



OPUR : Observatoire d'hydrologie urbaine en Île de France
Thème de recherche R3: Gestion à la source des eaux pluviales
Action de recherche R3.4

***DEVENIR DES MICROPOLLUANTS ORGANIQUES DANS LES
SOLS DES OUVRAGES DE GESTION A LA SOURCE DES
EAUX PLUVIALES :
INTERACTIONS DIVERSITE MICROBIENNE ET
BIODEGRADABILITE DES MICROPOLLUANTS***

Rapport final
Thèse de doctorat de Andréa OUDOT
Novembre 2024

*Thèse réalisée au sein du laboratoire Leesu sous la direction de Noureddine Bousserhine et
Marie-Christine Gromaire*





THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS EST CRETEIL

Ecole Doctoral Sciences, Ingénierie et Environnement

Spécialité

Sciences et Techniques de l'Environnement

Présentée par

Andréa OUDOT

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris Est Créteil

Devenir des micropolluants organiques dans les sols des ouvrages de gestion à la source des eaux pluviales : interactions diversité microbienne et biodégradabilité des micropolluants

Soutenue le 6 novembre 2024 devant le jury composé de :

HAICHAR Feