entre 61 et 750 Bq/g. Par comparaison, les trois échantillons prélevés en dehors de la tranchée présentent, quant à eux, une activité en ^{137}Cs beaucoup plus faible (avec des valeurs allant de 0,35 à 1,5 Bq/g). La teneur en ^{137}Cs a également révélé une certaine variabilité lors des différentes campagnes de prélèvement, probablement en raison de l'hétérogénéité de la contamination dans la tranchée. Le même constat a pu être établi pour les concentrations en ^{238}U qui varient entre 11 et 81 $\mu\text{g/g}$ de sol. Les échantillons de la tranchée se caractérisent donc par un niveau de ^{238}U élevé, mais aussi par des ratios $^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$ (avec des valeurs allant de 0,98 à 1,17%) élevés. Ces derniers attestent de la présence de particules de combustibles issues de l'explosion de la centrale dans la tranchée T22.

En outre, cette caractérisation a aussi permis de mettre en évidence des différences quant aux valeurs d'autres paramètres pouvant influencer la diversité bactérienne, comme le pH, l'humidité ou la teneur en carbone organique. En effet, les valeurs de pH varient de 4,4 à 6,1 et la teneur en eau du sol de 2,2 à 7,3%. La teneur en carbone organique (mesurée seulement en 2009) était dans la même gamme pour tous les échantillons (moyenne = 2,25 mg/g), sauf pour les échantillons 4, 13 et 14 qui avaient une teneur comprise entre 0,1 et 0,88 mg/g. Comme nous avons pu le voir dans l'étude bibliographique, ces différents paramètres sont susceptibles d'influencer la diversité bactérienne.

L'hétérogénéité constatée au niveau de la tranchée T22 provient de son contenu qui se compose de litière de sol, de végétaux en décomposition et de particules de combustible répartis de manière non uniforme dans celle-ci. Malgré ce constat, les résultats montrent que les échantillons prélevés en dehors de la tranchée constituent des échantillons de sol contrôles appropriés puisque leur teneur en radionucléides y est beaucoup plus faible et que le ratio $^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$ y est proche de celui de l'U naturel.

L'analyse des isolats cultivables au niveau du site de Tchernobyl démontre que les sols de la tranchée T22 se caractérisent par une diversité bactérienne importante et ce, malgré un niveau

de contamination en ^{137}Cs élevé (max : 750 Bq/g). En effet, près de 303 isolats bactériens présentant des morphotypes variés ont été identifiés par séquençage de l'ADNr 16S au cours des différentes campagnes de prélèvements. Ils se répartissent en 83 UOTs affiliées aux *Firmicutes*, aux *Actinobacteria*, aux *Gamma-* et *Beta-Proteobacteria* ainsi qu'aux *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* (CFB).

Certaines espèces bactériennes identifiées au niveau de la tranchée T22 ont déjà pu être identifiées dans d'autres environnements contaminés par des radionucléides ou des métaux lourds (cf. contribution scientifique). En revanche, en comparant l'abondance bactérienne au sein des phylums bactériens identifiés il apparaît difficile de dégager un effet clair de la radioactivité sur la répartition des taxons. En effet, aucune corrélation n'a pu être établie entre le niveau de radioactivité et le nombre ou la répartition taxonomique des bactéries cultivables isolées.

La diversité bactérienne au niveau de la tranchée T22 a aussi pu être estimée par l'approche moléculaire. En effet, les résultats de DGGE ont montré une diversité apparente élevée dans tous les échantillons analysés et ce, en utilisant un couple d'amorces généralistes (30 bandes en moyenne par piste) ou des amorces spécifiques aux *Actinobacteria*, *Alpha*, *Beta*, *Gamma-Proteobacteria* et *Firmicutes* (respectivement 28, 25, 20 et 30 bandes en moyenne). Seuls les profils DGGE spécifiques aux *Actinobacteria* sont moins diversifiés avec une moyenne de 13 bandes.

L'analyse des dendrogrammes montre l'absence d'une structure communautaire spécifique dans les échantillons riches en radionucléides. En effet, le dendrogramme construit à partir des différents profils DGGE obtenus par utilisation des amorces généralistes révèle deux grands groupes qui partagent un faible niveau de similarité. Le premier groupe est constitué des échantillons hautement contaminés 1, 3, 4, 8, 10 qui partagent 35% de similarité. L'autre groupe comprend les sols contrôles 13, 14, 20 ainsi que l'échantillon contaminé 12 et ceux-ci partagent seulement 30% de similarité. L'analyse des dendrogrammes réalisées à partir des profils obtenus par l'utilisation des amorces groupe spécifique présentent également de faibles pourcentages de similarité et l'absence d'une structure liée à la contamination.

Ces observations montrent donc que les profils DGGE des échantillons de sols présentent diverses topologies qui ne révèlent pas de relations évidentes entre la structure des communautés et la provenance des échantillons (tranchée / hors tranchée).

Cette étude aura permis au moyen de deux techniques complémentaires de faire un état des lieux de la diversité des bactéries cultivables dans les échantillons de sols de Tchernobyl et de constituer une collection de bactéries cultivables. Cette étude nous aura aussi permis d'acquérir une collection de souches, qui comme nous avons pu le voir au cours de l'étude bibliographique, peut recéler la présence d'espèces intéressantes pour leur capacité de résistance à l'irradiation (cf. Chapitre III) ou pour étudier les interactions bactéries - radionucléides (cf. Chapitres V et VI). Néanmoins, la DGGE et l'analyse culturale présentent des limites qui ne permettent pas d'avoir une vision tout à fait exhaustive de la diversité bactérienne. Une perspective à cette première étude était de réaliser une analyse complémentaire, plus exhaustive, par pyroséquençage (cf. Chapitre IV).

En outre, cette première étude a révélé la difficulté à mettre en évidence un effet de la contamination sur la diversité bactérienne des sols de Tchernobyl, que ce soit en analysant les bactéries cultivables ou par l'approche moléculaire.

CHAPITRE III : Recherche de bactéries affiliées au phylum des *Deinococcus-Thermus* dans les sols de la tranchée T22

1. Contexte général

Dans les sols de Tchernobyl, plus particulièrement au niveau de la tranchée T22, la recherche de bactéries affiliées au phylum des *Deinococcus-Thermus* s'est imposée comme une évidence au cours de cette étude. Bien entendu, des représentants de ce phylum sont détectables dans des environnements naturels ubiquistes comme les sols forestiers ou les sédiments mais ce phylum est surtout connu en microbiologie environnementale pour recéler des bactéries capables de survivre à des conditions extrêmes d'irradiation ou de température. La capacité des bactéries à résister à l'irradiation est liée à leur capacité à résister à la dessiccation et les *Deinococcus* sont fréquemment détectés dans les environnements arides comme les déserts (Callegan *et al.*, 2008, Chanal *et al.*, 2006, de Groot *et al.*, 2005, Hirsch *et al.*, 2004, Rainey *et al.*, 2007, Rainey *et al.*, 2005, Yuan *et al.*, 2009). Historiquement, la bactérie *Deinococcus radiodurans* R1 fut découverte en 1956 dans l'Oregon comme contaminant de viande « stérilisée » par exposition au rayonnement γ (Anderson *et al.*, 1956). La bactérie est capable de survivre après une irradiation de 15 kGy. Cette bactérie fut nommée *Micrococcus radiotolerans* à cause de sa morphologie similaire à celle des membres du genre *Micrococcus*. Les études ultérieures ont montré que cette espèce appartenait à un nouveau genre qui a été nommé *Deinococcus* (Brooks et Murray 1981). La résistance de la bactérie *D. radiodurans* aux agents qui endommagent l'ADN est essentiellement due à une réparation particulièrement performante des cassures doubles brins de l'ADN (Minton 1996). Certaines des bactéries de ce phylum ont pu être isolées à partir d'environnements radioactifs (Asker *et al.*, 2008, Asker *et al.*, 2009, Asker *et al.*, 2011, Fredrickson *et al.*, 2004).

Au cours de la première partie de l'étude, l'approche culturale a permis de mettre en évidence la présence de 4 phylums bactériens dans les sols de Tchernobyl mais n'a pas révélé la présence de bactéries affiliés aux *Deinococcus-Thermus*. Cependant, la limite induite par l'approche culturale peut ne pas avoir permis de révéler leur présence. Une alternative qui permet d'améliorer la sélection d'espèces appartenant à ce phylum est l'irradiation aigüe de l'échantillon. Cette approche permet d'éradiquer les espèces radiosensibles et de sélectionner les espèces radiorésistantes, améliorant ainsi la possibilité de les détecter par l'approche culturale. D'ailleurs, de nombreux isolats de ce phylum ont été obtenus après sélection par

exposition à de fortes doses d'irradiation d'échantillons de terre, de sable, de produits alimentaires, d'instruments médicaux ou de textiles (Anderson *et al.*, 1956, de Groot *et al.*, 2005, Ferreira *et al.*, 1997, Hirsch *et al.*, 2004, Suresh *et al.*, 2004). Dans le cas des échantillons de sol de Tchernobyl, cette approche est compromise car il est impossible de transporter des échantillons de sol hors de la zone d'exclusion afin de les irradier à de fortes doses. Une alternative a donc été de rechercher la présence de ce phylum dans les échantillons d'ADN métagénomique préalablement extraits à partir des différents échantillons de sol au moyen d'une approche moléculaire (cf. Chapitre II). Pour ce faire, nous avons choisi de développer des amorces spécifiques à ce phylum. Des amorces ciblant spécifiquement les *Deinococcus* ont été décrites dans la littérature mais elles ne permettent pas d'amplifier les *Thermus* (Chaturvedi et Archana 2012). Au cours de ce travail des amorces permettant d'amplifier les bactéries de l'ensemble du phylum *Deinococcus-Thermus* sur des ADNs environnementaux ont été développées.

2. Objectif de l'étude et démarche expérimentale

L'objectif de cette étude était de savoir si l'impact d'une irradiation chronique liée à la présence des radionucléides dans les sols de Tchernobyl a induit la sélection d'espèces radiorésistantes appartenant au phylum des *Deinococcus-Thermus*. Nous avons ainsi développé une approche moléculaire simple et rapide basée sur la mise au point d'amorces spécifiques de ce phylum ciblant une région spécifique sur l'ADNr 16S, permettant ainsi leur amplification sélective au cours de l'étape de PCR. Tout d'abord, les amorces ont été définies par une approche *in silico*. Nous avons ensuite testé *in vitro* leur spécificité à la fois sur des échantillons d'ADN génomique de référence et d'ADN métagénomique dans lesquelles les *Deinococcus-Thermus* avaient déjà pu être identifiées au cours d'études précédentes. Ces échantillons d'ADN métagénomique provenaient de sources chaudes de Tunisie et du désert de Tataouine. Cette première partie de l'étude sera présentée dans l'article qui suit.

Dans un second temps, nous avons testé ces amorces sur les échantillons de sol de Tchernobyl à la recherche de *Deinococcus-Thermus*. Les tests ont été réalisés sur les deux échantillons de sols les plus contaminés, c'est-à-dire les échantillons de sol 8 et 10 (cf. Chapitre II). Les résultats seront présentés par la suite sous forme d'expérience complémentaire.

3. Contribution scientifique

Theodorakopoulos N., Bachar D., Christen R., Alain K., Chapon V. 2013. Exploration of *Deinococcus-Thermus* molecular diversity by novel group-specific PCR primers. *Microbiology Open* 2 (5), 862-8

ORIGINAL RESEARCH

Exploration of *Deinococcus-Thermus* molecular diversity by novel group-specific PCR primersNicolas Theodorakopoulos^{1,2,3,4}, Dipankar Bachar^{5,6}, Richard Christen^{5,6}, Karine Alain⁷ & Virginie Chapon^{1,2,3}¹CEA, DSV, IBEB, SBVME, LIPM, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France²CNRS, UMR 7265, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France³Université d'Aix-Marseille, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France⁴IRSN, PRP-ENV, SERIS, L2BT, F-13115 Saint Paul-lez-Durance, France⁵Université de Nice-Sophia Antipolis, UMR 7138, Systématique, Adaptation, Evolution, Parc Valrose, BP71, F-06108 Nice Cedex 02, France⁶CNRS, UMR 7138, Systématique, Adaptation, Evolution, Parc Valrose, BP71, F-06108 Nice Cedex 02, France⁷CNRS, IUEM – UMR 6197, Laboratoire de Microbiologie des Environnements Extrêmes (LMEE), Place Nicolas Copernic, F-29280 Plouzané, France**Keywords***Deinococcus-Thermus*, group-specific primers, molecular diversity.**Correspondence**

Virginie Chapon, CEA, DSV, IBEB, SBVME, LIPM, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France. Tel: +33 442 253 478; Fax: +33 442 252 625; E-mail: virginie.chapon@cea.fr

Funding Information

This work was financially supported by the CEA through the Toxicology Program. N. Theodorakopoulos is supported by a PhD grant co-funded by the IRSN and the Provence-Alpes-Côte d'Azur regional council.

Received: 21 March 2013; Revised: 4 July 2013; Accepted: 5 July 2013

MicrobiologyOpen 2013; 2(5): 862–872

doi: 10.1002/mbo3.119

Abstract

The deeply branching *Deinococcus-Thermus* lineage is recognized as one of the most extremophilic phylum of bacteria. In previous studies, the presence of *Deinococcus*-related bacteria in the hot arid Tunisian desert of Tataouine was demonstrated through combined molecular and culture-based approaches. Similarly, *Thermus*-related bacteria have been detected in Tunisian geothermal springs. The present work was conducted to explore the molecular diversity within the *Deinococcus-Thermus* phylum in these extreme environments. A set of specific primers was designed in silico on the basis of 16S rRNA gene sequences, validated for the specific detection of reference strains, and used for the polymerase chain reaction (PCR) amplification of metagenomic DNA retrieved from the Tataouine desert sand and Tunisian hot spring water samples. These analyses have revealed the presence of previously undescribed *Deinococcus-Thermus* bacterial sequences within these extreme environments. The primers designed in this study thus represent a powerful tool for the rapid detection of *Deinococcus-Thermus* in environmental samples and could also be applicable to clarify the biogeography of the *Deinococcus-Thermus* phylum.

Introduction

The phylum *Deinococcus-Thermus* is currently divided into the orders *Deinococcales* and *Thermales*. While the order *Thermales* encompasses five genera (*Thermus*, *Meiothermus*, *Marinithermus*, *Oceanithermus*, and *Vulcanithermus*), the order *Deinococcales* is composed of three genera (*Deinococcus*, *Deinobacterium*, and *Truepera*). *Deinococcus-Thermus* is recognized as one of the most extremophilic phylum of bacteria. Cultured representatives of *Thermus* are either thermophilic or

hyperthermophilic (Brock and Freeze 1969; Bjornsdottir et al. 2009; Zhang et al. 2010; Vajna et al. 2012), while *Deinococcus* strains exhibit resistance to extreme ionizing and ultraviolet radiations, desiccation, and other DNA damaging conditions (Rainey et al. 1997; Albuquerque et al. 2005; Cox and Battista 2005; Slade and Radman 2011). As these microorganisms or their cellular components are of biotechnological interest with potential applications in bioremediation or molecular biology (e.g., thermostable enzymes), much research has been focused on this particular group of prokaryotes. *Deino-*

coccales members have been isolated from a wide range of natural environments such as arid soils (Hirsch *et al.* 2004; de Groot *et al.* 2005; Rainey *et al.* 2005, 2007; Chanal *et al.* 2006; Callegan *et al.* 2008; Yuan *et al.* 2009), radioactive sites (Asker *et al.* 2011), nuclear waste contaminated sediments (Fredrickson *et al.* 2004), air (Yoo *et al.* 2010), water (Im *et al.* 2008; Kämpfer *et al.* 2008), and the human gut (Lagier *et al.* 2012); they have also been isolated from a paper mill (Ekman *et al.* 2011). *Thermales* members have been recovered from a large set of natural and artificial thermal environments (Oshima and Imahori 1974; da Costa *et al.* 2006; Vajna *et al.* 2012; Yu *et al.* 2012), highlighting the exceptional adaptive abilities of these bacteria. In addition, *Deinococcus-Thermus*-related sequences have been detected by molecular tools in a huge range of biotopes, where they generally represent minor taxa (Janssen 2006).

In previous molecular diversity inventories, we have demonstrated the presence of *Deinococcus* taxa in the desert sands of Tataouine, Tunisia (Chanal *et al.* 2006), as well as the presence of *Thermus* taxa in Tunisian geothermal springs (Sayeh *et al.* 2010). However, the 16S rDNA clone libraries constructed from these studies are insufficient for a thorough exploration of *Deinococcus-Thermus* diversity. Indeed, sequences belonging to these taxa represent less than 2% of the overall community detected in Tataouine, and less than 10% of the overall revealed community in the Tunisian hot springs. An alternative approach to investigate the diversity of a taxonomic group in greater detail is to use group-specific primers specifically targeting a given taxon. This has been a successful strategy for the detection of diverse groups of Bacteria and Archaea at different taxonomic levels, including *Actinobacteria* (Stach *et al.* 2003); *Bacteroidetes*, *Planctomycetes*, *Firmicutes*, *Cyanobacteria*, α -, β -, and γ -*proteobacteria* (Mühling *et al.* 2008); *Korarchaeota* (Auchtung *et al.* 2011); *Acidobacteria* (Lee and Cho 2011; Gans *et al.* 2012); *Pseudomonas* (Widmer *et al.* 1998); and *Francisella* (Duodu *et al.* 2012). Furthermore, a specific primer for hemi-nested polymerase chain reaction (PCR) that targets the genus *Deinococcus* has recently been described (Chaturvedi and Archana 2012).

Here, we have developed specific PCR primers that target the 16S rRNA gene sequence of the entire *Deinococcus-Thermus* phylum. Following the initial *in silico* design step, primers specificity was tested with a collection of reference strains. Finally, we constructed 16S rDNA clone libraries to validate the use of these primers with environmental DNA. This approach has enabled us to detect novel representatives of *Deinococcus* and *Thermus* in desert sand samples from Tataouine, as well as in Tunisian geothermal spring water.

Material and Methods

Bacterial strains, culture conditions, and genomic DNA purification

The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. Biomass for the genomic DNA extraction was prepared by growing *Deinococcus* isolates in TGY medium (0.5% tryptone, 0.1% glucose, 0.3% yeast extract) at 30°C; *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were cultivated in Luria-Bertani (LB) medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) at 37°C; *Shewanella oneidensis* was grown in LB medium at 30°C; all other isolates were grown in 0.1× Tryptic Soy Broth (DIFCO laboratories, Detroit, MI) at 30°C. Bacteria were harvested by 5 min centrifugation at 10000g, and DNA extractions were performed on the cell pellet with the DNeasy® Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to manufacturer's instructions. *Magnetospirillum magneticum* genomic DNA was provided by J. B. Rioux (IBEB-LBC-CEA Cadarache, France).

Environmental DNA

Sample collection and environmental DNA extraction for the sample from the Tataouine desert (located ~100 km west from the Sahara border; see Fig. 1) are reported in Chanal *et al.* (2006). *Deinococcus* have been detected therein by a combination of molecular and cultural methods. The present study was performed with purified DNA stored at -20°C.

Five water samples from Tunisian geothermal springs, described in Sayeh *et al.* (2010), were examined in this study: Ain Essalhine (spring 5), Nefta (spring 7), Hammem Bouhlel (spring 9), El Hamma of Tozeur (spring 10), and Ain Atrous (spring 11) (see Fig. 1). Springs 5, 9, and 11 were chosen as control samples as *Thermus* sequences have been previously detected therein. Springs 7 and 10 were also examined to assess whether the use of specific primers is more sensitive than the cloning/sequencing approach, as no *Deinococcus/Thermus* were detected previously. Water samples (either 10 mL or 50 mL) were filtered through 0.2- μ m pore size filters, which were then stored at -80°C. Environmental DNA was extracted directly from these filters in the present study, using the UltraClean Soil DNA Isolation Kit (MoBio, Solana, CA).

In silico design of *Deinococcus-Thermus* specific primers

All *Deinococcus-Thermus* sequences were extracted from the SILVA 111 reference sequences and aligned using the Muscle program. From this, a 90% sequence consensus was computed, and encoded using the IUPAC notation

Table 1. Bacterial strains used in this study.

Bacterial strains	Description, origin, reference number	Reference or source
<i>α</i> -proteobacteria		
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> 2.4.1	Type strain (ATCC 11167)	M. Sabaty, CEA Cadarache, France
<i>Magnetospirillum magneticum</i> AMB-1	Type strain (ATCC 700264)	J. B. Rioux, CEA Cadarache, France
<i>Afpia</i> sp. CYB52	Arsenic contaminated water, Bangladesh	Lab. collection
<i>Brevundimonas</i> sp. OVA 3.2	Soil, Gabon	Lab. collection
<i>Chelatococcus</i> sp. VCT108	Tataouine desert sand, Tunisia	Chanal et al. (2006)
<i>β</i> -proteobacteria		
<i>Variovorax</i> sp. Cu5	Uranium ores, France	Lab. collection
<i>Burkholderia</i> sp. VeU10	Uranium ores, France	Lab. collection
<i>Collimonas</i> sp. Ve03a1 ou VeU15	Uranium ores, France	Lab. collection
<i>γ</i> -proteobacteria		
<i>Escherichia coli</i> MG1655	Type strain (ATCC 700926)	Lab. Collection
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1	Type strain (ATCC BAA-47™)	R. Voulhoux, CNRS, France
<i>Shewanella oneidensis</i> MR1	Type strain (ATCC BAA-1096™)	A. Verméglio, CEA Cadarache, France
<i>Deinococcus-Thermus</i>		
<i>Deinococcus radiodurans</i> R ₁	Type strain (ATCC 13939)	S. Sommer, Univ. Of Paris-Sud, France
<i>Deinococcus desertii</i> VCD115	Type strain (DSM 17065)	de Groot et al. (2005)
<i>Deinococcus desertii</i> VCD117	Sahara desert, reference strain	de Groot et al. (2005)
<i>Deinococcus</i> sp. VCT102	Tataouine desert sand, Tunisia	Chanal et al. (2006)
<i>Deinococcus proteolyticus</i> MRP	Feces of <i>Lama glam</i> , type strain (ATCC 35074)	Kobatake et al. (1973); Brooks and Murray (1981)
<i>Deinococcus radiopugnans</i> MIT 248	Irradiated haddock, type strain (ATCC 19172)	Brooks and Murray (1981)
<i>Deinococcus murrayi</i> ALT-1b	Hot springs, type strain (DSM 11303)	Ferreira et al. (1997)
<i>Deinococcus geothermalis</i> AG-3a	Hot springs, type strain (DSM 11300)	Ferreira et al. (1997)
<i>Deinococcus indicus</i> Wt/1a	Arsenic polluted water, type strain (DSM 15307)	Suresh et al. (2004)
<i>Deinococcus radiophilus</i> RBD	Irradiated Bombay duck, type strain (DSM 20551)	Lewis (1973); Brooks and Murray (1981)
<i>Deinococcus grandis</i> KS 0485	Hot springs, type strain (DSM 3963)	Oyaizu et al. (1987); Rainey et al. (1997)
<i>Meiothermus ruber</i> 21	Hot springs, type strain (DSM 1279)	Loginova et al. (1984); Nobre et al. (1996)
<i>Thermus aquaticus</i> YT-1	Hot springs, type strain (DSM 625)	Brock and Freeze (1969)
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	Hot springs, type strain (DSM 579)	Oshima and Imahori (1974); Manaia et al. (1994)
<i>Firmicutes</i>		
<i>Lysinibacillus</i> sp. Vi07	Granitic soil, France	Lab. collection
<i>Paenibacillus</i> sp. Vi0A7b	Granitic soil, France	Lab. collection
<i>Bacillus</i> sp. ViU12	Uranium ores, France	Lab. collection
<i>Actinobacteria</i>		
<i>Corynebacterium</i> sp. Vi06	Granitic soil, France	Lab. collection
<i>Streptomyces</i> sp. Vi02	Granitic soil, France	Lab. collection
<i>Arthrobacter</i> sp. ViUA5	Uranium ores, France	Lab. collection
<i>Leifsonia</i> sp. Ve03a2	Granitic soil, France	Lab. collection
<i>Bacteroidetes</i>		
<i>Pedobacter</i> sp. VeU6	Uranium ores, France	Lab. collection
<i>Chryseobacterium</i> sp. Tch1_1_n3	Radionuclide-contaminated soil, Chernobyl	Chapon et al. (2012)
<i>Hymenobacter</i> sp. Tch1_11_n5	Radionuclide-contaminated soil, Chernobyl	Lab. collection
<i>Sphingobacterium</i> sp. CYB21	Arsenic contaminated water, Bangladesh	Lab. collection

(without taking into account indels for consensus computing). A 15 nucleotide (nt) sliding window was used to extract each subsequence containing less than three degeneracies. The overlapping extracted 15 nt oligomers were then recombined into longer domains. Each possible primer with a length of 20–30 nts containing less than three degeneracies was then extracted from the domains.

A specific program, written in C, was developed to test which sequences would be recognized in the SILVA database, allowing up to three mismatches. Primers were then selected having a high specificity and a wide coverage for

sequences of the *Deinococcus-Thermus* clade. A set of Python programs was used to improve their coverage while remaining specific. At the end of this process, the Deino-f-326-350/Deino-r-758-785 primers displayed good coverage and specificity, and we selected them for in vivo validation.

PCR amplification and construction of 16S rRNA gene libraries

For the in vitro validation of primers that specifically target *Deinococcus-Thermus*, an initial set of experiments was

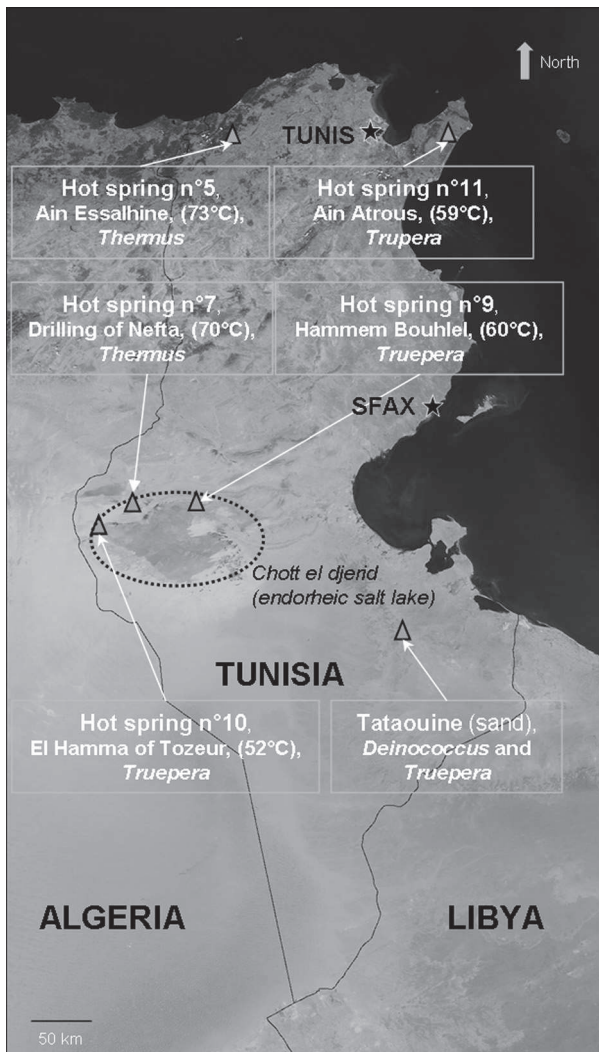


Figure 1. Location map of the study sites (triangles). For the hot springs, the water temperature is indicated in brackets. Genera belonging to the *Deinococcus-Thermus* phylum retrieved in each site are also indicated.

performed using phylogenetically diverse bacteria (Table 1). Genomic DNA from pure cultures was used as a template for PCR amplification with the primers Deino-f-326-350 (5'-CGGGAGGCAGCAGTTAGGAATCTTC-3') and Deino-r-758-785 (5'-GTTTAGGGYGTGGACTACCCGGGTATCT-3'). Each amplification reaction mixture (50 μ L) contained 1 \times PCR buffer, 2 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L of each dNTP, 1 μ mol/L of each primer, 1U Go Taq[®] Hot start polymerase (Promega), and 75 ng of DNA template. Based on the nucleotide content of the primers, the annealing temperature was predicted to be 64.5°C for Deino-f-326-350 and 65°C for Deino-r-758-785. However, when PCR amplification was performed with an annealing temperature of 65°C, all *Deinococcus-*

Thermus strains DNAs were successfully amplified while no amplification was detected for strains belonging to any other phyla, with the exception of *Firmicutes*. Amplification of *Firmicutes* was predicted by in silico analysis, and can be accounted for by two primer/template mismatches. To avoid nonspecific amplification of *Firmicutes*, the PCR protocol was optimized by increasing the annealing temperature to 72°C. After an initial 2 min denaturation step at 94°C, 25 cycles were performed (94°C for 30 sec, 72°C for 1 min 45 sec), followed by a final extension step at 72°C for 5 min.

In a second set of experiments, primer efficiency and specificity for environmental DNA were examined by nested PCR. First, community DNA were used as targets for PCR amplification of the 16S rRNA genes with the universal primers fD1/S17, as described in Chanal et al. (2006). This primer set recognized 39.6, 82, and 88.5% of the 139 eligible sequences of *Deinococcus-Thermus* by allowing, respectively, 0, 1, or 2 mismatches between primers and sequences. The PCR products were then purified and used as the targets in a second PCR amplification with the primers Deino-f-326-350/Deino-r-758-785. The resulting PCR products were purified, cloned into the pCR2.1-TOPO vector (TOPO TA Cloning kit; Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions, and electrotransformed into *E. coli* DH5 α cells. Single colonies containing inserts were randomly selected and plasmids were extracted using the QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), according to manufacturer's instructions. Plasmids were sent to GATC (Germany) for Sanger sequencing, using the M13F sequencing primer. Sequence quality was ensured manually with the BioEdit Version 7.0.5.3 (Hall 1999).

Phylogenetic analyses

To assign taxonomy, the SILVA 111 reference sequence database was downloaded and used to search each clone sequence using a Needleman–Wunsch algorithm, applying a 80% similarity cutoff to retrieve the 20 most similar sequences. Five clone sequences had no close relative in the SILVA database. These five sequences were then submitted to a Blastn query (excluding environmental sequences) using the NCBI nr database. First, we looked for hits with $\geq 99\%$ similarity, and we calculated a consensus taxonomy. In the event that no hit was found with $\geq 99\%$ similarity, the threshold was successively lowered in a step-wise fashion to determine at what level a taxonomy could be assigned. This process was repeated until an 80% threshold was reached. A consensus taxonomy corresponded, for example, to a defined genus if all selected hits shared the same genus.

For each of the 142 clone sequence, the two most similar sequences from the SILVA 111 reference database were selected (but with filtering to include at least one cultured bacterial sequence) to create a file of clone sequences and

reference sequences (194 sequences in total). SeaView (Gouy et al. 2010) was used to align these sequences, using the included Muscle program. An initial tree was built from conserved domains, and sequences were reordered as they occurred in this tree using SeaView's tools. Alignments were checked and manually modified when necessary. This process was repeated until no problem was detected. Trees were built using Neighbor-Joining (with distances corrected using the Kimura 2-parameter method), as implemented in SeaView with 1000 bootstrap replications. Trees were plotted with TreeDyn (Chevenet et al. 2006). To determine OTUs (operational taxonomic units), sequences were pairwise aligned by a Needleman–Wunsch algorithm, a distance matrix was computed and sequences were clustered by average linkage from 85% to 100% similarity. We used clustering with a similarity of 97% in this study.

Results and Discussion

In silico analysis of primer pair specificity and coverage

The Deino-f-326-350/Deino-r-758-785 primers exhibited high coverage and specificity for the phylum *Deinococcus-Thermus* (Table 2). By allowing 0, 1, or 2 mismatches between primers and sequences, the primer set, respectively, recognized 89, 95.7, and 97.2% of the 1048 sequences of *Deinococcus-Thermus*. The coverage values were high for all genera within the phylum except for *Marinithermus*.

Among the 731,338 sequences in the SILVA database, three (out of 222,804) *Proteobacteria* sequences and two (out of 890) *Aquificae* sequences matched exactly with the primers. Allowing one mismatch between primers and sequences increased the number of matches, to 211 sequences from Candidate division TM7 (27.8% coverage value), 89 sequences from *Chloroflexi* (0.9% coverage value), 30 sequences from BD1–5 (7.6% coverage value), and 10 sequences from *Proteobacteria*.

The coverage values increased for several phyla, when two mismatches were tolerated between primers and sequences. However, for member-rich phyla (e.g., *Proteobacteria*), the coverage values remained low (0.1–2.4%) except for *Firmicutes* (25%). Elevated coverage values were obtained for a number of small phyla, including Candidate Divisions TM7 (39.2%), WS6 (22.2%), and KB1 (12.8%); BD1–5 (69.9%), WCHB1–60 (84.3%), MVP-21 (37.5%), and Kazan-3B-28 (15.4).

In vitro validation of primers with reference strains

Tests for primer specificity and optimization of PCR amplification conditions were performed on a set of 36

Table 2. In silico analysis of the coverage obtained by the set of primers.

	Total number of sequences	0 mismatch (%)	1 mismatch (%)	2 mismatches (%)
<i>Deinococcus-Thermus</i>	1048	89	95.7	97.2
<i>Marinithermus</i>	2	0	0	100
<i>Meiothermus</i>	201	88	95	97
<i>Oceanithermus</i>	15	100	100	100
<i>Thermus</i>	318	91	97	97
<i>Vulcanithermus</i>	3	67	67	100
<i>Deinococcus</i>	365	92	98	99
<i>Truepera</i>	132	80	89	92
<i>Proteobacteria</i>	222,804	<0.1	<0.1	0.3
<i>Firmicutes</i>	191,278	0	<0.1	25
<i>Bacteroidetes</i>	79,438	0	0	0.1
<i>Actinobacteria</i>	46,948	0	0	0.1
<i>Acidobacteria</i>	13,074	0	0	0.2
<i>Cyanobacteria</i>	12,752	0	0	0.1
<i>Chloroflexi</i>	10,437	0	0.9	2.4
<i>Tenericutes</i>	4234	0	0	7.8
<i>Nitrospirae</i>	2558	0	<0.1	1.6
<i>Fusobacteria</i>	2345	0	0	0.2
<i>Deferribacteres</i>	1671	0	0	1.6
<i>Fibrobacteres</i>	1116	0	0	0.1
<i>Chlorobi</i>	1101	0	0	3.3
Candidate division OD1	998	0	0	0.2
<i>Aquificae</i>	890	0.2	0.2	0.2
<i>Thermotogae</i>	770	0	0	0.1
Candidate division TM7	758	0	27.8	39.2
<i>Armatimonadetes</i>	660	0	0	1.4
BD1–5	396	0	7.6	69.9
TM6	373	0	0	4.6
TA06	310	0	0	0.3
Candidate division BRC1	265	0	0	0.8
RF3	231	0	0	4.3
Candidate division WS6	158	0	0	22.2
Candidate division KB1	78	0	0	12.8
<i>Spirochetes</i>	57	0	0	11.4
WCHB1–60	51	0	0	84.3
MVP-21	24	0	0	37.5
GAL08	17	0	0	5.9
Kazan-3B-28	13	0	0	15.4

The results for *Deinococcus-Thermus* are detailed according to the genera. The total number of sequences available in the database is indicated for each phylum and genera. The given coverage values correspond to 0, 1, or 2 mismatches between the primers and the 16S rRNA gene sequences.

bacterial strains comprising representatives from the bacterial phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, and *Proteobacteria* (Table 1). When

PCR amplification was performed with an annealing temperature of 72°C, *Deinococcus* and *Thermus* DNAs were successfully amplified, resulting in an expected amplicon size of 460 bp. No amplification was detected for strains belonging to any other phyla (Fig. S1).

Contribution of the Deino-f-326-350 and Deino-r-758-785 primers for the efficient detection of *Deinococcus-Thermus* in environmental DNA

To validate the use of Deino-f-326-350 and Deino-r-758-785 primers for environmental ecology applications, primer specificity was examined using six environmental community DNAs extracted from two distinct environments: the Tataouine desert sand and Tunisian geothermal springs. A direct PCR using the Deino-f-326-350 and Deino-r-758-785 primers with a 72°C annealing temperature did not yield any product with our six environmental DNA samples. This could be related to the high annealing temperature used here, in combination with low amount of *Deinococcus-Thermus* derived DNA and large quantity of nonspecific DNA in template DNA sample. Therefore, we performed a nested PCR protocol: the universal bacterial primers fD1 and S17 were used in a first round, and the resulting amplicons were targeted in the second round with the Deino-f-326-350 and Deino-r-758-785 primers (with an annealing temperature of 72°C). This protocol resulted in PCR products of the expected size for the six DNA samples tested.

Then, to check primer specificity, six gene libraries were constructed with the PCR products and 142 sequences were used for a phylogenetic analysis (Fig. S2); a simplified tree is shown in Figure 2. The sequences clustered into 33 OTUs at 97% sequence identity. The rarefaction curves plotted at this level did not reach an asymptote indicating that new OTUs would have appeared when increasing the number of clones sequenced (Fig. S3). One hundred twenty-four out of 142 sequences were affiliated with the targeted phylum *Deinococcus-Thermus*, whereas 18 sequences were affiliated with nontargeted phyla such as *Chloroflexi*, *Firmicutes*, and the Candidate Divisions KB1, TM7, and OD1. Among these 18 sequences, 15 displayed low similarity values (<93%) to known 16S rRNA gene sequences and three were related to *Firmicutes*; the latter suggests either amplification linked to primer mismatches (that could not be avoided even with an annealing temperature of 72°C) or PCR-induced artifacts. In spite of this, these nonspecific reactions occurred with a low frequency (13%) and did not prevent the detection of the targeted sequences within complex environmental DNA samples.

Molecular diversity of taxa affiliated with *Deinococcus-Thermus* in the desert of Tataouine

All twenty-four 16S rRNA gene clone sequences from the desert of Tataouine were identified as belonging to *Deinococcales*, and could be divided into two groups: the first group affiliates with the genus *Deinococcus* and comprises 14 sequences clustered into three OTUs; the second group is affiliated with the genus *Truepera* and comprises 10 sequences clustered into two OTUs (Fig. 2).

Nine sequences from *Deinococcales* were grouped into OTU 9. Within this OTU, four sequences were closely related to *Deinococcus desertii* (with similarity values ranging from 98.3–98.7%), a bacterium previously isolated from the Tataouine desert sand (Chanal *et al.* 2006). By contrast, the other sequences were affiliated to *Deinococcus hopiensis* and *D. navajonensis* (95.5–99.8% similarity), two radioresistant strains recovered from arid soils in the Sonoran hot desert (Rainey *et al.* 2005). Four sequences grouped into OTU 13 were not closely related to any cultured strains, and their closest neighbor (94.1–95.2% similarity) was a 16S rRNA gene sequence detected in a quartz hypolith from the Acataama desert (Lacap *et al.* 2011).

Ten sequences, clustered into OTUs 6 and 10, affiliated with *Truepera*, and exhibited 93–94% 16S rRNA gene sequence similarity with *Truepera radiovictrix*, the sole type strain of this genus, isolated from hot spring run-offs (Albuquerque *et al.* 2005). These sequences displayed higher similarity (98.4–100%) to uncultured bacteria sequences from diverse biotopes and notably from extreme environments, including: rock samples from the Black Canyon of the Chihuahuan desert (NM; Northup *et al.* 2010); the Mars desert research station (UT; Direito *et al.* 2011); sunlight-exposed biofilms from Chernobyl (Ukraine; Ragon *et al.* 2011); and saline biological desert crusts (China; Li *et al.* 2013).

Thus, application of the Deino-f-326-350 and Deino-r-758-785 primers revealed sequences that were detected in our previous study (such as *Deinococcus desertii*), as well as several new sequences that have not previously been recovered. In particular, the presence of *Truepera* in this environment was unsuspected until now.

Molecular diversity of taxa affiliated with *Deinococcus-Thermus* in Tunisian geothermal springs

One hundred sequences belonging to the *Deinococcus-Thermus* group were recovered from hot springs 5, 7, 9, 10, and 11. These were marked by an uneven distribution among the five springs, as the 26 sequences derived from

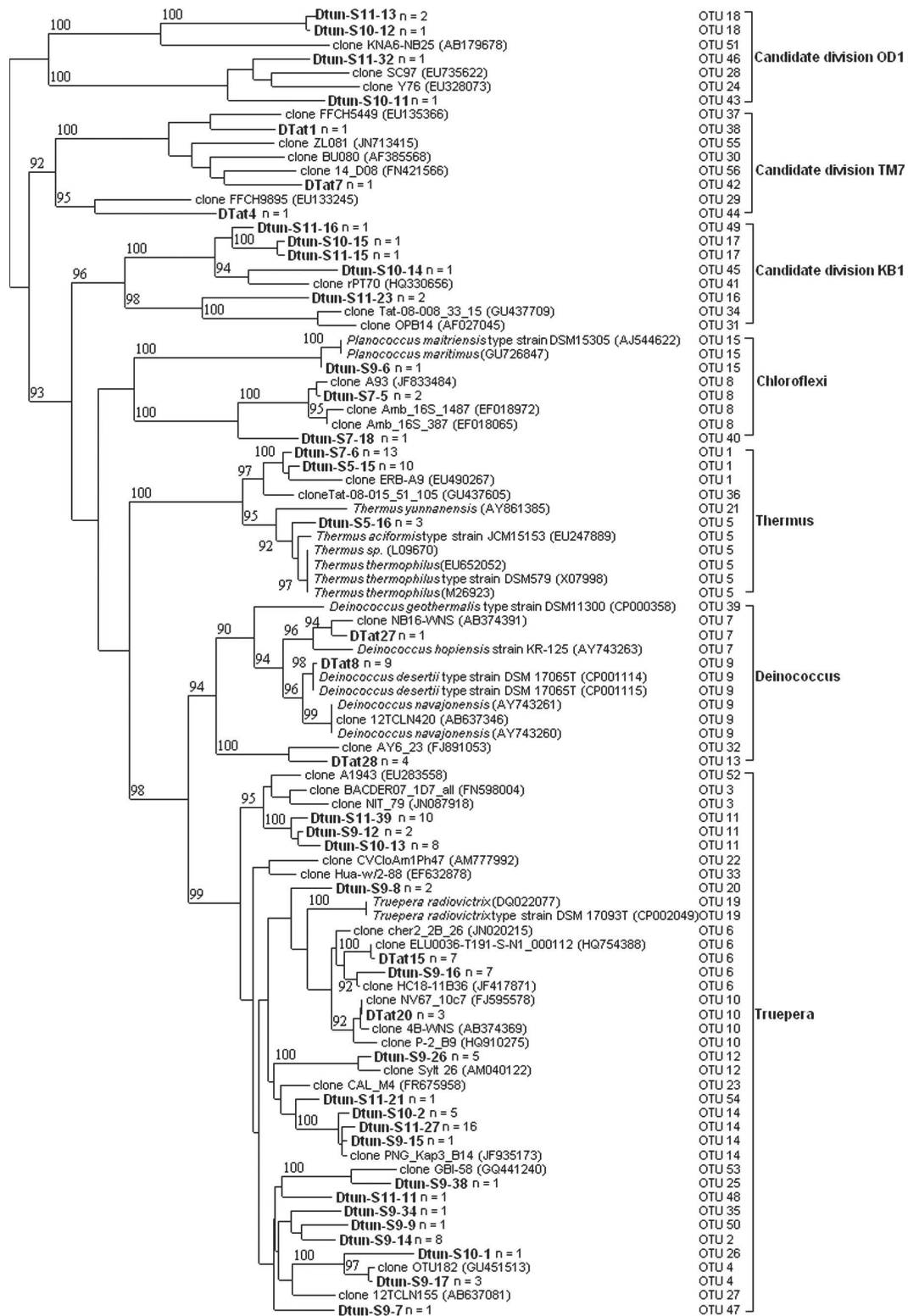


Figure 2. Neighbor-Joining tree based on 16S rRNA sequences recovered from Tataouine (labelled with the prefix DTat) and from hot springs 5, 7, 9, 10 and 11 (labelled with the prefixes Dtun-S5, Dtun-S7, Dtun-S9, Dtun-S10 and Dtun-S11, respectively). The tree is simplified to include one sequence per OTU and per collection site, as well as the most similar sequences from public databases. The number of sequences within each OTU is indicated at the leaves (n = x). A complete tree is shown in Figure S2.

springs 5 and 7 all affiliated with *Thermales* while the 74 sequences derived from springs 9, 10, and 11 all affiliated with *Deinococcales* (Fig. 2). This result differs to some extent from that previously reported by Sayeh *et al.* (2010), in which *Thermales* sequences were identified in springs 5, 9, and 11, and no sequences were found to affiliate with *Deinococcales*. This discrepancy between the two studies could be explained by the fact that, for this study, new DNA extractions were performed from samples stored at -80°C , implicating that the DNA extracts were not exactly the same in both cases. The discrepancies could also be due to differences in DNA extraction procedures and PCR conditions (e.g., primer pair and/or amplification programs).

The 74 *Deinococcales* sequences recovered from springs 9, 10, and 11 all affiliated with the genus *Truepera*. Springs 10 and 11 displayed a very similar molecular diversity, whereas spring 9 had a distinct profile. Springs 10 and 11 were dominated by OTUs 11 and 14, representing, respectively, 93 and 96% of the sequences; these OTUs were also characterized by a lower than 90% similarity to cultured species. Sequences recovered from spring 9 also clustered into these two OTUs, but with much less abundance (three sequences). Sequences from OTU 14 were most closely related (95–99.8%) to sequences recovered from “hot” environments such as alkaline hot springs (JF935173, Papua New Guinea), arid soils of northwestern China (FR849462), and hot Calamita ferromagnetic sand (Perfumo *et al.* 2011). Sequences from OTU 11 were most closely related (95–96% similarity) to uncultured bacteria derived from an impressive number of saline and hypersaline environments, including: French Guiana coast mud (KC010001); the northern subtropical Pacific Ocean (Eiler *et al.* 2011); hypersaline microbial mats (Mexico, JN501803); north Pacific subtropical gyres (Pham *et al.* 2008); activated sludge from a seawater-processing wastewater treatment plant (Sánchez *et al.* 2011); the northeast subarctic Pacific Ocean (HQ674210); coastal sediments of the Ariake Sea (Japan, AB560052); the Xiao Chaidan salt lake (China, HM128252); tailing material from Chanaral Bay (Acatama desert, HF558617); hypersaline sediments from Lake Kasin (Russia; Emmerich *et al.* 2012); marine sponge (Florida; Montalvo and Hill 2011); and the Sapelo Island salt marsh (GA, AY711411). Despite their great geographic separation, springs 9 and 10 (located near Tozeur, at the border of the “Chott el-Djerid” endorheic salt lake) and 11 (located near Korbous, on the Mediterranean Sea) each showed elevated salinity (3, 5, and 11 g/L, respectively). Taken together, these data strongly suggest that sequences from OTUs 11 and 14 belong to ubiquitous halophilic *Truepera* found in saline environments worldwide.

Nine OTUs related to *Truepera* (2, 4, 6, 12, 20, 25, 35, 47, and 50), and which represent 30 sequences, were

detected exclusively in spring 9. Sequences belonging to the OTUs 2, 4, 12, 25, 47, and 50 were most closely related to uncultured organisms derived from marine environments, such as surfaces of marine macroalgae (GU451513; Lachnit *et al.* 2011) and marine sandy sediments from the North Sea (AM040122; Musat *et al.* 2006). Bacteria belonging to these OTUs may correspond to salt-tolerant species. This hypothesis is consistent with the location of spring 9 near the endorheic salt lake “Chott el-Djerid”. The OTU 6 encompassed six sequences that were also detected in spring 9, and which displayed close relationships with sequences detected in several extreme environments such as deserts and radioactive sites (see above). This OTU was singular in that it was additionally represented in the Tataouine desert sample; this phenomenon could be the signature of exchanges between the Tataouine site and spring 9, possibly occurring through the dust and sand storms that frequently occur in this region.

The 26 *Thermales* sequences derived from spring 5 (13 sequences) and spring 7 (13 sequences) all affiliated with the genus *Thermus* and clustered into two OTUs. OTU 1 was the most abundant and accounted for 77% of the sequences from spring 5, and 100% of the sequences from spring 7. Sequences from this OTU have no close cultured neighbor, and exhibit high similarity (96.1–97.0%) with a sequence detected in hot mineral soils (Antarctica; Soo *et al.* 2009). In addition, three sequences from spring 5 clustered into OTU 5 and were closely related to *Thermus thermophilus* (97.4–99.6% similarity) and *Thermus arciformis* (97.6% similarity), two thermophilic strains isolated from hot springs (Murzina *et al.* 1988; Zhang *et al.* 2010). As most *Deinococcus* species are mesophilic or moderately thermophilic, the absence of these bacteria from springs 5 and 7 could be explained by the elevated temperatures recorded at these sites (73°C and 70°C , respectively).

Conclusions

We have demonstrated that the primers developed for this study are highly specific and allow the detection of *Deinococcus-Thermus* sequences within environmental samples. They represent a powerful tool to detect novel *Deinococcus-Thermus* sequences through the sequencing of a limited number of clones, which will provide new insight into *Deinococcus-Thermus* molecular diversity in extreme environments. In line with this, our results indicate the presence of previously undescribed salt-tolerant bacteria in three springs.

These primers could be used in ecological studies for a rapid screening of environmental DNA samples, and could also be applicable to clarify the biogeography of the *Deinococcus-Thermus* phylum.

Acknowledgments

We thank Laurie Piette for technical assistance. This work was financially supported by the CEA through the Toxicology Program. Nicolas Theodorakopoulos is supported by a PhD grant co-funded by the IRSN and the Provence-Alpes-Côte d'Azur regional council. We thank Brandon Loveall of Improve for manuscript correction services.

Conflict of Interest

None declared.

References

- Albuquerque, L., C. Simões, M. F. Nobre, N. M. Pino, J. R. Battista, M. T. Silva, et al. 2005. *Truepera radiovictrix* gen. nov., sp. nov., a new radiation resistant species and the proposal of *Trueperaceae* fam. nov. FEMS Microbiol. Lett. 247:161–169.
- Asker, D., T. S. Awad, L. McLandsborough, T. Beppu, and K. Ueda. 2011. *Deinococcus depolymerans* sp. nov., a gamma- and UV-radiation-resistant bacterium, isolated from a naturally radioactive site. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:1448–1453.
- Auchtung, T. A., G. Shyndriayeva, and C. M. Cavanaugh. 2011. 16S rRNA phylogenetic analysis and quantification of *Korarchaeota* indigenous to the hot springs of Kamchatka, Russia. Extremophiles 15:105–116.
- Bjornsdottir, S. H., S. K. Petursdottir, G. O. Hreggvidsson, S. Skirmisdottir, S. Hjorleifsdottir, J. Arnfinnsson, et al. 2009. *Thermus islandicus* sp. nov., a mixotrophic sulfur-oxidizing bacterium isolated from the Torfajokull geothermal area. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59:2962–2966.
- Brock, T. D., and H. Freeze. 1969. *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a nonsporulating extreme thermophile. J. Bacteriol. 98:289–297.
- Brooks, B. W., and R. G. E. Murray. 1981. Nomenclature for *Micrococcus radiodurans* and other radiation resistant cocci: *Deinococcaceae* fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. Int. J. Syst. Bacteriol. 31:353–360.
- Callegan, R. P., M. F. Nobre, P. M. McTernan, J. R. Battista, R. Navarro-González, C. P. McKay, et al. 2008. Description of four novel psychrophilic, ionizing radiation-sensitive *Deinococcus* species from alpine environments. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:1252–1258.
- Chanal, A., V. Chapon, K. Benzerara, M. Barakat, R. Christen, W. Achouak, et al. 2006. The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. Environ. Microbiol. 8:514–525.
- Chapon, V., L. Piette, M. H. Vesvres, F. Coppin, C. Le Marrec, R. Christen, et al. 2012. Microbial diversity in contaminated soils along the T22 trench of the Chernobyl experimental platform. Appl. Geochem. 27:1375–1383.
- Chaturvedi, R., and G. Archana. 2012. Novel 16S rRNA based PCR method targeting *Deinococcus* spp. and its application to assess the diversity of deinococcal populations in environmental samples. J. Microbiol. Methods 90:197–205.
- Chevenet, F., C. Brun, A. L. Banuls, B. Jacq, and R. Christen. 2006. TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. BMC Bioinform. 7:439.
- da Costa, M. S., F. A. Rainey, and M. F. Nobre. 2006. The genus *Thermus* and relatives. Pp. 797–812 in M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, and E. Stackebrandt, eds. The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria. 3rd ed. Vol. 7. Springer, New York, NY.
- Cox, M. M., and J. R. Battista. 2005. *Deinococcus radiodurans* – the consummate survivor. Nat. Rev. Microbiol. 3:882–892.
- Direito, S., P. Ehrenfreund, A. Marees, M. Staats, B. Foing, and W. Röling. 2011. A wide variety of putative extremophiles and large beta-diversity at the Mars Desert Research Station (Utah). Int. J. Astrobiol. 10:191–207.
- Duodu, S., P. Larsson, A. Sjödin, M. Forsman, and D. J. Colquhoun. 2012. The distribution of *Francisella*-like bacteria associated with coastal waters in Norway. Microb. Ecol. 64:370–377.
- Eiler, A., D. H. Hayakawa, and M. S. Rappé. 2011. Non-random assembly of bacterioplankton communities in the subtropical north pacific ocean. Front. Microbiol. 2:140.
- Ekman, J. V., M. Raulio, H. J. Busse, D. P. Fewer, and M. Salkinoja-Salonen. 2011. *Deinobacterium chartae* gen. nov., sp. nov., an extremely radiation-resistant, biofilm-forming bacterium isolated from a Finnish paper mill. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61:540–548.
- Emmerich, M., A. Bhansali, T. Lösekann-Behrens, C. Schröder, A. Kappler, and S. Behrens. 2012. Abundance, distribution, and activity of Fe(II)-oxidizing and Fe (III)-reducing microorganisms in hypersaline sediments of Lake Kasin, southern Russia. Appl. Environ. Microbiol. 78:4386–4399.
- Ferreira, A. C., M. F. Nobre, F. A. Rainey, M. T. Silva, R. Wait, J. Burghardt, et al. 1997. *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., two extremely radiation-resistant and slightly thermophilic species from hot springs. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:939–947.
- Fredrickson, J. K., J. M. Zachara, D. L. Balkwill, D. Kennedy, S. M. Li, H. M. Kostandarithes, et al. 2004. Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the Hanford site, Washington state. Appl. Environ. Microbiol. 70:4230–4241.
- Gans, J. D., J. Dunbar, S. A. Eichorst, L. V. Gallegos-Graves, M. Wolinsky, and C. R. Kuske. 2012. A robust PCR primer design platform applied to the detection of Acidobacteria Group 1 in soil. Nucleic Acids Res. 40:e96.

- Gouy, M., S. Guindon, and O. Gascuel. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27:221–224.
- de Groot, A., V. Chapon, P. Servant, R. Christen, M. F. Saux, S. Sommer, et al. 2005. *Deinococcus deserti* sp. nov., a gamma-radiation-tolerant bacterium isolated from the Sahara Desert. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:2441–2446.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95–98.
- Hirsch, P., C. A. Gallikowski, J. Siebert, K. Peissl, R. Kroppenstedt, P. Schumann, et al. 2004. *Deinococcus frigens* sp. nov., *Deinococcus saxicola* sp. nov., and *Deinococcus marmoris* sp. nov., low temperature and draught-tolerating, UV-resistant bacteria from continental Antarctica. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:636–645.
- Im, W. T., H. M. Jung, L. N. Ten, M. K. Kim, N. Bora, M. Goodfellow, et al. 2008. *Deinococcus aquaticus* sp. nov., isolated from fresh water, and *Deinococcus caeni* sp. nov., isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:2348–2353.
- Janssen, P. H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1719–1728.
- Kämpfer, P., N. Lodders, B. Huber, E. Falsen, and H. J. Busse. 2008. *Deinococcus aquatilis* sp. nov., isolated from water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58:2803–2806.
- Kobatake, M., S. Tanabe, and S. Hasegawa. 1973. New Micrococcus radioresistant red pigment, isolated from Lama glama feces, and its use as microbiological indicator of radiosterilization. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* 167:1506–1510.
- Lacap, D. C., K. A. Warren-Rhodes, C. P. McKay, and S. B. Pointing. 2011. Cyanobacteria and chloroflexi-dominated hypolithic colonization of quartz at the hyper-arid core of the Atacama Desert, Chile. *Extremophiles* 15:31–38.
- Lachnit, T., D. Meske, M. Wahl, T. Harder, and R. Schmitz. 2011. Epibacterial community patterns on marine macroalgae are host-specific but temporally variable. *Environ. Microbiol.* 13:655–665.
- Lagier, J. C., F. Armougom, M. Million, P. Hugon, I. Pagnier, C. Robert, et al. 2012. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:1185–1193.
- Lee, S. H., and J. C. Cho. 2011. Group-specific PCR primers for the phylum Acidobacteria designed based on the comparative analysis of 16S rRNA gene sequences. *J. Microbiol. Methods* 86:195–203.
- Lewis, N. F. 1973. Radio-resistant *Micrococcus radiophilus* sp. nov. isolated from irradiated Bombay duck (*Harporodon nehereus*). *Curr. Sci. (Bangalore)* 42:504.
- Li, K., R. Liu, H. Zhang, and J. Yun. 2013. The diversity and abundance of bacteria and oxygenic phototrophs in saline biological desert crusts in Xinjiang, Northwest China. *Microb. Ecol.* 66:40–48.
- Loginova, L. G., L. A. Egorova, R. S. Golovacheva, and L. M. Seregina. 1984. *Thermus ruber* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34:498–499.
- Manaia, C. M., B. Hoste, M. C. Gutiérrez, M. Gillis, A. Ventosa, K. Kersters, and M. S. da Costa. 1994. Halotolerant *Thermus* strains from marine and terrestrial hot springs belong to *Thermus thermophilus* (ex Oshima and Imahori, 1974) nom. rev. emend. *Syst. Appl. Microbiol.* 17:526–532.
- Montalvo, N. F., and R. T. Hill. 2011. Sponge-associated bacteria are strictly maintained in two closely related but geographically distant sponge hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:7207–7216.
- Mühling, M., J. Woolven-Allen, J. C. Murrell, and I. Joint. 2008. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME J.* 2:379–392.
- Murzina, N. V., D. P. Vorozheykina, and N. I. Matvienko. 1988. Nucleotide sequence of *Thermus thermophilus* HB8 gene coding 16S rRNA. *Nucleic Acids Res.* 16:8172.
- Musat, N., U. Werner, K. Knittel, S. Kolb, T. Dodenhof, J. E. van Beusekom, et al. 2006. Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Rømø Basin, Wadden Sea. *Syst. Appl. Microbiol.* 29:333–348.
- Nobre, M. F., H. G. Trüper, and M. S. da Costa. 1996. Transfer of *Thermus ruber* (Loginova et al. 1984), *Thermus silvanus* (Tenreiro et al. 1995), and *Thermus chliarophilus* (Tenreiro et al. 1995) to *Meiothermus* gen. nov. as *Meiothermus ruber* comb. nov., *Meiothermus silvanus* comb. nov., and *Meiothermus chliarophilus* comb. nov., respectively, and emendation of the genus *Thermus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:604–606.
- Northup, D. E., J. R. Snider, M. N. Spilde, M. L. Porter, J. L. van de Kamp, P. J. Boston, et al. 2010. Diversity of rock varnish bacterial communities from Black Canyon, New Mexico. *J. Geophys. Res.* 115:G02007.
- Oshima, T., and K. Imahori. 1974. Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) com. nov., a non-sporulating thermophilic bacterium from a Japanese thermal spa. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 24:102–112.
- Oyaizu, H., E. Stackebrandt, K. H. Schleifer, W. Ludwig, H. Pohla, A. Hirata, et al. 1987. A radiation-resistant rod-shaped bacterium *Deinobacter grandis* gen. nov., sp. nov., with peptidoglycan containing ornithine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:62–67.
- Perfumo, A., C. Cockell, A. Elsaesser, R. Marchant, and G. Kmínek. 2011. Microbial diversity in Calamita ferromagnetic sand. *Environ. Microbiol. Rep.* 3:483–490.
- Pham, V. D., K. T. Konstantinidis, T. Palden, and E. F. DeLong. 2008. Phylogenetic analyses of ribosomal DNA-containing bacterioplankton genome fragments from a

- 4000 m vertical profile in the North Pacific Subtropical Gyre. *Environ. Microbiol.* 10:2313–2330.
- Ragon, M., G. Restoux, D. Moreira, A. P. Moller, P. Lopez-Garcia, A. P. Møller, et al. 2011. Sunlight-exposed biofilm microbial communities are naturally resistant to chernobyl ionizing-radiation levels. *PLoS ONE* 6:e21764.
- Rainey, F. A., M. F. Nobre, P. Schumann, E. Stackebrandt, and M. S. da Costa. 1997. Phylogenetic diversity of the deinococci as determined by 16S ribosomal DNA sequence comparison. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:510–514.
- Rainey, F. A., K. Ray, M. Ferreira, B. Z. Gatz, M. F. Nobre, D. Bagaley, et al. 2005. Extensive diversity of ionizing-radiation-resistant bacteria recovered from Sonoran Desert soil and description of nine new species of the genus *Deinococcus* obtained from a single soil sample. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5225–5235. Erratum in: *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. 71:7630.
- Rainey, F. A., M. Ferreira, M. F. Nobre, K. Ray, D. Bagaley, A. M. Earl, et al. 2007. *Deinococcus peraridilitoris* sp. nov., isolated from a coastal desert. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:1408–1412.
- Sánchez, O., L. Garrido, I. Forn, R. Massana, M. I. Maldonado, and J. Mas. 2011. Molecular characterization of activated sludge from a seawater-processing wastewater treatment plant. *Microb. Biotechnol.* 4:628–642.
- Sayeh, R., J. L. Birrien, K. Alain, G. Barbier, M. Hamdi, and D. Prieur. 2010. Microbial diversity in Tunisian geothermal springs as detected by molecular and culture-based approaches. *Extremophiles* 14:501–514.
- Slade, D., and M. Radman. 2011. Oxidative stress resistance in *Deinococcus radiodurans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 75:133–191.
- Soo, R. M., S. A. Wood, J. J. Grzymalski, I. R. McDonald, and S. C. Cary. 2009. Microbial biodiversity of thermophilic communities in hot mineral soils of Tramway Ridge, Mount Erebus, Antarctica. *Environ. Microbiol.* 11:715–728.
- Stach, J. E., L. A. Maldonado, A. C. Ward, M. Goodfellow, and A. T. Bull. 2003. New primers for the class Actinobacteria: application to marine and terrestrial environments. *Environ. Microbiol.* 5:828–841.
- Suresh, K., G. S. N. Reddy, S. Sengupta, and S. Shivaji. 2004. *Deinococcus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium from an aquifer in West Bengal, India. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:457–461.
- Vajna, B., S. Kanizsai, Z. Kéki, K. Márialigeti, P. Schumann, and E. M. Tóth. 2012. *Thermus composti* sp. nov., isolated from oyster mushroom compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62:1486–1490.
- Widmer, F., R. J. Seidler, P. M. Gillevet, L. S. Watrud, and G. D. Di Giovanni. 1998. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:2545–2553.
- Yoo, S. H., H. Y. Weon, S. J. Kim, Y. S. Kim, B. Y. Kim, and S. W. Kwon. 2010. *Deinococcus aerolatus* sp. nov. and *Deinococcus aerophilus* sp. nov., isolated from air samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:1191–1195.
- Yu, T. T., J. C. Yao, H. Ming, Y. R. Yin, E. M. Zhou, M. J. Liu, et al. 2012. *Thermus tengchongensis* sp. nov., isolated from a geothermally heated soil sample in Tengchong, Yunnan, south-west China. *Antonie Van Leeuwenhoek* 103:513–518.
- Yuan, M., W. Zhang, S. Dai, J. Wu, Y. Wang, T. Tao, et al. 2009. *Deinococcus gobiensis* sp. nov., an extremely radiation-resistant bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59:1513–1517.
- Zhang, X. Q., Y. Ying, Y. Ye, X. W. Xu, X. F. Zhu, and M. Wu. 2010. *Thermus arciformis* sp. nov., a thermophilic species from a geothermal area. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60:834–839.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. PCR amplification using Deino-f-326-350 and Deino-r-758-785 primers and genomic DNA of diverse *Deinococcus*, *Meiothermus*, *Thermus*, *Paenibacillus*, *Bacillus* and *Lysinibacillus* strains.

Figure S2. Neighbor-Joining tree (1000 replicates) based on 16S rRNA gene sequences recovered from Tataouine (labelled with the prefix DTat) and from hot springs 5, 7, 9, 10 and 11 (labelled with the prefixes Dtun-S5, Dtun-S7, Dtun-S9, Dtun-S10 and Dtun-S11, respectively). The tree includes the most similar sequences from public databases.

Figure S3. Rarefaction curves of the OTUs at 97% sequence similarity.

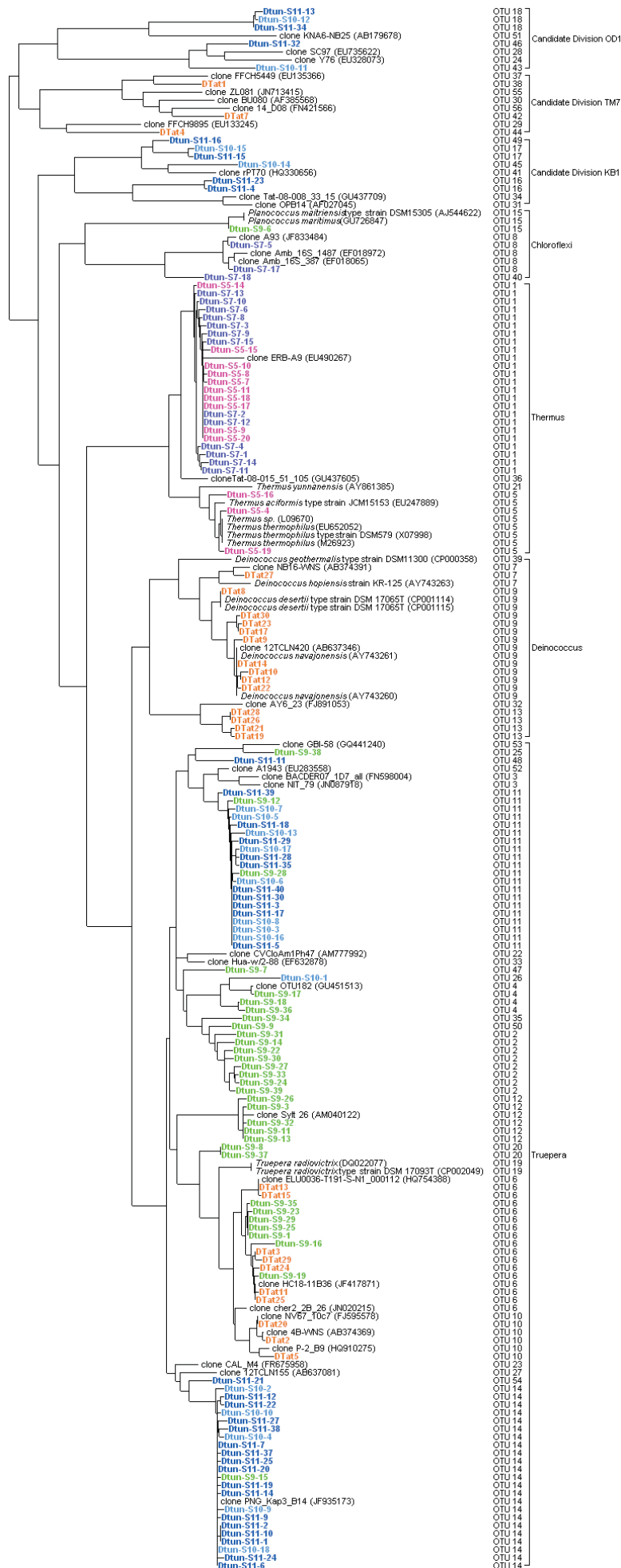


Figure S2. Neighbor-Joining tree (1000 replicates) based on 16S rRNA gene sequences recovered from Tataouine (labelled with the prefix DTat) and from hot springs 5, 7, 9, 10 and 11 (labelled with the prefixes Dtun-S5, Dtun-S7, Dtun-S9, Dtun-S10 and Dtun-S11, respectively). The tree includes the most similar sequences from public databases.

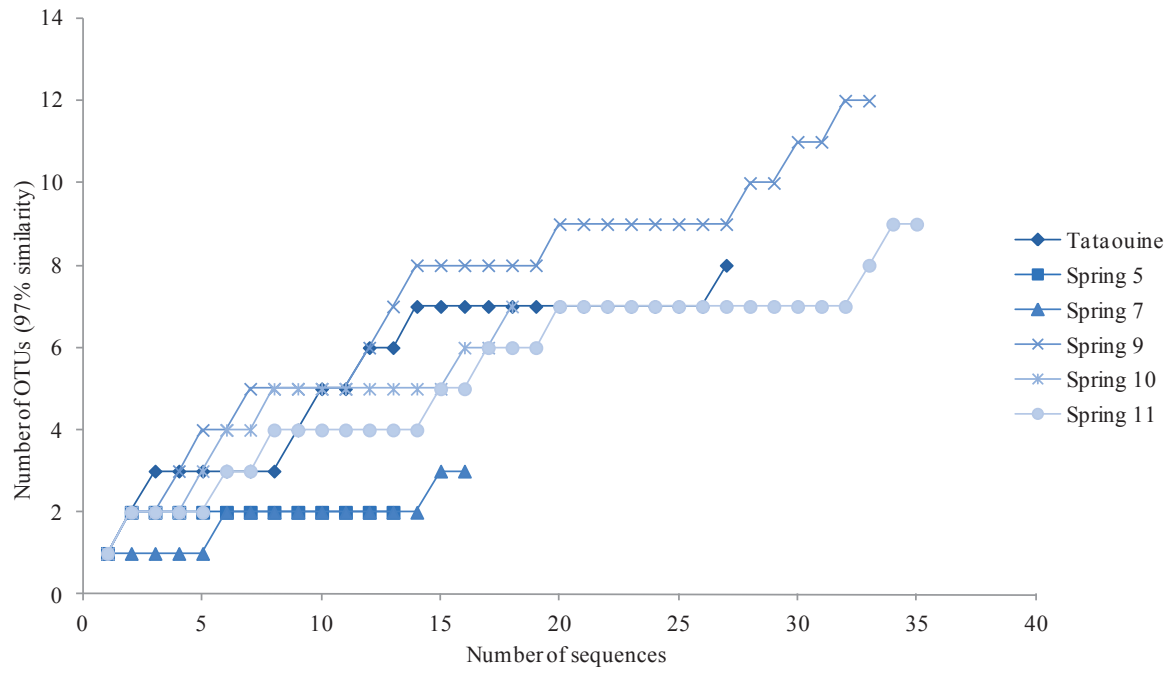


Figure S3. Rarefaction curves of the OTUs at 97% sequence similarity.

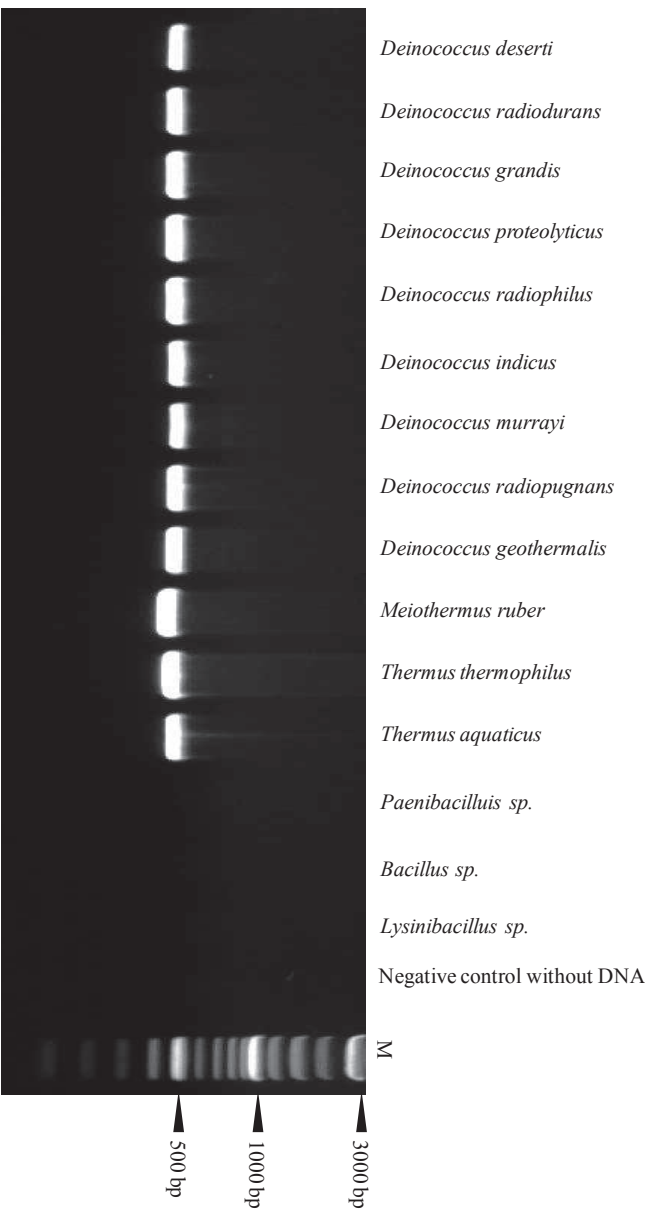


Figure S1 . PCR amplification using Deino-f-326-350 and Deino-r-758-785 primers and genomic DNA of diverse *Deinococcus*, *Meiothermus*, *Thermus*, *Paenibacillus*, *Bacillus* and *Lysinibacillus* strains.

4. Résultats et Discussion

L'analyse *in silico* montre que le couple d'amorces est très spécifique des *Deinococcus-Thermus*. En effet, 89% des séquences de ce phylum peuvent être reconnus si aucun mésappariement n'a lieu au cours de la PCR. L'analyse révèle en revanche une possible amplification de séquences affiliés aux *Aquificae* (0,2%) et aux *Proteobacteria* (< 0,1%). Si au cours de l'étape de PCR deux mésappariements ont lieu, alors 97,2% des séquences de *Deinococcus-Thermus* sont reconnues mais aussi des séquences d'autres phylums, notamment 25% des séquences de *Firmicutes*. Pour pallier ce problème de mésappariement au cours de l'étape de PCR, nous avons choisi d'effectuer l'étape d'hybridation des amorces à la température la plus élevée possible (72°C). Par la suite, et afin de valider l'approche *in-silico*, des tests d'amplification sur les ADN génomiques de souches de *Deinococcus-Thermus* (12 souches) mais aussi de *Firmicutes* (3 souches) ont été réalisés. Ces tests démontrent la spécificité des amorces puisque toutes les séquences des *Deinococcus-Thermus* ont été amplifiées et aucune amplification des *Firmicutes* n'a été détectée.

Dans un deuxième temps, les amorces ont été validées sur des échantillons dans lesquels la présence de séquences de *Deinococcus-Thermus* avait déjà été mise en évidence au cours d'études précédentes (Chanal *et al.*, 2006, Sayeh *et al.*, 2010). Ces échantillons, d'eaux ou de sols de Tunisie, ont fait l'objet d'une amplification préalable à l'aide d'un couple d'amorces généralistes *Bacteria* visant l'ADNr 16S. Cinq échantillons provenant de sources chaudes tunisiennes et un échantillon provenant du désert de Tataouine ont ainsi été testés.

L'étude démontre la spécificité des amorces sur ces ADN métagénomiques puisque leur utilisation a permis de retrouver des séquences qui avaient déjà pu être identifiées au niveau des échantillons d'ADN métagénomique mais aussi de révéler des nouvelles séquences appartenant aux *Deinococcus-Thermus*.

5. Expérience complémentaire : recherche de *Deinococcus-Thermus* dans des échantillons de Tchernobyl

Au cours de cette seconde partie, nous avons utilisé le couple d'amorces spécifiques des *Deinococcus-Thermus* sur les échantillons de sols qui présentaient la plus forte teneur en ¹³⁷Cs

et qui, du fait de l'irradiation induite, étaient les plus susceptibles d'avoir entraîné la sélection d'espèces appartenant au phylum des *Deinococcus-Thermus*.

5.1. Matériel et méthodes

Les ADNs métagénomiques extraits des sols 8 et 10 ont tout d'abord été amplifiés avec les amorces universelles *Bacteria* FD1 / S17 au cours d'une étape de PCR selon les paramètres décrit par Chanal *et al.*, (2006). Les produits d'amplification ainsi obtenus ont été amplifiés à l'aide du couple d'amorces Deino-f-326-350/Deino-r-758-785 selon le protocole d'amplification préalablement défini. Les amplicons ainsi obtenus ont été purifiés et clonés dans le vecteur pCR2.1-TOPO (TOPO TA Cloning kit; Invitrogen, Carlsbad, CA) selon les recommandations du fournisseur. Les plasmides obtenus ont été transformés par électroporation dans les cellules électrocompétentes d'*E. Coli* DH5 α . Une fois sur milieu sélectif, les colonies contenant l'insert ont été repiquées aléatoirement puis les plasmides ont été extraits à l'aide du kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Les inserts portés par les plasmides ont été séquencés (GATC, Allemagne). La qualité des séquences a été vérifiée à l'aide du logiciel BioEdit Version 7.0.5.3.

5.2. Résultats et Discussion

L'utilisation de ces amorces sur les ADN métagénomiques de Tchernobyl n'a pas permis de mettre en évidence la présence de *Deinococcus-Thermus* dans les échantillons malgré une amplification positive des échantillons 8 et 10. En effet, l'analyse des amplicons par construction d'une banque de 16 clones montre que les séquences d'ADNr 16S amplifiées sont exclusivement affiliées aux *Firmicutes*. Toutes les séquences obtenues présentent un pourcentage de similarité compris entre 95 et 98% avec une séquence de *Firmicutes* identifiée au niveau d'un sol de bambouseraie (WSF2-15). Bien que les amorces soient spécifiques aux *Deinococcus-Thermus*, lors de l'étape de PCR, des amplifications non spécifiques peuvent également se produire. Ce problème, prédit par l'approche *in silico*, a également été souligné dans l'article précédent. Cette amplification non spécifique témoigne de l'absence, ou tout du moins de la très faible abondance d'ADNr 16S de *Deinococcus-Thermus* dans les échantillons métagénomiques de Tchernobyl.

L'irradiation chronique engendrée par la présence des radionucléides dans les sols de la tranchée T22 ne semble donc pas avoir entraîné un enrichissement d'espèces radiorésistantes

appartenant au phylum des *Deinococcus-Thermus*. Certains éléments permettent d'expliquer cette observation. La plupart des espèces radiorésistantes appartenant à ce phylum ne proviennent pas d'environnements radioactifs mais proviennent de sites « arides » où leur capacité de résistance à l'irradiation vient du fait qu'elles sont résistantes à la dessiccation. Les sols de Tchernobyl sont bien au contraire humides et sujets aux contraintes climatiques ukrainiennes qui se caractérisent par un climat tempéré. De plus, les différentes études réalisées pour isoler des espèces radiorésistantes affiliées aux *Deinococcus-Thermus* sont basées sur des irradiations avec des débits de dose de plusieurs kGy/h afin d'éliminer les bactéries incapables de réparer les lésions. Or, ces forts débits de dose vont entraîner principalement des cassures doubles brins et la production d'espèce réactives de l'oxygène, alors que les lésions générées par les débits de dose rencontrés à Tchernobyl (5 et 200 $\mu\text{Gy/h}$, cf. ci-dessous) vont principalement causer des oxydations de base et des cassures simple brin et la formation d'espèces réactives de l'oxygène. Les systèmes de réparation mis en jeu ne sont probablement pas les mêmes ce qui peut expliquer l'absence de *Deinococcus* détectables.

Au cours de cette étude, les débits de dose reçue par les bactéries aux différents points de prélèvement ont été calculés à l'aide du logiciel EDEN¹ (Beaugelin-Seiller *et al.*, 2006) sur la base des concentrations en ¹³⁷Cs, ¹³¹Am, ⁶⁰Co, ¹⁵⁴Eu et ⁹⁰Sr dans les sols. Selon que l'on considère ou non la pondération par l'efficacité biologique relative des différents types de rayonnement dans les calculs de doses, les débits de dose s'établissent entre 5 et 200 $\mu\text{Gy/h}$ pour les échantillons issus de sols contaminés et entre 0,01 et 0,4 $\mu\text{Gy/h}$ pour les échantillons contrôles. Toutefois, en se basant sur les teneurs en ²³⁸U, ²³⁴U, ²³⁵U, ²³⁶U, ²³²Th, ²³⁹Pu, ²⁴⁰Pu et ²⁴¹Pu, on peut estimer que les débits de dose reçue par les bactéries à proximité de particules de combustible seraient 1000 fois plus élevés en moyenne. En considérant cette valeur, le débit de dose maximum s'élève ainsi à 200 mGy/h, une valeur qui reste éloignée du kGy/h.

¹ EDEN : logiciel de dosimétrie environnementale, qui permet le calcul des facteurs de conversion de dose pour les organismes non-humains

CHAPITRE IV : Exploration de la diversité bactérienne des sols de la tranchée T22 par pyroséquençage

1. Contexte général

Les techniques de séquençage de nouvelle génération ont fait leur apparition ces dernières années. Suite à leur introduction dans le domaine de l'écologie microbienne, de nombreuses études se sont employées à les utiliser afin d'explorer la diversité bactérienne des sols. Au cours de notre étude, les approches précédentes nous ont permis d'évaluer la diversité bactérienne entre les différents échantillons et de constituer une collection de bactéries cultivables. Cependant, comme nous avons pu le voir dans le Chapitre I, l'approche culturale et la DGGE ont leurs limites. Afin de pallier ces limites, nous avons choisi d'analyser les échantillons d'ADN métagénomique au moyen du pyroséquençage 454. Bien que la technique existe depuis 2005, les prix prohibitifs ne permettaient pas d'accéder à la technologie. La démocratisation des techniques de pyroséquençage et la baisse des coûts d'analyse nous ont permis d'y accéder. La technique est tout à fait appropriée dans le cadre d'une étude comparative entre différents types d'échantillons de sol.

2. Objectifs de l'étude

Le but de l'étude était d'analyser une portion de l'ADNr 16S (région variable V4) de 36 échantillons d'ADN métagénomique purifiés de la tranchée T22 par pyroséquençage 454. Au total, 9 échantillons de la campagne d'Avril 2009 et 27 échantillons de la campagne d'Octobre 2009 (9 échantillons en 3 réplicats) ont été analysés.

Une analyse en composante principale a été réalisée pour comparer la structure des communautés bactériennes entre les différents échantillons ainsi que les variations saisonnières. Une analyse de co-inertie a également été réalisée afin d'évaluer les relations entre les variables physico-chimiques et la diversité bactérienne.

3. Contribution scientifique

Theodorakopoulos N., Christen R., Piette L., Février L., Coppin F., Martin-Garin A., Le Marrec C., Sergeant C., Berthomieu C. and Chapon V. Bacterial populations of Chernobyl soils are shaped by radionuclides exposure. Article en préparation.

Microbial communities of Chernobyl soils are shaped by radionuclides exposure.

Nicolas Theodorakopoulos^{1,2,3,4}, Richard Christen^{5,6}, Laurie Piette^{1,2,3}, Laureline Février⁴, Frédéric Coppin⁴, Arnaud Martin-Garin⁴, Claire Le Marrec⁷, Claire Sergeant^{8,9}, Catherine Berthomieu^{1,2,3} and Virginie Chapon^{1,2,3}.

¹ CEA, DSV, IBEB, SBVME, LIPM, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France.

² CNRS, UMR 7265, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France.

³ Université d'Aix-Marseille, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France.

⁴ IRSN, PRP-ENV, SERIS, L2BT, F-13115 Saint Paul-lez-Durance, France

⁵ Université de Nice-Sophia Antipolis, UMR 7138, Systématique, Adaptation, Evolution, Parc Valrose, BP71, F-06108 Nice cedex 02, France.

⁶ CNRS, UMR 7138, Systématique, Adaptation, Evolution, Parc Valrose, BP71, F-06108 Nice cedex 02, France.

⁷ ISVV, UMR 1219, Institut Polytechnique de Bordeaux/INRA, POB 50008, F-33882 Villenave d'Ormon,

⁸ Univ. Bordeaux, CENBG, UMR5797, F-33170 Gradignan, France

⁹ CNRS, IN2P3, CENBG, UMR5797, F-33170 Gradignan, France

Running title: Microbial diversity in Chernobyl soils

Abstract

Following the Chernobyl nuclear accident, contaminated soils, vegetation and other radioactive debris were buried *in situ* in trenches. In this area, the trench n° 22 has been a pilot site for the study of radionuclides (RNs) migration in soil for many years. In a previous study, the presence of complex communities in contaminated and control soil samples from this site was evidenced by a genetic fingerprint method (DGGE). However, the magnitude of changes in soil bacterial community structure upon RNs exposure was not clear. In this work, we used high throughput pyrosequencing to get a comprehensive picture of the phylogenetic diversity of Bacteria and Archae in these soils in order to assess the impact of long-term RNs exposure on the communities. Bacteria and Archae represent 95.5 and 4.1 % respectively of the 695,000 reads retrieved from 36 soils samples. We revealed highly diverse communities with 34 bacterial and 2 archaeal phyla represented, and 635 operational taxonomic units at 97% sequence similarity level. A statistical analysis of the data demonstrated that the bacterial populations within highly contaminated samples differs significantly from the controls, indicating that RNs exert a deep impact on the communities.

1. Introduction

During the last decade uranium mining, military activities and nuclear power plants accidents introduced new anthropogenic contaminants in the environments (Hu et al., 2008). Indeed, the nuclear power plant disasters in Chernobyl (CNPPD) and Fukushima contributed greatly to the dispersion of long half-life radionuclides (RN) isotopes such as ^{233}U , ^{137}Cs or ^{90}Sr . Due to its intrinsic parameters (half-life, volatility and mobility), ^{137}Cs is one of the most persistent contaminant in the environment. It is still one of the most detected RN in the Chernobyl exclusion zone and its concentration is still higher than other RNs in some areas (Nakamaru et al., 2007). Among the total $13,650 \times 10^{15}$ Becquerel (Bq) (Aquilina et al., 2012) released during the CNPPD, the amount of ^{137}Cs was estimated to be ~85 PBq (I.A.E.A, 2006). In the case of Fukushima Daiichi nuclear power plant accident, 1 PBq of ^{137}Cs was deposited on the island (Yasunari et al., 2011). Thus the understanding of RN migration such as ^{137}Cs in soils is crucial (Kirchner et al., 2009). This migration depends on several factors such as soil composition and micro-flora. Bacteria are able to interact with contaminants such as heavy metals in soils. Therefore, bacterial communities could play an essential role in contaminant mobility in soils by lowering or enhancing their transfer to other compartments (e.g. water,

plant, animals). Bacteria could affect the radionuclides migration directly *via* multiple mechanisms such as biomineralisation, bioaccumulation, biotransformation or biosorption (Lloyd and Macaskie, 2002) or indirectly *via* the degradation of organic matter, which interact with radionuclides such as ^{90}Sr or ^{137}Cs , leading to their release. RNs contaminants might also exert toxic effects on bacteria hence inhibiting their role in the transfer. There are few studies assessing the effect of RNs contamination on bacteria in Chernobyl. Most of them are based on cultivation approaches and showed a decrease of bacterial diversity under chronic radiation (Romanovskaya et al., 1998; 1999; 2000; Zavlgesky et al., 1998; Czirjak et al., 2010). In 2011, Ragon et al. reported the first study based on molecular approaches of sunlight adapted biofilm microbial communities exposed to different radiation levels (from 0.35 to 25 $\mu\text{Sv/h}$) in the Chernobyl area. While the diversity was similar in irradiated and non-irradiated UV-adapted communities, an increase of the mutation level within some OTUs was correlated with radiation.

Here, we evaluate the effects of RNs on bacterial communities in heavily contaminated soils by a high throughput sequencing method. Soon after the Chernobyl disaster, RN contaminated wastes have been buried in a large network of trenches around the nuclear power plant leading to a highly contaminated environmental spots containing RNs such as ^{241}Pu , ^{233}U , ^{137}Cs and ^{90}Sr . One of these trenches (trench T-22) has been studied since 1999 to follow the migration of RNs in the environment (Aquilina et al., 2012). In a previous study (Chapon *et al.*, 2012), the presence of complex communities in contaminated and control soil samples from this site was evidenced by a genetic fingerprint method (DGGE). However, no dominant community fingerprint related to RNs content was evidenced by this method. In this work, we reassessed our previous results by using high throughput pyrosequencing to better evaluate the taxonomic diversity of Bacteria and Archae. The presence of highly diverse communities in both control and contaminated soils was confirmed. We further evidenced a clear impact of RNs contamination on bacterial diversity.

2. Materiel and methods

2.1. Sample collection, DNA extraction and pyrosequencing of 16S rRNA genes

Sampling and DNA extraction procedure is described Chapon *et al.* (2012). Briefly, sandy soil samples, containing various ^{137}Cs content, were collected at 9 different positions in the RNs contaminated trench T22 area, located in the exclusion zone of Chernobyl (Bugai et al.

(2005). In April and October 2009, RNs contaminated soil samples (number 1, 3, 4, 8, 10 and 12) were collected inside the trench as well as controls (number 13, 14 and 20) that were collected in the vicinity. In April, environmental DNA was extracted from a single subsample of each soil while in October, environmental DNA was extracted from triplicates subsamples. The resulting 36 DNA samples were stored at -20 °C.

For the pyrosequencing analyses, amplicons from the V4 region of the 16S rRNA genes were generated by PCR using the primer set 530f (5'-GTGCCAGCMGCNGCGG-3'; Dowd *et al.*, 2008) and 802r (5'-TACNVGGGTATCTAATCC-3'; Claesson *et al.*, 2009) for each DNA sample. PCR amplifications were performed in triplicates of 50 µl reactions which consisted of 30-50 ng of template DNA, 0.6 µM of each forward and reverse primers, 0.2 mM each dNTP, 2 mM MgCl₂, 1.25 U of Go Taq® Hot start polymerase (Promega, USA) and 1 X reaction buffer. Samples were initially denaturated at 94 °C for 5 min then amplified using 30 cycles of 94 °C for 30s, 55 °C for 30s and 72 °C for 45s; and a final extension at 72 °C for 5 min. Triplicates were pooled before purification of the amplicons. DNA from each amplicon (500ng) was sent separately for sequencing (Roche 454 GS-FLX system, Titanium chemistry, by GATC, Konstanz, Germany). Adaptor and sample-specific 4-pb keys were added to each amplicon by another step of PCR before mixing and pyrosequencing.

2.2. Reference sequences

Silva 108 reference dataset (618,449 sequences) was used to build a reference database of predicted amplicon sequences (PAS). The two primers used for the PCR amplifications were used to identify Silva sequences that contained them exactly, to which were added sequences recognized successively at 1, 2 and 3 mismatches between primers and sequences. This showed that the primer set recognized almost no Eukarya SSU rRNA sequence, very few Archaea and most Bacteria sequences. Among Bacteria only some classes of the *Chloroflexi* phylum were problematic (*Anaerolineae*, *Dehalococcoidetes*, *Elev-1554*, *P2-11E* and *SHA-26*). The PAS contained 524,496 bacterial, 24,846 archaeal and 33,365 eukaryal sequences, demonstrating that by using up to 4 differences between primers and sequences we were able to build a rather complete database (582 707 sequences, 94% of Silva).

2.3. Reads extraction and prefiltering.

From the sequencing service of GATC-Biotech (Konstanz, Germany) we obtained both the raw .sff files (two half-plates) and 36 .fna fasta files of sequences filtered by the Roche pipeline. The sff files were used to analyse the number of sequences that would pass our own quality filter. This filter consisted in using a 20 nt sliding window to extract reads for which none of these windows would have a mean probability of error at a given threshold; we used 5, 10,...90 %. Based on these results we decided to use a threshold of 20% or less as an error probability (QS20). We used also the MID's sequences to extract reads into 36 .fasta files. Each of the .fna (454 pipeline) or .fasta (QS20 filtered) files was then filtered and dereplicated, provided a read that contained no N, contained exactly the two primers and had a sequence length between 90 and 500 nucleotides (calculated from the PAS sequences). In these strictly identical dereplicated fasta files, sequences were sorted by decreasing abundance.

2.4. Reads Clustering and dereplication

The next step was to cluster each read with a more abundant read when they differed by 3 differences or less. In this step, the differences linked to the presence of homopolymer were not taken into account (mis-reading of homopolymers is the main error of the 454 sequencer). Then clusters which represented more than 0.1% of total occurrences were retained, clusters with too few occurrences were discarded to minimize the overestimation of diversity. It has now been shown that very rare reads are mostly sequencing artefacts and that at this depth of sequencing (roughly 20,000 or less reads per sample), rare reads are obtained or not by chance (Kunin et al., 2010).

2.5. Taxonomic assignments

For the two sets of reads (fasta and fna), a taxonomy was assigned by comparison to PAS sequences. The first assignments were done at the phylum and class levels. A read was assigned if it was exactly identical to at least one PAS sequence, if not if 98.5% or more similar to at least 2 PAS sequences, if not if 96.5% or more similar to at least two PAS sequence, and so on using 92%, 85% and 80% similarity. Reads without similar PAS sequence were assigned as "not hit". Consensus taxonomy was built using PAS sequences

found; for example, if all PAS sequences agreed at the family level but not the genus, a read was assigned only at the family level. Curves were then plotted to see how each filtering procedure differed. No difference could be seen between the two filtering procedures and we choose to proceed with the QS20 dataset since we had entire control on this filtering. Assignments were then done down from the phylum level to the genus level. For the genus level of assignment, only clades present in at least 0.1% abundance in at least one sample were used to build figures while at the phylum level, a threshold value of 1% was used.

2.6. Saturation Curves

Saturation curves were plotted after clustering at 3 differences (roughly 1.5 % sequence divergence) and 6 differences (roughly 3 % sequence divergence) and filtering as described above.

2.7. Un-supervised clustering.

Supervised clustering (by taxonomic assignment) is perfect to identify most abundant clades in a given sample. However it may not be the best method to cluster samples. Indeed as shown by our analyses, a very abundant read can often not be better assigned than at the family or order level, because no similar sequences can be found in the reference sequences. In this case when this read is found in several samples, we have no proper way to identify it. Un-supervised clustering was done by computing every pair-wise distance using a global (Needleman-Wunsch) computation. Average linkage clustering was then done at each % of similarity from 100% to 70%.

2.8. Multivariate analysis

PCA analysis was carried out using R (2.12.0) program with the package ade4. All the data were centered but not scaled.

3. Results and discussion

3.1. Analysis of the pyrosequencing data set

In this study, 36 DNA samples were analyzed by pyrosequencing of the V4 region of 16S rRNA genes. These samples were purified from soils collected at 9 different positions in April and October 2009 in the trench T22 area in Chernobyl (Chapon *et al.*, 2012). Soils collected at positions 1, 3, 4, 8, 10 and 12 were heavily contaminated with RNs (^{137}Cs activity ranging from 61 to 750 Bq g⁻¹) while soils samples n° 13, 14 and 20 corresponded to low contaminated controls (^{137}Cs ranging from 0.35 to 1.5 Bq g⁻¹; Table 1). A significant linear dependence between the ^{137}Cs concentration and C_{org} has been observed. In October, 3 subsamples (designated as a, b and c) were used for DNA extraction in order to assess the reproducibility of the experiment.

The pyrosequencing raw dataset comprised a total of 825,622 tag sequences that was reduced to 693,257 after quality filtering. Plastid and mitochondrial sequences (2,511) were also removed. Reads had a mean length of 254 bp. The number of sequences per DNA sample ranged from 14,869 to 21,819 with an average of 19,167, which constitutes one of the largest 16S rRNA-based dataset from soils. The obtained reads were taxonomically identified at *phylum*, *class*, *order*, *family* and *genus* levels. We could assign almost every read at least to the phylum level: only 723 sequences had no neighbor at 80% similarity in the SILVA database, leading to a data set of 690,023 sequences assigned.

3.2. Overall bacterial diversity

OTUs were identified at genetic distances of 3% by using denoised sequences as described in the methods and rarefaction curves were computed. As shown in Figure 1, rarefaction curves reached an asymptote, indicating that the depth of sequencing was sufficient to cover almost the full extent of taxonomic diversity. Higher apparent species richness was observed in ^{137}Cs contaminated samples compared to the controls (except for the control sample n°20 which had a similar pattern than the contaminated sample n°4), suggesting a positive effect of the trench conditions (high RNs and C_{org} content) on phylogenetic diversity. This feature has already been observed in concrete biofilms (Ragon *et al.*, 2011) and for macro-invertebrates in the Chernobyl area (Murphy *et al.*, 2011).

The primer set used in this study was predicted by *in silico* analysis to amplify most *Bacteria* and few *Archaea* sequences (see the method). Among the 690,023 sequences which could be

classified, 95.8% were affiliated to *Bacteria* and 4.2% to *Archaea* (Table 2). Within the *Archaea*, *Thaumarchaeota* were by far the most abundant representing 98.5% of the archaeal sequences while 1.5% were affiliated to *Euryarchaeota*. The *Thaumarchaeota* is one of the most abundant archaeal phylum on earth that comprises several clades composed of environmental sequences only (Brochier-Armanet et al., 2008; Pester et al., 2012). A total of 661,684 tag sequences were affiliated to *Bacteria* and represented 34 phyla. The most consistently detected phyla, accounting for 90.0% of all sequences, were *Chloroflexi* (25.5%), *Acidobacteria* (17.6%), *Proteobacteria* (16.3%), *Verrucomicrobia* (9.7%), *Planctomycetes* (9.6%), *Actinobacteria* (7.3%) and *Cyanobacteria* (4.0%). These phyla are commonly encountered as dominant taxa in soils (Janssen, 2006; Rastogi et al., 2009) but here, the abundance of *Chloroflexi* was noticeably high in all samples. The high abundance of *Chloroflexi* is not an artefact linked to DNA extraction or PCR amplification since other soil samples processed in the same run of experiment did not show the same profile (Chapon V., personal communication). The *Chloroflexi* was mainly composed of sequences related to the clades JG37-AG-4 and TK10, accounting for 63.6% and 11.3% of this phylum respectively. JG37-AG-4 and TK10 are clades of uncultured *Chloroflexi* with no cultured representative, comprising at the time of writing only 1973 and 1701 sequences (Silva release 115; <http://www.arb-silva.de>). Some members of these groups are extremophiles since they have been detected in several environments including uranium contaminated sites and natural uranium ores (Mondani et al., 2011; Selenska-Pobell, 2002), acid mine drainage (Garcia-Moyano et al., 2012), desert (Mars Desert Research Station, acc. num. HQ910310; Atacama desert, acc. num. JF706691) and permafrost (Yergeau et al., 2012).

Acidobacteria as well as *Proteobacteria* are common inhabitants of a wide range of soils including metal and heavy metal contaminated environments (Chien et al., 2008; Zhou et al., 2010; Selenska-Pobell et al., 2002; Chapon et al., 2012). *Cyanobacteria* constitute usually a minor fraction of the soil communities but representative of this phylum have been shown to transport caesium via their ammonium transport system (Avery et al., 1992). Finally, sixteen rare phyla, including *Firmicutes*, represented 0.9% to 0.1% of all sequences while the last 11 had relative abundances of less than 0.1% (Table 2).

It should be mentioned that few sequences (0.013% of all sequences) were identified as *Deinococcus-Thermus*. *Deinococcus* members are desiccation- and radiation-resistant bacteria 10kGy (Asker et al., 2008; Rainey et al., 2005) and have been detected in Chernobyl concrete biofilms (Ragon et al., 2011). Since their relative abundance in our samples was very low and could be the consequence of sequencing errors, we tried to confirm their presence by

the use of specific primers targeting the phylum *Deinococcus-Thermus* (Theodorakopoulos *et al.*, 2013). Despite several attempts, we failed to amplify *Deinococcus-Thermus* 16S rRNA genes. Furthermore, *Deinococcus*-related species were not identified among the cultured bacteria retrieved from the Chernobyl soils (Chapon *et al.*, 2012). Taken together, these results strongly suggest that *Deinococcus* are not present in this environment or represent a very minor fraction of the communities. This could be explained by the fact that in the trench bacteria are exposed for a long period of time to dose rates ranging from 5 to 200 $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$. These dose rates are several orders of magnitude lower than those used for *Deinococcus* species which are able to withstand more than 10 kGy, but delivered in a very short period of time (dose rates in ^{60}Co irradiators are in $\text{kGy}\cdot\text{h}^{-1}$). These contrasting conditions will generate different kind of damages within the cells: high dose rates will induce much more DNA double strand-breaks than lower dose rates. Different repair mechanisms will be then implicated, explaining why *Deinococcus* are not favoured by the trench conditions.

3.3. High consistency of replicated samples

The reproducibility of the experiment is rarely considered in studies of bacterial community composition based on high throughput sequencing. Here, for each soil sample collected in October 2009, 3 subsamples (a, b and c) were taken for subsequent DNA extraction, amplification and sequencing to examine the variation linked to the experimental conditions. OTUs were identified at genetic distance of 3% and their relative abundances in each replicate were calculated. We noticed that rare OTUs (<0.1% in a given sample) could be absent in the other replicates. Bacterial OTUs matrices were subjected to Principal Component Analysis. As shown in Figure 2, the first two axis of the PCA accounted for 80.6% of the variability between samples. High consistency between replicates was found indicating high reproducibility of the experimental procedure. Consequently, a single “October” dataset was created for each soil sample by averaging replicates a, b and c to simplify the subsequent comparative analysis.

3.4. Comparative analysis of bacterial diversity

As mentioned previously, 635 distinct OTUs at 97% sequence similarity were calculated. A high number of OTUs corresponded to rare phylotypes since only 298 among 635 had a relative abundance >0.1% in at least one sample. These rare OTUs represented a minor

fraction of the communities since they accounted for 0.6 to 3.1% of the sequences in the samples (Table S1). Even at this depth of sequencing and even if the rarefaction curves were saturated, the real presence of these rare phylotypes in the communities remains questionable since we cannot exclude the possibility that they derive from artefact of extraction, PCR amplification, lack of depth in sequencing or sequencing errors. Consequently, these rare OTUs were not considered for the subsequent comparative analysis. When these rare OTUs were discarded, 21 bacterial phyla and 2 archaeal phyla were represented in the new dataset (Table S2).

A comparative analysis of the archaeal and bacterial communities across the samples was performed to assess the influence of RNs contamination on the diversity. The relative abundance of Bacteria and Archaea at the phylum level in the soil samples is given in Figure 3. The profiles retrieved for the trench samples as well as for the controls were broadly similar with *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* and *Planctomycetes* being predominant. Moreover, the trench samples were not separated from the controls by Principal Component Analysis (PCA) computed with the relative abundances of the different phyla. This indicates that at this high-rank taxonomic level, a possible RNs contamination which influences bacterial diversity is not detected (Figure 4A). To refine this analysis, a PCA based on the relative abundances of bacterial and archaeal OTUs at 97% was computed. As shown in Figure 4B, the first two principal components accounted for 73.3% of the variability between samples. In this case, except for samples 3_A and 4_O, the samples collected inside and outside the trench were clearly separated on the first axis of the PCA, which accounts for 61.5% of the total variability. This data demonstrate that RNs contamination had a significant impact on microbial communities through the modification of species composition and relative abundance. Based on the distribution of the OTUs on the PC1 axis, we identified those correlated with contaminated samples or with controls (Table S3). The OTUs having the lowest abscissa values were indicator species of the contaminated samples. The later were putatively identified as *Planctomycetaceae*, JG37-AG-4 (*Chloroflexi*), SAGMCG-1 (*Thaumarchaeota*), and *Burkholderia* (abscissa values ranging from -2.00 and -0.89). The OTUs having the highest abscissa values, which are indicator species of the control samples, were putatively identified as JG37-AG-4 (*Chloroflexi*), DA101 (*Chthoniobacterales*), MB-A2-108 (*Actinobacteria*) and 32-20 (*Acidobacteria*) (abscissa values ranging from 7.98 to 1.06). In addition, these OTUs exhibited all high relative abundance (Table S1).

These data evidenced that diverse phylogenetic microorganisms can adapt to the RNs contamination within the trench. Among them, OTUs related to *Planctomycetes*, to the clade

JG37-AG-4 of *Chloroflexi* and to the clade SAGMCG-1 of *Thaumarchaeota* were enriched in all the contaminated samples (Table S1). However, the metabolism of these microorganisms is still unknown since these clades have no cultured representatives. Here again, the importance of *Chloroflexi* in the bacterial communities of these soils was evidenced. Interestingly, two abundant OTUs, both affiliated to clade JG37-AG-4, were indicator species of either contaminated samples or controls. We can speculate that this particular feature could be the result of RNs contamination. These bacteria could correspond to species able to colonize successfully the soil after the accident which have diverged upon radiation exposure, leading to the emergence of distinct OTUs. This hypothesis is supported by three studies. The first two ones demonstrated the ability of *Chloroflexi* to recolonize soils after acute irradiations (El Sayed et al., 2009; McNamara et al., 2010). The third one was conducted by Ragon et al. (2011) on microbial biofilm communities submitted to different level of radiation in the Chernobyl area. They showed a positive correlation between the radiation dose (ranging from 0.35 to 25 $\mu\text{Sy}\cdot\text{h}^{-1}$) and the mutations rates but only in non-coding ITS regions and not in the 16S rRNA genes. In our case, the radiation doses are much higher (5 to 200 $\mu\text{Gy}\cdot\text{h}^{-1}$) and could have led to the accumulation of mutations in the 16S rRNA genes. This hypothesis could explain why the apparent diversity in contaminated samples was higher than in controls.

4. Conclusion

In this work, we explored the diversity of Bacteria and Archaea evolving since 25 years in RNs contaminated soils in the trench T22, located in the exclusion zone of Chernobyl. We assessed the effect of RNs exposure on microbial assemblages using a comparative analysis with control soils collected outside the trench in the same area. The high throughput pyrosequencing technique permitted to obtain one of the largest 16S rRNA-based dataset from soils which was sufficient to cover almost the full extent of taxonomic diversity. We first demonstrated the high reproducibility of the experiment by the study of triplicates for 9 different soil samples. Then, we confirmed the presence of highly diverse communities in and outside the contaminated trench. One most remarkable feature of these communities was the high relative abundance of *Chloroflexi*, which constitutes a unique signature of this area. We further demonstrated that more than 25 years of RNs exposure have shaped bacterial and archaeal communities in the soils by enhancing diversity and modifying species composition and abundance. Above all, microorganisms related to uncultured *Planctomycetes*, to the clade

JG37-AG-4 of *Chloroflexi* and to the clade SAGMGC-1 of *Thaumarchaeota* constitute an abundant population that has successfully colonized the trench.

References

- Aquilina L, Matray JM, Lancelot J. 2012. 25 years after the Chernobyl power plant explosion: Management of nuclear wastes and radionuclide transfer in the environment. *Applied Geochemistry* 27: 1291-1296
- Asker D, Awad TS, Beppu T, Ueda K. 2008. *Deinococcus misasensis* and *Deinococcus roseus*, novel members of the genus *Deinococcus*, isolated from a radioactive site in Japan. *Systematic and Applied Microbiology* 31: 43-49
- Avery SV, Codd GA, Gadd GM. 1992. Caesium transport in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*: Kinetics and evidence for uptake via ammonium transport system(s). *FEMS Microbiology Letters* 95, 253-258
- Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P. 2008. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nature Review in Microbiology* 6: 245-52
- Bugai D, Kashparov V, Dewiére L, Khomutinin Y, Levchuk S, Yoschenko V. 2005. Characterization of subsurface geometry and radioactivity distribution in the trench containing Chernobyl clean-up wastes. *Environmental Geology* 47: 869-881
- Chapon V, Piette L, Vesvres MH, Coppin F, Marrec CL, Christen R, Theodorakopoulos N, Février L, Levchuk S, Martin-Garin A, Berthomieu C, Sergeant C. 2012. Microbial diversity in contaminated soils along the T22 trench of the Chernobyl experimental platform. *Applied Geochemistry* 27: 1375-1383
- Chien C, Kuo Y, Chen C, Hung C, Yeh C, Yeh W. 2008. Microbial diversity of soil bacteria in agricultural field contaminated with heavy metals. *Journal of Environmental Sciences* 20: 359-363
- Claesson MJ, O'Sullivan O, Wang Q, Nikkilä J, Marchesi JR, Smidt H, de Vos WM, Ross RP, O'Toole PW. 2009. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS ONE* 4: e6669
- Czirják GA, Møller AP, Mousseau TA, Heeb P. 2010. Microorganisms associated with feathers of barn swallows in radioactively contaminated areas around Chernobyl. *Microbiol Ecology* 60: 373-80
- Dowd SE, Callaway TR, Wolcott RD, Sun Y, McKeenan T, Hagevoort RG, Edrington TS. 2008. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiology* 8: 125

- El-Sayed WS, Ghanem S. Bacterial Community Structure Change Induced by Gamma Irradiation in Hydrocarbon Contaminated and Uncontaminated Soils Revealed by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Biotechnology* 8: 78-85
- Garcia-Moyano A, Gonzalez-Toril E, Aguilera A, Amils R. (2012) Rio Tinto Comparative microbial ecology study of the sediments and the water column of the Rio Tinto, an extreme acidic environment. *FEMS Microbiology Ecology* 81: 303-314
- Hu QH, Weng JQ, Wang JS. 2008, Sources of anthropogenic radionuclides in the environment: a review. *Journal of Environmental Radioactivity* 101: 426-37
- I.A.E.A. 2006. Environmental consequences of the Chernobyl accident and their remediation: twenty years of experience. In: Radiological Assessment Report Series, Report of the Chernobyl Forum Expert Group 'Environment'. Vienna.
- Janssen PH. 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1719-1728.
- Kirchner G, Strebl F, Bossew P, Ehlken S, Gerzabek MH. 2009. Vertical migration of radionuclides in undisturbed grassland soils. *Journal of Environmental Radioactivity* 100: 716-720
- Kunin V, Engelbrektson A, Ochman H, Hugenholtz P. 2010. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology* 12: 118-123
- Lloyd JR, Macaskie LE. 2002. Chapter 11 Biochemical basis of microbe-radionuclide interactions, In: Keith-Roach MJ, Livens FR. (Eds.) *Radioactivity in the Environment*. Elsevier, 313-342
- McNamara, N.P., R.I. Griffiths, A. Tabouret, N.A. Beresford, M.J. Bailey and A.S. Whiteley, 2007. The sensitivity of a forest soil microbial community to acute gamma-irradiation. *Applied Soil Ecol.*, 37: 1-9
- Mondani L, Benzerara K, Carrière M, Christen R, Mamindy-Pajany Y, Février L, Marmier N, Achouak W, Nardoux P, Berthomieu C, Chapon V. 2011. Influence of Uranium on Bacterial Communities: A Comparison of Natural Uranium-Rich Soils with Controls. *PLoS ONE* 6: e25771
- Murphy JF, Nagorskaya LL, Smith JT. 2011. Abundance and diversity of aquatic macroinvertebrate communities in lakes exposed to Chernobyl-derived ionising radiation. *Journal of Environmental Radioactivity* 102: 688-694

- Nakamaru Y, Ishikawa N, Tagami K, Uchida S. 2007. Role of soil organic matter in the mobility of radiocesium in agricultural soils common in Japan. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 306: 111-117
- Pester M, Schleper C, Wagner M. 2012. The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current Opinion in Microbiology* 14: 300-306
- Ragon M, Restoux G, Moreira D, Møller AP, López-García P. 2011. Sunlight-exposed biofilm microbial communities are naturally resistant to Chernobyl ionizing-radiation levels. *PLoS One* 6(7): e21764
- Rainey FA, Ray K, Ferreira M, Gatz BZ, Nobre MF, Bagaley D, Rash BA, Park MJ, Earl AM, Shank NC, Small AM, Henk MC, Battista JR, Kämpfer P, da Costa MS. 2005. Extensive Diversity of Ionizing-Radiation-Resistant Bacteria Recovered from Sonoran Desert Soil and Description of Nine New Species of the Genus *Deinococcus* Obtained from a Single Soil Sample. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5225-5235
- Rastogi G, Stetler L, Peyton B, Sani R. 2009. Molecular analysis of prokaryotic diversity in the deep subsurface of the former Homestake gold mine, South Dakota, USA. *The Journal of Microbiology* 47: 371-384
- Romanovskaya VA, Sokolov IG, Rokitko PV, Chernaya NA. 1998. Ecological consequences of radioactive pollution for soil bacteria within the 10-km region around the Chernobyl Atomic Energy Station. *Mikrobiologiya* 67: 274-280
- Romanovskaya, V.A., P.V. Rokitko, Y.R. Malashenko, T.P. Krishtab and N.A. Chernaya, 1999. Sensitivity of soil bacteria isolated from the alienated zone around the Chernobyl nuclear power plant to various stress factors. *Mikrobiologiya* 68: 465-469
- Romanovskaya VA, Rokitko PV, Malashenko Iu R. 2000. Unique properties of highly radioresistant bacteria. *Mikrobiologiya Z* 62: 40-63
- Sawidis T, Drossos E, Heinrich G, Papastefanou C. 1990. Cesium-137 accumulation in higher plants before and after Chernobyl. *Environment International* 16: 163-169
- Selenska-Pobell, S. 2002. Chapter 8 Diversity and activity of bacteria in uranium waste piles, In: Keith-Roach, M.J., Livens, F.R. (Eds.) *Radioactivity in the Environment*. Elsevier, 225-254
- Theodorakopoulos N, Bachar D, Christen R, Alain K, Chapon V. 2013. Exploration of *Deinococcus-Thermus* molecular diversity by novel group-specific PCR primers. *Microbiologyopen*. 2(5): 862-72

- Yasunari TJ, Stohl A, Hayano RS, Burkhart JF, Eckhardt S, Yasunari T. 2011. Cesium-137 deposition and contamination of Japanese soils due to the Fukushima nuclear accident. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 19530-19534
- Yergeau E, Bokhorst S, Kang S, Zhou J, Greer CW, Aerts R, Kowalchuk GA. 2012. Shifts in soil microorganisms in response to warming are consistent across a range of Antarctic environments *ISME Journal* 6: 692-702
- Zavilgelsky GB, Abilev SK, Sukhodolets VV, Ahmad SI. 1998. Isolation and analysis of UV and radio-resistant bacteria from Chernobyl. *Journal of Photochemical and Photobiology B* 43: 152–157. doi: 10.1016/s1011-1344(98)00099-2
- Zhou ZJ, Yin HQ, Liu Y, Xie M, Qiu GZ, Liu XD. 2010. Diversity of microbial community at acid mine drainages from Dachang metals-rich mine, China. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China* 20, 1097-1103

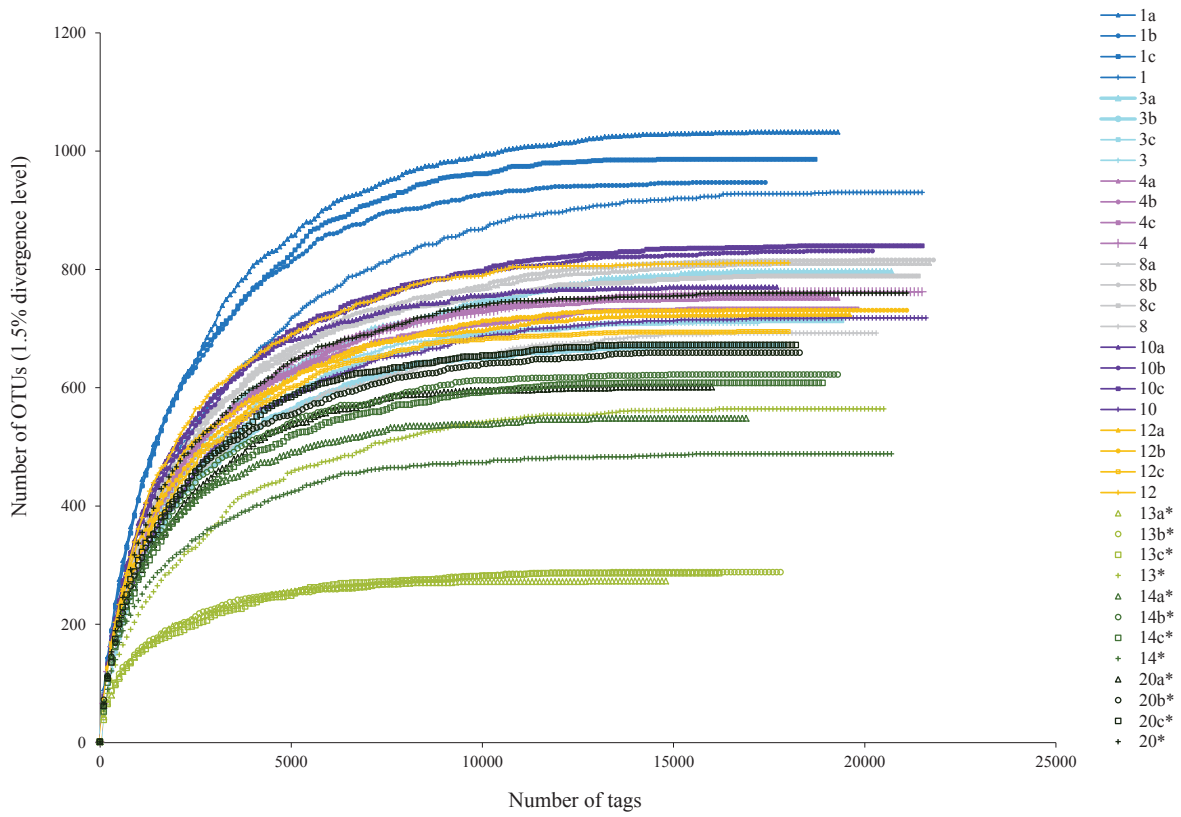


Figure 1. Rarefaction curves generated from 16S rRNA genes sequences clustered at genetic distance of 3%.

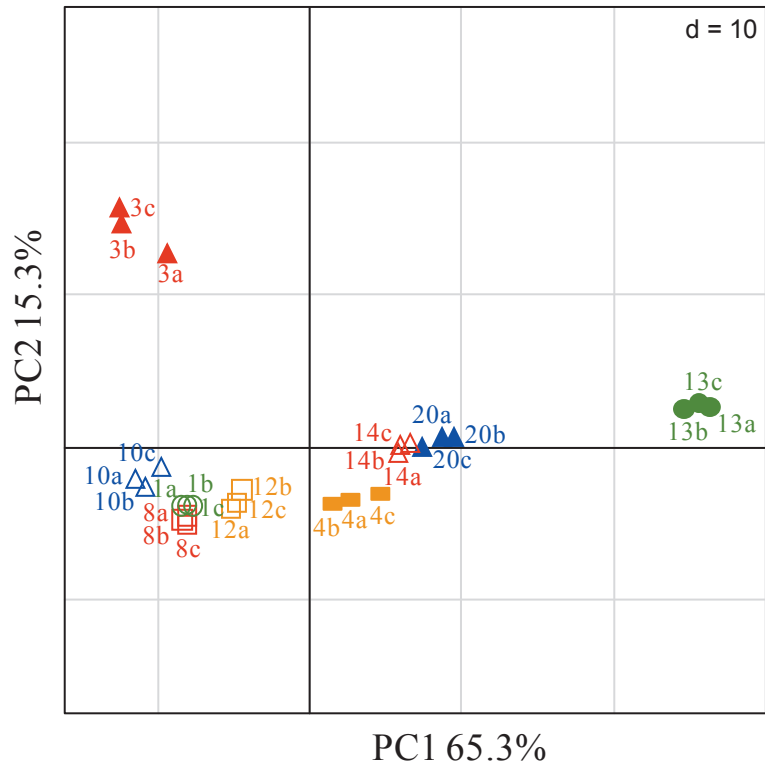


Figure 2. PCA computed from relative abundance matrices of OTUs at 97% sequence similarity of triplicates samples (a, b and c).

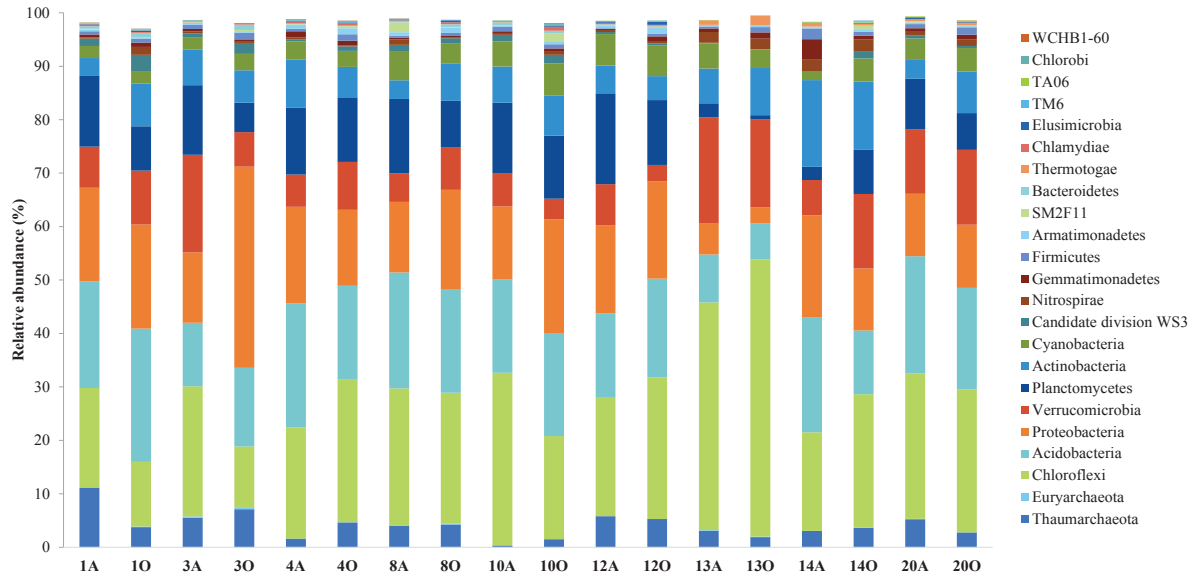


Figure 3. Relative abundance of bacterial and archaeal phyla in the Chernobyl soils samples when rare OTUs (<0,1% in all samples) are not considered.

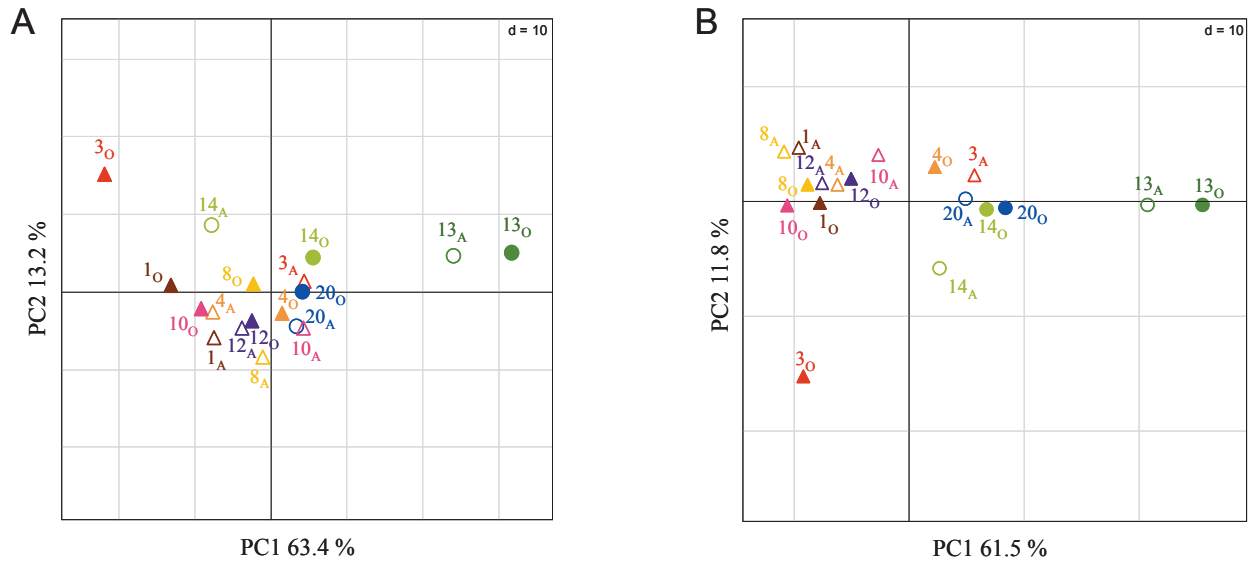


Figure 4. PCA computed from relative abundance of phylum (A) and OTUs at 97% sequence similarity (B) in the Chernobyl soil samples collected in April (sample_A) and October (sample_O).

Table 1. Physico-chemicals and technical parameters recorded on the different soil samples

Soil samples	¹³⁷ Cs (Bq/g)	pH	Corg	Subsample	Total number of tag sequences	Archaea (%)	Bacteria (%)
1 _A	420	5.1	2.56		19617	11.2	88.8
1 _O	420	4.8	2.61	a	19277	4.2	95.8
				b	17397	3.9	96.2
				c	18715	3.6	96.4
3 _A	300	5.6	1.48		17294	3.3	96.8
3 _O	750	5	1.77	a	20657	2.4	97.6
				b	17894	1.8	98.2
				c	19356	1.8	98.2
4 _A	61	5.4	0.49		21498	3.1	97.0
4 _O	140	4.8	0.88	a	19369	3.8	96.2
				b	19009	3.7	96.3
				c	19868	3.7	96.3
8 _A	640	5.2	4.12		20352	5.4	94.7
8 _O	670	4.5	2.93	a	21717	2.7	97.3
				b	21740	3.1	96.9
				c	21335	2.5	97.5
10 _A	290	4.7	2.15		21650	5.8	94.2
10 _O	710	4.9	2.77	a	17703	6.6	93.5
				b	20187	8.3	91.7
				c	21544	7.2	92.8
12 _A	260	5.4	1.16		17975	1.6	98.4
12 _O	370	4.4	1.48	a	19560	5.5	94.5
				b	21030	4.1	95.9
				c	18054	4.4	95.6
13 _A	0.37	6.1	0.16		18602	3.7	96.3
13 _O	1.5	4.3	0.12	a	14869	5.5	94.6
				b	17868	4.5	95.5
				c	16272	3.3	96.7
14 _A	0.91	6.1	0.1		20737	0.3	99.7
14 _O	0.79	4.8	0.34	a	16880	1.6	98.4
				b	19274	1.2	98.9
				c	18927	1.7	98.3
20 _A	0.35	5.4	1.99		21150	5.8	94.2
20 _O	0.54	4.5	1.96	a	15999	5.5	94.5
				b	18365	4.4	95.7
				c	18282	6.0	94.0

Table 2. Relative abundances of bacterial and archaeal phyla in Chernobyl soils

Domain	Phylum	Relative abundance (%)
Archaea	Thaumarchaeota	4,2
Archaea	Euryarchaeota	0,1
Bacteria	Chloroflexi	25,5
Bacteria	Acidobacteria	17,6
Bacteria	Proteobacteria	16,3
Bacteria	Verrucomicrobia	9,7
Bacteria	Planctomycetes	9,6
Bacteria	Actinobacteria	7,3
Bacteria	Cyanobacteria	4,0
Bacteria	Nitrospirae	0,9
Bacteria	Firmicutes	0,9
Bacteria	Gemmatimonadetes	0,8
Bacteria	Candidate division TM7	0,6
Bacteria	Armatimonadetes	0,5
Bacteria	SM2F11	0,3
Bacteria	Bacteroidetes	0,3
Bacteria	Chlamydiae	0,3
Bacteria	Thermotogae	0,3
Bacteria	Elusimicrobia	0,2
Bacteria	Candidate division OP11	0,1
Bacteria	Candidate division WS3	0,1
Bacteria	TM6	0,1
Bacteria	Candidate division OD1	0,1
Bacteria	TA06	0,1
Bacteria	Chlorobi	0,1
Bacteria	WCHB1-60	<0,05
Bacteria	BHI80-139	<0,05
Bacteria	Deinococcus-Thermus	<0,05
Bacteria	Candidate division WS6	<0,05
Bacteria	Candidate division OP3	<0,01
Bacteria	Synergistetes	<0,01
Bacteria	HDB-SIOH1705	<0,01
Bacteria	BD1-5	<0,01
Bacteria	Fibrobacteres	<0,01
Bacteria	Tenericutes	<0,01
Bacteria	NPL-UPA2	<0,01

Table S1. Relative abundance of OTUs at 97% sequence similarity. Rare OTUs (<0,1%) are highlighted in grey.

OTU	Domain	Phylum	Class	Order	Family	Genus	1A	1B	3A	3B	4A	4B	8A	8B	10A	10B	12A	12B	13A	13B	14A	14B	20A	20B	max	
OTU244	Bacteria	Chloroflexi	JG37-AG-4	JG37-AG-4	JG37-AG-4	unc. bact.	1.79	2.02	11.71	2.33	2.83	12.89	2.15	2.94	12.04	1.50	5.27	7.80	24.11	31.67	9.85	12.49	13.68	16.59	31.67	
OTU624	Bacteria	Verrucomicrobia	Spartobacteria	Chthoniobacterales	DA101 soil group	Chtoniobacterales	2.52	2.64	13.60	2.23	4.85	6.58	0.21	1.92	1.09	0.15	1.33	0.89	18.31	15.98	5.93	9.83	9.46	11.36	18.31	
OTU508	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	0.02	0.01	1.07	15.12	0.00	0.01	0.00	0.19	0.41	2.00	3.21	1.66	0.29	0.00	1.61	0.56	0.54	0.77	15.12	
OTU397	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	unc.	10.20	5.27	10.82	3.08	10.12	10.50	10.37	6.20	9.97	8.90	11.67	9.33	2.14	0.65	2.19	5.17	7.60	5.73	11.67	
OTU245	Bacteria	Chloroflexi	JG37-AG-4	JG37-AG-4	JG37-AG-4	unc. Chloroflexi bact.	3.33	1.72	4.12	0.97	4.14	4.01	2.24	1.92	3.45	2.60	1.85	4.17	9.13	10.98	6.61	7.79	2.70	3.40	10.98	
OTU51	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria	DA052	DA052	unc. bact.	3.89	4.25	2.81	5.67	4.67	4.62	4.47	5.03	3.74	4.89	3.56	4.90	5.3	18.8	10.64	2.62	7.88	5.77	10.64	
OTU422	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobaceae	Nitrobacter	0.00	0.00	1.14	8.02	1.60	0.60	1.29	2.32	1.57	3.62	2.16	1.72	0.38	0.11	3.40	1.86	1.25	1.57	8.02	
OTU8	Archaea	Thaumarchaeota	South African Gold Mine Cp 1 (SAGMCG-1)	South African Gold Mine Cp 1 (SAGMCG-1)	South African Gold Mine Cp 1 (SAGMCG-1)	unc. crenarchaeote	7.39	2.06	0.58	3.91	0.40	0.40	1.69	1.72	0.14	1.01	0.40	1.97	0.04	0.00	0.00	0.53	1.08	0.05	7.39	
OTU26	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriales	unc.	4.27	6.32	2.96	3.72	5.50	4.90	3.26	4.66	7.38	3.83	4.01	4.95	1.99	1.91	3.27	3.32	3.54	3.56	7.38	
OTU247	Bacteria	Chloroflexi	JG37-AG-4	JG37-AG-4	JG37-AG-4	unc. forest soil bact.	3.42	0.03	0.02	1.11	2.57	0.02	5.36	6.25	6.18	3.99	3.65	4.52	0.02	0.00	0.00	0.02	0.00	0.02	0.04	6.25
OTU17	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria	nov-24	nov-24	unc. bact.	0.03	0.32	0.04	0.01	0.10	0.34	5.33	0.50	0.03	1.15	0.46	0.54	0.00	0.00	0.09	0.01	0.21	0.18	5.33	
OTU142	Bacteria	Actinobacteria	MB-A2-108	MB-A2-108	MB-A2-108	unc. bact.	0.00	1.97	1.05	0.97	5.33	0.98	0.00	0.00	0.00	0.01	0.39	0.44	3.00	4.36	2.36	4.58	1.30	3.85	5.33	
OTU79	Bacteria	Actinobacteria	Holophagae	iii-8	iii-8	unc. candidate division OS-K bact.	0.08	0.89	0.18	0.24	0.62	0.59	0.00	0.17	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.02	0.21	2.21	0.14	4.62	0.62	
OTU294	Bacteria	Chloroflexi	TK10	TK10	TK10	unc. bact.	1.10	1.52	2.32	0.94	4.51	2.89	2.62	1.60	2.43	1.41	2.49	2.62	1.06	0.48	0.10	1.16	3.54	2.17	4.51	
OTU449	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	unc.	1.64	2.53	3.09	2.13	2.04	2.63	2.69	2.33	2.17	1.13	2.74	3.21	0.23	0.53	4.37	2.16	1.42	1.70	4.37	
OTU514	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	Simplicispira	0.16	0.03	0.00	0.00	0.03	0.00	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.42	
OTU525	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	unc.	0.56	1.67	0.35	1.00	3.84	1.14	0.00	0.09	0.09	0.11	0.09	0.20	0.05	0.10	0.22	0.10	1.08	1.18	3.84	
OTU364	Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadaceae	unc.	0.47	0.64	0.44	0.21	0.90	0.66	0.16	0.23	0.26	0.26	0.21	0.48	0.69	1.16	3.81	0.67	0.60	0.81	3.81	
OTU629	Bacteria	Verrucomicrobia	Spartobacteria	Chthoniobacterales	Fukui18 freshwater group	unc. bact.	0.00	3.78	0.00	1.14	0.00	0.01	0.00	0.05	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.12	0.47	0.00	0.00	3.78	
OTU298	Bacteria	Chloroflexi	TK10	TK10	TK10	unc. soil bact.	0.29	0.46	0.23	0.15	0.37	0.42	1.18	0.78	0.53	0.12	0.58	0.41	2.00	3.64	0.50	0.67	0.44	0.67	3.64	
OTU612	Bacteria	Verrucomicrobia	OPB35 soil group	OPB35 soil group	OPB35 soil group	unc. bact.	2.77	1.12	0.21	0.89	0.24	0.20	3.56	1.70	1.46	1.91	3.19	0.55	0.02	0.03	0.01	0.21	0.22	0.21	3.56	
OTU632	Bacteria	Verrucomicrobia	Spartobacteria	Chthoniobacterales	Xiphinematobacteraceae	Candidatus Xiphinematobacter	0.95	0.78	3.34	1.29	0.65	1.92	1.09	3.44	3.25	1.08	2.45	1.45	0.82	0.27	0.22	2.36	1.89	2.38	3.44	
OTU307	Bacteria	Cyanobacteria	WD272	WD272	WD272	unc. bact.	1.29	1.77	1.11	0.34	0.88	1.12	2.90	2.44	2.34	3.13	3.24	3.01	3.21	1.71	1.33	3.05	2.01	2.07	3.24	
OTU72	Bacteria	Acidobacteria	Holophagae	32-20	32-20	unc. bact.	0.00	0.24	0.19	0.07	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	2.95	1.50	1.65	0.12	1.21	3.11	3.11	
OTU585	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Sinobacteraceae	unc.	1.51	2.06	0.73	1.56	0.56	0.95	2.32	3.01	1.19	2.33	2.25	2.45	2.07	0.45	1.56	1.04	1.07	3.01	3.01	
OTU281	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Thermogemmatisporales	Thermogemmatisporales	unc. bact.	1.47	0.43	0.50	0.05	0.48	0.42	1.94	3.00	0.88	1.20	0.98	0.75	0.03	0.02	0.00	0.06	0.52	0.07	3.00	
OTU101	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Mycobacteriaceae	Mycobact.	0.23	0.30	1.07	0.71	0.04	0.24	0.29	1.02	1.86	0.46	1.40	0.67	1.03	0.87	2.90	2.83	0.27	0.74	2.90	
OTU56	Bacteria	Acidobacteria	DA052	DA052	DA052	unc. forest soil bact.	2.89	1.87	0.34	0.37	0.57	0.93	2.00	0.63	1.41	2.08	0.13	0.41	1.07	0.11	0.19	0.10	0.22	0.20	2.89	
OTU4	Archaea	Thaumarchaeota	Soil Crenarchaeotic Group (SCG)	Soil Crenarchaeotic Group (SCG)	Soil Crenarchaeotic Group (SCG)	unc. crenarchaeote	0.92	0.76	2.82	1.38	0.72	2.68	0.46	1.22	0.06	0.04	1.40	1.07	0.36	0.41	0.87	0.65	0.91	0.45	2.82	
OTU10	Archaea	Thaumarchaeota	terrestrial group	terrestrial group	terrestrial group	unc. crenarchaeote	1.95	0.83	1.55	0.68	0.40	1.25	1.04	0.08	0.19	2.80	1.66	1.28	0.17	0.52	1.47	1.31	0.97	2.80		
OTU279	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Thermosporichthaceae	unc. Ktedobacteria bact.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.70	0.00	0.00	0.00	0.00	2.70		
OTU270	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	JG30a-KF-32	unc. bact.	1.05	0.11	0.19	0.20	0.99	0.53	2.65	1.56	0.64	1.93	1.06	1.68	0.82	0.06	0.00	0.02	0.57	0.16	2.65	
OTU310	Bacteria	Cyanobacteria	WD272	WD272	WD272	unc. forest soil bact.	0.54	0.28	0.50	2.35	1.37	1.16	2.14	1.11	1.77	2.55	2.37	1.76	1.18	0.42	0.05	0.13	0.96	1.00	2.55	
OTU421	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobium	Bradyrhizobium	2.43	1.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.43		
OTU80	Bacteria	Acidobacteria	Holophagae	iii-8	iii-8	unc. proteobact.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.24	2.39	0.71	0.76	1.10	2.39		
OTU40	Bacteria	Acidobacteria	DA023	DA023	DA023	unc. bact.	1.64	2.39	1.34	1.74	2.17	1.75	0.43	0.67	0.53	0.76	0.89	0.94	0.38	0.04	0.56	0.57	0.69	1.16	2.39	
OTU450	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	unc. bact.	2.33	0.01	0.00	0.00	0.10	0.10	0.00	0.08	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.33	
OTU394	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Planctomycetes	1.46	0.95	0.93	0.96	0.81	0.40	1.62	1.12	2.13	1.57	1.55	1.14	0.06	0.06	0.05	1.37	0.47	0.28	2.13	
OTU149	Bacteria	Actinobacteria	Thermoleophilina	Thermoleophilina	AKIWS43	AKIWS43	0.36	1.01	0.91	0.47	0.46	0.86	0.15	0.11	0.22	0.05	0.00	0.15	0.32	0.84	0.12	1.29	0.22	0.43	2.12	
OTU65	Bacteria	Acidobacteria	Order Incertae Sedis	Order Incertae Sedis	Family Incertae Sedis	Bryobacter	1.27	1.17	0.44	0.66	0.84	0.66	1.38	1.23	0.68	1.35	1.08	2.05	1.01	0.12	0.60	0.65	1.48	1.00	0.05	
OTU161	Bacteria	Actinobacteria	Thermoleophilina	Thermoleophilina	TM146	unc. Actinomycetales bact.	0.13	0.05	0.45	0.10	0.33	0.46	0.31	0.41	0.47	0.26	0.08	0.09	0.16	0.31	2.04	0.29	0.13	0.22	2.04	
OTU597	Bacteria	SM2F11	SM2F11	SM2F11	SM2F11	unc. bact.	0.17	0.18	0.05	0.39	0.11	0.39	1.85	0.08	0.04	1.67	0.05	0.21	0.00	0.01	0.73	0.20	0.07	1.85		
OTU273	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	bact. SOSP 1-142	bact. SOSP 1-142	0.30	0.23	0.09	1.85	0.10	0.19	0.20	0.29	0.26	0.65	0.19	0.39	0.03	0.00	0.00	0.00	0.12	0.00	1.85	
OTU369	Bacteria	Nitrosipirae	Nitrosipirae	Nitrosipirales	0319-6A21	unc. bact.	0.08	0.80	0.13	0.09	0.66	0.05	0.00	0.01	0.00	0.00	0.10	1.11	1.85	1.62	1.10	1.54	0.08	0.83	1.85	
OTU240	Bacteria	Chloroflexi	JG30-KF-CM66	JG30-KF-CM66	JG30-KF-CM66	unc. bact.	1.82	1.33	0.42	0.03	0.47	0.55														

Chapitre 4 : étude de la biodiversité bactérienne par pyroséquençage 454

OTU21	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidobact.	0.57	0.24	0.11	0.20	0.01	0.07	0.44	0.64	0.29	0.71	0.97	0.15	0.15	0.01	0.00	0.14	0.02	0.00	0.97
OTU373	Bacteria	Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	Nitrospiraceae	Nitrospira	0.00	0.47	0.14	0.17	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16	0.33	0.97	0.40	0.23	0.36	0.97	
OTU207	Bacteria	Candidate division OP11	Candidate division OP11	Candidate division OP11	Candidate division OP11	unc. bact.	0.02	0.06	0.02	0.00	0.00	0.04	0.02	0.06	0.26	0.03	0.02	0.02	0.07	0.00	0.97	0.44	0.18	0.97	
OTU38	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria	DA023	DA023	unc. Acidobacteria bact.	0.95	0.50	0.24	0.23	0.39	0.45	0.12	0.20	0.00	0.22	0.17	0.20	0.02	0.00	0.02	0.03	0.00	0.02	0.95
OTU141	Bacteria	Actinobacteria	MB-A2-108	MB-A2-108	MB-A2-108	unc. actinobact.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.20	0.95	0.16	0.07	0.04	0.95
OTU329	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	Geobacillus	0.02	0.01	0.00	0.01	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.07	0.93	0.02	0.00	0.02	0.93
OTU173	Bacteria	Armatimonadetes	Armatimonadetes	Armatimonadetes	Armatimonadetes	unc. bact. #0319-6E2	0.00	0.00	0.18	0.03	0.63	0.93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.93
OTU528	Bacteria	Protobacteriia	Betaproteobacteria	SC1-84	SC1-84	unc. bact.	0.92	0.52	0.14	0.09	0.71	0.92	0.79	0.52	0.67	0.89	0.24	0.89	0.00	0.00	0.00	0.01	0.06	0.06	0.92
OTU391	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Isoophara	0.32	0.13	0.64	0.26	0.56	0.31	0.16	0.13	0.23	0.19	0.92	0.32	0.10	0.09	0.07	0.52	0.54	0.29	0.92
OTU34	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria	Candidatus Solibacter	Candidatus Solibacter	unc. bact.	0.77	0.77	0.43	0.34	0.58	0.33	0.45	0.69	0.43	0.73	0.29	0.71	0.13	0.08	0.58	0.47	0.92	0.40	0.92
OTU627	Bacteria	Verrucomicrobia	Spartobacteria	Chthoniobacterales	DA101 soil group	unc. Verrucomicrobia bact.	0.91	0.19	0.12	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.09	0.34	0.07	0.28	0.21	0.09	0.02	0.91
OTU285	Bacteria	Chloroflexi	S085	S085	S085	unc. bact.	0.20	0.24	0.08	0.05	0.08	0.03	0.14	0.02	0.05	0.08	0.02	0.03	0.00	0.00	0.06	0.39	0.91	0.91	0.91
OTU172	Bacteria	Armatimonadetes	Armatimonadetes	Armatimonadetes	Armatimonadetes	unc. bact.	0.28	0.10	0.21	0.05	0.12	0.14	0.59	0.90	0.15	0.37	0.32	0.81	0.12	0.28	0.23	0.33	0.26	0.21	0.90
OTU301	Bacteria	Cyanobacteria	MLE1-12	MLE1-12	MLE1-12	unc. bact.	0.16	0.19	0.39	0.06	0.78	0.50	0.25	0.13	0.34	0.17	0.24	0.43	0.15	0.11	0.12	0.76	0.73	0.88	0.88
OTU47	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria	DA023	DA023	unc. soil bact.	0.05	0.03	0.56	0.35	0.77	0.31	0.02	0.57	0.01	0.02	0.87	0.69	0.00	0.03	0.42	0.14	0.05	0.26	0.87
OTU459	Bacteria	Protobacteriia	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	unc.	0.23	0.21	0.21	0.32	0.30	0.53	0.10	0.12	0.12	0.38	0.31	0.38	0.84	0.01	0.00	0.15	0.05	0.01	0.84
OTU103	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Corynebacteriales	unc. bact.	0.09	0.20	0.36	0.34	0.04	0.12	0.15	0.29	0.84	0.17	0.28	0.24	0.15	0.00	0.04	0.61	0.20	0.62	0.84
OTU277	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacteriales	Thermosporotrichaceae	Thermosporotrix	0.33	0.20	0.10	0.08	0.23	0.12	0.12	0.27	0.47	0.15	0.83	0.09	0.00	0.16	0.00	0.12	0.04	0.00	0.83
OTU93	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobia	Acidimicrobiales	Acidimicrobiales	TM214	0.36	0.10	0.05	0.05	0.19	0.22	0.51	0.47	0.49	0.83	0.34	0.33	0.02	0.00	0.10	0.00	0.02	0.83	
OTU268	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacteriales	HSB OF53-F07	unc. bact.	0.04	0.11	0.08	0.00	0.08	0.07	0.57	0.19	0.04	0.28	0.08	0.12	0.21	0.83	0.02	0.04	0.21	0.06	0.83
OTU594	Bacteria	Protobacteriia	TA18	TA18	unc. Acidobacteria bact.	0.30	0.82	0.00	0.00	0.04	0.02	0.18	0.05	0.47	0.33	0.00	0.23	0.00	0.01	0.31	0.00	0.02	0.01	0.02	0.00
OTU295	Bacteria	Chloroflexi	FK10	FK10	unc. Chloroflexi bact.	0.12	0.08	0.50	0.02	0.00	0.12	0.43	0.19	0.57	0.81	0.17	0.16	0.06	0.00	0.00	0.03	0.02	0.06	0.81	0.81
OTU280	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacteriales	Thermosporotrichaceae	unc. soil bact.	0.48	0.12	0.12	0.79	0.27	0.13	0.29	0.56	0.26	0.42	0.26	0.30	0.02	0.10	0.02	0.06	0.15	0.09	0.79
OTU138	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Streptosporangiales	Thermomonosporaceae	Actinoosoralla	0.05	0.04	0.03	0.78	0.04	0.04	0.02	0.08	0.19	0.17	0.02	0.16	0.03	0.11	0.00	0.00	0.00	0.06	0.78
OTU406	Bacteria	Protobacteriia	Alphaproteobacteria	Caulobacteriales	Caulobacteriales	unc.	0.08	0.11	0.02	0.45	0.12	0.11	0.22	0.16	0.40	0.78	0.15	0.26	0.08	0.00	0.02	0.00	0.06	0.78	
OTU153	Bacteria	Actinobacteria	Thermolophilina	AKIW543	AKIW543	unc. soil bact.	0.03	0.07	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.04	0.78	0.15	0.09	0.15	0.78	
OTU98	Bacteria	Actinobacteria	Actinospira	Catenulisporales	Actinospira	unc.	0.00	0.06	0.00	0.03	0.00	0.01	0.04	0.76	0.01	0.05	0.19	0.04	0.08	0.02	0.00	0.10	0.00	0.06	0.76
OTU526	Bacteria	Protobacteriia	Betaproteobacteria	Rhodocyclales	Rhodocyclales	Azospira	0.02	0.05	0.13	0.01	0.73	0.32	0.00	0.02	0.00	0.02	0.00	0.02	0.01	0.00	0.00	0.14	0.08	0.73	
OTU262	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacteriales	1921-3	unc. bact.	0.23	0.16	0.13	0.03	0.27	0.69	0.45	0.33	0.10	0.08	0.04	0.17	0.03	0.36	0.09	0.11	0.20	0.06	0.69
OTU625	Bacteria	Verrucomicrobia	Spartobacteria	Chthoniobacteriales	DA101 soil group	unc. organism	0.00	0.68	0.60	0.31	0.04	0.09	0.00	0.02	0.03	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.29	0.00	0.68	
OTU169	Bacteria	Actinobacteria	Thermolophilina	YNPFFP1	YNPFFP1	unc. bact.	0.10	0.18	0.34	0.13	0.08	0.38	0.05	0.44	0.23	0.33	0.20	0.21	0.44	0.56	0.66	0.37	0.05	0.14	0.66
OTU336	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Paenibacillaceae	Paenibacillus	0.17	0.21	0.19	0.60	0.05	0.29	0.07	0.27	0.15	0.29	0.03	0.24	0.09	0.61	0.65	0.47	0.14	0.63	0.65
OTU375	Bacteria	Planctomycetes	BD7-11	BD7-11	BD7-11	unc. bact.	0.13	0.16	0.20	0.16	0.65	0.27	0.07	0.20	0.05	0.23	0.20	0.60	0.00	0.16	0.52	0.27	0.26	0.65	
OTU530	Bacteria	Protobacteriia	Betaproteobacteria	SC1-84	SC1-84	unc. Burkholderiaceae bact.	0.65	0.09	0.04	0.00	0.09	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.65
OTU575	Bacteria	Protobacteriia	Gammaproteobacteria	Gammaproteobacteriales	Haliomonadaceae	Haliomonas	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.65
OTU515	Bacteria	Protobacteriia	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Comamonadaceae	unc.	0.10	0.09	0.44	0.02	0.58	0.64	0.03	0.10	0.10	0.02	0.05	0.09	0.00	0.04	0.07	0.47	0.34	0.64	
OTU22	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Candidatus Koribacter	0.06	0.08	0.02	0.02	0.04	0.02	0.06	0.03	0.06	0.15	0.08	0.22	0.07	0.00	0.00	0.64	0.00	0.02	0.64
OTU475	Bacteria	Protobacteriia	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	JG37-AG20	unc. bact.	0.06	0.01	0.00	0.11	0.00	0.02	0.15	0.25	0.06	0.63	0.15	0.12	0.00	0.00	0.02	0.02	0.06	0.05	0.63
OTU189	Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Chitinophagaceae	unc.	0.40	0.63	0.04	0.41	0.06	0.02	0.18	0.42	0.39	0.28	0.15	0.11	0.00	0.00	0.10	0.00	0.09	0.63	
OTU284	Bacteria	Chloroflexi	P2-11E	P2-11E	P2-11E	unc. Chloroflexi bact.	0.04	0.06	0.04	0.00	0.11	0.05	0.06	0.00	0.62	0.08	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.62
OTU132	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Streptomycetales	Streptomycetales	Streptomyces	0.13	0.62	0.15	0.42	0.14	0.21	0.02	0.15	0.11	0.28	0.21	0.05	0.03	0.07	0.51	0.11	0.21	0.29	0.62
OTU420	Bacteria	Protobacteriia	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiaceae	unc.	0.00	0.10	0.36	0.01	0.06	0.08	0.00	0.05	0.03	0.01	0.04	0.13	0.61	0.00	0.15	0.13	0.30	0.61	
OTU224	Bacteria	Chlamydiae	Chlamydiae	Chlamydiales	Smiknaciae	Candidatus Rhabdochlamydia	0.27	0.04	0.02	0.05	0.19	0.31	0.00	0.27	0.05	0.60	0.14	0.08	0.00	0.00	0.03	0.04	0.09	0.60	
OTU427	Bacteria	Protobacteriia	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Family Incertae Sedis	Rhizomicrobium	0.46	0.42	0.02	0.59	0.16	0.07	0.12	0.37	0.38	0.45	0.10	0.10	0.00	0.00	0.09	0.04	0.07	0.59	
OTU73	Bacteria	Acidobacteria	Holophaga	32-20	32-20	unc. proteobact.	0.02	0.06	0.07	0.01	0.27	0.59	0.00	0.02	0.00	0.00	0.07	0.02	0.05	0.01	0.00	0.04	0.11	0.15	0.59
OTU110	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Dermatophilales	Dermatophilales	Dermatophilus	0.43	0.37	0.24	0.17	0.31	0.01	0.30	0.29	0.01	0.58	0.19	0.18	0.29	0.33	0.37	0.29	0.32	0.14	0.58
OTU547	Bacteria	Protobacteriia	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacteriaceae	Cystobacteriaceae	0.06	0.03	0.14	0.13	0.15	0.10	0.04	0.01	0.07	0.13	0.07	0.09	0.15	0.04	0.56	0.18	0.11	0.47	0.56
OTU568	Bacteria	Protobacteriia	Deltaproteobacteria	Legionellales	Coxiellaceae	Coxiella	0.55	0.06	0.02	0.02	0.05	0.03	0.08	0.09	0.17	0.24	0.17	0.10	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.55
OTU212	Bacteria	Candidate division TM7	Candidate division TM7	Candidate division TM7	Candidate division TM7	unc. candidate division TM7 bact.	0.20	0.13	0.00	0.55	0.03	0.02	0.19	0.27	0.12	0.22	0.06	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.55	
OTU453	Bacteria	Protobacteriia	Alphaproteobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	Acidiphilium	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.54	0.00	0.00	0.00	0.54	
OTU6	Archaea	Thaumarchaeota	Soil Crenarchaeotic Group(SCG)	Soil Crenarchaeotic Group(SCG)	Soil Crenarchaeotic Group(SCG)	unidentified archaeon SCA1145	0.54	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.54	
OTU363	Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadales	Gemmatimonadales	Gemmatimonas	0.08	0.16	0.02	0.14	0.27														

Chapitre 4 : étude de la biodiversité bactérienne par pyroséquençage 454

OTU589	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	Stenotrophomonas	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,40	0,00	0,00	0,00	0,40
OTU476	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	JG37-AG-20	unc. Rhodospirillaceae bact.	0,18	0,39	0,07	0,04	0,00	0,03	0,04	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39
OTU52	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria	DA052	DA052	unc. bact. KF-GS-JG36-31	0,02	0,00	0,07	0,00	0,05	0,08	0,00	0,39	0,00	0,00	0,14	0,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39
OTU376	Bacteria	Planctomycetes	OM190	OM190	OM190	unc. bact.	0,00	0,39	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39
OTU278	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacteriales	Thermosporotrichaceae	unc. bact.	0,00	0,03	0,00	0,00	0,02	0,00	0,04	0,00	0,02	0,02	0,02	0,39	0,05	0,24	0,00	0,00	0,39
OTU302	Bacteria	Cyanobacteria	SEA-109	SEA-109	SEA-109	unc. bact.	0,20	0,00	0,05	0,00	0,20	0,15	0,14	0,02	0,09	0,07	0,03	0,37	0,16	0,26	0,24	0,10	0,38
OTU242	Bacteria	Chloroflexi	JG30-KF-CM66	JG30-KF-CM66	JG30-KF-CM66	unc. soil bact.	0,11	0,08	0,08	0,02	0,27	0,31	0,12	0,07	0,17	0,14	0,18	0,14	0,07	0,33	0,01	0,13	0,38
OTU263	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacteriales	1959-1	unc. bact.	0,10	0,34	0,05	0,05	0,00	0,03	0,09	0,14	0,04	0,05	0,24	0,01	0,11	0,00	0,00	0,02	0,37
OTU436	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	KF-JG40-B3	unc. bact.	0,20	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,37	0,31	0,02	0,08	0,00	0,00	0,00	0,24	0,00
OTU157	Bacteria	Actinobacteria	Thermoleophilina	Solirubrobacteriales	Conexibacteraceae	Conexibacter	0,03	0,23	0,00	0,03	0,01	0,03	0,06	0,00	0,36	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
OTU90	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobia	Acidimicrobiales	TM214	unc. actinobact.	0,09	0,19	0,33	0,15	0,25	0,35	0,10	0,16	0,18	0,34	0,18	0,27	0,04	0,00	0,00	0,10	0,02
OTU480	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillaceae	unc.	0,03	0,05	0,00	0,34	0,02	0,01	0,00	0,05	0,06	0,24	0,00	0,04	0,02	0,04	0,02	0,00	0,34
OTU393	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Pirellula	unc. bact.	0,03	0,34	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34
OTU417	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	BCF3-20	unc. bact.	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34
OTU595	Bacteria	Proteobacteria	TA18	TA18	TA18	unc. bact.	0,03	0,33	0,02	0,11	0,03	0,04	0,11	0,05	0,07	0,11	0,10	0,06	0,00	0,01	0,01	0,06	0,04
OTU82	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobia	Acidimicrobiales	Acidimicrobiaceae	unc.	0,00	0,04	0,08	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,33	0,01	0,00
OTU446	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhodobiaceae	Rhodobium	0,02	0,31	0,18	0,06	0,03	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02	0,00	0,04	0,00	0,31
OTU314	Bacteria	Elusimicrobia	Elusimicrobia	Lineage IIa	Lineage IIa	actinobact. YJF1-30	0,00	0,08	0,00	0,01	0,02	0,03	0,00	0,02	0,00	0,01	0,06	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31
OTU261	Bacteria	Proteobacteria	Ktedonobacteria	JG30-KF-AS9	JG30-KF-AS9	unc. soil bact.	0,03	0,03	0,00	0,00	0,01	0,01	0,06	0,02	0,00	0,06	0,31	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31
OTU410	Bacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	1174-901-12	1174-901-12	unc. bact.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31
OTU162	Bacteria	Actinobacteria	Thermoleophilina	Solirubrobacteriales	TM146	unc. bact.	0,15	0,31	0,15	0,09	0,19	0,05	0,13	0,12	0,15	0,19	0,03	0,14	0,02	0,00	0,00	0,02	0,31
OTU631	Bacteria	Verrucomicrobia	Spartobacteria	Chthoniobacteriales	LD29	unc. bact.	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,30	0,04	0,03	0,02	0,30
OTU274	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacteriales	Ktedonobacteraceae	Ktedonobacter	0,10	0,05	0,06	0,08	0,14	0,10	0,30	0,20	0,25	0,21	0,24	0,18	0,02	0,03	0,02	0,03	0,30
OTU316	Bacteria	Elusimicrobia	Elusimicrobia	Lineage IIa	Lineage IIa	unc. bact.	0,03	0,19	0,00	0,02	0,07	0,11	0,14	0,22	0,04	0,12	0,15	0,30	0,00	0,03	0,09	0,11	0,30
OTU368	Bacteria	Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	0319-6A21	unc. actinobact.	0,00	0,00	0,07	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	0,29
OTU204	Bacteria	Candidate division OD1	Candidate division OD1	Candidate division OD1	Candidate division OD1	unc. bact.	0,29	0,08	0,02	0,09	0,07	0,03	0,08	0,00	0,02	0,10	0,00	0,03	0,00	0,00	0,10	0,00	0,29
OTU447	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Xanthobacteraceae	Labrys	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29
OTU578	Bacteria	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Moraxellaceae	Acinetobacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	0,29
OTU531	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	SC-1-84	SC-1-84	unc. forest soil bact.	0,13	0,02	0,00	0,00	0,00	0,10	0,16	0,08	0,05	0,22	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,29
OTU610	Bacteria	Verrucomicrobia	OPB35 soil group	OPB35 soil group	OPB35 soil group	bact. enrichment culture clone auto10_4W	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,15	0,00	0,07	0,28	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,28
OTU398	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	unc. bact.	0,00	0,04	0,04	0,02	0,03	0,02	0,00	0,00	0,00	0,05	0,27	0,07	0,06	0,00	0,05	0,24	0,27
OTU260	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	JG30-KF-AS9	JG30-KF-AS9	unc. bact.	0,05	0,01	0,00	0,01	0,02	0,08	0,17	0,09	0,08	0,27	0,17	0,05	0,00	0,01	0,00	0,07	0,27
OTU484	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ver007	unc. bact.	0,00	0,00	0,06	0,18	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,27	0,01	0,03	0,27
OTU271	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacteriales	JG30a-KF-32	unc. Chloroflexi bact.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,03	0,02	0,01	0,26	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,26
OTU622	Bacteria	Verrucomicrobia	S-BQ2-57 soil group	S-BQ2-57 soil group	S-BQ2-57 soil group	unc. Verrucomicrobia bact.	0,08	0,26	0,15	0,05	0,00	0,04	0,00	0,03	0,00	0,00	0,09	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,26
OTU481	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	ver007	alpha proteobact. Gsoil 257	0,12	0,26	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,26
OTU19	Bacteria	Acidobacteria	32-21	32-21	32-21	unc. bact.	0,04	0,03	0,04	0,02	0,18	0,24	0,05	0,01	0,05	0,18	0,00	0,26	0,02	0,04	0,26	0,23	0,26
OTU395	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	Schleseria	0,19	0,17	0,00	0,26	0,00	0,00	0,12	0,07	0,09	0,08	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,26
OTU39	Bacteria	Acidobacteria	DA023	DA023	DA023	unc. Acidobacteriales bact.	0,26	0,19	0,12	0,04	0,08	0,12	0,08	0,05	0,03	0,04	0,07	0,10	0,08	0,03	0,00	0,10	0,08
OTU607	Bacteria	Verrucomicrobia	Candidatus Methylocidiphilum	Candidatus Methylocidiphilum	Candidatus Methylocidiphilum	unc. bact.	0,18	0,03	0,00	0,00	0,05	0,07	0,25	0,02	0,02	0,08	0,01	0,00	0,00	0,00	0,22	0,00	0,25
OTU504	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadales	Sphingomonas	0,02	0,05	0,00	0,02	0,04	0,06	0,07	0,00	0,07	0,01	0,00	0,03	0,25	0,00	0,01	0,01	0,25
OTU258	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	C0119	C0119	unc. soil bact.	0,08	0,06	0,06	0,00	0,03	0,25	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25
OTU518	Bacteria	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Collimonas	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25
OTU75	Bacteria	Acidobacteria	Holophaga	43F-1404R	43F-1404R	unc. Acidobacteriales bact.	0,03	0,00	0,24	0,01	0,00	0,00	0,02	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,24
OTU302	Bacteria	Cyanobacteria	MLE1-12	MLE1-12	MLE1-12	unc. cyanobact.	0,04	0,00	0,13	0,24	0,04	0,03	0,00	0,00	0,02	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,03
OTU283	Bacteria	Chloroflexi	P2-11E	P2-11E	P2-11E	unc. bact.	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,24	0,00	0,03	
OTU602	Bacteria	TM6	TM6	TM6	TM6	unc. bact.	0,09	0,05	0,04	0,01	0,20	0,24	0,06	0,06	0,07	0,21	0,13	0,04	0,00	0,00	0,03	0,12	0,06
OTU389	Bacteria	Planctomycetes	Pla4 lineage	Pla4 lineage	Pla4 lineage	unc. planctomycete	0,04	0,01	0,00	0,00	0,03	0,05	0,24	0,04	0,01	0,17	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,01	0,24
OTU352	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Family XVIII Incertae Sedis	Symbiobact.	0,00	0,01	0,03	0,00	0,02	0,06	0,00	0,01	0,04	0,01	0,00	0,00	0,23	0,23	0,10	0,17	0,00
OTU465	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales																			

Chapitre 4 : étude de la biodiversité bactérienne par pyroséquençage 454

OTU155	Bacteria	Actinobacteria	Thermolobophila	Solirubrobacterales	480-2	unc. bact.	0,04	0,05	0,07	0,01	0,00	0,02	0,06	0,04	0,00	0,04	0,00	0,00	0,02	0,13	0,17	0,12	0,00	0,01	0,17
OTU502	Bacteria	Protobacteria	Alphaproteobacteria	Sphingomonadales	Alphaproteobacteria	Novosphingobium	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,02	0,17	0,00	0,00	0,00	0,17
OTU506	Bacteria	Protobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Betaproteobacteria	Achromobacter	0,04	0,15	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	0,00	0,04	0,03	0,17	
OTU230	Bacteria	Chlorobi	Chlorobia	Rhizobiales	Chlorobia	OPB86	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,07	0,00	0,02	0,03	0,00	0,11	0,00	0,00	0,17	0,00	0,00	0,17	
OTU487	Bacteria	Protobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Rhodospirillales	w007007	0,12	0,03	0,00	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	
OTU468	Bacteria	Protobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Alphaproteobacteria	DA111	0,00	0,04	0,00	0,06	0,06	0,07	0,00	0,00	0,03	0,03	0,01	0,08	0,11	0,00	0,04	0,10	0,17	0,17	
OTU571	Bacteria	Protobacteria	Gammaproteobacteria	NKB5	Gammaproteobacteria	NKB5	0,04	0,00	0,00	0,01	0,02	0,01	0,00	0,08	0,00	0,12	0,15	0,07	0,02	0,00	0,17	0,00	0,01	0,17	
OTU163	Bacteria	Actinobacteria	Thermolobophila	Solirubrobacterales	TM146	unc. soil bact.	0,03	0,04	0,00	0,08	0,01	0,09	0,00	0,04	0,00	0,01	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,17	
OTU370	Bacteria	Nitrospirae	Nitrospirae	Nitrospirales	0319-6A21	unc. candidate division SPAM bact.	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	
OTU470	Bacteria	Protobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	DA111	unc. proteobact.	0,00	0,02	0,02	0,00	0,00	0,08	0,00	0,01	0,07	0,01	0,00	0,00	0,05	0,16	0,02	0,03	0,04	0,16	
OTU178	Bacteria	Armatimonadales	Armatimonadales	Armatimonadales	DA111	unc. bact.	0,04	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,03	0,03	0,00	0,03	0,02	0,01	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	
OTU444	Bacteria	Protobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiales	Rhizobium	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	
OTU405	Bacteria	Protobacteria	Alphaproteobacteria	Caulobacterales	Caulobacteraceae	Phenylobact.	0,02	0,02	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,16	
OTU511	Bacteria	Protobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiales	Ralstonia	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,16	
OTU309	Bacteria	Cyanobacteria	WD272	WD272	WD272	unc. Firmicutes bact.	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,01	0,05	0,03	0,05	0,08	0,02	0,15	0,02	0,00	0,00	0,00	0,06	0,01	0,15
OTU11	Archaea	Euryarchaeota	Halobacteria	Halobacteriales	Miscellaneous Euryarchaeotic Group(MEG)	unc. archaeon	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,02	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	
OTU532	Bacteria	Protobacteria	Betaproteobacteria	TR3-20	TR3-20	unc. bact.	0,00	0,02	0,02	0,15	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	
OTU23	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriales	Edaphobacter	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	
OTU53	Bacteria	Acidobacteria	Acidobacteria	DA052	DA052	unc. eubact. WD2123	0,14	0,08	0,15	0,03	0,06	0,06	0,11	0,11	0,07	0,03	0,06	0,14	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,15	
OTU152	Bacteria	Actinobacteria	Thermolobophila	AKIW543	AKIW543	unc. Rubrobacteridae bact.	0,05	0,03	0,09	0,02	0,09	0,10	0,09	0,11	0,15	0,11	0,03	0,09	0,03	0,01	0,13	0,07	0,07	0,15	
OTU548	Bacteria	Protobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacteriaceae	unc.	0,10	0,11	0,00	0,03	0,15	0,06	0,08	0,03	0,00	0,07	0,08	0,02	0,02	0,00	0,07	0,00	0,04	0,15	
OTU269	Bacteria	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacteriales	HSB OF53-F07	unc. soil bact.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	
OTU580	Bacteria	Protobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Pseudomonadales	Pseudomonas	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,02	0,03	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	
OTU581	Bacteria	Protobacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales	Gammaproteobacteria	unc.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	
OTU472	Bacteria	Protobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	DA111	unc. soil bact.	0,05	0,05	0,00	0,01	0,00	0,00	0,14	0,00	0,08	0,07	0,02	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	
OTU485	Bacteria	Protobacteria	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	w007007	unc. marine bact.	0,02	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	
OTU91	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobia	Acidimicrobiales	TM214	unc. Actinomycetales bact.	0,00	0,01	0,05	0,00	0,05	0,05	0,02	0,01	0,08	0,14	0,00	0,05	0,00	0,01	0,05	0,03	0,08	0,14	
OTU621	Bacteria	Verrucomicrobia	S-BQ2-57 soil group	S-BQ2-57 soil group	S-BQ2-57 soil group	unc. bact.	0,00	0,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,14	
OTU229	Bacteria	Chlorobi	Chlorobia	Chlorobiales	Chlorobia	unc. bact.	0,05	0,08	0,06	0,01	0,12	0,04	0,03	0,03	0,02	0,13	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,00	0,00	0,13	
OTU220	Bacteria	Chlamydiae	Chlamydiae	Parachlamydiales	Chlamydiae	Candidatus Metachlamydia	0,00	0,01	0,04	0,02	0,06	0,06	0,00	0,03	0,06	0,13	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02	0,05	0,13
OTU588	Bacteria	Protobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Xanthomonadales	Rhodanobacter	0,13	0,07	0,03	0,07	0,00	0,01	0,00	0,00	0,02	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13
OTU213	Bacteria	Candidate division TM7	Candidate division TM7	Candidate division TM7	Candidate division TM7	unc. soil bact.	0,04	0,11	0,05	0,09	0,00	0,11	0,05	0,13	0,00	0,08	0,00	0,00	0,00	0,06	0,00	0,00	0,00	0,13	
OTU317	Bacteria	Elimicrobia	Lineage Ite	Lineage Ite	Lineage Ite	unc. soil bact.	0,04	0,01	0,03	0,06	0,05	0,03	0,03	0,13	0,01	0,01	0,02	0,13	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,13	
OTU12	Archaea	Euryarchaeota	Thermoplasmata	Thermoplasmatales	Marine Group II	unc. archaeon	0,00	0,12	0,00	0,05	0,02	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	0,09	0,00	0,00	0,08	0,02	0,13	
OTU3	Archaea	Thaumarchaeota	Soil Crenarchaeotic Group(SCG)	Candidatus Nitrososphaera	Candidatus Nitrososphaera	unc. crenarchaeote	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06	0,03	0,00	0,13	0,00	0,01	0,01	0,13	
OTU431	Bacteria	Protobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiales	Rhodanobacter	0,00	0,00	0,02	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,06	0,13	
OTU124	Bacteria	Actinobacteria	Actinobacteria	Pseudonocardiales	Actinobacteria	Actinophytocola	0,00	0,02	0,00	0,02	0,03	0,03	0,04	0,06	0,13	0,08	0,03	0,03	0,06	0,01	0,00	0,00	0,00	0,13	
OTU419	Bacteria	Protobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Beijerinckiacae	Methylovirgula	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,04	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,13	
OTU71	Bacteria	Acidobacteria	Holophagae	32-20	32-20	unc. Acidobacteria bact.	0,06	0,13	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	
OTU634	Bacteria	WCHB1-60	WCHB1-60	WCHB1-60	WCHB1-60	unc. bact.	0,02	0,04	0,00	0,04	0,07	0,01	0,03	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,13	
OTU182	Bacteria	Bacteroidetes	Cytophagia	Cytophagales	Cytophagales	Flexibacter	0,00	0,13	0,00	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,13	
OTU95	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobia	Acidimicrobiales	TM214	unc. soil bact.	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	
OTU593	Bacteria	Protobacteria	SK259	SK259	SK259	unc. bact.	0,04	0,04	0,02	0,01	0,01	0,00	0,02	0,04	0,01	0,12	0,03	0,03	0,04	0,00	0,00	0,02	0,05	0,00	0,12
OTU37	Bacteria	Acidobacteria	Candidatus Solibacter	Candidatus Solibacter	Candidatus Solibacter	unc. soil bact.	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,02	0,01	0,07	0,02	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	
OTU1623	Bacteria	Verrucomicrobia	Sparobacteria	Chthoniobacteriales	Chthoniobacteriales	Chthoniobacter	0,12	0,12	0,03	0,03	0,00	0,00	0,03	0,10	0,00	0,00	0,04	0,00	0,07	0,00	0,02	0,00	0,00	0,12	
OTU290	Bacteria	Chloroflexi	Thermomicrobia	JG30-KF-CM45	JG30-KF-CM45	unc. bact.	0,05	0,01	0,00	0,01	0,01	0,03	0,04	0,01	0,07	0,04	0,02	0,01	0,03	0,01	0,00	0,00	0,12	0,12	
OTU299	Bacteria	Cyanobacteria	ML635J-21	ML635J-21	ML635J-21	unc. bact.	0,04	0,10	0,05	0,07	0,06	0,02	0,02	0,10	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,12	0,09	0,12	0,12	
OTU339	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillales	Bhargavaea	0,08	0,09	0,12	0,05	0,06	0,11	0,09	0,05	0,12	0,05	0,02	0,05	0,00	0,00	0,00	0,07	0,10	0,12	
OTU89	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobia	Acidimicrobiales	TM214	unc. Acidimicrobiae bact.	0,00	0,06	0,07	0,01	0,00	0,12	0,00	0,04	0,04	0,01	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00	0,06	0,03	0,01	0,12
OTU1	Archaea	Thaumarchaeota	Marine Benthic Group A	Marine Benthic Group A	Marine Benthic Group A	unc. archaeon	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	
OTU76	Bacteria	Acidobacteria	Holophagae	43F-1404R	43F-1404R	unc. bact.	0,00	0,01	0,00	0,04	0,02	0,06	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,12	
OTU549	Bacteria	Protobacteria	Deltaproteobacteria	Myxococcales	Elev-16S-1158	unc. bact.	0,00	0,12	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,12	
OTU392	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetacia	Planctomycetacia	Pir4 lineage	0,06	0,12	0,05	0,11	0,00	0,00	0,00	0											

Chapitre 4 : étude de la biodiversité bactérienne par pyroséquençage 454

OTU461	Bacteria	Protozoa	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	Acetobacteraceae	unc. forest soil bact.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.10	
OTU572	Bacteria	Protozoa	Gammaproteobacteria	NKB5	Gammaproteobacteria	unc. gamma proteobact.	0.02	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.10	0.00	0.05	0.03	0.00	0.04	0.04	0.09
OTU365	Bacteria	Gemmatimonadetes	Gemmatimonadetes	Kazan-1B-37	Kazan-1B-37	unc. proteobact.	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
OTU464	Bacteria	Protozoa	Alphaproteobacteria	DA111	Rhodospirillales	unc. Acetobacteraceae bact.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.06	0.05	0.00	0.00	
OTU232	Bacteria	Chloroflexi	Anaerolineae	Anaerolineales	Anaerolineaceae	unc.	0.00	0.02	0.03	0.01	0.01	0.10	0.04	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	
OTU203	Bacteria	BH180-139	Pseudonocardiaceae	Pseudonocardiaceae	unc. bact.	0.03	0.02	0.03	0.02	0.03	0.04	0.00	0.03	0.00	0.01	0.03	0.10	0.00	0.00	0.03	0.02	
OTU126	Bacteria	Actinobacteria	Holophaga	32-20	Crossiella	unc. soil bact.	0.05	0.08	0.02	0.03	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.03	0.00	0.10	0.00	0.03	0.00	
OTU74	Bacteria	Acidobacteria	DA023	DA023	unc. bact. DA008	unc. soil bact.	0.08	0.10	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	
OTU45	Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteria	Sphingobacteriales	Flavobacter	unc. soil bact.	0.00	0.10	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	
OTU187	Bacteria	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Zavarzinella	unc. soil bact.	0.02	0.10	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.07	0.04	0.06	0.02	0.08	0.00	0.00	0.10	
OTU401	Bacteria	Protozoa	Deltaproteobacteria	Myxococcales	0319-6G20	unc. delta proteobact.	0.04	0.06	0.03	0.02	0.00	0.00	0.02	0.01	0.01	0.02	0.09	0.01	0.00	0.00	0.09	
OTU545	Bacteria	Protozoa	Deltaproteobacteria	Myxococcales	mle1-27	unc. proteobact.	0.04	0.04	0.09	0.01	0.00	0.03	0.02	0.02	0.00	0.04	0.00	0.02	0.00	0.01	0.09	
OTU553	Bacteria	Protozoa	Deltaproteobacteria	Myxococcales	mle1-27	unc. proteobact.	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.01	0.03	0.02	0.00	0.09	0.02	0.00	0.00	0.00	0.09	
OTU5	Archaea	Thaumarchaeota	Soil Crenarchaeotic Group(SCG)	Soil Crenarchaeotic Group(SCG)	Soil Crenarchaeotic Group(SCG)	unidentified	0.00	0.09	0.03	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
OTU308	Bacteria	Cyanobacteria	WD272	WD272	unc. cyanobact.	unc. soil bact.	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.03	0.00	0.00	0.02	0.03	0.00	0.02	0.03	0.01	0.09	
OTU248	Bacteria	Chloroflexi	JG37-AG-4	JG37-AG-4	unc. soil bact.	unc. soil bact.	0.00	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.03	0.04	0.00	0.04	0.00	0.01	0.00		
OTU300	Bacteria	Cyanobacteria	ML635J-21	ML635J-21	unc. soil bact.	unc. soil bact.	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
OTU543	Bacteria	Protozoa	Deltaproteobacteria	Myxococcales	0319-6G20	bact. enrichment culture clone auto112_4W	0.09	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.09		
OTU404	Bacteria	Protozoa	Alphaproteobacteria	Caulobacter	Caulobacteraceae	unc. Firmicutes bact.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.07	0.04	0.06	0.00	0.09	0.00	0.00		
OTU176	Bacteria	Armatimonadetes	Armatimonadetes	Armatimonadetes	Sorangium	unc. soil bact.	0.00	0.03	0.08	0.02	0.00	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.02	0.09		
OTU557	Bacteria	Protozoa	Deltaproteobacteria	Myxococcales	SEA-109	unc. soil bact.	0.00	0.01	0.02	0.05	0.02	0.00	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.09	0.04		
OTU304	Bacteria	Cyanobacteria	SEA-109	SEA-109	unc. soil bact.	unc. soil bact.	0.00	0.02	0.02	0.00	0.03	0.04	0.09	0.05	0.03	0.02	0.07	0.03	0.04	0.00		
OTU2	Archaea	Thaumarchaeota	Miscellaneous Crenarchaeotic Group	Miscellaneous Crenarchaeotic Group	Miscellaneous Crenarchaeotic Group	unc. crenarchaeote	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.01	0.00	0.08		
OTU471	Bacteria	Protozoa	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	DA111	unc. Rhodospirillaceae bact.	0.02	0.01	0.02	0.03	0.05	0.00	0.00	0.04	0.00	0.04	0.00	0.02	0.00	0.01	0.08	
OTU635	Bacteria	WCHB1-60	WCHB1-60	WCHB1-60	unc. soil bact.	unc. soil bact.	0.02	0.04	0.05	0.00	0.00	0.08	0.03	0.01	0.02	0.01	0.00	0.02	0.00	0.02		
OTU425	Bacteria	Protozoa	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	DUSs3-71	unc. Hyphomicrobiaceae bact.	0.00	0.00	0.04	0.03	0.08	0.00	0.03	0.06	0.02	0.03	0.08	0.00	0.00	0.00		
OTU357	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Veillonellaceae	Sporotalea	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
OTU322	Bacteria	Elusimicrobia	Lineage IV	Lineage IV	unc. bact.	unc. bact.	0.00	0.00	0.00	0.02	0.03	0.05	0.03	0.02	0.04	0.03	0.00	0.08	0.00	0.04		
OTU350	Bacteria	Firmicutes	Clostridia	Clostridiales	Family XI Incertae Sedis	Tepidimicrobium	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.05	0.00		
OTU614	Bacteria	Verrucomicrobia	OPB35 soil group	OPB35 soil group	unc. soil bact.	unc. soil bact.	0.02	0.08	0.02	0.05	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.08		
OTU330	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Oceanobacillus	unc. soil bact.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
OTU519	Bacteria	Protozoa	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Oxalobacteraceae	Massilia	0.00	0.04	0.04	0.01	0.00	0.03	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05		
OTU386	Bacteria	Planctomycetes	Physcisphaera	WD2101 soil group	WD2101 soil group	unc. plantomycete	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
OTU144	Bacteria	Protozoa	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	alpha cluster	unc. bact.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.08	0.00			
OTU62	Bacteria	Acidobacteria	KF-JG0-18	KF-JG0-18	unc. bact.	unc. bact.	0.02	0.03	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.01	0.03			
OTU77	Bacteria	Acidobacteria	Holophaga	Elev-16S-816	Elev-16S-816	unc. bact.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01	0.08	0.02	0.00	0.00			
OTU218	Bacteria	Chlamydiae	Chlamydiae	evE6	Chlamydiae	unc. bact.	0.00	0.03	0.00	0.03	0.04	0.03	0.00	0.00	0.02	0.04	0.08	0.00	0.00			
OTU222	Bacteria	Chlamydiae	Chlamydiae	Parachlamydiae	Neochlamydia	unc. bact.	0.06	0.03	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.08	0.01	0.00	0.00			
OTU474	Bacteria	Protozoa	Alphaproteobacteria	Rhodospirillales	JG37-AG-20	unc. alpha proteobact.	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02			
OTU210	Bacteria	Candidate division OP3	Candidate division OP3	Candidate division OP3	unc. bact.	unc. bact.	0.04	0.07	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
OTU428	Bacteria	Protozoa	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Blastochloris	unc. soil bact.	0.00	0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	0.03	0.05	0.00	0.03	0.05	0.07	0.00			
OTU311	Bacteria	Deinococcus-Thermus	Deinococci	Deinococcales	Deinococcus	unc. soil bact.	0.00	0.02	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.02			
OTU208	Bacteria	Candidate division OP11	Candidate division OP11	Candidate division OP11	unc. candidate division OP11 bact.	unc. candidate division OP11 bact.	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
OTU147	Bacteria	Actinobacteria	Thermolophilina	AKIW543	AKIW543	bact. Elin7545	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
OTU445	Bacteria	Protozoa	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Rhizobiales	unc. soil bact.	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.00	0.00			
OTU451	Bacteria	Protozoa	Alphaproteobacteria	Rhodobacteriales	Rhodobacteraceae	unc.	0.00	0.01	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00			
OTU174	Bacteria	Armatimonadetes	Armatimonadetes	Armatimonadetes	unc. candidate division OP10 bact.	unc. candidate division OP10 bact.	0.03	0.01	0.00	0.02	0.00	0.05	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00			
OTU413	Bacteria	Protozoa	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	alpha cluster	unc. alpha proteobact.	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.01	0.03	0.00	0.00			
OTU286	Bacteria	Chloroflexi	SAR202 clade	SAR202 clade	unc. bact.	unc. bact.	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.03	0.00	0.02	0.00			
OTU102	Bacteria	Actinobacteria	Corynebacteriales	Nocardia	Corynebacteriales	unc. soil bact.	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00			
OTU84	Bacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	TM214	Acidimicrobiales	unc. soil bact.	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
OTU237	Bacteria	Chloroflexi	Gitt-GS-136	Gitt-GS-136	unc. Anaerolineae bact.	unc. sludge bact. A22	0.00	0.04	0.07	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00			
OTU46	Bacteria	Acidobacteria	DA023	DA023	unc. soil bact.	unc. soil bact.	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
OTU14	Archaea	Euryarchaeota	Thermoplasmata	Terrestrial Miscellaneous Cp(TMEG)	unc. archaeon	unc. archaeon	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00			
OTU379	Bacteria	Planctomycetes	Physcisphaera	Physcisphaerales	Physcisphaera	unc. soil bact.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.04	0.05	0.06	0.00	0.01	0.00	0.00			
OTU497	Bacteria	Protozoa	Alphaproteobacteria	Rickettsiales	TK34	unc. soil bact.	0.00	0.01	0.00	0.02	0.03	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03			
OTU297	Bacteria	Chloroflexi	TK10	TK10	unc. plantomycete	unc. soil bact.	0.06	0.04	0.00	0.00	0.03	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
OTU346	Bacteria	Firmicutes	Bacilli	Thermoactinomyetaceae	Mechercharimyces	unc. soil bact.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00			
OTU241	Bacteria	Chloroflexi	JG30-KF-CM66	JG30-KF-CM66	unc. Chloroflexi bact.	unc. soil bact.	0.02	0.02	0.00	0.01	0.02	0.01	0.00	0.01	0.02	0.00	0.01	0.00	0.01			
OTU570	Bacteria	Protozoa	Gammaproteobacteria	Legionellales	Legionella	unc. soil bact.	0.02	0.00	0.04	0.03	0.00	0.05	0.00	0.00	0.05	0.03	0.05	0.06	0.00			
OTU385	Bacteria																					

Table S2. Relative abundances of phyla when rare OTUs (<0,1% in all samples) are not considered.

Domain	Phylum	1 _A	1 _O	3 _A	3 _O	4 _A	4 _O	8 _A	8 _O	10 _A	10 _O	12 _A	12 _O	average (trench)	13 _A	13 _O	14 _A	14 _O	20 _A	20 _O	average (controls)
Archaea	Thaumarchaeota	11,18	3,76	5,53	7,12	1,60	4,64	4,00	4,26	0,34	1,50	5,81	5,28	4,58	3,07	1,90	3,06	3,61	5,22	2,77	3,27
Archaea	Euryarchaeota	0,00	0,12	0,25	0,23	0,02	0,05	0,02	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,13	0,09	0,00	0,04	0,10	0,02	0,06
Bacteria	Chloroflexi	18,62	12,09	24,33	11,52	20,83	26,67	25,70	24,50	32,31	19,30	22,15	26,53	22,05	42,61	51,92	18,45	24,97	27,24	26,72	25,18
Bacteria	Acidobacteria	19,98	24,95	11,89	14,71	23,18	17,57	21,73	19,40	17,45	19,16	15,77	18,46	18,69	8,98	6,72	21,54	11,93	21,89	19,01	17,53
Bacteria	Proteobacteria	17,47	19,48	13,18	37,64	18,08	14,20	13,18	18,57	13,66	21,40	16,47	18,19	18,46	5,77	3,00	19,08	11,60	11,69	11,82	15,94
Bacteria	Verrucomicrobia	7,70	10,07	18,25	6,43	6,02	8,97	5,36	7,90	6,24	3,88	7,73	3,10	7,64	19,86	16,42	6,60	13,94	12,02	14,01	9,59
Bacteria	Planctomycetes	13,23	8,29	13,04	5,52	12,49	11,97	13,89	8,74	13,19	11,77	17,02	12,11	11,77	2,65	0,79	2,47	8,27	9,47	6,89	9,66
Bacteria	Actinobacteria	3,37	7,97	6,62	6,05	8,99	5,82	3,49	7,03	6,75	7,47	5,16	4,49	6,10	6,50	8,83	16,23	12,78	3,56	7,77	7,10
Bacteria	Cyanobacteria	2,26	2,38	2,26	3,07	3,42	2,99	5,50	3,76	4,71	6,04	5,90	5,73	4,00	4,73	3,50	1,53	4,33	4,00	4,39	3,92
Bacteria	Candidate division WS3	1,37	3,03	0,81	2,06	0,38	0,84	1,16	0,95	1,24	1,63	0,38	0,36	1,18	0,09	0,07	0,04	1,36	0,61	0,40	0,94
Bacteria	Nitrospirae	0,22	1,47	0,36	0,34	0,37	0,14	1,03	0,10	0,35	0,55	0,41	0,34	0,47	2,01	1,94	2,24	2,18	0,63	1,20	0,86
Bacteria	Gemmatimonadetes	0,55	0,80	0,46	0,35	1,16	0,92	0,35	0,31	0,31	0,64	0,21	1,00	0,59	0,69	1,16	3,84	0,69	0,67	0,93	0,82
Bacteria	Firmicutes	0,60	0,74	0,79	1,21	0,48	1,21	0,30	0,58	0,89	0,77	0,09	0,54	0,68	0,34	0,97	2,00	0,73	0,78	1,37	0,79
Bacteria	Armatimonadetes	0,31	0,12	0,39	0,16	0,79	1,13	0,67	1,02	0,21	0,42	0,48	1,03	0,56	0,33	0,36	0,23	0,37	0,32	0,21	0,48
Bacteria	SM2F11	0,17	0,18	0,05	0,39	0,11	0,39	1,85	0,08	0,04	1,67	0,05	0,21	0,43	0,00	0,00	0,01	0,73	0,20	0,07	0,35
Bacteria	Bacteroidetes	0,49	0,78	0,04	1,02	0,08	0,04	0,30	0,53	0,54	0,43	0,23	0,12	0,38	0,00	0,00	0,12	0,13	0,00	0,09	0,28
Bacteria	Thermotogae	0,00	0,03	0,16	0,00	0,00	0,07	0,02	0,03	0,09	0,01	0,04	0,11	0,05	0,83	1,79	0,69	0,24	0,33	0,34	0,25
Bacteria	Chlamydiae	0,30	0,14	0,09	0,10	0,29	0,41	0,05	0,34	0,11	0,77	0,24	0,17	0,25	0,00	0,00	0,00	0,10	0,08	0,16	0,19
Bacteria	Elusimicrobia	0,07	0,28	0,03	0,09	0,14	0,18	0,17	0,36	0,05	0,14	0,23	0,59	0,19	0,00	0,00	0,03	0,10	0,34	0,18	0,17
Bacteria	TM6	0,09	0,05	0,04	0,01	0,20	0,24	0,06	0,06	0,07	0,21	0,13	0,04	0,10	0,00	0,00	0,03	0,12	0,05	0,06	0,08
Bacteria	TA06	0,15	0,17	0,05	0,02	0,04	0,02	0,02	0,00	0,01	0,00	0,02	0,05	0,05	0,07	0,00	0,10	0,18	0,13	0,14	0,06
Bacteria	Chlorobi	0,05	0,08	0,06	0,02	0,12	0,04	0,10	0,03	0,04	0,17	0,00	0,14	0,07	0,00	0,01	0,01	0,17	0,00	0,00	0,06
Bacteria	WCHB1-60	0,02	0,04	0,00	0,04	0,07	0,01	0,03	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,02
	Total	98,20	97,04	98,66	98,10	98,85	98,52	98,96	98,70	98,58	98,06	98,52	98,57		98,65	99,47	98,28	98,57	99,34	98,56	

Table S3. Coordinate values on the PC1 and PC2 axis of the OTUs correlated with contaminated (orange) and control soils (green).

	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Comp1	Comp2
OTU397	Planctomycetes	Planctomycetacia	Planctomycetales	Planctomycetaceae	unc.	-2,00	2,13
OTU247	Chloroflexi	JG37-AG-4	JG37-AG-4	JG37-AG-4	unc. forest soil bact.	-1,47	0,91
OTU8	Thaumarchaeota	South African Gold Mine Gp 1(SAGMCG-1)	SAGMCG-1	SAGMCG-1	unc. crenarchaeote	-0,91	-0,30
OTU508	Proteobacteria	Betaproteobacteria	Burkholderiales	Burkholderiaceae	Burkholderia	-0,89	-2,92
OTU26	Acidobacteria	Acidobacteria	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	unc.	-0,78	0,35
OTU612	Verrucomicrobia	OPB35 soil group	OPB35 soil group	OPB35 soil group	unc. bact.	-0,75	0,32
OTU51	Acidobacteria	Acidobacteria	DA052	DA052	unc. bact.	-0,72	-0,74
OTU422	Proteobacteria	Alphaproteobacteria	Rhizobiales	Bradyrhizobiaceae	Nitrobacter	-0,67	-1,46
OTU585	Proteobacteria	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales	Sinobacteraceae	unc.	-0,61	0,10
OTU56	Acidobacteria	Acidobacteria	DA052	DA052	unc. forest soil bact.	-0,47	0,27
OTU279	Chloroflexi	Ktedonobacteria	Ktedonobacterales	Thermosporotrichaceae	unc. Ktedobacteria bact.	0,30	-0,01
OTU9	Thaumarchaeota	terrestrial group	terrestrial group	terrestrial group	unc. archaeon	0,36	-0,05
OTU601	Thermotogae	Thermotogae	Thermotogales	Thermotogaceae	GAL15	0,38	-0,05
OTU369	Nitrospirae	Nitrospira	Nitrospirales	0319-6A21	unc. bact.	0,49	-0,12
OTU298	Chloroflexi	TK10	TK10	TK10	unc. soil bact.	0,61	0,07
OTU72	Acidobacteria	Holophagae	32-20	32-20	unc. bact.	0,73	-0,17
OTU142	Actinobacteria	MB-A2-108	MB-A2-108	MB-A2-108	unc. bact.	1,06	-0,27
OTU245	Chloroflexi	JG37-AG-4	JG37-AG-4	JG37-AG-4	unc. Chloroflexi bact.	2,28	0,13
OTU624	Verrucomicrobia	Spartobacteria	Chthoniobacterales	DA101 soil group	unc. bact.	5,22	-0,21
OTU244	Chloroflexi	JG37-AG-4	JG37-AG-4	JG37-AG-4	unc. bact.	7,98	0,53

4. Résultats et Discussion

L'analyse a permis de montrer l'exhaustivité de la technique dans la détection de la diversité bactérienne des sols de Tchernobyl. En effet, après nettoyage du jeu de données, il reste 695 000 séquences, avec en moyenne 19 300 séquences par échantillon d'ADN environnemental. Le calcul des courbes de raréfaction à 97% montre que le plateau est atteint pour tous les échantillons, ce qui indique que la profondeur de séquençage est suffisante pour effectuer des analyses comparatives de la diversité des populations bactériennes dans les sols. L'analyse par pyroséquençage rejoint les résultats préalablement établis (Chapitre II) et démontre définitivement que la diversité bactérienne dans les sols de la tranchée T22 de Tchernobyl n'est pas diminuée par la présence des radionucléides. En effet, les résultats montrent que la diversité apparente observée dans les échantillons les plus contaminés n'est pas plus faible que dans les échantillons contrôles.

Au cours de l'étude, la reproductibilité des analyses a pu être démontrée en analysant les triplicats d'Octobre 2009 dont les profils sont très similaires, ce qui démontre aussi la stabilité des populations au point d'échantillonnage.

L'analyse phylogénétique des séquences montre la présence d'une diversité importante avec 95,5% de *Bacteria* et 4,1% d'*Archaea*, 34 phylums bactériens et 2 phylums archéens représentés, et 635 OTUs à 97% d'identité. Les phylums de *Bacteria* les plus abondants sont ceux classiquement retrouvés dans les sols (*Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, *Actinobacteria*) et représentent 90% de la diversité totale. Cependant, l'abondance relative des *Chloroflexi* est tout à fait atypique avec des valeurs allant de 13 à 53%, ce qui est bien supérieur à ce qui est décrit habituellement dans les sols (Janssen 2006). Bien qu'au cours de l'étude bibliographique, nous ayons pu voir que les *Chloroflexi* sont capables de recoloniser un sol soumis à une irradiation aigue (5 kGy), l'abondance de ces derniers dans les sols de Tchernobyl n'en reste pas moins atypique et semble être une signature de ces sols de Tchernobyl. Avec l'approche culturale, nous n'avons pas isolé d'espèces appartenant à ce phylum. Par la suite, il serait intéressant d'isoler des espèces de *Chloroflexi* afin de comprendre cette disparité de sensibilité aux conditions de la tranchée au sein d'un même genre bactérien, mais aussi afin de tester leurs capacités d'interactions avec les radionucléides.

Afin de comparer les communautés présentes dans les sols de la tranchée (n°1, 3, 4, 8, 10 et 12) avec celles des sols contrôles (n°13, 14 et 20), une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée sur les jeux de données de séquençage. En prenant en compte l'abondance relative au niveau taxonomique du phylum pour réaliser l'ACP, il apparaît difficile de dégager un effet clair des conditions de la tranchée sur la structure des communautés bactériennes. En revanche, en utilisant un niveau taxonomique plus fin (UOTs), la séparation des échantillons contrôles avec ceux de la tranchée est mise en évidence.

Ce résultat démontre la présence d'espèces bactériennes soit mieux adaptées, soit plus sensibles aux conditions de la tranchée, qui se caractérise par de fortes teneurs en ^{137}Cs , en U et en carbone organique (cf. Chapitre II). Ceci n'avait pas pu être mis en évidence ni par la technique de DGGE, ni par l'approche culturale utilisée dans un premier temps.

Parmi les espèces qui caractérisent les sols contrôles (espèces sensibles aux conditions de la tranchée) on peut noter la présence d'un OTU abondant affilié à la famille JG37-AG-4 des *Chloroflexi*. Des espèces voisines affiliées à cette même famille sont, elles, au contraire abondantes dans la tranchée.

On peut proposer que cette répartition soit la signature de l'évolution d'un même groupe bactérien présent initialement dans le sol et qui aurait divergé après la contamination. Cette hypothèse est en accord avec les résultats obtenus par Ragon *et al.*, (2011) qui ont mis en évidence un taux de mutations proportionnel au débit de dose dans les régions intergéniques 16S-23S.

De façon complémentaire, nous avons cherché à comparer les résultats obtenus par l'approche culturale à ceux acquis par le pyroséquençage. Ainsi, l'ensemble des séquences d'ADNr 16S des 303 isolats a été recherchée dans le jeu de données de pyroséquençage (695 000 séquences). Les résultats montrent que toutes les séquences identifiées au cours de l'approche culturale ne sont pas identifiables par pyroséquençage et que seules trois d'entre elles ont une abondance supérieure à 1%. Deux isolats affiliés aux *Burkholderia* (*Burkholderia terrae* et *Burkholderia* sp. II-44) présentent une abondance supérieure à 1% dans le jeu de données de pyroséquençage et ont été évalués dans la suite de l'étude pour leurs capacités de survie avec de l'uranium (cf. Chapitre V).

CHAPITRE V : Etude des interactions bactéries-uranium

1. Contexte général

Dans le cadre de cette étude, nous avons analysé les interactions engagées par les bactéries avec deux radionucléides : le ^{137}Cs et l'uranium. Nous avons choisi dans un premier temps d'étudier les interactions avec l'uranium. Comme nous l'avons vu au cours du chapitre II, la mesure des ratios isotopiques d' $^{235/238}\text{U}$ montre que la tranchée se caractérise par la présence d'uranium enrichi provenant de l'explosion de la centrale. Celui-ci est vraisemblablement présent sous forme de particules de combustibles constituées d'oxyde d'uranium et d'oxydes mixtes d'uranium-zirconium. De plus, les concentrations d'uranium dans les échantillons de sol prélevés dans la tranchée montrent que celles-ci peuvent atteindre 80 $\mu\text{g/g}$, une valeur qui dépasse les valeurs hautes des sols européens (cf. Chapitre I). Bien que la dissolution des particules de combustible ait pu être mise en évidence, les analyses chimiques des différents horizons de sol ont montré que l'uranium ne migrait pas dans le sol. Le sol étant un environnement très hétérogène, on peut supposer l'existence de micro-niches dans lesquelles les bactéries sont exposées à l'uranium.

Enfin, les études de caractérisation des voies d'interactions entre l'uranium et les bactéries tiennent rarement compte de la viabilité des cellules, ce paramètre étant pourtant fondamental dans un contexte écologique.

2. Objectifs de l'étude et démarche expérimentale

L'objectif général de ce chapitre a tout d'abord été de sélectionner dans la collection de bactéries cultivables une souche capable de survivre à de fortes concentrations d'uranium. Les résultats acquis sont présentés en résultat complémentaire.

Dans un second temps, l'objectif a été d'étudier les mécanismes fins d'interaction entre l'uranium et la souche préalablement sélectionnée. Les résultats sont présentés sous forme d'article.

3. Résultats complémentaire : Sélection d'une souche résistante à l'uranium

Dans une première phase de l'étude, nous avons cherché à sélectionner une souche capable de survivre à de fortes concentrations d'uranium.

3.1. Matériel et méthodes

Une collection de 303 isolats cultivables, représentant 83 UOTs à 97% de similarité, a été constituée au cours de l'étude (cf. Chapitre II). Au cours de cette expérience, un représentant de chacun des 48 UOTs a été testé pour sa capacité de survie à l'uranium. Au total, 6 souches appartenant au phylum des *Actinobacteria*, 1 souche de *Bacteroidetes*, 29 souches de *Firmicutes* et 12 souches affiliées aux *Proteobacteria* ont été testées. Les cellules ont été cultivées sur milieu TSB 0,1X jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance. Les cellules ont ensuite été centrifugées (3600 g / 10 min) puis le culot cellulaire a été lavé deux fois dans une solution physiologique NaCl 0,1M. Les cellules ont été resuspendues dans une solution NaCl 0,1M en présence ou en absence de 100 µM de nitrate d'uranyle ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$) durant 24 heures. Après 24 heures d'exposition, la survie des cellules a été mesurée par comptage des UFCs sur milieu gélosé (TSB 0,1X). La durée de culture à 32°C a été adaptée en fonction de la croissance de chaque souche pour permettre un comptage des UFCs. Le taux de survie a été déterminé par rapport à la condition contrôle.

3.2. Résultats et discussions

Les résultats montrent que les bactéries testées présentent des taux de survie très différents en présence d'uranium (tableau 1). Au total, sur 48 souches testées, 28 souches bactériennes présentent un pourcentage de survie inférieur à 1%, 8 souches un pourcentage de survie compris entre 1 et 10%, et 12 souches un pourcentage de survie supérieur à 10%.

Pour le genre *Burkholderia*, sur cinq souches testées, quatre souches ne présentent pas de capacité particulière de résistance (> 1% de survie), et une présente une survie de 4,5%. Dans le chapitre précédent, nous avons pu voir que deux isolats de *Burkholderia* étaient bien représentés dans le jeu de pyroséquençage avec des pourcentages supérieur à 1%. Néanmoins, malgré leur abondance dans les sols de la tranchée T22, ces deux isolats ne présentent pas de capacités de survie en présence d'uranium (tableau 1).

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des 48 UOTs testées au cours de la phase de sélection de bactéries résistantes à l'uranium (exposition à 100 µM de nitrate d'uranyle pendant 24 heures).

Dénomination	Affiliation taxonomique	Voisin le plus proche à 97%	% survie après 24h	
TchI_8_n23	<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus reuszeri</i>	53,3	Survie supérieur à 10 %
TchII_4_n26	<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus</i> sp. CJ71	15,1	
A9_3_sp3_-1_2	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium paraoxydans</i>	13,6	
TchIII_20_n17	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus pectinilyticus</i>	150,0	
TchIII_4_n10	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. BM-7	100,7	
O8_8_sp8_-2_12	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. ES_MS17	85,7	
TchIII_10_n15	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. GR13-04	67,7	
TchIII_4_n6	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus anaericanus</i>	66,7	
TchII_10_n8	<i>Paenibacillus</i>	uncultured <i>Paenibacillaceae</i> bacterium	20,5	
O8_8_sp8_-2_8	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. JA-08	14,6	
TchII_10_n13	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. PA26	10,4	
A9_8_b_-2_6a	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium</i> sp. I_Gauze_K_8_2	13,5	
TchI_4_n5	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp. GUF8	1,5	
TchI_10_n14	<i>Burkholderia</i>	uncultured eubacterium WD2116	4,5	
TchI_8_n14	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus</i> sp. TSSAS2-47	1,1	
A9_1_sp1_0_4	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i> sp. QAI13	4,8	
TchIII_10_n2	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. BF32	6,9	
TchI_8_n6	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. JS16-06	1,0	
TchI_10_n18	<i>Roseomonas</i>	<i>Roseomonas aerolata</i>	1,1	
TchIII_20_n24	<i>Sporosarcina</i>	uncultured bacterium	2,2	
TchI_8_n3	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter ramosus</i>	0,3	Survie inférieur à 1%
A9_4_b_-1_4	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter oryzae</i>	0,0	
TchI_4_n3	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus soli</i>	0,7	
TchI_8_n1	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp. JAM-FM2801	0,0	
TchI_8_n9	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	0,0	
A9_1_-1_2	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp. WTZ-1	0,0	
TchI_1_n8	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	0,0	
TchI_3_n13	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp. II-44	0,0	
TchI_3_n16	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp. II-44	0,0	
TchII_10_n3	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia terrae</i>	0,0	
TchI_1_n3	<i>Chryseobacterium</i>	<i>Chryseobacterium</i> sp. PT-1	0,0	
TchI_10_n15	<i>Cohnella</i>	<i>Cohnella</i> sp. GT-L22	0,5	
TchII_4_n2	<i>Incertae Sedis</i>	uncultured <i>Bacillus</i> sp.	0,0	
TchI_4_n16	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus</i> sp. SP4	0,3	
TchI_10_n9	<i>Okibacterium</i>	<i>Microbacterium</i> sp. VA8728_00	0,0	
TchI_1_n11	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. Sx52	0,6	
TchI_10_n3	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. SJH06	0,3	
TchI_8_n2	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. EWF52	0,0	
TchI_1_n5	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. Eur1 9.2	0,0	
A9_10_b_-1_8	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. SJH06	0,0	
TchIII_4_n5	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus macerans</i>	0,0	
A9_10_b_-1_8	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. SJH06	0,0	
TchI_4_n1	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. OK-5	0,0	
TchI_1_n17	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. F17	0,0	
A9_13_-2_1	<i>Staphylococcus</i>	bacterium H17(2009)	0,0	
A9_10_b_-1_5	<i>Stenotrophomonas</i>	uncultured bacterium	0,0	
TchIII_4_n24	uncultured gamma proteobacterium		0,0	
TchIII_20_n12	<i>Variovorax</i>	uncultured <i>Comamonadaceae</i> bacterium	0,0	

Les souches bactériennes les plus résistantes à l'uranium appartiennent au phylum des *Firmicutes*, principalement au genre *Paenibacillus*. Au sein de ce genre bactérien, 17 souches ont pu être testées. 8 souches présentent une survie supérieure à 10% et 7 souches une survie inférieure à 1%.

Bien que la plupart des isolats de *Paenibacillus* survivent suite à l'exposition, les suspensions cellulaires sont hétérogènes et les colonies sont mucilagineuses ce qui rend les comptages très peu précis. Il est donc difficile de mesurer avec précision leur taux de survie.

Parmi les souches qui résistent le mieux à l'exposition et qui forment des colonies facilement comptables, la souche A9_3_sp3_-1_2 apparaît être un candidat idéal pour la suite de l'étude. Cette souche, isolée à Tchernobyl sur milieu AEM1 après chauffage pendant 8 minutes à 95°C, est affiliée au genre *Microbacterium* et présente un taux de survie de 13,6% après 24 h d'exposition à 100 µM de nitrate d'uranyle.

Les données de la littérature confortent également le choix de ce modèle d'étude puisque des espèces affiliées à *Microbacterium* ont pu être identifiées dans des environnements naturellement riches en uranium (Mondani *et al.*, 2011) ainsi que dans des sols contaminés par du ¹³⁷Cs (Fredrickson *et al.*, 2004), dans l'environnement oligotrophe d'un bassin de stockage de combustible nucléaire (Chicote *et al.*, 2005), dans un site de stockage de déchets radioactifs en Russie (Nedelkova *et al.*, 2007), et au niveau du site contaminé par de l'uranium et d'autres métaux lourds de North Cave Hill (Rastogi *et al.*, 2010).

Sur la base des résultats de survie et de la bibliographie, la souche *Microbacterium* A9_3_sp3_-1_2 a été retenue pour étudier plus finement les interactions engagées avec l'uranium.

4. Caractérisation fine des interactions entre uranium et *Microbacterium* A9_3_sp3_-1_2

4.1. Objectifs de l'étude

L'objectif final de cette étude était d'identifier les mécanismes de détoxification de l'uranium mis en jeu par la souche A9_3_sp3_-1_2 (notée par la suite *Microbacterium* souche sp. A9). Nous avons ainsi choisi d'utiliser des concentrations d'uranium plus faibles que dans l'expérience de sélection précédente afin d'améliorer le taux de survie.

La caractérisation fine des interactions *Microbacterium*-uranium a été réalisée au cours d'une exposition à 10 et 50 μM de nitrate d'uranyle pendant 24 h en solution physiologique (0.1 M NaCl) à pH 5. Afin de tester l'implication potentielle d'un système actif dans l'interaction avec l'uranium, deux températures ont été testées en parallèle : 25 et 4°C. Au cours de l'exposition, la survie des bactéries et l'évolution de la concentration en uranium et en phosphate ont été mesurées dans le milieu. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, les interactions bactérie-uranium impliquent souvent l'intervention de groupes phosphate, soit à travers leur excrétion par la cellule, soit par leur implication à l'intérieur des cellules sous forme de granules de polyphosphate.

La localisation subcellulaire de l'uranium a aussi été suivie par des observations en Microscopie Electronique à Transmission (MET) couplée à de l'analyse chimique (EDX). Enfin, sur ces mêmes échantillons, l'analyse de la spéciation de l'uranium dans la cellule a été réalisée en couplant des approches de Spectroscopie Infra-Rouge à Transformée de Fourier (IRTF) et de Spectroscopie Laser Résolue en Temps (SLRT).

5. Contribution scientifique

Theodorakopoulos N., Chapon V., Coppin F., Floriani M., Vercouter T., Sergeant C., Camilleri V., Berthomieu C. and Février L. Use of combined microscopic and spectroscopic techniques to evidence interactions between uranium and *Microbacterium* sp. strain A9, a strain isolated from the Chernobyl exclusion zone. Article en préparation pour le journal PlosOne.

Use of combined microscopic and spectroscopic techniques to evidence interactions between uranium and *Microbacterium* sp. strain A9, a strain isolated from the Chernobyl exclusion zone

Nicolas Theodorakopoulos^{1,2,3,4*}, Virginie Chapon^{1,2,3}, Frédéric Coppin⁴, Magali Floriani⁴, Thomas Vercoüter⁵, Sergeant^{6,7}, Virginie Camilleri⁴, Catherine Berthomieu^{1,2,3} and Laureline Février⁴

¹ CEA, DSV, IBEB, SBVME, LIPM, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France.

² CNRS, UMR 7265, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France.

³ Université d'Aix-Marseille, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France.

⁴ IRSN/PRP-ENV/SERIS/L2BT, bld 186, B.P. 3, F-13115 Saint Paul-lez-Durance, France

⁵ CEA/DEN/DANS/DPC/SEARS/LANIE, Bât 391, F-91191 Gif-Sur-Yvette Cedex, France

⁶ Univ. Bordeaux, CENBG, UMR5797, F-33170 Gradignan, France

⁷ CNRS, IN2P3, CENBG, UMR5797, F-33170 Gradignan, France

Keywords: Chernobyl, *Microbacterium*, uranium, interaction, temperature

Abstract

The Chernobyl accident induced dispersion of uranium (U) around the nuclear power plant, leading to high levels of soil contamination. A worldwide multidisciplinary research focusing on the evaluation of the mobility of this element and on finding bioremediation process has been engaged. This work aimed at identifying detoxification mechanisms engaged by a bacteria isolated from Chernobyl soil and U(VI) and at distinguishing active from passive mechanisms of interaction. The Chernobyl *Microbacterium* sp. strain A9 was exposed to 0, 10 and 50 μM of U(VI) at 4 and 25°C for 24h under aerobic conditions. The ability of the strain to remove U(VI) from aqueous solutions was evaluated as well as the survival capacity upon U(VI) exposure. The subcellular localization of U was determined by TEM/EDX microscopy, functional groups involved in the interaction with U were further evaluated by FTIR and finally, the speciation of U(VI) was analyzed by TRLFS. We evidenced a novel active mechanism promoting metal efflux from the cells, in early steps after U exposure at 25°C. *Microbacterium* sp. strain A9 also store U(VI) intracellularly as needle-like structures identified as autunite group mineral. This study constitutes the first report of the influence of temperature as a determinant parameter influencing both bacteria U(VI) interactions and the ability of bacteria to remove U(VI) from aqueous media. Taken together, our results demonstrate that this strain exhibits a high U tolerance based on multiple detoxification mechanisms. These findings support the potential role of the genus *Microbacterium* in remediation of aqueous environments contaminated with U(VI) under aerobic conditions.

1. Introduction

Uranium (U) is a naturally occurring element whose concentration in European soils ranged from 0.2 to 50 mg kg⁻¹ with a median value at 2 mg kg⁻¹ (De Vos and Tarvainen, 2006). It is classified as a major soil and groundwater contaminant due to its combined chemo and radiotoxicity. Anthropogenic activities as nuclear fuel production, weapons manufacturing and nuclear power plant accidents have contributed to the redistribution of this element in the environment. The Chernobyl accident has induced the release of huge quantities of radionuclides. Among those, fuel particles composed of uranium oxide (UO₂) and mixed zirconium-uranium oxide (Zr-UO₂) were dispersed around the nuclear power plant, leading to a highly contaminated surrounding (Khasparov *et al.*, 2004). The concentrations of U in the upper 0-10 cm soil layers ranges from 2.1 µg kg⁻¹ to 2.0 mg kg⁻¹, depending mainly on the distance from the Chernobyl reactor (24 km and 7 km from the CNPP respectively) (Mironov *et al.*, 2005). Close to the plant (2.5 km) fuel particles and other radioactive debris were buried in radioactive waste repositories resulting in uranium concentrations reaching 80 mg kg⁻¹ and mass ratio of ²³⁵U/²³⁸U as high as 1.17% while natural values should not exceed 0.72% (Sahoo *et al.*, 2009; Chapon *et al.*, 2012). The large uranium radioactive decay half-life (*i.e.* > 4 billion years for ²³⁸U and > 700 million years for ²³⁵U) leads to a long radioactive persistence in Chernobyl soils. Moreover, U deposits in soils can be subjected to rainfall infiltration resulting in U mobility.

Research focusing on the evaluation of the mobility of this element and on finding bioremediation processes has been largely engaged worldwide (Gavrilescu *et al.*, 2009). Some laboratory experiments have already demonstrated the great interest of bacteria for reducing uranium mobility. In oxic environments, bacteria may interact directly with uranium through biosorption at the cell surface or by intracellular bioaccumulation, or indirectly through modification of surrounding geochemical conditions leading to precipitation of U (Merroun and Selenska-Pobell, 2008). However, the viability of bacteria in those processes is rarely taken into account although this factor could be critical for the success of long term bioremediation applications.

It has already been shown that highly contaminated environments constitute putative reservoirs for the isolation of U resistant bacteria (Suzuki and Banfield, 2004; Choudhary and Sar, 2011). In a previous work, we selected and identified a strain affiliated to the genus *Microbacterium* (referred as *Microbacterium* sp. strain A9) able to survive to U(VI) exposure

(100 μM of $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ at pH 5 in NaCl 0.1M), among a set of 50 bacterial strains isolated from a radioactive waste repository in the Chernobyl exclusion zone (Chapon *et al.*, 2012). Previous reports on U interaction with *Microbacterium* strains isolated near a Siberian radioactive waste depository revealed the ability of those bacterial strains to interact with up to 0.5 mM of $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ (Merroun *et al.*, 2006). This genus of bacteria was detected in several radioactive waste contaminated areas or in natural U rich soil (Kumar *et al.*, 2013; Mondani *et al.*, 2011; Nedelkova *et al.*, 2007) thus constitutes a good candidate to study active interactions of cells with U. Moreover, some *Microbacterium* species exhibit interesting features as polymetal resistance (Kaushik *et al.*, 2012; Nazina *et al.*, 2010) and have been proposed in bioremediation applications.

The goal of this work was to identify detoxification mechanisms engaged by *Microbacterium* sp. strain A9 living cells exposed to a range of U(VI) concentrations. The opportunity was taken to evaluate and distinguish active from passive mechanisms of interactions by the influence of temperature as a parameter influencing the activity of the bacteria. The survival rate of bacteria was assessed in all exposure conditions as well as the quantification of U uptake by bacteria and phosphate release. The localization and the speciation of U having interacted with the cells were conducted respectively by microscopic (TEM-EDX) and spectrometric approaches (ATR-FTIR, TRLFS).

2. Material and methods

2.1. Site description, isolation method and cultivation conditions

The strain *Microbacterium* sp. A9 was isolated from Chernobyl soil in the trench T22, a waste contaminated storage site located near the Chernobyl nuclear power plant (2.5 km) which contains clean-up waste from the Red Forest and other contaminated debris since 1987 (Bugai *et al.*, 2005). The strain was isolated on AEM1 medium agar plates after heating at 95°C during 8 min as described previously (Chapon *et al.*, 2012). For this study, the strain A9 was routinely cultivated in 0.1x Tryptic Soy Broth (TSB, Difco Laboratories) at 32°C with shaking at 150 rpm.

2.2. Uranium exposure

The strain *Microbacterium* sp. A9 was cultivated in 0.1x TSB medium until exponential growth phase and cells were harvested by centrifugation for 10 min at 5,000 g. From this stage, the samples were maintained either at 4°C or at 25°C throughout the experiment. After

centrifugation, the cell pellets were washed twice in NaCl 0.1M. Bacteria were then re-suspended at the same cell density in NaCl 0.1M pH 5 in the presence of 0, 10 or 50 μM of $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$. U was added as uranyl nitrate $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (specific activity: $1.23 \times 10^4 \text{ Bq g}^{-1}$, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France) from a previously prepared and filtered 7.51 mM stock solution in 0.016 M HNO_3 . The chemical form of U used leads to the addition of NO_3^- in the medium. Therefore, for each condition tested, the nitrate concentration was adjusted by adding NaNO_3 to reach the same NO_3^- final concentration (0.416 mM) in all exposure conditions. Bacteria exposed to uranium were incubated with shaking (400 rpm min^{-1}) at 25°C or 4°C . Triplicate samples were performed for each test condition. The concentration of bacteria in the exposure solution was about $6 \cdot 10^9 \text{ bacteria ml}^{-1}$ ($\pm 9\%$). Aliquots were taken after 0.5; 2; 4; 6; 10 and 24 h for measurement of U and phosphate in the supernatant. Bacterial viability was checked at 0.5 and 24 h. TEM-EDX, TRLFS and ATR-FTIR analyses were performed on bacterial cell pellets after 0.5, 6 and 24 h of exposure to uranium.

2.3. Uranium speciation modelling

Speciation of 10 and 50 μM of U in the exposure media at 25°C or 4°C was simulated using the chemical speciation software Visual MINTEQ (ver. 3.0) (Easton, PA, USA).

2.4. Uranium quantification

The samples were centrifuged at 8,000 g for 5 min. Uranium in the supernatant was assayed after an acidification step with nitric acid (0.31 M HNO_3). Samples were analyzed by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES Optima 4300DV, PerkinElmer, Wellesley/USA; detection limit: $10 \mu\text{g L}^{-1} \pm 10\%$). Controls without bacteria were also included to ensure that U was not adsorbed on the materiel surface.

2.5. Phosphate quantification

The amount of inorganic phosphate (Pi) in the supernatant was quantified by colorimetric measurements using the molybdophosphoric acid blue method (Osmond, 1887). 250 μL of the clear supernatant was added to 50 μL of the reactive solution of molybdate ammonium and samples were incubated at 25°C for 20 min. Potassium dihydrogen phosphate solutions with

concentrations ranging from 0 to 32.3 μM were used as standards. All the measurements were done at 25°C in a 96 well micro-plate and recorded at 720 nm.

2.6. Bacterial viability

Aliquots of cell suspensions taken at 0.5 and 24 hours were diluted in 0.1x TSB and spread on 0.1x TSB agar plates. Colony Forming Units (CFUs) were counted after 24 h at 30°C.

2.7. Microscopy (TEM-EDX) analysis

Bacterial cell pellets were fixed in sodium cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4) supplemented with 2.5% glutaraldehyde. After 24 h at 4°C, the samples were washed three times for 5 min with sodium cacodylate buffer and post-fixed in the same buffer containing 1% osmium tetroxide (OsO_4) for 1 h. The samples were dehydrated through a graded ethanol series, and finally embedded in the monomeric resin Epon 812. All chemicals used for histological preparation were purchased from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, USA). Samples were cut in ultra-thin sections of 80 nm (TEM) and 110 nm (EDX) using an ultramicrotome UCT (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). For ultrastructural observation the sections were then mounted on copper grids and observed with a Scanning Transmission Electron Microscope (TEM/STEM, Tecnai G²Biotwin, FEI company Eindhoven, the Netherlands), equipped with a CCD camera Megaview III, (Olympus Soft imaging Solutions GmbH, Münster, Germany). At least 200 photographs of cells were taken, analyzed and compared for each condition. The localization of U was conducted using the Energy Dispersive X-ray analyzer Phoenix (EDAX Inc., Mahwah, USA), equipped with a Super Ultra-Thin Window model sapphire detector with a counting time of 100 seconds.

2.8. Time-Resolved Laser-induced Fluorescence Spectroscopy (TRLFS)

Because the temperature of the TRLFS analytical design was not controlled, only samples resulting from exposure at 25°C have been analysed. Cell pellets were washed five times with ultrapure water to remove labile U and to avoid fluorescence quenching linked to the presence of Cl^- ions. Cell pellets were re-suspended in 600 μL of ultrapure water and 300 μL aliquots were introduced in a 96 well black quartz microplate for analyses. A pulsed laser (Continuum Minilight, 5 ns / pulse, 10 Hz, $E < 3 \mu\text{J}$) with an emission wavelength of 266 nm was used for

the excitation. Fluorescence intensity was recorded from 376 to 669 nm using a CCD camera (Spectrophotometer Andor Technology SR-303i-A) with a spectral resolution of 0.14 nm. As for the washing step, acquisition was done at room temperature. The time resolved spectra were recorded between 1 and 96 μs with a step width of 0.5 μs from 1 to 6 μs and of 5 μs from 6 to 96 μs and a gate width of 20 μs . Accumulation of acquisition from 100 laser flashes were averaged for each spectrum. Lifetimes were calculated as described in Vercouter *et al.* (2008). Additionally, a sample containing a U-phosphate complex $[\text{UO}_2(\text{H}_2\text{PO}_4)_2]$ was prepared by mixing $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ (1 mg L^{-1}) with H_3PO_4 (0,5 M) and used as a reference.

2.9. Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infra-Red spectroscopy (ATR-FTIR)

The cell pellets, stored frozen in liquid nitrogen, were thawed and subsequently washed with ultrapure water before use. 1,5 μL of each sample was deposited and dried on the ATR surface (9 bounce diamond microprism with a 4.3 mm surface diameter and ZnSe optics, SensIr Technologies) during 15 min to avoid background absorption from water. All the infrared spectra were recorded with 4 cm^{-1} resolution in the 4000-400 cm^{-1} range using a Bruker IFS28 FTIR spectrometer equipped with a DTGS detector (SensIR ATR Setup). Typically, 300 scans were accumulated for one spectrum.

2.10. Statistical analysis

Results of cell viability as well as those of uranium and phosphate measurements in the supernatants are given as mean \pm the standard deviation of the mean. All statistical analyses were done using the R language and environment for statistical computing (R development Core Team, 2009). The cell viability and phosphate release were statistically analyzed with ANOVA, after checking assumptions of normality and variance homogeneity of residuals. A probability of $p < 0.05$ was considered significant for the statistical results of cell viability experiment and of $p < 0.001$ for total inorganic phosphate concentrations determination.

3. Results

3.1. U speciation

The results of U speciation simulation in the different exposure media are presented in Table 1. As no precipitate has been observed during the preparation of our exposure media,

precipitation has been excluded from our simulation. In a simple physiologic solution (NaCl, 0,1 M) at pH 5, U is mainly present as UO_2^{2+} and UO_2OH^+ , which both have been found to be bioavailable (Markich, 2002). The abundance of those species fluctuated in function of U concentration and temperature. U bioavailable form constitutes 60% and 80% of the soluble U at 50 μM respectively at 25°C and 4°C while at 10 μM it constitutes 86% and 94% respectively at 25°C and 4°C.

3.2. Bacterial viability upon uranium exposure

The viability of bacterial cells in the different conditions tested was determined by CFUs counting. In the control without U, no mortality was measured after 24 hours at 4°C and 25°C indicating that bacteria remained viable during the experiment (Figure 1). The same result was obtained for the samples incubated at 4°C with 10 and 50 μM U and for the samples incubated at 25°C with 10 μM U. In contrast, incubation at 25°C in the presence of 50 μM U led to 61% mortality after 24h.

3.3. U sequestration by *Microbacterium* sp. strain A9

The kinetic of U uptake from the exposure solution by bacterial cells was determined by measuring U content in the supernatant. At the highest concentration (50 μM), a first step of fast metal uptake was observed at 4°C and at 25°C (Figure 2B). Within the first 30 min of exposure, 78% of the initial amount of U was removed from the supernatant. The uptake reached an apparent equilibrium after 24 hours at 4°C while at 25°C, U uptake continued to increase. The amount of U removed from the supernatant after 24h was 94% at 25°C and 86% at 4°C.

At the lowest U concentration (10 μM) the kinetic was also characterized by a rapid U uptake of more than 90% of the total U within the first 30 min at both temperatures (Figure 2A). After this step, great differences could be observed between both temperatures. At 4°C, U uptake stopped and the system remained stable until the end of the experiment. At 25°C in contrast, a release was observed between 0.5 and 4h, followed by a slow U uptake leading finally to the accumulation of 86% of total U after 24h.

3.4. Inorganic phosphate release during U exposure

Since inorganic phosphate (Pi) released by cells can strongly influence U speciation and solubility, its content was measured in all the cell-free supernatants (Figure 3). At 4°C, no statistically significant differences were found between the control samples and samples with 10 µM U, where the concentration of Pi remained constant during the experiment, with an average of 7.4 ± 0.76 µM. In contrast, with 50 µM U, the Pi concentration values were always significantly lower than in the other conditions and showed a strong decline during the incubation. At the end of the experiment, the Pi concentration decreased by more than 7 fold as compared to the control (1 µM of Pi).

At 25°C an increase of the Pi content in the supernatant was observed in all the conditions but with different extents. The maximum release of Pi occurred for cells exposed to 10 µM U, except at 24h where the highest value was measured in the control sample (43 µM). In the condition 50 µM U, Pi release was observed with values 2.5 to 4 times lower than in the other conditions at 25°C.

3.5. Microscopic observations of uranium-exposed cells

Microscopic observations by means of Transmission Electron Microscopy (TEM) coupled with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDX) revealed needle-like structures that contain U inside the bacteria (Figure 4). Those structures were detected exclusively in the samples incubated at 25°C and exposed to U for at least 6 hours. The size of these structures increased as function of time. The EDX analysis revealed that U in these structures was co-localized mainly with phosphorus and calcium. The presence of P structures co-localized with Ca but without U was also evidenced in the cytoplasm of bacteria whatever the exposure conditions (25°C or 4°C).

3.6. Analysis of uranium speciation with TRLFS

To investigate how U interacts with the biomass, uranium speciation within the bacteria cells was analyzed by TRLFS. This technique enables to derive information on the possible U species formed (by the analysis of the band position in the static emission fluorescence spectrum) and on the number of different species (by the analysis of the time-resolved fluorescence measurements) present in the sample. TRLFS measurements were performed on

cells exposed to 10 and 50 μM U at 25°C for 0.5, 6 and 24 h. The fluorescence emission spectra of cells exposed to 50 μM U are presented in Figure 5. Spectra of cells exposed for 0.5 h showed a low signal-to-noise ratio with poorly resolved peaks of emission. The positions of the emission maxima of the exposed bacteria evolved as a function of the exposure time to U. The three spectra were characterized by the same positions of emission maxima at 495, 516 and 539 nm. However cells exposed for 24 hours showed two more important shoulders characterized by emission at 503 and 524 nm.

It should be mentioned that the signal emitted by cells exposed to 10 μM U was very low, making the identification of the maximum emission spectra impossible, but spectrum had the same shape than those observed for cells exposed to 50 μM U.

The position of the emission maxima of the exposed cells coincided with those of our U-phosphate reference complex (Figure 5A, 495, 516, 539, 565 nm). However the construction of a convoluted spectrum based only on the presence of the U-phosphate complex and background noise evidenced the need to consider a second compound, with emission maxima corresponding to those of autunite (Figure 5B, 503, 524, 547 and 573 nm), to explain the spectra of exposed cells. The percentage of autunite needed to fit the exposed cells spectra increased with the exposure time to U. After 6 h of exposure to U, the fluorescence spectra of uranium accumulated in the cells might be explained by the presence of 6% autunite, 34% U-phosphate complexes and 61% background noise, whereas after 24h of exposure these values reached 15%, 45% and 40% for autunite, U-phosphate complexes and background noise respectively.

The luminescence lifetimes analyses of the exposed cells samples could not reveal differences according to the exposure time. All data fitted well with a bi-exponential decay curve, confirming the presence of two luminescent species, with a first lifetime values of 29.9 ± 5.4 , 34.4 ± 4.3 and 32.6 ± 3.1 μs and a second lifetime of 2.0 ± 0.7 , 3.5 ± 1.8 and 2.3 ± 0.4 μs for respectively 0.5, 6 and 24 hours. These lifetimes were slightly shorter than the lifetimes of autunite (105 and 18 μs) and U-phosphate complex (94.6 ± 3.6 and 3.1 ± 0.9 μs) probably due to the presence of fluorescence quenchers (mainly from organic origin) in bacteria (Reitz *et al.*, 2011).

3.7. FTIR

To obtain more information about the bacterial functional groups involved in U(VI) complexation, ATR-FTIR spectra were recorded for non-exposed bacteria (control) as well as

for bacteria exposed to 10 and 50 μM U for 0.5, 6 and 24 h both at 4°C and 25°C. Results are presented in Figure 6 as difference spectra (i. e. spectra of the exposed bacteria minus spectra of the non-exposed bacteria). The spectra of control and exposed cells have been calibrated using the absorption bands of proteins to calculate the difference spectra. In these spectra, positive and negative peaks represent vibrational modes of functional groups that undergo changes due to U complexation. A main result revealed by this approach was the temperature dependence of the difference spectra and the spectral changes observed at 25°C with the exposure time. At 4°C difference spectra showed only a slight evolution with the exposure time to U. They are characterized by a clear positive band at 916 cm^{-1} and by negative bands at 1400 cm^{-1} and 1570 cm^{-1} . The positive band (at 916 cm^{-1}) was assigned to the asymmetric stretching vibration of the uranyl ion and observed for uranyl complexes involving functional groups belonging to various cellular components (Popa *et al.*, 2003; Barkleit *et al.*, 2011). The two others bands were respectively assigned to the symmetric and to the asymmetric vibration of carboxylate groups, suggesting that uranyl is coordinated by carboxylate groups in the cells at 4°C. In addition, IR bands between 1300 and 1000 cm^{-1} are in accordance with bands of phosphoryl or phosphate groups (Barkleit *et al.*, 2011; Pardoux *et al.*, 2012), showing that these groups may also be involved in uranium binding at 4°C. In contrast at 25°C, a clear evolution of the difference spectra according to the different exposure time to U was observed. The spectrum recorded after 0.5 h of U exposure at 25°C was similar to that recorded after the same exposure time at 4°C. This indicates that similar chelation processes occur shortly after uranyl exposure at both temperatures, and that these processes involve carboxylate groups. For spectra recorded after 6 h and 24 h exposure to uranium at 25°C, the bands assigned to carboxylate groups at 1400 and 1570 cm^{-1} decrease significantly, and bands assigned to phosphate and /or phosphoryl groups at 1087 cm^{-1} , 1220 cm^{-1} , and 1274 cm^{-1} changed, i.e. largely increased notably after 24 h exposure. These changes highlight the role of phosphate groups in the binding of uranium at 25°C at longer time scales.

4. Discussion

4.1. Mechanism of U-bacteria interaction

The present study described the interaction of the *Microbacterium* sp. strain A9 isolated from a radioactive waste repository. Comparison of data obtained at two temperatures, and the use of a strain resistant to uranium in the exposure conditions allowed proposing for the first time active and passive mechanisms of uranium uptake and release (Figure 7).

4.1.1. U uptake and release mechanisms

The uptake of U(VI) by *Microbacterium* sp. strain A9 was characterized by a multiple steps mechanism. The first step occurred in few minutes (30 min) and was metabolism independent. Such a mechanism has already been shown in several previous studies and has been interpreted as adsorption of U to the bacterial external membrane due to electrostatic interaction between anionic sites such as carboxyl and/or phosphoryl groups present on lipopolysaccharides and parts of cell envelope for which uranium has a strong affinity (Choudhary and Sar, 2011). This was confirmed by our FTIR results which showed that at this stage U in the bacteria was coordinated mainly to carboxyl groups. This mechanism could also result from a metabolism-independent accumulation of U (Merroun and Selenska-Pobell, 2008) due to membrane permeability (Suzuki and Banfield, 2004). However, no accumulation of U inside the cells was detectable with TEM observation at this first stage, neither later at 4°C.

Immediately after the first U(VI) uptake, the cell exposed to 10 µM released a fraction of uranium, possibly as a protective mechanism. Since this release was observed only at 25°C, it may involve an active mechanism such as an export system. Metal export systems are widespread and allow bacteria to survive in metal contaminated environments (Nies, 2003). The involvement of U-efflux system in the detoxification of uranium is unclear but the up-regulation of genes encoding for metal efflux pumps have been already evidenced when *Desulfotomaculumreducens* was exposed to 100 µM of U(VI) under anaerobic condition (Junier *et al.*, 2011). In our study, U(VI) release in the media was only observable at the lowest exposure concentration. This suggests that the release mechanism can only support small amounts of U(VI) and that the exposure to high U(VI) concentrations could inhibit the phenomenon or that there is an equilibrium between a low efficiency release mechanisms and higher efficiency uptake mechanisms.

Finally, a slower temperature dependent uptake of U(VI) appeared at both concentrations of U (with higher uptake efficiency at 25°C than at 4°C), suggesting the involvement of a metabolism-dependent mechanism in the uptake of U. Using a different range of temperatures (32°C to 45°C), (Fosso-Kankeu *et al.*, 2010) have evidenced a positive correlation between increase temperature and metal uptake (silver (I), chromium (III), and lead (II)). This could result from improved metabolic activity and energy of the system at higher temperature, which could promote the active uptake or attachment of metal to cell surface respectively (Goyal *et al.*, 2003). The strain *Chryseomonas* MGF-48 treated with metabolic inhibitors

(dinitrophenol or sodium azide) showed a decrease in uranium uptake capacity (respectively 8% and 13%) and confirmed that uranium accumulation by this bacterium involves both a metabolism-independent and a metabolism-dependent phase (Malekzadeh *et al.*, 2002).

4.1.2. Phosphate release and its detoxification role

Involvement of phosphate (Pi) to decrease U toxicity has often been shown in a lot of different organisms (Merroun and Selenska-Pobell 2008; Misson *et al.*, 2009). Phosphate release by the *Microbacterium* sp. strain A9 was observed at 25°C but not at 4°C. At this low temperature, an initial amount of Pi was initially present in the media, probably due to the stress induced by the low temperature but the quantity of Pi in the media didn't increase during the experiment. This result confirmed that the *Microbacterium* sp. strain A9 is inactive at 4°C and that Pi release is an active process. At 25°C the release of Pi was U-concentration dependent. Bacteria exposed to the lowest and non-toxic U(VI) concentration (10 µM) showed a rapid induction of Pi release, leading to Pi concentrations in the media higher than in the controls for the first 10 hours. Active bacteria could induce the discharge of Pi to limit the entrance of U(VI) by passive diffusion as a protective mechanism. In fact, the production of extracellular ligands for metal sequestration is a common bacterial response to toxic contaminants (Gadd 2010) and previous studies have evidenced the implication of Pi to precipitate U in the extra-cellular region, thus preventing or limiting its entrance into the cytoplasm (Martinez *et al.*, 2007). In our conditions, no U precipitates were observed by TEM in the exposure media or at the bacterial surface. Therefore, it is more probable that the U-Pi complexes remained as soluble complexes in the exposure media. Besides, Pi release by bacteria exposed to 10µM U was concomitant with the efflux of U discussed above. Therefore, it is not possible to clearly identify if the release of Pi had occurred previously to the entrance of U in the cell or if the Pi was involved in the efflux system leading to a release of both U and Pi. It has been reported that the storage of phosphorus into polyphosphate granule bodies is a widespread ability among bacteria such as *M. tuberculosis*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus* (Talaat, 2012; Tobin *et al.*, 2007). Phosphorus is accumulated by bacteria as a resource in case of starvation and can be used in defense mechanisms against metal contamination when needed (Sivaswamy *et al.*, 2011). Basically, under stress conditions (ex: starvation, metal contamination) Pi release is initiated by phosphatase enzymes which catalyse liberation of Pi from polyphosphate granules to cope with the stress. Studies have demonstrated the efficiency of non-specific acid phosphatases in metal

precipitation (Martinez *et al.*, 2007). Phosphatase activity has also been reported in studies where released Pi co-precipitated with U (Beazley *et al.*, 2007).

The release of Pi seemed to be affected by the accumulation of U inside the cell. Indeed, exposure for 24h to 10 μM U or exposure to high concentrations of U (50 μM) inhibited the release of Pi, as compared to the controls. A total or partial inhibition of the phosphatase activity by the uranyl ion (Finlay *et al.*, 1999) could be suspected. Indeed U is known to be able of inhibiting the activity of various enzymes (Finlay *et al.*, 1999; Al Kadissi *et al.*, 2012a; Al Kadissi *et al.*, 2012b; Barillet *et al.*, 2011). It is also possible that phosphate is maintained in cells as part of uranium-phosphate precipitates (Misson *et al.*, 2009). Ray *et al.* (2011) have reported that U minimizes the final average concentrations of Pi in solution of bacterial culture exposed to 100 μM of U(VI). We can also hypothesize that the high toxicity of U led to the impairment of cellular function and the latter couldn't manage the massive entrance of U.

4.1.3. Speciation of uranium accumulated in the cells

Microscopic as well as spectroscopic techniques have been employed to elucidate the speciation of uranium that has interacted with *Microbacterium* sp. strain A9. The three techniques gave coherent results which demonstrates the involvement of Pi in the sequestration of U. Uranium interaction with *Microbacterium* sp. strain A9 led not only to adsorption to the cell wall, as seen in the early time of exposure, but also to intracellular accumulation observable with TEM at both exposure concentration of U (10 and 50 μM). This accumulation involved a metabolism-dependent mechanism (since it was never observed at 4°C) which led to the formation of needle like structures, where U co-localized with P and Ca. The amount of those structures in the bacterial cell increased during the exposure time and the correlative higher amount of U in the cell. Similar intracellular structures of U have been reported in the literature for Gram negative bacteria and for Gram positive bacteria (Ray *et al.*, 2011; Merroun *et al.*, 2011).

A spectroscopic technique like TRLFS allows a direct determination of the speciation of uranium (Lütke *et al.*, 2012). Results of TRLFS analysis confirmed that U interacted with phosphate and evidenced two species of U. The first one has been identified as U-inorganic phosphate complexes, based on the reference compounds analyzed. However, U(VI)-ATP has been shown to have similar spectrum than our reference U-inorganic phosphate complexes (Merroun *et al.*, 2003; Renninger *et al.*, 2004). Although we could not clearly identify if U was complexed with ATP or with inorganic phosphate, the involvement of a U-phosphate

complex as the main U species in the bacterial cell was unambiguous. The second U species has been identified as autunite ($\text{Ca}(\text{UO}_2)_2(\text{PO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})_{10}$). This finding confirmed the TEM-EDX results which had evidenced a precipitate where Ca, U and P co-localized. Previous studies have evidenced the formation of autunite as a mechanism of U(VI) sequestration on the cell wall or intracellularly by bacteria isolated from uranium mine wastes, ground water, radioactive waste depositories, and uranium waste piles but also from non-contaminated areas (Merroun *et al.*, 2006; Nedelkova *et al.*, 2007; Jroundi *et al.*, 2007; Krawczyk-Bärsch *et al.*, 2012). However based on both TEM-EDX and TRLFS analyses, our results showed for the first time that autunite might be able to form after exposure to concentrations of U as low as 10 μM and that its concentration in bacteria increases with exposure time. Precipitation of autunite makes U less available for complexation with proteins (Pardoux *et al.*, 2012) or biomolecules (Frelon *et al.*, 2013) and therefore decreases its toxicity.

Whereas TRLFS is a precious tool for analyzing speciation governed by fluorescent species, it might have lacked the identification of others U complexes that show no luminescence at room temperature (Lutke *et al.*, 2012). Therefore, ATR-FTIR was used as a complementary method to assess U speciation in the bacteria. In addition, ATR-FTIR allowed the determination of the U coordination in the samples exposed at 4°C. FTIR experiments are frequently used to determine bacterial chemical groups involved in uranium binding (Choudhary and Sar, 2011; Acharya *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2010) and generally revealed a synergistic involvement of deprotonated phosphate and carboxylate moieties in U interaction (Kazy *et al.*, 2009; Choudhary and Sar, 2011). The same functional groups interacted with U(VI) in the current study but our results evidenced a clear distinction in the U coordination in samples exposed at 4°C and 25°C. As discussed above, U coordination with carboxylate groups was dominant only at 4°C and at early time of exposure at 25°C, reflecting U adsorption at the surface of the bacteria. Intracellular accumulation of U inside the bacteria at 25°C led to a different coordination of U, kinetically controlled. As exposure time increases, U coordination involved predominantly phosphate groups. This result confirmed both the TEM-EDX and the TRLFS results and evidenced a metabolic-dependent mechanisms involving phosphate to reduce uranium toxicity inside the cell.

4.2. Resistance of *Microbacterium* to U

The results of modelled speciation demonstrated that U bioavailability is influenced by the pH, the redox-potential, and the presence of various complexing agents. In our study, to focus

exclusively on the role of U(VI) in its more bioavailable form (UO_2^{2+}) we employed an exposure media totally devoid of complexing agents. Ours results indicated that the strain *Microbacterium* sp. A9 is highly resistant to U(VI) exposure and a large part of the cells remained viable despite the presence of 50 μM of U(VI). *Microbacterium* was reported to be resistant to many metals such as arsenic, cobalt, nickel, zinc, chromium selenium and stannous and exhibited variable sensitivity to mercury, cadmium, lead and antimony (Gavrilescu *et al.*, 2009). Moreover, *Microbacterium* populations are flexible, able to adapt rapidly to stress conditions and can sustain changes in their habitat induced by the introduction of heavy metals (Chicote *et al.*, 2005). In a study conducted by Nedlekova *et al.* (2007), three *Microbacterium* species were tested for their ability to interact with uranium under aerobic conditions and their results clearly proved the potential of this genus to immobilize high quantity of U(VI). The three tested strains were able to precipitate uranium in the bulk phase as well as on the cell surface at pH 4.5 *via* the formation of meta-autunite like phase when exposed to 500 μM of U(VI) (Nedelkova *et al.*, 2007). In the present work, coherent results were obtained with the strain A9 which demonstrated a high potential for U(VI) removal. However U(VI) was localized inside the cell. This could be the result of the concentration employed which was ten times lower (50 μM). At this concentration and based on the speciation modelling, U(VI) is under its more bioavailable form. Moreover, those strains were not isolated from the same area and thus could exhibit different detoxification mechanism against U(VI). This could signify that among the genus *Microbacterium*, species could develop different mechanisms of resistance against uranium.

The ability of *Microbacterium* to simultaneously tolerate high U exposure and accumulate the pollutant as autunite would participate to both an efficient immobilization and extraction of this heavy metal from soils. Such minerals are identified in contaminated sediments as the long-term controlling phase of U (Wellman *et al.*, 2006) due to their stability in time. Intracellular accumulation of U as autunite mineral could be a promising strategy for treatment and cleanup of U contaminated sub-surfaces. Indeed, peripheral deposited U has higher probability of resolubilisation than inside cells. In addition, living bacteria could multiply and colonize environments and thus increase the exchange capacity and the possibility of U(VI) bio-accumulation. Therefore, viable bacteria constitute a good solution for effective long-term immobilization of U in soil.

5. Conclusions and perspectives

In conclusion, the strain *Microbacterium* sp. A9 isolated from the highly contaminated trench T22 of Chernobyl showed high capacity of survival and resistance to U(VI) under aerobic conditions. This bacterium accumulated the radioelement and was capable to put in place various detoxification mechanisms. Three mechanisms have been identified, which all involved phosphate. The first one is a phosphate release in the exposure media that may complex uranium and prevent its further entrance in the cell. The second one is an efflux mechanism of U from the bacteria. This mechanism is only visible when bacteria are exposed to low concentration of U (10 μ M). Whether it is masked or doesn't exist at higher concentration of U is still unknown. Moreover, the efflux of U is concomitant with the release of phosphate, which may suggest that these first two mechanisms are linked together. The consequence of these two mechanisms is clearly to limit U entrance in the cell and reduce its intracellular concentration. The third mechanism of detoxification consists in precipitating the uranium accumulated intracellularly as autunite.

This study also highlights the potential use of *Microbacterium* genus for bioremediation. In order to validate its use as a solution for cleanup of U contaminated sub-surfaces it would be interesting to study the behavior of these bacteria *in situ* conditions and determine the immobilization capacity of U in soils. A proposition of the mechanism of interaction between U and bacteria was proposed (Figure 7) which corroborated all the results obtained. Finally, these mechanisms are far from being totally understood. Therefore, an effort in elucidating the efflux and detoxification mechanisms should be made as a research perspective for this work.

Acknowledgements:

This work is financially supported by the CNRS and IRSN through the GNR TRASSE (Research Action Number 2008-1C) and corresponds to the GNR TRASSE Contribution Number 2011-08. We thank Sacha Pasquier for his technical assistance during TLRFS analysis. Nicolas Theodorakopoulos PhD Grant of is co-funded by IRSN and the PACA regional council.

References

- Acharya C, Joseph D, Apte SK. 2009. Uranium sequestration by a marine cyanobacterium, *Synechococcus elongatus* strain BDU/75042. *Bioresource Technology* 100: 2176-2181
- Al Kaddissi S, Frelon S, Elia AC, Legeay A, Gonzalez P, Coppin F, Orjollet D, Camilleri V, Beaugelin-Seiller K, Gilbin R, Simon O. 2012. Are antioxidant and transcriptional responses useful for discriminating between chemo- and radiotoxicity of uranium in the crayfish *Procambarus clarkii*? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80: 266-272
- Al Kaddissi S, Legeay A, Elia AC, Gonzalez P, Camilleri V, Gilbin R, Simon O. 2012. Effects of uranium on crayfish *Procambarus clarkii* mitochondria and antioxidants responses after chronic exposure: What have we learned? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78: 218-224
- Barillet S, Adam-Guillermin C, Palluel O, Porcher J-M, Devaux A. 2011. Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. *Environmental Pollution* 159: 495-502
- Barkleit A, Foerstendorf H, Li B, Rossberg A, Moll H, Bernhard G. 2011. Coordination of uranium(vi) with functional groups of bacterial lipopolysaccharide studied by EXAFS and FT-IR spectroscopy. *Dalton Transactions* 40: 9868-9876
- Beazley MJ, Martinez RJ, Sobecky PA, Webb SM, Taillefert M. 2007. Uranium biomineralization as a result of bacterial phosphatase activity: insights from bacterial isolates from a contaminated subsurface. *Environmental Science & Technology* 41: 5701-5707
- Bugai D, Kashparov V, Dewiére L, Khomutinin Y, Levchuk S, Yoschenko V. 2005. Characterization of subsurface geometry and radioactivity distribution in the trench containing Chernobyl clean-up wastes. *Environmental Geology* 47: 869-881
- Chapon V, Piette L, Vesvres M-H, Coppin F, Marrec CL, Christen R, Theodorakopoulos N, Février L, Levchuki S, Martin-Garin A, Berthomieu C, Sergeant C. 2012. Microbial diversity in contaminated soils along the T22 trench of the Chernobyl experimental platform. *Applied Geochemistry* 27: 1375-1383
- Chicote E, García AM, Moreno DA, Sarró MI, Lorenzo PI, Montero F. 2005. Isolation and identification of bacteria from spent nuclear fuel pools. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32: 155-162

- Choudhary S, Sar P. 2011. Uranium biomineralization by a metal resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from contaminated mine waste. *Journal of Hazardous Materials* 186: 336-343
- De Vos W et Tarvainen T. 2006. Geochemical Atlas of Europe. Part 2 – Interpretation of Geochemical Maps, Additional tables, Figures, Maps and Related Publications (<http://www.gsf.fi/publ/foregsatlas/part2.php>)
- Finlay JA, Allan VJ, Conner A, Callow ME, Basnakova G, Macaskie LE. 1999. Phosphate release and heavy metal accumulation by biofilm-immobilized and chemically-coupled cells of a *Citrobacter* sp. pre-grown in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering* 63: 87-97
- Fosso-Kankeu E, Mulaba-Bafubiandi AF, Mamba BB, Marjanovic L, Barnard TG. 2010. A comprehensive study of physical and physiological parameters that affect bio-sorption of metal pollutants from aqueous solutions. *Physics and Chemistry of the Earth* 35: 672-678
- Frelon S, Mounicou S, Lobinski R, Gilbin R, Simon O. 2013. Subcellular fractionation and chemical speciation of uranium to elucidate its fate in gills and hepatopancreas of crayfish *Procambarus clarkii*. *Chemosphere* 91: 481–490
- Gadd GM. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156: 609-643
- Gavrilescu M, Pavel LV, Cretescu I. 2009. Characterization and remediation of soils contaminated with uranium. *Journal of Hazardous Materials* 163: 475-510
- Goyal N, Jain SC, Banerjee UC. 2003. Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals. *Advances in Environmental Research* 7: 311-319
- Jroundi F, Merroun ML, Arias JM, Rossberg A, Selenska-Pobell S, González-Muñoz MT. 2007. Spectroscopic and Microscopic Characterization of Uranium Biomineralization in *Myxococcus xanthus*. *Geomicrobiology Journal* 24: 441-449
- Junier P, Vecchia ED, Bernier-Latmani R. 2011. The response of *Desulfotomaculum reducens* MI-1 to U(VI) exposure: A transcriptomic study. *Geomicrobiology Journal* 28: 483-496
- Kashparov VA, Ahamdach N, Zvarich SI, Yoschenko VI, Maloshtan IM, Dewiere L. 2004. Kinetics of dissolution of Chernobyl fuel particles in soil in natural conditions. *Journal of Environmental Radioactivity* 72: 335-353

- Kazy SK, D'Souza SF, Sar P. 2009. Uranium and thorium sequestration by a *Pseudomonas* sp.: Mechanism and chemical characterization. *Journal of Hazardous Materials* 163: 65-72.11
- Kumar R, Nongkhlaw M, Acharya C, Joshi SR. 2013. Uranium (U)-tolerant bacterial diversity from U ore deposit of domiasiat in North-East India and its prospective utilisation in bioremediation. *Microbes and Environments* 28: 33-41
- Krawczyk-Bärsch E, Lünsdorf H, Pedersen K, Arnold T, Bok F, Steudtner R, Lehtinen A, Brendler V. 2012. Immobilization of uranium in biofilm microorganisms exposed to groundwater seeps over granitic rock tunnel walls in Olkiluoto, Finland. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 96: 94-104
- Lütke L, Moll H, Bernhard G. 2012. Insights into the uranium (VI) speciation with *Pseudomonas fluorescens* on a molecular level. *Dalton Transactions* 41: 13370-78
- Malekzadeh F, Latifi AM, Shahamat M, Levin M, Colwell RR. 2002. Effects of selected physical and chemical parameters on uranium uptake by the bacterium *Chryseomonas* MGF-48. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 599-602
- Markich SJ. 2002. Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *Scientific World Journal* 2: 707-729
- Martinez RJ, Beazley MJ, Taillefert M, Arakaki AK, Skolnick J, Sobecky PA. 2007. Aerobic uranium (VI) bioprecipitation by metal-resistant bacteria isolated from radionuclide- and metal-contaminated subsurface soils. *Environmental Microbiology* 9: 3122-3133
- Martins M, Faleiro ML, da Costa AM, Chaves S, Tenreiro R, Matos AP, Costa MC. 2010. Mechanism of uranium (VI) removal by two anaerobic bacterial communities. *Journal of Hazardous Materials* 184: 89-96
- Merroun ML, Geipel G, Nicolai R, Heise KH, Selenska-Pobell S. 2003. Complexation of uranium (VI) by three eco-types of *Acidithiobacillus ferrooxidans* studied using time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy and infrared spectroscopy. *BioMetals* 16: 331-39
- Merroun M, Nedelkova M, Rossberg A, Hennig C, Selenska-Pobell S. 2006. Interaction mechanisms of bacterial strains isolated from extreme habitats with uranium. *Radiochimica Acta* 94: 723-729
- Merroun ML, Selenska-Pobell S. 2008. Bacterial interactions with uranium: An environmental perspective. *Journal of Contaminant Hydrology* 102: 285-295.
- Merroun ML, Nedelkova M, Ojeda JJ, Reitz T, Fernández ML, Arias JM, Romero-González M, Selenska-Pobell S. 2011. Bio-precipitation of uranium by two bacterial isolates

- recovered from extreme environments as estimated by potentiometric titration, TEM and X-ray absorption spectroscopic analyses. *Journal of Hazardous Materials* 197: 1-10.
- Mironov VP, Matusевич JL, Kudrjashov VP, Ananich P I, Zhuravkov VV, Boulyga SF, Becker JS. 2005. Determination of uranium concentration and burn-up of irradiated reactor fuel in contaminated areas in Belarus using uranium isotopic ratios in soil samples. *Radiochimica Acta*. 93: 781
- Misson J, Henner P, Morello M, Floriani M, Wu TD, Guerquin-Kern JL, Février L. 2009. Use of phosphate to avoid uranium toxicity in *Arabidopsis thaliana* leads to alterations of morphological and physiological responses regulated by phosphate availability. *Environmental and Experimental Botany* 67: 353–362
- Mondani L, Benzerara K, Carrière M, Christen R, Mamindy-Pajany Y, Février L, Marmier N, Achouak W, Nardoux P, Berthomieu C, Chapon V. 2011. Influence of Uranium on Bacterial Communities: A Comparison of Natural Uranium-Rich Soils with Controls. *PLoS ONE* 6: e25771
- Nazina TN, Luk'yanova EA, Zakharova EV, Konstantinova LI, Kalmykov SN, Poltarau AB Zubkove AA. 2010. Microorganisms in a Disposal Site for Liquid Radioactive Wastes and Their Influence on Radionuclides. *Geomicrobiology Journal* 27: 473-486
- Nedelkova M, Merroun ML, Rossberg A, Hennig C, Selenska-Pobell S. 2007. Microbacterium isolates from the vicinity of a radioactive waste depository and their interactions with uranium. *FEMS Microbiology Ecology* 59: 694-705
- Nies DH. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 313-339
- Osmond F. 1887. Dosage colorimétrique du phosphore. *Bulletin de la Société Chimique de Paris* 47
- Pardoux R, Sauge-Merle S, Lemaire D, Delangle P, Guilloureau L, Adriano J-M, Berthomieu C. 2012. Modulating Uranium binding affinity in engineered calmodulin EF-hand peptides: Effect of phosphorylation. *PLoS ONE* 7: e41922
- Popa K, Cecal A, Drochioiu G, Pui A, Humelnicu D. 2003. *Saccharomyces cerevisiae* as uranium bioaccumulating material: The influence of contact time, pH and anion nature. *Nukleonika* 48: 121-125

- Ray AE, Bargar JR, Sivaswamy V, Dohnalkova AC, Fujita Y, Peyton BM, Magnusson TS. 2011. Evidence for multiple modes of uranium immobilization by an anaerobic bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75: 2684-2695
- Reitz T, Merroun ML, Rossberg A, Steudtner R, Selenska-Pobell S. 2011. Bioaccumulation of U(VI) by *Sulfolobus acidocaldarius* under moderate acidic conditions. *Radiochimica Acta* 99: 543-53
- Renninger N, Knopp R, Nitsche H, Clark DS, Keasling JD. 2004. Uranyl Precipitation by *Pseudomonas aeruginosa* via Controlled Polyphosphate Metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 7404-12
- Sahoo SK, Yoshida S, Tokonami S, Yonehara H, Tsygankova NY, Zamostyana PV. 2009. Isotopic composition of Uranium in soil and ground water samples collected around 30 km Chernobyl Exclusion Zone. *Radioprotection* 44: 785-790
- Sivaswamy V, Boyanov MI, Peyton BM, Viamajala S, Gerlach R, Apel WA, Sani RK, Dohnalkova A, Kemner KM, Borch T. 2011. Multiple mechanisms of uranium immobilization by *Cellulomonas* sp. strain ES6. *Biotechnology and Bioengineering* 108: 264-276
- Suzuki Y, Banfield JF. 2004. Resistance to, and Accumulation of, Uranium by Bacteria from a Uranium-Contaminated Site. *Geomicrobiology Journal* 21: 113-121
- Kaushik P, Rawat N, Mathur M, Raghuvanshi P, Bhatnagar P, Swarnkar H, Flora S. 2012. Arsenic hyper-tolerance in four Microbacterium species isolated from soil contaminated with textile effluent. *Toxicology International* 19: 188-94
- Talaat AM. 2012. Single-Cell Elemental Analysis of Bacteria: Quantitative Analysis of Polyphosphates in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2.
- Tobin KM, McGrath JW, Mullan A, Quinn JP, O'Connor KE. 2007. Polyphosphate Accumulation by *Pseudomonas putida* CA-3 and Other Medium-Chain-Length Polyhydroxyalkanoate-Accumulating Bacteria under Aerobic Growth Conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 1383-1387
- Vercouter T, Vitorge P, Amekraz B, Moulin C. 2008. Stoichiometries and Thermodynamic Stabilities for Aqueous Sulfate Complexes of U(VI). *Inorganic Chemistry* 47: 2180-2189
- Wellman DM, Icenhower JP, Gerner AP, Forrester SW. 2006. Effects of pH, temperature, and aqueous organic material on the dissolution kinetics of meta-autunite minerals, $(\text{Na, Ca})_{2-1}[(\text{UO}_2)(\text{PO}_4)]_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. *American Mineralogist* 91: 143-158

Table. 1. MINTEQA modeling results showing the expected U(VI) species present in uranium exposure solution.

Speciesname	50 μ M 25°C	50 μ M 4°C	10 μ M 25°C	10 μ M 4°C
	% of total concentration			
UO ₂ ²⁺	46,962	63,173	67,529	73,832
UO ₂ OH ⁺	12,664	16,997	18,186	19,84
(UO ₂) ₂ (OH) ₂ ²⁺	19,984	8,39	8,249	2,288
(UO ₂) ₃ (OH) ⁵⁺	14,98	0,932	1,773	0,059
(UO ₂) ₄ (OH) ⁷⁺	0,791	2,939	0,027	0,044
(UO ₂) ₃ (OH) ₄ ²⁺	1,395	3,633	0,165	0,231
(UO ₂) ₂ OH ³⁺	0,566	1,015	0,234	0,277
UO ₂ (OH) ² (aq)	0,122	0,17	0,175	0,198
UO ₂ NO ³⁺	0,014	0,029	0,021	0,034
UO ₂ Cl ⁺	2,513	2,716	3,63	3,189

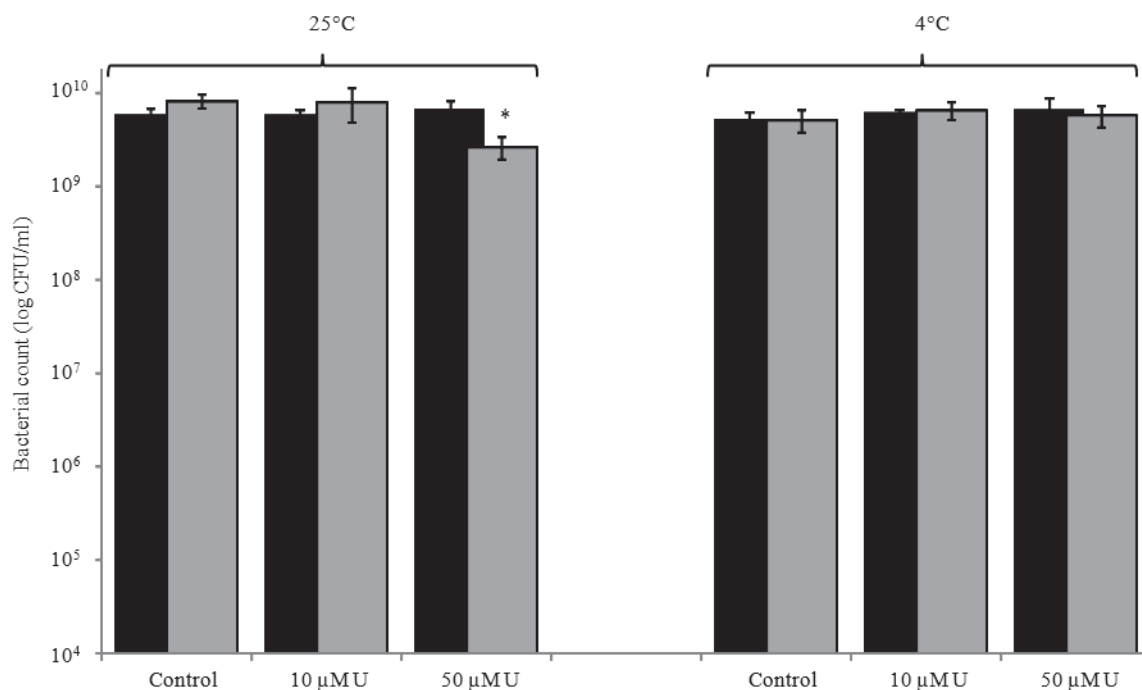


Figure 1. Effect of uranium exposure on viability of the bacteria at an early stage (0.5h, black column) and after 24h of exposure (grey column) to 0 (control), 10 and 50 μM of U(VI) at 4 and 25°C. Values are presented as mean ± SD ($n = 3$).

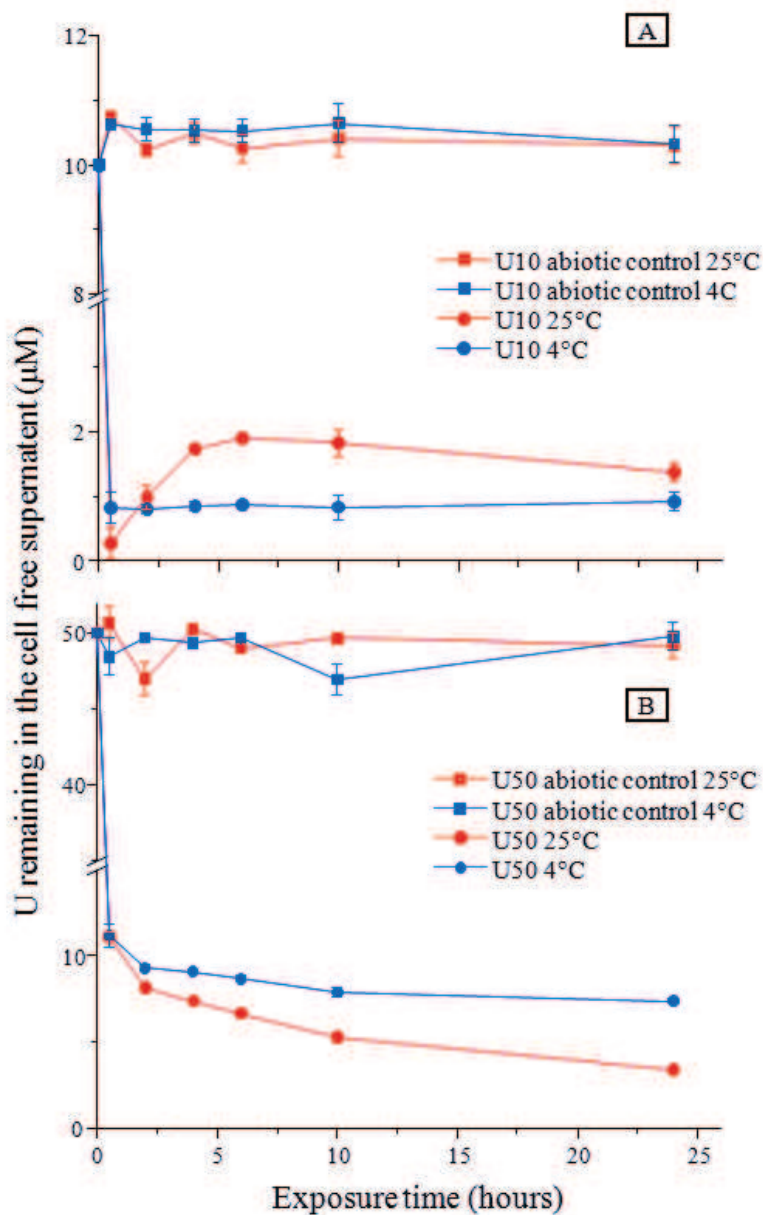


Figure 2. Kinetic of uranium uptake after 10 μM (A) and 50 μM (B) of exposure under different temperatures (4°C and 25°C). The condition 25°C is represented by red lines and 4°C by blue lines. Abiotic controls are represented by squares and biotic conditions by circles. Values are presented as mean \pm SD ($n = 3$).

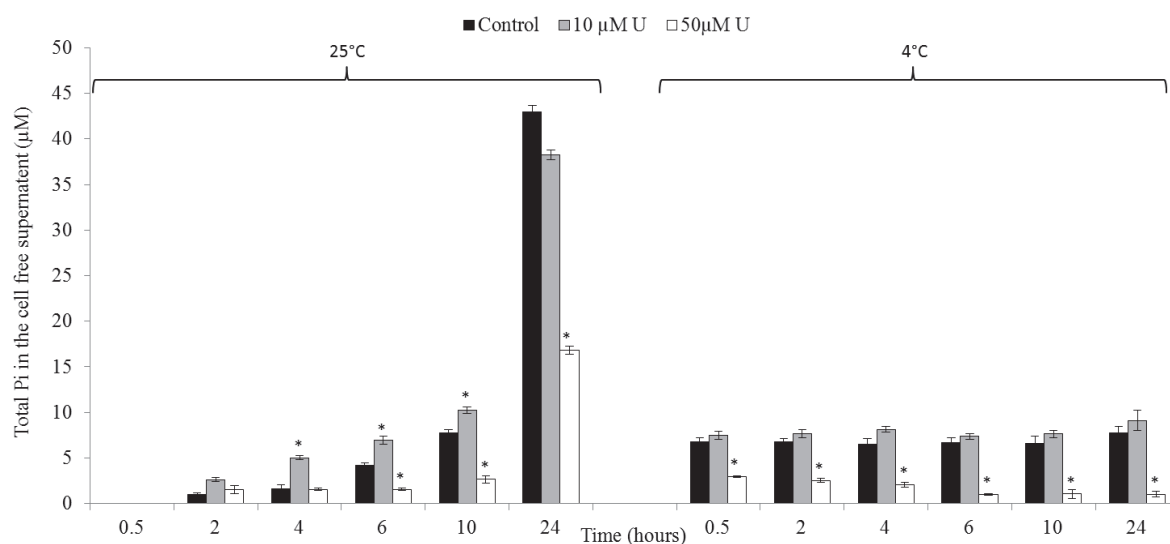


Figure 3. Total phosphorus concentrations in the cell free supernatant of control and exposed samples in function of time (h) at 4 and 25°C. * $p < 0.001$, compared with control bacteria. Values are presented as mean \pm SD ($n = 3$).

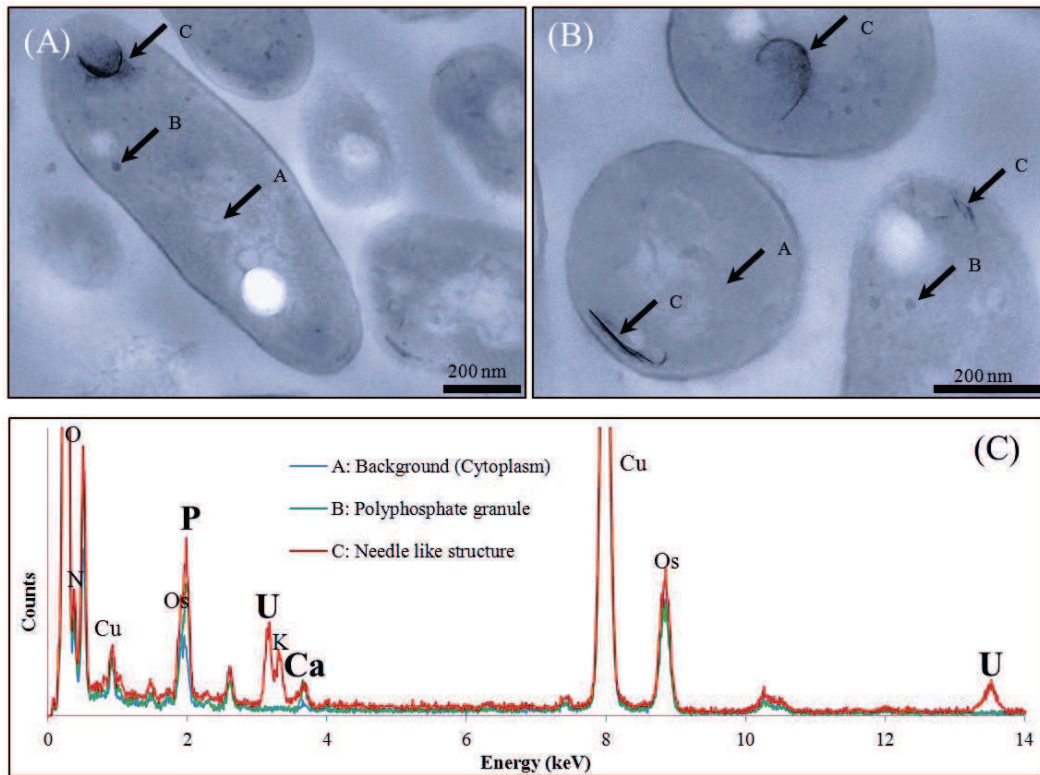


Figure 4. Transmission electron microscopy (TEM) analysis of uranium in the strain *Microbacterium* sp. after 24h of exposure to 50µM of uranium nitrate at 25°C. Spectrums provided from EDX analysis are presented, A (control inside the cell), B (rich Ca and Phosphate structures), C (needle like structures).

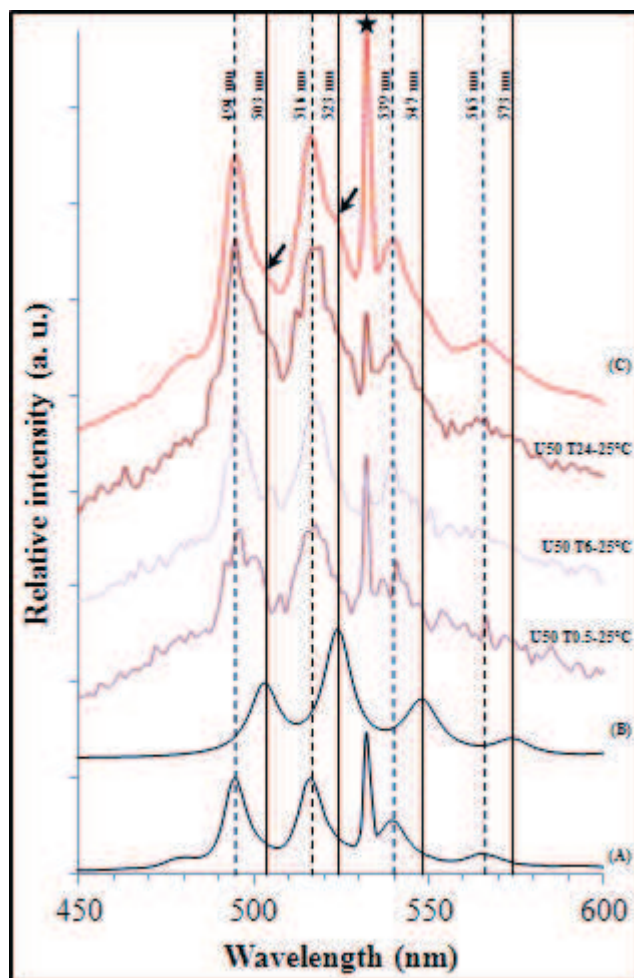


Figure 5. Summary of measured fluorescence spectra. Reference sample spectra include: uranyl phosphate (A), autunite (B), and the convoluted spectra of A+B (C). Spectra from bacteria exposed to 50 μM U(VI) for 0.5, 6 and 24 h at 25°C are labelled as T0.5, T6 and T24, respectively. Maximum emission wavelengths are indicated for the reference spectra (dotted lines: uranyl phosphate; solid lines: autunite). The peak marked with a star (*) represents the harmonic signal at 532 nm.

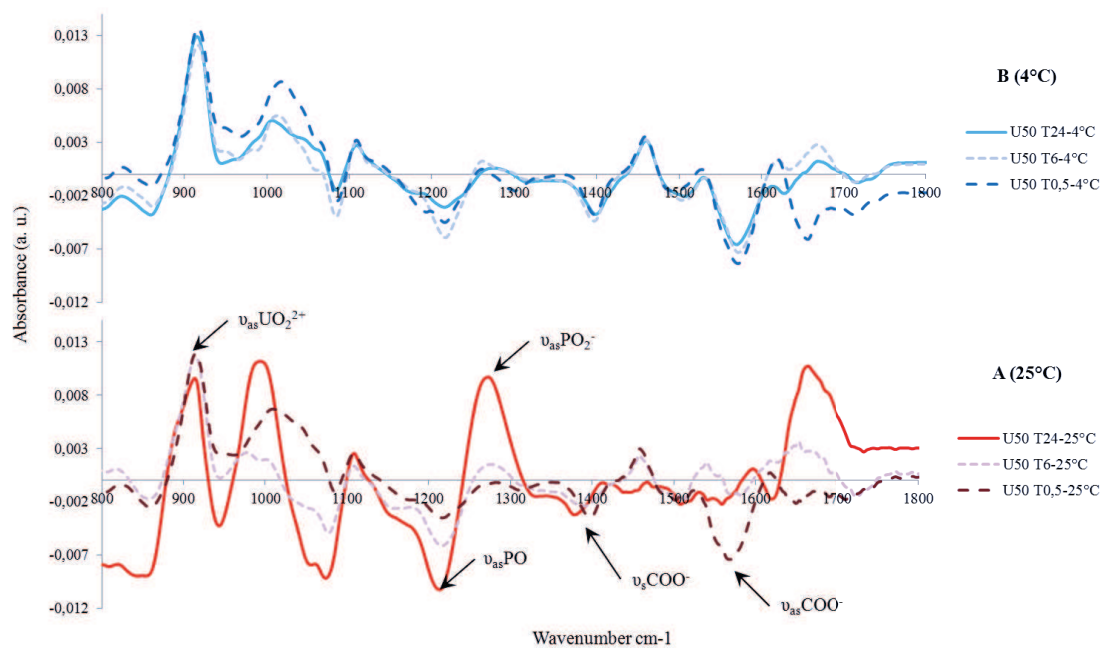


Figure 6. FTIR differential spectrum between control samples and uranium exposed bacteria (10 and 50 μM U) at 0.5, 6 and 24 hours for both temperature 25°C (A) and 4°C (B).

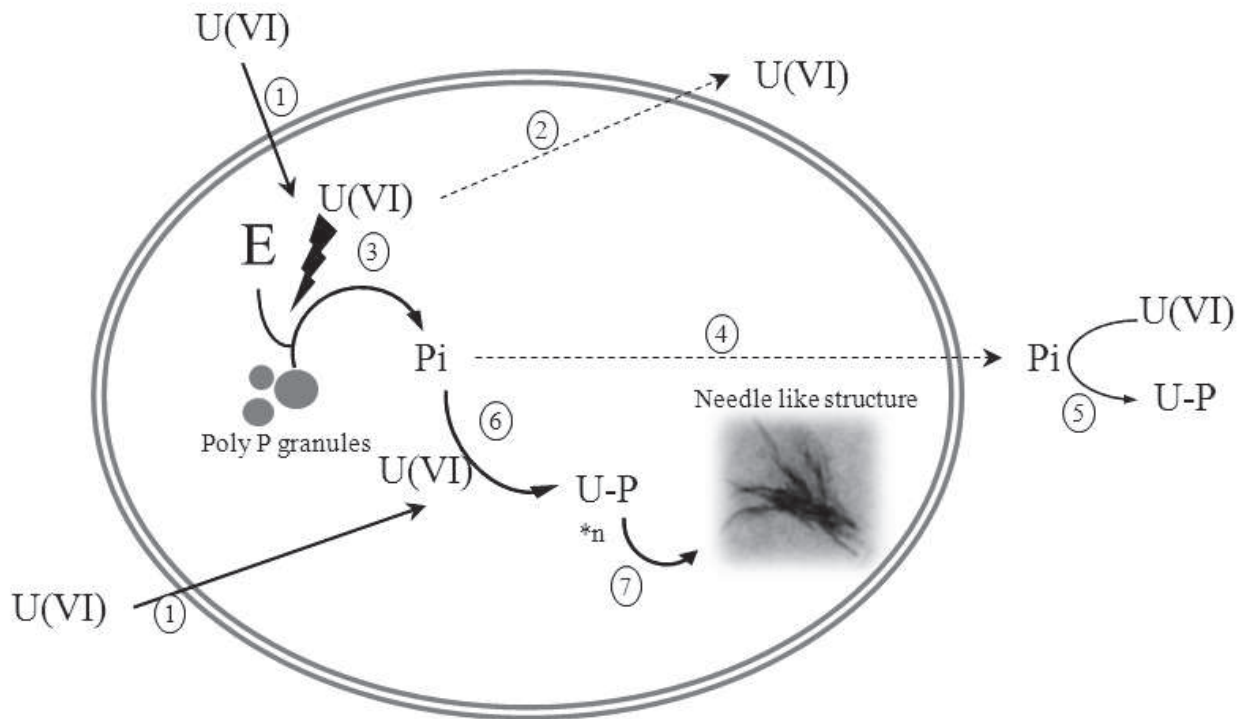


Figure 7. Proposed mechanism of U interaction with *Microbacterium* sp. A9

(U(VI)) bioavailable uranium, (Pi) phosphate ions, (U-P) uranium-phosphate complex, (*n) indicates a necessity of a high concentration, (gray circles) Poly Phosphate granules, (E) degradative enzymes of Poly Phosphate granules, (solide line arrow) indicates an entrance, (dashed line arrow) indicates a release, (picture) needle like uranium structure, (1) uranium entrance in the cell, (2) uranium release in media, (3) induction of enzymatic pass ways causing bound breakage of Poly Phosphate granules, (4) phosphate ions release in media, (5) extracellular complexation of bioavailaible uranium with released phosphate ions, (6) intracellular complexation of bioavailaible uranium with phosphate ions, (7) needle like structures formation after a high concentration of uranium-phosphate complexes.

6. Résultats et discussion

Les résultats montrent que la souche de *Microbacterium* est résistante aux concentrations d'uranium testées et que cette résistance dépend de la température d'exposition. En présence de 10 μM d'uranium la souche *Microbacterium* sp. A9 présente 100% de survie à 4 et à 25°C. En revanche, un effet toxique modéré est observé en présence de 50 μM d'uranium à 25°C qui induit 61% de mortalité, alors qu'à 4°C aucune mortalité n'est observée suggérant ainsi l'implication d'un mécanisme actif d'interaction bactérie-uranium.

La mesure de la concentration en uranium dans le surnageant au cours du temps montre que l'interaction entre les cellules et l'uranium se fait selon une cinétique bi-phasique, et que les cellules interagissent fortement avec l'élément. La première phase met en jeu un processus passif indépendant de la température d'exposition, probablement de l'adsorption *via* des groupements affins présents à la surface des bactéries ou une entrée passive massive d'uranium dans les cellules. En effet, dans les 4 conditions testées, on observe une disparition très rapide de l'uranium du milieu au cours des 30 premières minutes.

Ensuite, une seconde phase d'accumulation lente apparaît. Celle-ci dépend à la fois de la concentration en uranium et de la température, ce qui suggère l'implication d'un mécanisme actif. En effet, à 50 μM d'uranium, la séquestration du métal se poursuit selon une cinétique plus lente à 4°C qu'à 25°C. En présence de 10 μM d'uranium à 4°C, la concentration d'uranium dans le milieu est constante après les 30 premières minutes. Par contre, à 25°C, on observe une phase de relargage d'uranium entre 30 minutes et 4h, suivie d'une phase d'accumulation lente conduisant à la séquestration de 98% de l'uranium total à 24 h. Cette phase de relargage observée en présence de 10 μM d'uranium à 25°C suggère clairement la présence d'un mécanisme actif d'efflux engagé par la bactérie.

La mesure de la concentration en phosphates inorganiques dans le milieu tout au long de l'exposition à l'uranium montre que leur libération dans le milieu met en jeu un mécanisme actif, qui pourrait constituer un moyen de défense permettant de limiter l'entrée de l'uranium dans les cellules. En effet, à 4°C, la teneur en phosphate du milieu n'augmente pas au cours du temps et il n'y a pas de différence significative de concentration entre le contrôle sans uranium et en présence de 10 μM d'uranium. Par contre, à 4°C et en présence de 50 μM d'uranium, la libération de phosphate dans le milieu est fortement inhibée (1 μM à 24 h). A 25°C en revanche, on observe dans toutes les conditions une augmentation de la concentration de phosphate au cours de la cinétique d'exposition. Cette libération induite en présence de 10 μM d'uranium est plus modérée en présence de 50 μM d'uranium par rapport au contrôle. Ce

résultat pourrait être lié à un effet toxique de l'uranium ou au piégeage des phosphates par celui-ci.

Au cours de l'exposition aux deux concentrations d'uranium testées, une accumulation intracellulaire d'uranium sous forme de précipités en « aiguilles » constitués d'uranium, de phosphate et de calcium a été détectée en MET-EDX. Cette accumulation résulte de processus actifs, puisqu'elle n'est opérante qu'à 25°C et seulement après 6 h d'exposition.

L'analyse en SLRT a permis de montrer que ces structures intracellulaires colocalisant le phosphore, le calcium et l'uranium correspondent à de l'autunite. Enfin, l'IRTF a confirmé l'implication des groupements phosphate dans la rétention de l'uranium, mais aussi de groupements carboxyle qui n'avaient pas été mis en évidence par la SLRT. De plus, l'analyse IRTF a permis de montrer l'implication prépondérante des groupements carboxylique par rapport aux groupements phosphate dans la rétention de l'uranium à 4°C. Cette observation concorde avec la non détection de l'uranium en MET à 4°C, et suggère ainsi que l'uranium se trouve sous une forme diffuse probablement adsorbé à la surface des cellules, associée à des groupements carboxyles et phosphate.

Cette étude aura ainsi permis de mettre en évidence les capacités de résistance d'une souche bactérienne isolée au niveau de la tranchée T22. Cette souche affiliée à l'espèce *Microbacterium* met en place des mécanismes pour pallier la toxicité de l'uranium. Ainsi, trois mécanismes de détoxification ont pu être identifiés. Le premier est la libération de phosphate dans le milieu extracellulaire. Le second est un mécanisme d'efflux qui conduit à un relargage de l'uranium initialement accumulé dans les cellules. Ces deux premiers mécanismes actifs ont pour conséquence de faire chuter la concentration intracellulaire d'uranium et de modifier la spéciation de l'uranium afin de limiter son entrée dans la cellule. Enfin, lorsque ces deux systèmes ne fonctionnent plus, la précipitation intracellulaire d'uranium sous une forme minérale (autunite) pourrait permettre de limiter sa toxicité.

Des études complémentaires sont envisageables afin d'affiner les résultats obtenus concernant notamment la caractérisation du système d'efflux d'uranium ou l'induction de la libération de phosphate observée à 25°C avec 10 µM d'uranium. Enfin, il serait intéressant de confronter les résultats de spéciation de l'uranium obtenus par SLRT avec une technique complémentaire comme l'EXAFS.

CHAPITRE VI : Expériences complémentaires

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent, les capacités de résistance à l'uranium des bactéries au sein d'un même genre bactérien, comme celui des *Paenibacillus* ou celui des *Microbacterium* diffèrent. Ces différences de survie pourraient s'expliquer par des mécanismes d'interactions différents. Au cours de ce chapitre, l'objectif a été de vérifier si l'interaction engagée par la souche *Microbacterium* sp. A9 est un phénomène généralisable à d'autres bactéries du genre *Microbacterium*.

EXPERIENCE COMPLEMENTAIRE 1: Exposition de six souches de *Microbacterium* à 10 μ M de nitrate d'uranyle et localisation sub-cellulaire

1. Introduction

Les bactéries peuvent engager différents types d'interaction avec les radionucléides comme la biosorption, l'accumulation, la réduction ou encore la précipitation par libération de ligands extracellulaires. Après avoir caractérisé de manière fine les interactions entre la souche *Microbacterium* sp. A9 et l'uranium, nous avons souhaité savoir si le même mécanisme d'accumulation intracellulaire était engagé par d'autres souches de *Microbacterium*. Pour cela, différentes souches de *Microbacterium* provenant d'environnements uniques ont été étudiées pour leurs capacités à interagir avec l'uranium. Ainsi, six souches de *Microbacterium* ont été testées : les souches *Microbacterium* sp. TchI_10_n9 et A9 isolées au cours de cette étude, les souches *Microbacterium* sp. ViU2a et sp. ViU22 isolées à partir d'un sol naturellement riche en uranium (Mondani *et al.*, 2011), la souche *Microbacterium oxydans* HG3, isolée à partir de sédiments de rivière collectés au niveau de la plage de sable noir de Vík í Mýrdal (Sud de l'Islande) (Birkhofer *et al.*, 2012) et enfin, la souche type *Microbacterium Testaceum* isolée à partir de riz.

Pour cela, la survie, les cinétiques d'interaction avec l'uranium et la localisation de l'élément ont été étudiées. L'expérience a été réalisée avec une concentration de 10 μ M de nitrate d'uranyle. Les cellules ont été cultivées dans un milieu différent de celui utilisé pour les expériences précédentes afin de permettre la culture de toutes les souches (Luria Broth ou LB).

2. Matériel et méthodes

Les cellules ont été cultivées en milieu LB jusqu'à atteindre la phase exponentielle de croissance, récupérées par centrifugation (5000 rpm / 5 min) puis lavées à deux reprises dans du NaCl 0,1 M. Après une nouvelle étape de centrifugation (5000 rpm / 5 min) les culots ont été repris dans du NaCl 0,1 M enrichie en nitrate d'uranyle 10 μ M, à pH 5. En parallèle, des échantillons contrôles ont été repris dans du NaCl 0,1 M à pH 5 additionnée de nitrate de sodium. La survie des cellules a été évaluée à 30 min et 24 h par comptage d'unités formant colonies en cultivant les cellules sur du milieu LB à 32 °C pendant 24 heures. Pour chaque temps de prélèvement (30 min, 2, 4, 6, 10, 24 heures), 1 ml de la solution a été prélevé et centrifugé (10 000 g / 10 min) puis le surnageant a été analysé en ICP/AES pour déterminer la concentration en uranium. Au terme des 24 heures d'exposition, une étape de centrifugation (5000 rpm / 5min) a permis de récupérer les culots pour l'analyse microscopique. Les culots ont été repris et fixés dans du tampon cacodylate de sodium (0,1 M, pH 7,4) contenant du glutaraldéhyde 2,5%. Après 24 heures à 4°C, les échantillons ont été lavés à trois reprises pendant 5 min avec du tampon cacodylate de sodium puis fixés dans ce même tampon en présence de 1% de tetroxyde d'osmium (OsO_4) durant 1 h. Les culots ont ensuite été déshydratés par une série de lavages avec de l'éthanol (en gradient de 70 à 100%) et finalement fixés dans une résine monomérique Epon 812. Tous les produits qui ont été utilisés proviennent de « Electron Microscopy Sciences » (Hatfield, USA). Les gélules ainsi obtenues ont été coupées en utilisant un ultra-microtome UCT (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) et en réalisant des coupes de 80 nm d'épaisseur. Les coupes obtenues ont été déposées sur une grille de cuivre et observées avec un Microscope Electronique à Transmission (TEM/STEM, Tecnai G2 Biotwin, FEI company Eindhoven, Netherlands), équipé d'une caméra CCD Megaview III, (Olympus Soft imaging Solutions GmbH, Münster, Germany).

3. Résultats et discussion

3.1. Survie des souches après exposition à 10 μ M de nitrate d'uranyle

Les résultats (Figure 10) montrent que toutes les souches de *Microbacterium* résistent à une exposition à 10 μ M de nitrate d'uranyle pendant 24 heures. Les souches les plus résistantes sont les souches *Microbacterium* ViU2a et *Microbacterium* Testaceum qui ne présentent

aucune mortalité. Le pourcentage de survie pour la souche *Microbacterium oxydans* HG3 est de 90%, tout comme pour la souche *Microbacterium* sp. TchI_10_n9.

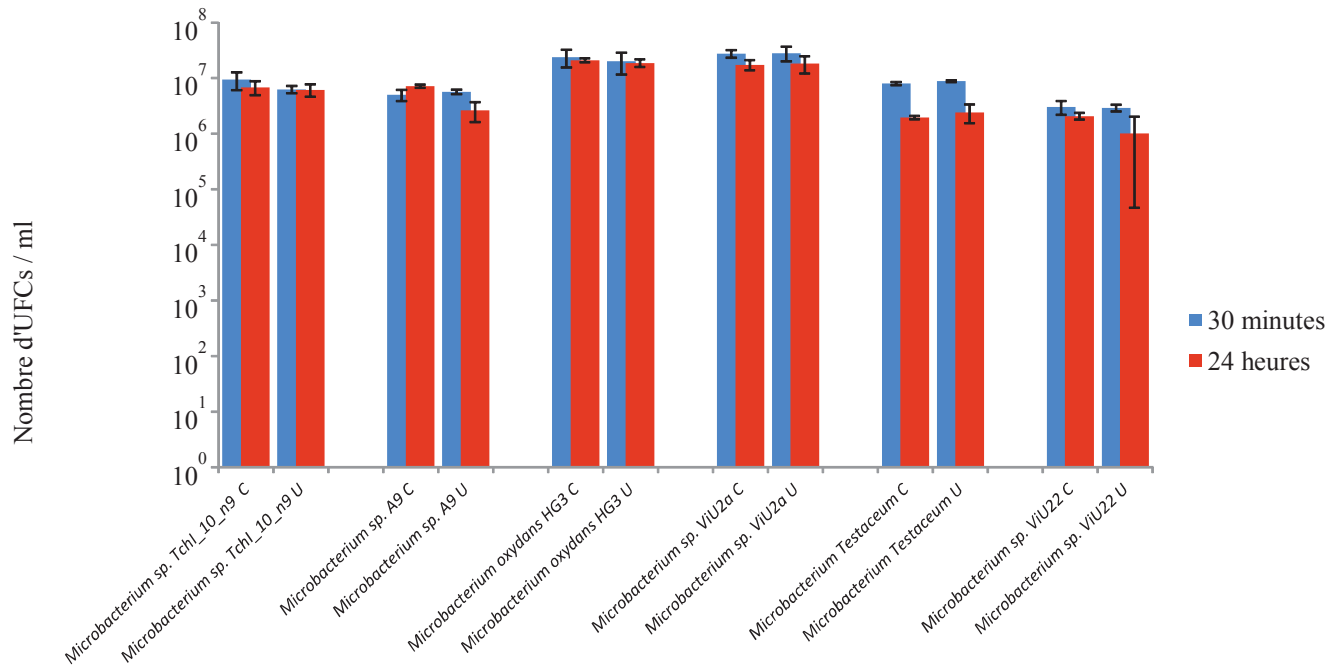


Figure 10 : Résultats de survie des isolats de *Microbacterium* dans la solution contrôle et dans la solution d'exposition à 10 µM de nitrate d'uranyle à t30 min (bleu) et t24 h (en rouge)

Les souches les plus sensibles sont les souches sp. ViU22 et la souche sp. A9 avec des pourcentages de survie respectifs de 49 et 36%. De manière intéressante, les résultats obtenus avec la souche sp. A9 diffèrent des précédents (cf Chapitre V). Il faut noter que dans cette expérience les souches ont été cultivées dans un milieu différent (milieu riche LB). On peut supposer que cela a influencé leur métabolisme et leur physiologie et donc leur capacité de survie. Il se peut également qu'après exposition à l'uranium dans la solution physiologique (NaCl 0,1 M), le passage en culture sur milieu riche LB inhibe partiellement la croissance de la souche A9.

3.2. Cinétique d'interaction

Au cours de l'étude, le dosage d'uranium dans les surnageants a révélé des différences en fonction des souches bactériennes testées (Figure 11). La phase rapide de séquestration de l'uranium est observée pour toutes les souches. Entre 40 et 90% de l'uranium interagit avec les cellules dans les 30 premières minutes. La souche qui séquestre le moins l'uranium est l'isolat *Microbacterium* sp. ViU22. La souche qui séquestre le plus d'uranium est l'isolat *Microbacterium* sp. A9.

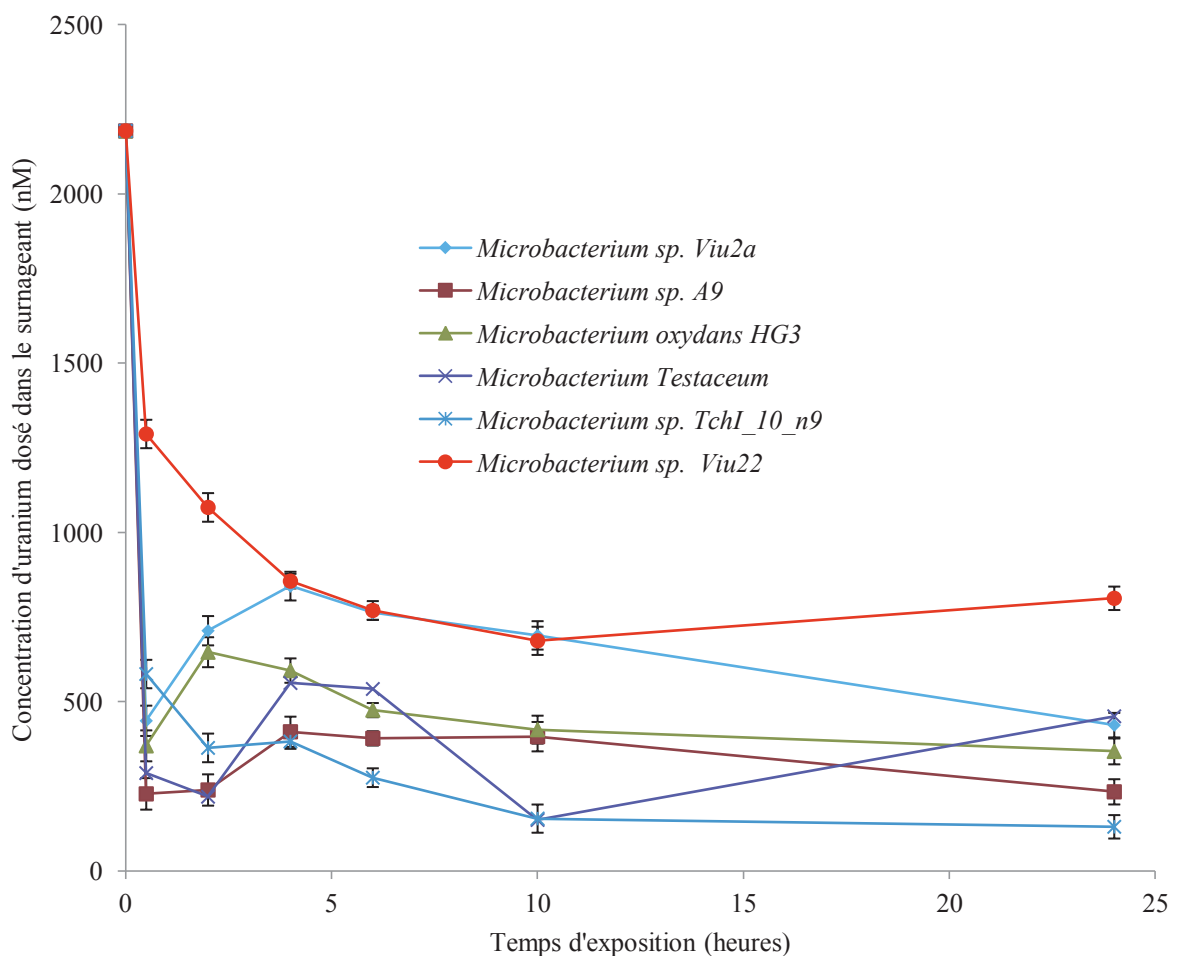


Figure 11 : Suivi de la cinétique d'interaction des souches de *Microbacterium* par dosage de la concentration d'uranium dans le milieu au cours du temps.

Sur les 6 souches testées, 4 présentent une cinétique d'interaction particulière qui se caractérise par une étape rapide d'interaction (30 min) suivie d'un efflux d'uranium

dans le surnageant. Ce phénomène n'est en revanche pas observable pour la souche ViU22 qui fait partie des souches sensibles à l'uranium dans ces conditions d'exposition.

3.3. Localisation subcellulaire de l'uranium après 24 h d'exposition

Les observations en MET après 24 heures d'exposition montrent que l'uranium est détecté exclusivement à l'intérieur des cellules quelle que soit la souche considérée (Figure 12).

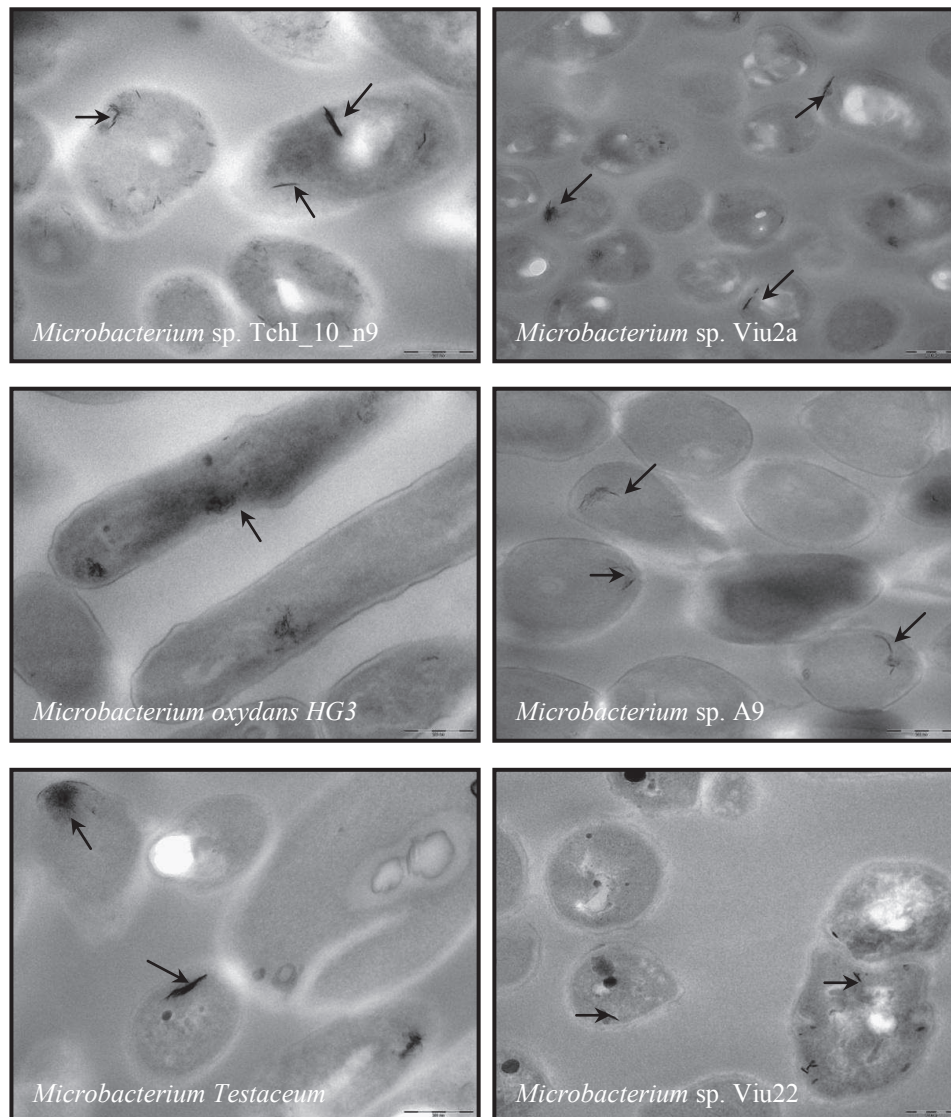


Figure 12 : Observation en MET de 6 souches de *Microbacterium* après exposition à 10 µM de nitrate d'uranyle durant 24 h. La localisation de certains précipités d'uranium est repérée par une flèche.

Le mécanisme de bioaccumulation de l'uranium semble donc être un mécanisme généralisable à d'autres espèces de *Microbacterium*. En effet, après 24 heures d'exposition, toutes les souches de *Microbacterium* testées accumulent l'uranium à l'intérieur des cellules sous forme d'oursins ou de paillettes. Cette généralisation du phénomène n'en reste pas moins discutable. En effet, il faut parler dans ce cas de généralisation dans nos conditions opératoires, qui se définissent par l'absence de ligands dans le milieu d'exposition, une faible concentration d'uranium, sous agitation et à 25°C.

Ce résultat est en contradiction avec ceux obtenus par Nedelkova et al (2007) sur d'autres souches de *Microbacterium*, où une précipitation d'uranium à la surface des cellules a été observée (Figure 13)

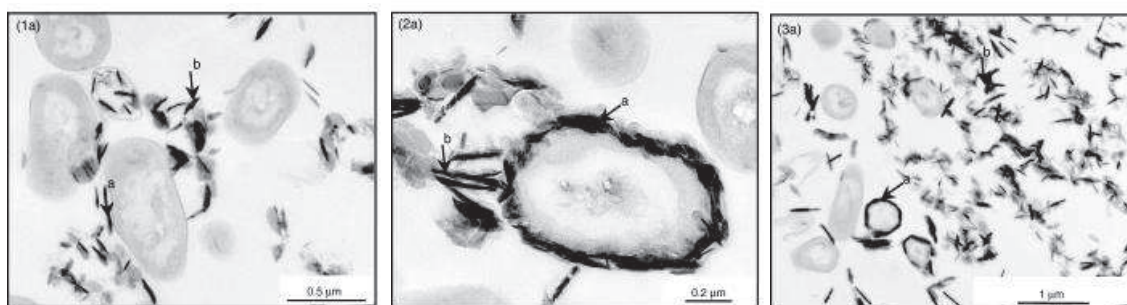


Figure 13 : Observations en MET. Les coupes représentent (1a) la souche S15-M2, (2a) S15-M4, (3a) S15-M5 exposée à U(VI) à pH 4,5. Le métal est accumulé à la surface cellulaire (Nedelkova *et al.*, 2007).

Cependant, les conditions opératoires sont différentes, les souches ont été incubées sur une durée plus longue (48 heures) et surtout la concentration d'uranium été 50 fois plus élevées (119 mg/L). De plus, la survie des cellules suite à l'exposition n'a pas été prise en compte dans cette étude et au regard de nos résultats, on peut penser que cette survie conditionne les mécanismes d'interaction bactéries-uranium. Les résultats sont donc difficilement comparables et il se peut que le mécanisme d'interaction avec l'uranium dépende des souches bactériennes testées, mais aussi de la concentration d'uranium utilisée.

4. Conclusion et perspectives

Cette expérience avait pour objectif de vérifier la généralisation du phénomène de bioaccumulation chez certaines espèces du genre *Microbacterium*. Les résultats permettent de démontrer que le protocole d'exposition utilisé conduit chez toutes les espèces testées à une bioaccumulation de l'uranium. En effet, dans toutes les souches testées, l'analyse en MET-EDX révèle la présence d'uranium dans le cytoplasme des cellules. En perspective à cette étude, il faudrait tester dans les mêmes conditions différents pH, différentes concentrations de cellules, toujours pour des concentrations d'exposition d'uranium non létales.

EXPERIENCE COMPLEMENTAIRE 2 : Etude de l'accumulation de ^{137}Cs par des souches de la tranchée T22

1. Introduction

Le césium (Cs) appartient, comme le lithium, le sodium, le potassium et le rubidium, au groupe des métaux alcalins. Chimiquement, le césium présente un seul degré d'oxydation correspondant à l'espèce ionique Cs^+ (+I). Le ^{137}Cs n'existe pas à l'état naturel et son introduction dans l'environnement provient d'essais nucléaires atmosphériques, d'émissions par les installations nucléaires en fonctionnement normal et de rejets accidentels.

Dans la majorité des sols, le césium est en généralement considéré comme très peu mobile. Il se concentre majoritairement dans la couche superficielle (Gaspar et Navas 2013) et dans les argiles. La présence dans un sol d'une faible quantité d'argiles suffit pour que la sorption soit gouvernée par les sites spécifiques de l'argile (Rigol *et al.*, 2002). En revanche, le césium est réputé être relativement mobile dans les sols « organiques » au sens d'une teneur en matière organique de l'ordre de plusieurs dizaines de pourcents (Staunton *et al.*, 2002).

La quantité de ^{137}Cs libérée dans l'environnement lors de l'accident de Tchernobyl est estimée à 85 PBq (Gaspar et Navas 2013). Comme nous avons pu le voir dans les chapitres précédents, l'activité en ^{137}Cs dans la tranchée T22 est élevée jusqu'à des valeurs maximales de 750 Bq/g. Au niveau de celle-ci, le ^{137}Cs provient d'une part de l'enfouissement des dépôts de surface suite à l'explosion et à l'incendie qui a suivi, mais aussi, de la dissolution

progressive des particules de combustibles présentes dans la tranchée. Les eaux d'infiltration contribuent à la dissolution des particules, et les sols de la tranchée de Tchernobyl sont soumis en permanence à la présence du radionucléide. Le ^{137}Cs constitue l'un des radionucléides les plus problématiques, d'une part du fait de sa biodisponibilité, de la toxicité des rayonnements gamma émis, mais aussi de par son temps de demi-vie (30,17 ans) (Unterweger 2002).

Au cours de l'étude, il a paru important d'étudier les interactions entre les bactéries et le Cs au même titre que pour l'uranium. Cette partie n'a pas pu être développée autant que celle concernant l'uranium. En revanche, la sélection d'une souche modèle pour l'étude de ces interactions a été réalisée, à l'instar de la démarche effectuée pour les interactions bactéries-uranium.

Tomioka *et al.* (1992) ont utilisé l'autoradiographie pour identifier des souches capables d'accumuler du Cs. C'est sur la base de cette expérience que nous avons réalisé les expériences de sélection d'une souche accumulatrice de Cs, en utilisant du Cs marqué en ^{137}Cs .

2. Matériel et méthodes

Trente-six isolats ont été testés pour leur capacité à accumuler le Cs. Tout d'abord, les bactéries ont été cultivées en milieu liquide TSB (0,1X) durant 24 heures à 32°C (120 rpm). Par la suite, 20 μL de culture ont été déposés sur milieu gélosé composé de TSB (0,1X) et de 1 mM CsCl marqué en ^{137}Cs (100 000 Bq). Après incubation 24 h à 32°C, les colonies obtenues ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose qui a servi de support à l'analyse par le Phosphorimager. Seule la couche supérieure des colonies bactériennes a été transférée afin d'éviter une contamination par le ^{137}Cs du milieu gélosé. Cette étape n'ayant pas permis de récupérer la totalité des colonies, les colonies restantes ont été transférées sur une deuxième membrane. La radioactivité a ensuite été mesurée sur chacune des membranes à l'aide du système Phosphorimager®Si (Molecular Dynamics). Le principe semblable à celui de l'autoradiographie consiste en l'impression de plaques radiosensibles phosphorescentes qui, une fois suffisamment exposées, sont scannées grâce au Phosphorimager. Pour chacune des colonies, une intensité de phosphorescence relative à la quantité de ^{137}Cs accumulé par la colonie a ainsi été obtenue. L'intensité au niveau de chacune des colonies a été analysée par le logiciel Image Quant (Molecular Dynamics) afin de quantifier les capacités d'accumulation des différentes souches bactériennes.

Pour chaque souche, les intensités mesurées sur chacune des membranes ont été additionnées afin d'estimer la quantité de ^{137}Cs accumulé. Les mesures sont exprimées en unités arbitraires (u.a.).

3. Résultats et discussion

Sur les 36 souches testées, 3 n'ont pas poussé (numérotées 7, 11, 26) ni en absence ni en présence de Cs. Pour les autres, la concentration 1 mM ne s'est pas révélée toxique et le résultat montre que les souches bactériennes testées ne présentent pas toutes les mêmes capacités d'accumulation. (Figure 14, B et C).

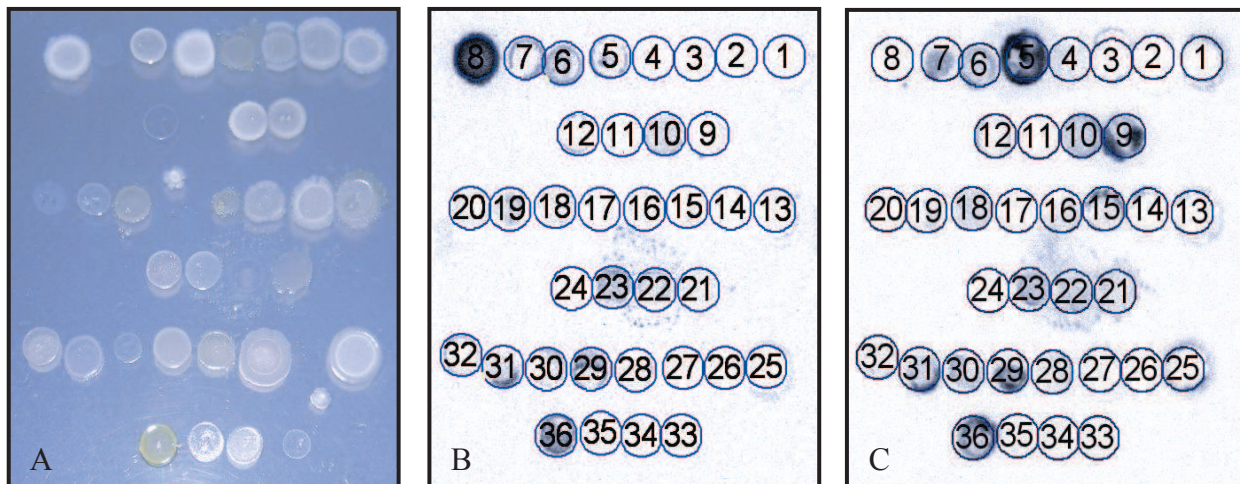


Figure 14 : Détection de souches accumulatrices de ^{137}Cs par autoradiographie. Souches cultivées sur TSB (0,1X) en présence de CsCl (1 mM) et de ^{137}Cs (10^6 Bq). A : colonies formés par les différentes souches testées avant transfert sur membrane de nitrocellulose. B et C : images obtenues des deux membranes par l'analyse au phosphorimager.

De manière arbitraire, les espèces ont été séparées en trois catégories en fonction de leurs capacités d'accumulation du ^{137}Cs (tableau 2). Parmi les souches qui accumulent fortement le ^{137}Cs (intensité $>150\,000$ u. a.), on note la présence de souches affiliées aux genres *Bacillus*, *Lysinibacillus*, *Burkholderia* et *Staphylococcus*. On peut également noter la présence d'un isolat de *Microbacterium*, la souche ViU2a ajouté ici comme référence et provenant non pas de Tchernobyl mais d'un échantillon de sol uranifère de Limoges. A l'inverse, parmi les souches qui accumulent le moins le ^{137}Cs (intensité $< 50\,000$ u.a.), on note la présence de *Burkholderia*, de *Rhodococcus*, de *Roseomonas*, mais aussi de *Paenibacillus*. Au sein du

genre *Paenibacillus*, on constate donc des différences dans les capacités d'accumulation avec des valeurs d'intensité allant de 119 045 à 35 952 u. a. Ce résultat rejoint celui obtenu pour la survie en présence d'uranium qui montrait également des différences au sein d'un même genre bactérien.

Tableau 2 : Analyse de l'intensité relative des différents spots obtenus par autoradiographie. Sur les 36 souches ont été testées. Les intensités obtenues à l'aide du logiciel ImageQuant sont exprimées en unité arbitraire (u. a.).

Identification sur la boîte	Dénomination	Affiliation taxonomique	Voisin le plus proche à 97%	Accumulation ¹³⁷ Cs (u. a.)	
8	TchI_4_n5	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp. GUF8	261055	Accumulation > 150000
5	TchI_8_n9	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	259423	
36	ViU2a	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium oxydans</i>	227053	
29	TchI_8_n14	<i>Lysinibacillus</i>	<i>Lysinibacillus</i> sp. TSSAS2-47	168552	
6	TchI_1_n8	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia pyrrocinia</i>	162937	
9	TchI_8_n1	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp. JAM-FM2801	160257	
23	A9_13_-2_1	<i>Staphylococcus</i>	bacterium H17(2009)	150511	
10	A9_1_-1_2	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i> sp. WTZ-1	145267	Accumulation entre 50000 et 150000
7	TchI_1_n17	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. F17	143457	
31	TchI_4_n3	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus soli</i>	140129	
22	TchI_8_n13	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. AT5	119045	
30	TchI_3_n6	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus telluris</i>	102783	
15	TchI_8_n2	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. EWF52	92491	
18	O8_3_sp3_-1_-2a3	<i>Paenibacillus</i>	unidentified	89161	
21	A9_8_b_-2_6a	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium</i> sp. I_Gauze_K_8_2	88745	
19	A9_4_b_-1_4	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter oryzae</i>	75058	
4	TchI_10_n4	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i>	70866	
32	TchII_20_n22	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus terrigena</i>	70582	
28	TchII_10_n8	<i>Paenibacillus</i>	uncultured <i>Paenibacillaceae</i> bacterium	69552	
12	TchI_4_n16	<i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus</i> sp. SP4	68567	
16	TchIII_4_n10	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. BM-7	65544	
25	A9_1_sp1_0_4	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i> sp. QAII13	56718	
35	A9_13_-1_3	<i>Methylobacterium</i>	uncultured bacterium	53688	
1	TchI_3_n13	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp. II-44	49508	Accumulation < 50000
13	TchI_10_n9	<i>Okibacterium</i>	<i>Microbacterium</i> sp. VA8728_00	46885	
20	A9_13_sp13_-1_1	<i>Rhodococcus</i>	<i>Rhodococcus</i> sp. ANT-2400 S9	44586	
3	TchI_3_n16	<i>Burkholderia</i>	<i>Burkholderia</i> sp. II-44	44341	
14	TchI_1_n20	<i>Collimonas</i>	<i>Collimonas</i> sp. wged41	42991	
27	TchII_4_n26	<i>Brevibacillus</i>	<i>Brevibacillus</i> sp. CJ71	42393	
34	TchI_1_n11	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. Sx52	42114	
11	TchI_10_n18	<i>Roseomonas</i>	<i>Roseomonas aerolata</i>	40811	
26	O8_8_sp8_-2_8	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. JA-08	39691	
17	TchII_4_n8	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. SBI-16	37565	
24	O8_8_sp8_-2_12	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. ES_MS17	36146	
33	TchIII_4_n2	<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. L47	35952	
2	TchI_8_n3	<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter ramosus</i>	33964	

4. Conclusion et perspectives

L'analyse de colonies cultivées sur milieu gélosé en présence de ^{137}Cs par autoradiographie s'est révélée être une technique pertinente pour l'identification de souches accumulatrices de Cs. L'avantage de ce système par rapport à l'autoradiographie classique est qu'il est plus résolutif et plus sensible. L'analyse des capacités d'accumulation des isolats de Tchernobyl montre que certains accumulent le Cs de manière efficace. De manière intéressante, parmi les souches qui accumulent fortement le Cs, on note la présence d'un isolat de *Microbacterium* (souche ViU2a isolée de sols uranifères). Cette étude réalisée au début de la thèse n'a pas permis d'intégrer faute de temps la souche *Microbacterium* sp. A9. Cependant, le résultat obtenu avec l'isolat de Limoges *Microbacterium* sp. ViU2a montre que certaines espèces appartenant au genre *Microbacterium* pourraient présenter des capacités d'accumulation de Cs efficace.

En perspective à cette étude, il serait intéressant d'étudier de manière plus fine les interactions de ces bactéries avec le Cs, en se basant sur les protocoles mis au point pour l'uranium. Pour cela, l'exposition des bactéries avec le Cs pourrait être réalisée en culture liquide, afin de quantifier plus précisément les capacités d'accumulation et de déterminer sa localisation subcellulaire. La toxicité du Cs sur ces souches environnementales pourrait également être mesurée. Enfin, l'étude au niveau moléculaire des mécanismes d'internalisation ou de biosorption pourrait être réalisée.

CONCLUSION

A ce jour, les études réalisées sur les sites contaminés par des éléments radioactifs se sont presque exclusivement focalisées sur ceux contaminés ou riches en uranium. Ces études ont révélé que divers microorganismes sont capables de s'y développer. Dans le cas d'accidents nucléaires, la contamination ne se limite pas à l'uranium et d'autres radionucléides caractérisés par leur radiotoxicité peuvent affecter les communautés bactériennes. Cependant, très peu de données sont disponibles sur l'impact à long terme de ces radionucléides sur les communautés bactériennes. Pourtant, il est admis que celles-ci jouent un rôle majeur dans les cycles biogéochimiques et par conséquent dans le fonctionnement du sol. Une diminution de l'abondance ou de la diversité bactérienne dans ces environnements extrêmes pourrait avoir des conséquences écologiques majeures. Par ailleurs, les bactéries, en interagissant avec les radionucléides, peuvent influencer leur migration dans le sol. La compréhension de ces processus nécessite par conséquent des étapes préalables de caractérisation de la diversité bactérienne.

Dans la zone d'exclusion de Tchernobyl, les tranchées d'enfouissement de déchets contaminés par les radionucléides rejetés lors de l'accident sont des environnements extrêmes, qui se caractérisent par une contamination radioactive élevée, mais aussi par l'hétérogénéité de cette contamination, liée à la présence de particules de combustibles et de déchets contaminés.

La majeure partie de ce travail de doctorat a consisté à étudier la diversité microbienne présente au niveau de la tranchée T22 et l'impact d'une exposition à long terme entre les bactéries et les radionucléides. L'étude a aussi permis d'évaluer les interactions engagées entre des souches bactériennes issues de la tranchée et les radionucléides caractéristiques de celle-ci, à savoir l'uranium et le ^{137}Cs .

Ainsi, la première partie de ce travail s'est concentrée sur la description des communautés bactériennes présentes dans des échantillons de sols collectés au niveau de la tranchée comparées à celles observées dans les échantillons contrôles collectés hors de la tranchée. La caractérisation physico-chimique des échantillons de sols a permis de montrer la forte contamination des échantillons de la tranchée T22 par rapport aux échantillons collectés autour de celle-ci, validant ainsi l'approche comparative menée dans la suite de l'étude. Pour

caractériser ces communautés bactériennes, la combinaison d'approches culturale et moléculaire (DGGE) a dans un premier temps permis de mettre en évidence la présence de communautés bactériennes diversifiées dans tous les échantillons de sols, y compris les plus contaminés. A travers l'analyse des résultats obtenus grâce à ces deux techniques, aucune corrélation entre structure des communautés bactériennes et teneur en radionucléides n'a pu être établie. L'analyse des bactéries cultivables a, en outre, permis de constituer une collection de bactéries constituées par les phylums des *Firmicutes*, des *Actinobacteria*, des *Proteobacteria* et des *Bacteroidetes*.

Dans un second temps, nous nous sommes focalisés sur la recherche de bactéries radiorésistantes affiliées au phylum des *Deinococcus-Thermus* dans les sols de Tchernobyl. A ce jour, très peu d'outils moléculaires permettent d'avoir accès de manière spécifique à ce phylum. Nous avons donc développé des amorces spécifiques nous permettant d'étudier directement des échantillons d'ADN métagénomique. Les bactéries de la tranchée étant soumises aux radiations, nous avons supposé la présence d'une population abondante de bactéries radiorésistantes affiliées aux *Deinococcus*. Or l'analyse avec ces amorces des deux échantillons les plus contaminés de la tranchée T22 n'a pas permis de révéler la présence de ces espèces. Dans les sols de Tchernobyl, l'irradiation chronique ne semble donc pas avoir entraîné la sélection d'espèces radiorésistantes appartenant à ce phylum. Néanmoins le terme « radiorésistant » qualifie des bactéries capables de supporter de fortes doses (kGy) délivrées sur des temps très courts, ce qui ne correspond pas aux conditions de la tranchée. Cela n'exclut donc pas la présence de bactéries qui pourraient être qualifiées de radiorésistantes mais qui seraient, quant à elles, capables de supporter une irradiation chronique.

Cette première partie de thèse axée sur l'inventaire des bactéries présentes dans les sols de la tranchée T22 s'est poursuivie par l'analyse exhaustive des communautés bactériennes par pyroséquençage 454. L'utilisation de cette dernière technique a permis de révéler une vaste diversité bactérienne. L'analyse des résultats a mis en évidence des différences entre les échantillons provenant de la tranchée T22 comparés aux échantillons contrôles. Ces différences, principalement visibles à des niveaux taxonomiques fins, montrent que certaines bactéries sont mieux adaptées aux conditions de la tranchée, qui se caractérise par une forte teneur en ^{137}Cs mais aussi en matière organique.

La seconde partie de la thèse s'est orientée vers l'étude des interactions bactéries-radionucléides à travers l'étude du ^{137}Cs et de l'uranium. Les résultats obtenus en exposant à l'uranium certaines souches issues de la collection de bactéries cultivables ont permis de

déceler des différences dans les capacités de résistance de ces souches à l'uranium. Parmi ces souches certaines sont affiliées à un même genre bactérien mais ne présentent pas toutes la même capacité de résistance face à l'élément (ex : *Paenibacillus*, *Microbacterium*). En termes d'écologie, cela montre qu'il est difficile de prédire le phénotype d'un groupe bactérien en ayant seulement l'affiliation taxonomique.

Au cours de ce travail, le choix d'étudier de manière plus fine les mécanismes d'interactions avec l'uranium par une souche de *Microbacterium* résistante a permis de mettre en évidence plusieurs mécanismes actifs permettant de limiter l'entrée d'uranium dans la cellule ou de limiter la toxicité de l'uranium internalisé. Parmi ces mécanismes, l'étude a permis pour la première fois de révéler la présence d'un mécanisme actif d'efflux d'uranium. Ce mécanisme d'efflux a pu ensuite être observé chez d'autres souches de *Microbacterium*, notamment chez celles qui résistent le mieux à l'uranium. Ce mécanisme reste à caractériser.

Les isolats issus de la tranchée T22 ont aussi la capacité d'accumuler du Cs et pourraient donc jouer un rôle important dans le devenir du ¹³⁷Cs présent dans le sol. Les expériences ont révélé une fois de plus des capacités d'accumulation disparates au sein des genres bactériens. Il semble que les capacités des bactéries à se développer et à accumuler le Cs soient là encore espèce-dépendantes.

Ces résultats nous ont apporté un nombre considérable d'informations sur la tranchée T22 de Tchernobyl et sur les communautés microbiennes qui la composent. Cependant, les travaux réalisés au cours de cette thèse ne représentent qu'une première étape dans la compréhension complète de cet écosystème. En effet, de nombreuses questions restent en suspens et nécessiteraient d'être approfondies par des études ultérieures.

PERSPECTIVES

Plusieurs études complémentaires pourraient être envisagées afin de mieux caractériser l'impact des radionucléides au niveau de la tranchée T22.

Tout d'abord, comme nous avons pu le constater au cours de l'étude, les échantillons contrôles se distinguent des échantillons prélevés au niveau de la tranchée par une faible teneur en radionucléides, mais aussi par une faible teneur en carbone organique. Ainsi, le

choix d'échantillons contrôles se caractérisant par des paramètres physico-chimiques plus proches des échantillons prélevés dans la tranchée T22 permettraient d'identifier de manière plus robuste l'influence des radionucléides sur la structure des communautés microbiennes.

D'autre part, il serait nécessaire d'établir un lien entre la composition et la fonction des communautés microbiennes identifiées. En effet, les méthodes utilisées dans cette thèse ont permis de caractériser les communautés microbiennes d'un point de vue phylogénétique, mais apportent peu de renseignements sur le rôle de ces microorganismes dans l'écosystème. L'analyse des bactéries cultivables permet de dégager quelques pistes afin de répondre à ces questions. Il serait particulièrement intéressant d'identifier les gènes impliqués dans les mécanismes de détoxification de l'uranium mis en évidence au cours de ce travail. Pour cela, le séquençage du génome des souches de *Microbacterium* a été réalisé et l'annotation est en cours. Une fois identifiés, des expériences visant à étudier ces gènes sur les échantillons de la tranchée T22 pourraient être envisagées. On pourrait s'intéresser à l'expression de ces gènes dans les sols, en présence et en absence de radionucléides, par RT-PCR quantitative. De manière plus fine, on peut également envisager de colocaliser les bactéries qui possèdent ces gènes avec les radionucléides présents sur les particules de sol par FISH et analyse chimique (MET-EDX). Ceci souligne l'importance du maintien des méthodes traditionnelles de culture et d'isolement pour la compréhension du rôle fonctionnel des microorganismes dans l'environnement.

Par ailleurs, le transfert des radionucléides au niveau de la tranchée T22 est une thématique d'intérêt qui, dans un contexte de compréhension de la mobilité des radionucléides dans le sol, nécessite l'identification des composants qui influencent cette mobilité. Il serait donc pertinent par la suite d'évaluer l'implication et les capacités des bactéries à immobiliser ou mobiliser les radionucléides dans un système sol. Pour ce faire, différentes possibilités sont envisageables. Une approche possible pour étudier la contribution bactérienne dans la mobilité des radionucléides serait la réalisation de colonne de sol. Ainsi, la mobilité comparée des radionucléides dans une colonne de sol sans bactéries et en présence d'un inoculum bactérien pourrait permettre de mieux appréhender la part d'implication des bactéries dans ce phénomène.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Akob DM, Mills HJ, Kostka JE. 2007. Metabolically active microbial communities in uranium-contaminated subsurface sediments. *FEMS Microbiology Ecology* 59: 95-107
- Anderson AW, Nordon HC, Cain RF, Parrish G, Duggan D. 1956. Studies on a radio-resistant micrococcus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technology* 10: 575-78
- Andrew DR, Fitak RR, Munguia-Vega A, Racolta A, Martinson VG, Dontsova K. 2012. Abiotic Factors Shape Microbial Diversity in Sonoran Desert Soils. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 7527-37
- Aquilina L, Matray JM, Lancelot J. 2012. 25 years after the Chernobyl power plant explosion: Management of nuclear wastes and radionuclide transfer in the environment. *Applied Geochemistry* 27: 1291-96
- Asker D, Awad TS, Beppu T, Ueda K. 2008. *Deinococcus misasensis* and *Deinococcus roseus*, novel members of the genus *Deinococcus*, isolated from a radioactive site in Japan. *Systematic and Applied Microbiology* 31: 43-49
- Asker D, Awad TS, Beppu T, Ueda K. 2009. *Deinococcus aquiradiocola* sp. nov., isolated from a radioactive site in Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 144-49
- Asker D, Awad TS, McLandsborough L, Beppu T, Ueda K. 2011. *Deinococcus depolymerans* sp. nov., a gamma- and UV-radiation-resistant bacterium, isolated from a naturally radioactive site. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61: 1448-53
- Barkleit A, Moll H, Bernhard G. 2008. Comparative investigation of the interaction of uranium with lipopolysaccharide and peptidoglycan In *Uranium, Mining and Hydrogeology*, ed. B Merkel, A Hasche-Berger, pp. 753-54: Springer Berlin Heidelberg
- Barns SM, Cain EC, Sommerville L, Kuske CR. 2007. Acidobacteria Phylum Sequences in Uranium-Contaminated Subsurface Sediments Greatly Expand the Known Diversity within the Phylum. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 3113-16
- Beaugelin-Seiller K, Jasserand F, Garnier-Laplace J, Gariel JC. 2006. Modeling radiological dose in non-human species: Principles, computerization, and application. *Health Physics* 90: 485-93

- Beazley MJ, Martinez RJ, Sobecky PA, Webb SM, Taillefert M. 2007. Uranium biomineralization as a result of bacterial phosphatase activity: insights from bacterial isolates from a contaminated subsurface. *Environmental Science & Technology* 41: 5701-7
- Beneš P, Kratzer K, Vlčková S, Sěbestová E. 1998. Adsorption of Uranium on Clay and the Effect of Humic Substances. *Radiochimica Acta* 82: 367-73
- Bernier-Latmani R, Veeramani H, Vecchia ED, Junier P, Lezama-Pacheco JS, Suvorova EI, Sharp JO, Wigginton NS, Bargar JR. 2010. Non-uraninite Products of Microbial U(VI) Reduction. *Environmental Science & Technology* 44: 9456-62
- Birkhofer K, Schöning I, Alt F, Herold N, Klärner B, Maraun M, Marhan S, Oelmann Y, Wubet T, Yurkov A, Begerow D, Berner D, Buscot F, Daniel R, Diekötter T, Ehnes RB, Erdmann G, Fischer C, Foesel B, Groh J, Gutknecht J, Kandeler E, Lang C, Lohaus G, Meyer A, Nacke H, Näther A, Overmann J, Polle A, Pollierer MM, Scheu S, Schloter M, Schulze E-D, Schulze W, Weinert J, Weisser WW, Wolters V, Schrupf M. 2012. General Relationships between Abiotic Soil Properties and Soil Biota across Spatial Scales and Different Land-Use Types. *PLoS ONE* 7: e43292
- Bollmann A, Lewis K, Epstein SS. 2007. Incubation of Environmental Samples in a Diffusion Chamber Increases the Diversity of Recovered Isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6386-90
- Bonin B, Blanc PL. 2001. L'uranium dans le milieu naturel, des origines jusqu'à la mine. In *L'uranium, de l'environnement à l'homme*, ed. ES Ed: Métivier H, IRSN Collection
- Borresen AL, Hovig E, Brogger A. 1988. Detection of base mutations in genomic DNA using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) followed by transfer and hybridization with gene-specific probes. *Mutation Research* 202: 77-83
- Brodie EL, DeSantis TZ, Joyner DC, Baek SM, Larsen JT, Andersen GL, Hazen TC, Richardson PM, Herman DJ, Tokunaga TK, Wan JM, Firestone MK. 2006. Application of a High-Density Oligonucleotide Microarray Approach To Study Bacterial Population Dynamics during Uranium Reduction and Reoxidation. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 6288-98
- Brooks BW, Murray RGE. 1981. Nomenclature for "Micrococcus radiodurans" and Other Radiation-Resistant Cocci: Deinococcaceae fam. nov. and Deinococcus gen. nov., Including Five Species. *International Journal of Systematic Bacteriology* 31: 353-60

- Buckley DH, Schmidt TM. 2002. Exploring the diversity of soil - a microbial rainforest In *Biodiversity of Microbial Life: Foundation of Earth's Biosphere*, ed. AL Reysenbach. New York, New York, USA: Wiley
- Bugai D, Kashparov V, Dewièrè L, Khomutinin Y, Levchuk S, Yoschenko V. 2005. Characterization of subsurface geometry and radioactivity distribution in the trench containing Chernobyl clean-up wastes. *Environmental Geology* 47: 869-81
- Bugai D, Skalskyy A, Dzhepo S, Kubko Y, Kashparov V, Van Meir N, Stammose D, Simonucci C, Martin-Garin A. 2012a. Radionuclide migration at experimental polygon at Red Forest waste site in Chernobyl zone. Part 2: Hydrogeological characterization and groundwater transport modeling. *Applied Geochemistry* 27: 1359-74
- Bugai D, Tkachenko E, Van Meir N, Simonucci C, Martin-Garin A, Roux C, Le Gal La Salle C, Kubko Y. 2012b. Geochemical influence of waste trench no. 22T at Chernobyl Pilot Site at the aquifer: Long-term trends, governing processes, and implications for radionuclide migration. *Applied Geochemistry* 27: 1320-38
- Calcott PH, Postgate JR. 1972. On substrate-accelerated death in *Klebsiella aerogenes*. *Journal of General Microbiology* 70: 115-22
- Callegan RP, Nobre MF, McTernan PM, Battista JR, Navarro-González R, McKay CP, da Costa MS, Rainey FA. 2008. Description of four novel psychrophilic, ionizing radiation-sensitive *Deinococcus* species from alpine environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 1252-58
- Casamayor EO, Schäfer H, Bañeras L, Pedrós-Alió C, Muyzer G. 2000. Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 499-508
- Catalano JG, Brown Jr GE. 2005. Uranyl adsorption onto montmorillonite: Evaluation of binding sites and carbonate complexation. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 69: 2995-3005
- Chanal A, Chapon V, Benzerara K, Barakat M, Christen R, Achouak W, Barras F, Heulin T. 2006. The desert of Tataouine: an extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria. *Environmental Microbiology* 8: 514-25
- Chaturvedi R, Archana G. 2012. Novel 16S rRNA based PCR method targeting *Deinococcus* spp. and its application to assess the diversity of deinococcal populations in environmental samples. *Journal of Microbiological Methods* 90: 197-205

- Chicote E, García A, Moreno D, Sarró MI, Lorenzo P, Montero F. 2005. Isolation and identification of bacteria from spent nuclear fuel pools. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32: 155-62
- Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, O'Toole PW. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research* 38: e200
- Cologgi DL, Lampa-Pastirk S, Speers AM, Kelly SD, Reguera G. 2011. Extracellular reduction of uranium via *Geobacter* conductive pili as a protective cellular mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*
- Curtis TP, Sloan WT, Scannell JW. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 10494-99
- Cycoń M, Markowicz A, Piotrowska-Seget Z. 2013. Structural and functional diversity of bacterial community in soil treated with the herbicide napropamide estimated by the DGGE, CLPP and r/K-strategy approaches. *Applied Soil Ecology* 72: 242-50
- Czirjak GA, Moller AP, Mousseau TA, Heeb P. 2010. Microorganisms associated with feathers of barn swallows in radioactively contaminated areas around chernobyl. *Microbial Ecology* 60: 373-80
- Daniel R. 2005. The metagenomics of soil. *Nature Reviews Microbiology* 3: 470-8
- Das S, Jean J-S, Kar S, Liu C-C. 2012. Changes in Bacterial Community Structure and Abundance in Agricultural Soils under Varying Levels of Arsenic Contamination. *Geomicrobiology Journal* 30: 635-44
- de Groot A, Chapon V, Servant P, Christen R, Saux MF-L, Sommer S, Heulin T. 2005. *Deinococcus deserti* sp. nov., a gamma-radiation-tolerant bacterium isolated from the Sahara Desert. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55: 2441-46
- Delmont TO, Simonet P, Vogel TM. 2012. Describing microbial communities and performing global comparisons in the omic era. *ISME Journal* 6: 1625-28
- Devell L, Tovedal H, Bergström U, Appelgren A, Chyssler J, Andersson L. 1986. Initial observations of fallout from the reactor accident at Chernobyl. *Nature* 321: 192-93
- DeVos W, Tarvainen T. 2006. *Geochemical Atlas of Europe: Part 2-Interpretation of geochemical maps, additional tables, figures, maps, and related publications*. Geological Survey of Finland.

- DiSpirito A, Talnagi J, Jr., Tuovinen O. 1983. Accumulation and cellular distribution of uranium in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Archives of Microbiology* 135: 250-53
- Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. 2003. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 8817-22
- El-Sayed WS, Ghanem S. 2009. Bacterial community structure change induced by gamma irradiation in hydrocarbon contaminated and uncontaminated soils revealed by pcr-denaturing gradient gel electrophoresis. *Biotechnology* 8: 78-85
- Fein JB, Powell BA. 2013. Uranium adsorption: speciation at mineral-water and bacterial cell-water interfaces In *Mineralogical Association of Canada*, pp. p. 165-201
- Ferreira AC, Nobre MF, Rainey FA, Silva MT, Wait R, Burghardt J, Chung AP, Da Costa MS. 1997. *Deinococcus geothermalis* sp. nov. and *Deinococcus murrayi* sp. nov., Two Extremely Radiation-Resistant and Slightly Thermophilic Species from Hot Springs. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47: 939-47
- Fields MW, Yan T, Rhee S-K, Carroll SL, Jardine PM, Watson DB, Criddle CS, Zhou J. 2005. Impacts on microbial communities and cultivable isolates from groundwater contaminated with high levels of nitric acid–uranium waste. *FEMS Microbiology Ecology* 53: 417-28
- Fierer N, Lennon JT. 2011. The generation and maintenance of diversity in microbial communities. *American Journal of Botany* 98: 439-48
- Francis AJ. 2006. Microbial transformations of radionuclides released from nuclear fuel reprocessing plants, Brookhaven National Laboratory ; distributed by the Office of Scientific and Technical Information, U.S. Dept. of Energy, Upton, N.Y.; Oak Ridge, Tenn.
- Francis AJ, Gillow JB, Dodge CJ, Harris R, Beveridge TJ, Papenguth HW. 2004. Uranium association with halophilic and non-halophilic bacteria and archaea. *Radiochimica Acta* 92: 481-88
- Fredrickson JK, Zachara JM, Balkwill DL, Kennedy D, Li S-MW, Kostandarithes HM, Daly MJ, Romine MF, Brockman FJ. 2004. Geomicrobiology of High-Level Nuclear Waste-Contaminated Vadose Sediments at the Hanford Site, Washington State. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4230-41
- Gadd GM. 1996. Influence of microorganisms on the environmental fate of radionuclides. *Endeavour* 20: 150-56

- Gadd GM. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156: 609-43
- Ganesh R, Robinson KG, Reed GD, Saylor GS. 1997. Reduction of hexavalent uranium from organic complexes by sulfate- and iron-reducing bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 4385-91
- Gaspar L, Navas A. 2013. Vertical and lateral distributions of ¹³⁷Cs in cultivated and uncultivated soils on Mediterranean hillslopes. *Geoderma* 207–208: 131-43
- Geras'kin SA, Fesenko SV, Alexakhin RM. 2008. Effects of non-human species irradiation after the Chernobyl NPP accident. *Environment International* 34: 880-97
- Hirsch P, Gallikowski CA, Siebert J, Peissl K, Kroppenstedt R, Schumann P, Stackebrandt E, Anderson R. 2004. *Deinococcus frigans* sp. nov., *Deinococcus saxicola* sp. nov., and *Deinococcus marmoris* sp. nov., Low Temperature and Draught-tolerating, UV-resistant Bacteria from Continental Antarctica. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 636-45
- Hirsch PR, Mauchline TH, Clark IM. 2010. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 878-87
- Hugenholtz P. 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biology* 3: reviews0003.1 - reviews03.8
- Janssen PH. 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 1719-28
- Janssen PH, Yates PS, Grinton BE, Taylor PM, Sait M. 2002. Improved Culturability of Soil Bacteria and Isolation in Pure Culture of Novel Members of the Divisions Acidobacteria, Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2391-96
- Kashefi K, Lovley DR. 2000. Reduction of Fe(III), Mn(IV), and toxic metals at 100°C by *Pyrobaculum islandicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 1050-56
- Kashefi K, Lovley DR. 2003. Extending the Upper Temperature Limit for Life. *Science* 301: 934
- Kashparov V, Yoschenko V, Levchuk S, Bugai D, Van Meir N, Simonucci C, Martin-Garin A. 2012. Radionuclide migration in the experimental polygon of the Red Forest waste site in the Chernobyl zone – Part 1: Characterization of the waste trench, fuel particle transformation processes in soils, biogenic fluxes and effects on biota. *Applied Geochemistry* 27: 1348-58

- Keep NH, Ward JM, Robertson G, Cohen-Gonsaud M, Henderson B. 2006. Bacterial resuscitation factors: revival of viable but non-culturable bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 63: 2555-59
- Kennedy AC, Smith KL. 1995. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. *Plant and Soil* 170: 75-86
- Koga Y. 2012. Thermal Adaptation of the Archaeal and Bacterial Lipid Membranes. *Archaea* 2012: 6
- Krawczyk-Bärsch E, Lünsdorf H, Pedersen K, Arnold T, Bok F, Steudtner R, Lehtinen A, Brendler V. 2012. Immobilization of uranium in biofilm microorganisms exposed to groundwater seeps over granitic rock tunnel walls in Olkiluoto, Finland. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 96: 94-104
- Kumar R, Nongkhlaw M, Acharya C, Joshi SR. 2013. Uranium (U)-tolerant bacterial diversity from U ore deposit of domiasiat in North-East India and its prospective utilisation in bioremediation. *Microbes and Environments* 28: 33-41
- Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. 2009. Pyrosequencing-Based Assessment of Soil pH as a Predictor of Soil Bacterial Community Structure at the Continental Scale. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 5111-20
- Lenhart JJ, Cabaniss SE, MacCarthy P, Honeyman BD. 2000. Uranium(VI) complexation with citric, humic and fulvic acids. *Radiochimica Acta* 88: 345-53
- Li Z, Xu J, Tang C, Wu J, Muhammad A, Wang H. 2006. Application of 16S rDNA-PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of shift in microbial community diversity in Cu-, Zn-, and Cd-contaminated paddy soils. *Chemosphere* 62: 1374-80
- Lovley DR, Phillips EJP, Gorby YA, Landa ER. 1991. Microbial reduction of uranium. *Nature* 350: 413-16
- Macaskie LE, Bonthron KM, Yong P, Goddard DT. 2000. Enzymically mediated bioprecipitation of uranium by a *Citrobacter* sp.: a concerted role for exocellular lipopolysaccharide and associated phosphatase in biomineral formation. *Microbiology* 146: 1855-67
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J, Braverman MS, Chen YJ, Chen Z, Dewell SB, Du L, Fierro JM, Gomes XV, Godwin BC, He W, Helgesen S, Ho CH, Irzyk GP, Jando SC, Alenquer ML, Jarvie TP, Jirage KB, Kim JB, Knight JR, Lanza JR, Leamon JH, Lefkowitz SM, Lei M, Li J, Lohman KL, Lu H, Makhijani VB, McDade KE, McKenna MP, Myers EW, Nickerson E, Nobile JR, Plant R, Puc BP, Ronan MT, Roth GT, Sarkis GJ, Simons JF, Simpson JW, Srinivasan

- M, Tartaro KR, Tomasz A, Vogt KA, Volkmer GA, Wang SH, Wang Y, Weiner MP, Yu P, Begley RF, Rothberg JM. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-80
- Markich SJ. 2002. Uranium speciation and bioavailability in aquatic systems: an overview. *Scientific World Journal* 2: 707-29
- Marqués A, Roca X, Simon-Pujol MD, Fuste MC, Congregado F. 1991. Uranium accumulation by *Pseudomonas* sp. EPS-5028. *Applied Microbiology and Biotechnology* 35: 406-10
- McDougald D, Rice SA, Weichart D, Kjelleberg S. 1998. Nonculturability: adaptation or debilitation? *FEMS Microbiology Ecology* 25: 1-9
- McNamara NP, Griffiths RI, Tabouret A, Beresford NA, Bailey MJ, Whiteley AS. 2007. The sensitivity of a forest soil microbial community to acute gamma-irradiation. *Applied Soil Ecology* 37: 1-9
- Merroun M, Nedelkova M, Rossberg A, Hennig C, Selenska-Pobell S. 2006. Interaction mechanisms of bacterial strains isolated from extreme habitats with uranium. *Radiochimica Acta* 94: 723-29
- Merroun ML, Geipel G, Nicolai R, Heise KH, Selenska-Pobell S. 2003. Complexation of uranium (VI) by three eco-types of *Acidithiobacillus ferrooxidans* studied using time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy and infrared spectroscopy. *BioMetals* 16: 331-39
- Merroun ML, Raff J, Rossberg A, Hennig C, Reich T, Selenska-Pobell S. 2005. Complexation of Uranium by Cells and S-Layer Sheets of *Bacillus sphaericus* JG-A12. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5532-43
- Merroun ML, Selenska-Pobell S. 2008. Bacterial interactions with uranium: An environmental perspective. *Journal of Contaminant Hydrology* 102: 285-95
- Messner P, Steiner K, Zarschler K, Schäffer C. 2008. S-layer nanoglycobiology of bacteria. *Carbohydrate Research* 343: 1934-51
- Minton KW. 1996. Repair of ionizing-radiation damage in the radiation resistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *Mutation Research/DNA Repair* 363: 1-7
- Møller AP, Mousseau TA. 2006. Biological consequences of Chernobyl: 20 years on. *Trends in Ecology & Evolution* 21: 200-07
- Mondani L, Benzerara K, Carrière M, Christen R, Mamindy-Pajany Y, Février L, Marmier N, Achouak W, Nardoux P, Berthomieu C, Chapon V. 2011. Influence of Uranium on

- Bacterial Communities: A Comparison of Natural Uranium-Rich Soils with Controls. *PLoS ONE* 6: e25771
- Mühling M, Woolven-Allen J, Murrell JC, Joint I. 2008. Improved group-specific PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the genetic diversity of complex microbial communities. *ISME Journal* 2: 379-92
- Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, Young M, Kell DB. 1998. A bacterial cytokine. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 8916-21
- Murray AE, Hollibaugh JT, Orrego C. 1996. Phylogenetic compositions of bacterioplankton from two California estuaries compared by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 2676-80
- Muyzer G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 2: 317-22
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 695-700
- Nakajima A, Tsuruta T. 2004. Competitive biosorption of thorium and uranium by *Micrococcus luteus*. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 260: 13-18
- Nedelkova M, Merroun ML, Rossberg A, Hennig C, Selenska-Pobell S. 2007. Microbacterium isolates from the vicinity of a radioactive waste depository and their interactions with uranium. *FEMS Microbiology Ecology* 59: 694-705
- Nichols D, Lewis K, Orjala J, Mo S, Ortenberg R, O'Connor P, Zhao C, Vouros P, Kaerberlein T, Epstein SS. 2008. Short Peptide Induces an "Uncultivable" Microorganism To Grow In Vitro. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 4889-97
- Nichols DS, Miller MR, Davies NW, Goodchild A, Raftery M, Cavicchioli R. 2004. Cold adaptation in the Antarctic Archaeon *Methanococoides burtonii* involves membrane lipid unsaturation. *Journal of Bacteriology* 186: 8508-15
- Niedrée B, Berns AE, Vereecken H, Burauel P. 2013a. Do Chernobyl-like contaminations with ¹³⁷Cs and ⁹⁰Sr affect the microbial community, the fungal biomass and the composition of soil organic matter in soil? *Journal of Environmental Radioactivity* 118: 21-29
- Niedrée B, Vereecken H, Burauel P. 2012. Effects of low-level radioactive soil contamination and sterilization on the degradation of radiolabeled wheat straw. *Journal of Environmental Radioactivity* 109: 29-35

- Niedrée B, Vereecken H, Burauel P. 2013b. Radiation-induced impacts on the degradation of 2,4-D and the microbial population in soil microcosms. *Journal of Environmental Radioactivity* 115: 168-74
- Nies DH. 1995. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 177: 2707-12
- Nies DH. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* 51: 730-50
- Nies DH. 2003. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 313-39
- North NN, Dollhopf SL, Petrie L, Istok JD, Balkwill DL, Kostka JE. 2004. Change in Bacterial Community Structure during In Situ Biostimulation of Subsurface Sediment Cocontaminated with Uranium and Nitrate. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4911-20
- Oliver JD. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *Journal of Microbiology* 43: 93-100
- Paulino-Lima I, Azua-Bustos A, Vicuña R, González-Silva C, Salas L, Teixeira L, Rosado A, Costa Leitao A, Lage C. 2013. Isolation of UVC-Tolerant Bacteria from the Hyperarid Atacama Desert, Chile. *Microbial Ecology* 65: 325-35
- Payne TE, Davis JA, Lumpkin GR, Chisari R, Waite TD. 2004. Surface complexation model of uranyl sorption on Georgia kaolinite. *Applied Clay Science* 26: 151-62
- Phillips EJP, Landa ER, Lovley DR. 1995. Remediation of uranium contaminated soils with bicarbonate extraction and microbial U(VI) reduction. *Journal of Industrial Microbiology* 14: 203-07 Publication year 1995
- Prakash D, Gabani P, Chandel AK, Ronen Z, Singh OV. 2013. Bioremediation: a genuine technology to remediate radionuclides from the environment. *Microbial Biotechnology* 6: 349-60
- Ragon M, Restoux G, Moreira D, Møller AP, López-García P. 2011. Sunlight-Exposed Biofilm Microbial Communities Are Naturally Resistant to Chernobyl Ionizing-Radiation Levels. *PLoS ONE* 6: e21764
- Rainey FA, Ferreira M, Nobre MF, Ray K, Bagaley D, Earl AM, Battista JR, Gómez-Silva B, McKay CP, da Costa MS. 2007. *Deinococcus peraridilitoris* sp. nov., isolated from a coastal desert. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1408-12

- Rainey FA, Ray K, Ferreira M, Gatz BZ, Nobre MF, Bagaley D, Rash BA, Park M-J, Earl AM, Shank NC, Small AM, Henk MC, Battista JR, Kämpfer P, da Costa MS. 2005. Extensive Diversity of Ionizing-Radiation-Resistant Bacteria Recovered from Sonoran Desert Soil and Description of Nine New Species of the Genus *Deinococcus* Obtained from a Single Soil Sample. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 5225-35
- Rainey FA, Ward-Rainey NL, Janssen PH, Hippe H, Stackebrandt E. 1996. *Clostridium paradoxum* DSM 7308T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology* 142: 2087-95
- Rappé MS, Giovannoni SJ. 2003. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology* 57: 369-94
- Rashmi V, Shylajanaciyar M, Rajalakshmi R, D'Souza SF, Prabakaran D, Uma L. 2013. Siderophore mediated uranium sequestration by marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus* BDU 130911. *Bioresource Technology* 130: 204-10
- Rastogi G, Osman S, Vaishampayan P, Andersen G, Stetler L, Sani R. 2010. Microbial Diversity in Uranium Mining-Impacted Soils as Revealed by High-Density 16S Microarray and Clone Library. *Microbial Ecology* 59: 94-108
- Ray AE, Bargar JR, Sivaswamy V, Dohnalkova AC, Fujita Y, Peyton BM, Magnuson TS. 2011. Evidence for multiple modes of uranium immobilization by an anaerobic bacterium. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 75: 2684-95
- Renshaw JC, Lloyd JR, Livens FR. 2007. Microbial interactions with actinides and long-lived fission products. *Comptes Rendus Chimie* 10: 1067-77
- Ribera D, Labrot F, Tisnerat G, Narbonnet J-F. 1996. Uranium in the Environnement: Occurrence, Transfer, and Biological Effects. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 146
- Rigol A, Vidal M, Rauret G. 2002. An overview of the effect of organic matter on soil–radiocaesium interaction: implications in root uptake. *Journal of Environmental Radioactivity* 58: 191-216
- Roesch LFW, Fulthorpe RR, Riva A, Casella G, Hadwin AKM, Kent AD, Daroub SH, Camargo FAO, Farmerie WG, Triplett EW. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME Journal* 1: 283-90
- Romanovskaya VA, Rokitko PV, Mikheev AN, Gushcha NI, Malashenko Iu R, Chernaiia NA. 2002. The effect of gamma-radiation and desiccation on the viability of the soil bacteria isolated from the alienated zone around the Chernobyl Nuclear Power Plant. *Mikrobiologiia* 71: 705-12

- Romanovskaya VA, Stoliar SM, Malashenko Iu R, Shatokhina ES. 1996. The effect of long-acting radiation on the diversity of heterotrophic bacteria in the soils of a 10-kilometer area around the Chernobyl Atomic Electric Power Station. *Mikrobiologichnyi zhurnal* 58: 3-12
- Sani RK, Peyton BM, Dohnalkova A. 2006. Toxic effects of uranium on *Desulfovibrio desulfuricans* G20. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25: 1231-38
- Satchanska C, Golovinsky E, Selenska-Pobell S. 2004. Bacterial Diversity in a Soil Sample from Uranium Mining Waste Pile as Estimated via a Culture-Independent 16S rDNA Approach. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences* 57: 4:75
- Sayeh R, Birrien J, Alain K, Barbier G, Hamdi M, Prieur D. 2010. Microbial diversity in Tunisian geothermal springs as detected by molecular and culture-based approaches. *Extremophiles* 14: 501-14
- Sekiguchi H, Tomioka N, Nakahara T, Uchiyama H. 2001. A single band does not always represent single bacterial strains in denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Biotechnology Letters* 23: 1205-08
- Selenska-Pobell S. 2002. *Interactions of microorganisms with radionuclides, Chapter 8*. Elsevier Science.
- Shahandeh H, Hossner LR. 2002. Role of Soil Properties in Phytoaccumulation of Uranium. *Water, Air, and Soil Pollution* 141: 165-80
- Shelobolina E, Coppi M, Korenevsky A, DiDonato L, Sullivan S, Konishi H, Xu H, Leang C, Butler J, Kim B-C, Lovley D. 2007. Importance of c-Type cytochromes for U(VI) reduction by *Geobacter sulfurreducens*. *BMC Microbiology* 7: 16
- Shendure J, Ji H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology* 26: 10
- Siqueira JF, Jr., Fouad AF, Rocas IN. 2012. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. *Journal of Oral Microbiology* 4: 23
- Sivaswamy V, Boyanov MI, Peyton BM, Viamajala S, Gerlach R, Apel WA, Sani RK, Dohnalkova A, Kemner KM, Borch T. 2011. Multiple mechanisms of uranium immobilization by *Cellulomonas* sp. strain ES6. *Biotechnology and Bioengineering* 108: 264-76
- Staley JT, Konopka A. 1985. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology* 39: 321-46
- Staunton S, Dumat C, Zsolnay A. 2002. Possible role of organic matter in radiocaesium adsorption in soils. *Journal of Environmental Radioactivity* 58: 163-73

- Stevenson BS, Eichorst SA, Wertz JT, Schmidt TM, Breznak JA. 2004. New Strategies for Cultivation and Detection of Previously Uncultured Microbes. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4748-55
- Stubbs JE, Elbert DC, Veblen DR, Zhu C. 2006. Electron Microbeam Investigation of Uranium-Contaminated Soils from Oak Ridge, TN, USA. *Environmental Science & Technology* 40: 2108-13
- Suresh K, Reddy GSN, Sengupta S, Shivaji S. 2004. *Deinococcus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium from an aquifer in West Bengal, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 457-61
- Suzuki Y, Banfield JF. 1999. Geomicrobiology of uranium. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry* 38: 393-432
- Tabak H, Lens P, Hullebusch E, Dejonghe W. 2005. Developments in Bioremediation of Soils and Sediments Polluted with Metals and Radionuclides – 1. Microbial Processes and Mechanisms Affecting Bioremediation of Metal Contamination and Influencing Metal Toxicity and Transport. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 4: 115-56
- Thorsen MK, Brandt KK, Nybroe O. 2013. Abundance and diversity of culturable *Pseudomonas* constitute sensitive indicators for adverse long-term copper impacts in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 57: 933-35
- Tomioka N, Uchiyama H, Yagi O. 1992. Isolation and characterization of cesium-accumulating bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 1019-23
- Torsvik V, Daae FL, Sandaa R-A, Øvreås L. 1998. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *Journal of Biotechnology* 64: 53-62
- Torsvik V, Salte K, Sørheim R, Goksøyr J. 1990. Comparison of phenotypic diversity and DNA heterogeneity in a population of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 56: 776-81
- Unterweger MP. 2002. Half-life measurements at the National Institute of Standards and Technology. *Applied Radiation and Isotopes* 56: 125-30
- VanEngelen MR, Field EK, Gerlach R, Lee BD, Apel WA, Peyton BM. 2010. UO_2^{2+} speciation determines uranium toxicity and bioaccumulation in an environmental *pseudomonas* sp. isolate. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29: 763-69
- Viggor S, Juhanson J, Jõesaar M, Mitt M, Truu J, Vedler E, Heinaru A. 2013. Dynamic changes in the structure of microbial communities in Baltic Sea coastal seawater

- microcosms modified by crude oil, shale oil or diesel fuel. *Microbiological Research* 168: 415-27
- Wall JD, Krumholz LR. 2006. Uranium Reduction. *Annual Review of Microbiology* 60: 149-66
- Weber KA, Thrash JC, Van Trump JI, Achenbach LA, Coates JD. 2011. Environmental and taxonomic bacterial diversity of anaerobic uranium(IV) bio-oxidation. *Applied Environmental Microbiology* 77: 4693-6
- Williams KH, Bargar JR, Lloyd JR, Lovley DR. 2012. Bioremediation of uranium-contaminated groundwater: a systems approach to subsurface biogeochemistry. *Current Opinion in Biotechnology*
- Woese CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51: 221-71
- Woolfolk CA, Whiteley HR. 1962. Reduction of inorganic compound with molecular hydrogen by *Micrococcus lactilyticus* I. : Stoichiometry with Compounds of Arsenic, Selenium, Tellurium, Transition and Other Elements. *Journal of Bacteriology* 84: 647-58
- Yablokov AV, Nesterenko VB, Nesterenko AV. 2009. Chapter III. Consequences of the Chernobyl Catastrophe for the Environment. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1181: 221-86
- Yanase N, Isobe H, Sato T, Sanada Y, Matsunaga T, Amano H. 2002. Characterization of hot particles in surface soil around the Chernobyl NPP. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 252: 233-39
- Yuan M, Zhang W, Dai S, Wu J, Wang Y, Tao T, Chen M, Lin M. 2009. *Deinococcus gobiensis* sp. nov., an extremely radiation-resistant bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 1513-17
- Zavilgelsky GB, Abilev SK, Sukhodolets VV, Ahmad SI. 1998. Isolation and analysis of UV and radio-resistant bacteria from Chernobyl. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 43: 152-57

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution du nombre de séquences d'ARNr depuis 1992 dans la base de données SSU.....	8
Figure 2: Résumé des principales étapes de séquençage par la technologie 454 (Siqueira <i>et al.</i> , 2012).....	13
Figure 3 : Relation entre le pH des sols et la diversité bactérienne, en utilisant la diversité phylogénétique (A) et le nombre de phylotypes (B) défini à 97% de similarité. La courbe pleine représente la courbe de tendance. Les indices de diversité ont été calculés en utilisant 1200 séquences par sol (Lauber <i>et al.</i> , 2009).....	15
Figure 4 : Contribution des séquences d'ARNr 16S bactériens aux phylums les mieux représentés dans le sol. Les données ont été compilées à partir de 21 banques (2920 clones) de clones d'ARNr 16S obtenus par amplification à partir d'ADN du sol. La barre horizontale représente le pourcentage moyen de séquences attribuées au phylum, le rectangle représente l'écart type et les barres verticales représentent les valeurs maximales et minimales (North <i>et al.</i> , 2004).	16
Figure 5 : Image TEM (Microscopie électronique à transmission) : micrographie d'une cellule de <i>Geobacter sulfurreducens</i> (orange) avec son pili (jaune) impliqué dans l'immobilisation de l'uranium (précipité noir). Image de Dena Cologgi et Gemma Reguera, Université de Michigan State.....	28
Figure 6 : Observation en MET de cellules de <i>B. sphaericus</i> JG-A12 (bactérie Gram positive). Le métal est accumulé à la surface de la cellule (a) (Merroun <i>et al.</i> , 2005)	31
Figure 7: Image en MET des cellules de <i>P. migulae</i> CIP 105470 (A) et de <i>S. maltophilia</i> JG-2 (B) traitées avec de l'uranium. Les flèches indiquent la présence d'uranium (Merroun et Selenska-Pobell 2008).....	33
Figure 8 : Schéma général du site expérimental de Tchernobyl (source IRSN)	37
Figure 9 : Carottage des sols au niveau de la tranchée de Tchernobyl et collecte des échantillons pour les analyses microbiologiques.	38
Figure 10 : Résultats de survie des isolats de <i>Microbacterium</i> dans la solution contrôle et dans la solution d'exposition à 10 µM de nitrate d'uranyle à t30 min (bleu) et t24 h (en rouge)...	159
Figure 11 : Suivi de la cinétique d'interaction des souches de <i>Microbacterium</i> par dosage de la concentration d'uranium dans le milieu au cours du temps.	160

Figure 12 : Observation en MET de 6 souches de *Microbacterium* après exposition à 10 µM de nitrate d'uranyle durant 24 h. La localisation de certains précipités d'uranium est repérée par une flèche. 161

Figure 13 : Observations en MET. Les coupes représentent (1a) la souche S15-M2, (2a) S15-M4, (3a) S15-M5 exposée à U(VI) à pH 4,5. Le métal est accumulé à la surface cellulaire (Nedelkova *et al.*, 2007). 162

Figure 14 : Détection de souches accumulatrices de ¹³⁷Cs par autoradiographie. Souches cultivées sur TSB (0,1X) en présence de CsCl (1 mM) et de ¹³⁷Cs (10⁶ Bq). A : colonies formés par les différentes souches testées avant transfert sur membrane de nitrocellulose. B et C : images obtenues des deux membranes par l'analyse au phosphorimager. 165

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des 48 UOTs testées au cours de la phase de sélection de bactéries résistantes à l'uranium (exposition à 100 µM de nitrate d'uranyle pendant 24 heures). 121

Tableau 2 : Analyse de l'intensité relative des différents spots obtenus par autoradiographie. Sur les 36 souches ont été testées. Les intensités obtenues à l'aide du logiciel ImageQuant sont exprimées en unité arbitraire (u. a.). 166

VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE

Publications scientifiques :

Nicolas Theodorakopoulos, Dipankar Bachar, Richard Christen, Karine Alain, Virginie Chapon: *Exploration of Deinococcus-Thermus molecular diversity by novel group-specific PCR primers*. Microbiology Open. 08/2013; 2(5): 862-8.

Virginie Chapon, Laurie Piette, Marie-Hélène Vesvres, Frédéric Coppin, Claire Le Marrec, Richard Christen, Nicolas Theodorakopoulos, Laureline Février, Sviatoslav Levchuk, Arnaud Martin-Garin, Catherine Berthomieu, Claire Sergeant: *Microbial diversity in contaminated soils along the T22 trench of the Chernobyl experimental platform*. Applied Geochemistry 07/2012; 27(7):1375-83.

Articles en préparation :

Nicolas Theodorakopoulos, Virginie Chapon, Frédéric Coppin, Magali Floriani, Thomas Vercouter, Sergeant, Virginie Camilleri, Catherine Berthomieu, Laureline Février: *Use of combined microscopic and spectroscopic techniques to evidence interactions between uranium and Microbacterium sp. strain A9, a strain isolated from the Chernobyl exclusion zone*. Publication prévue dans Plos One.

Nicolas Theodorakopoulos, Richard Christen, Laurie Piette, Laureline Février, Frédéric Coppin, Arnaud Martin-Garin, Claire Le Marrec, Claire Sergeant, Catherine Berthomieu, Virginie Chapon: *Bacterial populations of Chernobyl soils are shaped by radionuclides exposure*. Article en préparation.

Conférences:

Virginie Chapon, Claire Sergeant, Laurie Piette, Marie-Hélène Vesvres, Frédéric Coppin, Claire Le Marrec, Laureline Février, Nicolas Theodorakopoulos, Sviatoslav Levchuk, Richard Christen, Arnaud Martin-Garin, Catherine Berthomieu: *Bacterial community analysis of contaminated soils from Chernobyl*. International Conference: "Twenty-five years after Chornobyl accident: safety for the future"; 20-22 April 2011, Kiev (Ukraine)

Claire Sergeant, Nicolas Theodorakopoulos, Laurie Piette, Marie-Hélène Vesvres, Claire Le Marrec, Richard Christen, Frédéric Coppin, Laureline Février, Arnaud Martin-Garin,

Catherine Berthomieu, Virginie Chapon: *Uranium interactions with Bacterial Communities from Contaminated Soils in Chernobyl*. Goldschmidt Conference, 14-19 august 2011, Prague (Czech Republic)

Claire Sergeant, Nicolas Theodorakopoulos, Laurie Piette, Marie-Hélène Vesvres, Claire Le Marrec, Richard Christen, Frédéric Coppin, Laureline Février, Arnaud Martin-Garin, Catherine Berthomieu, Virginie Chapon: *Uranium interactions with Bacterial Communities from Contaminated Soils in Chernobyl*. International Conference: Microorganisms facing their environment, 27-28 octobre 2011, Paris

Nicolas Theodorakopoulos, Richard Christen, Laurie Piette, Laureline Février, Frédéric Coppin, Arnaud Martin-Garin, Claire Le Marrec, Claire Sergeant, Catherine Berthomieu, Virginie Chapon: *Analysis of bacterial diversity in a Chernobyl contaminated soil by pyrosequencing*. SETAC 2012, 20-24 May 2012, Berlin (Allemagne)

Nicolas Theodorakopoulos

Analysis of bacterial diversity in a Chernobyl contaminated soil by pyrosequencing. 20th meeting of the doctoral school in biological and health sciences, Faculty of medicine la Timone, 1 June 2012, Marseille (France)

Nicolas Theodorakopoulos, Richard Christen, Laurie Piette, Laureline Février, Frédéric Coppin, Arnaud Martin-Garin, Claire Le Marrec, Claire Sergeant, Catherine Berthomieu, Virginie Chapon: *Pyrosequencing analysis of bacterial diversity in Chernobyl contaminated trenches*. Goldschmidt Conference, 25-29 June 2012, Montreal (Quebec)

Claire Sergeant, Nicolas Theodorakopoulos, Richard Christen, Marie-Hélène Vesvres, Laurie Piette, Michael S. Pravikoff, Laureline Février, Frédéric Coppin, Arnaud Martin-Garin, Claire Le Marrec, Catherine Berthomieu, Virginie Chapon: *Analyse de la diversité bactérienne de tranchées contaminées de Tchernobyl par méthodes culturales et pyrosequençage*. XIIIes Journées Nationales de Radiochimie et de Chimie Nucléaire, 4-5 octobre 2012, Nantes

Nicolas Theodorakopoulos

Apport des techniques spectroscopiques et microscopiques pour caractériser les interactions bactéries -uranium

Séminaire de toxicologie nucléaire environnementale et humaine, 17 septembre 2013, MNHN, Paris

RESUME DE THESE

Les accidents nucléaires des centrales de Tchernobyl et de Fukushima rendent primordial la compréhension des transferts de la contamination radioactive dans l'environnement et de ses conséquences écologiques. Bien que certaines études aient été réalisées sur les organismes supérieurs, trop peu ont étudié les communautés bactériennes telluriques, qui jouent pourtant un rôle essentiel dans la mobilité des contaminants dans les sols en diminuant ou en améliorant leur transfert vers d'autres compartiments (eau, végétaux, animaux). Cependant, les radionucléides (RNs) peuvent avoir des effets toxiques sur les bactéries, entraînant une inhibition de leur rôle dans ce transfert. Les objectifs de cette étude étaient (1) d'évaluer l'impact d'une contamination radioactive sur les communautés bactériennes d'un sol de la zone d'exclusion de Tchernobyl (sol de la tranchée T22) et (2) d'étudier les interactions bactérie-uranium pour une souche résistante, isolée à partir de ce sol. Les différentes techniques utilisées pour caractériser la diversité bactérienne (culture de bactéries, DGGE, pyroséquençage) ont toutes témoigné de la richesse et de l'abondance des communautés bactériennes malgré la contamination. Un impact sur la structure des communautés, difficilement visualisable avec la DGGE et l'approche culturale, a néanmoins été mis en évidence par l'utilisation du pyroséquençage, suggérant la présence d'espèces plus adaptées aux conditions du sol contaminé. Cet environnement particulièrement irradiant pouvant constituer un habitat de choix pour les bactéries radio-résistantes, un outil moléculaire spécifique à la recherche de bactéries affiliées au phylum des *Deinococcus-Thermus* (ex : l'espèce *Deinococcus radiodurans* survit après une irradiation de plusieurs kGy) a été mis au point. Il n'a pas permis de révéler la présence de bactéries affiliées à ce phylum dans le sol contaminé. Parallèlement à l'étude de la diversité bactérienne, une cinquantaine de souches de bactéries cultivables a été isolée à partir de ce site et a servi de support à la sélection d'une souche capable de survivre à de fortes concentrations d'U(VI) (*Microbacterium*). La caractérisation des interactions entre cet isolat bactérien et l'U(VI) a mis en évidence un mécanisme de détoxification actif qui met en jeu un efflux de l'U(VI) entré dans la cellule et une précipitation intracellulaire d'U(VI) sous la forme d'autunite.

ABSTRACT

The nuclear power plants accidents of Chernobyl and Fukushima demonstrate the importance of the understanding of the transfer of the radioactive contamination in the environment and its ecological consequences. Although certain studies have been realized on superior organisms of the food chain, studies on telluric bacterial communities are scarce. The latter play nevertheless an essential role in the mobility of contaminants in soils by decreasing or improving their transfer towards other compartments (water, vegetables and animals). Moreover radionuclides (RNs) can have toxic effects on bacteria, leading to an inhibition of their participation in such transfer. The objectives of this study were (1) to estimate the impact of the radioactive contamination on bacterial communities belonging to a soil of the Chernobyl exclusion zone (trench T22) and (2) to study the uranium-bacteria interactions of a resistant strain, isolated from this soil. The various techniques used to characterize the bacterial diversity (culture of bacteria, DGGE, 454 pyrosequencing) all testified of the multiplicity and the abundance of the bacterial communities in spite of the contamination. An impact on the community structure was difficult to assess by DGGE or cultural approach, but was nevertheless highlighted by the use of pyrosequencing, suggesting the presence of species more adapted to the contaminated soil conditions. A specific molecular tool dedicated to the search of bacteria affiliated to the known radiation resistant *Deinococcus-Thermus* phylum (for example the *Deinococcus radiodurans* specie survives after an irradiation of several kGy) was developed. However it did not reveal the presence of bacteria affiliated to such a phylum in the studied soil. In parallel to the study of the bacterial biodiversity, about fifty culturable bacteria were isolated from this site and were used as a support to select a species (*Microbacterium*) capable to survive strong U(VI) concentrations. The characterization of the interactions between the selected bacteria isolate (*Microbacterium*) and U(VI) highlighted an active mechanism of detoxification which involves an efflux of the U(VI) entering the cell and an intracellular precipitation of U(VI) in form of autunite.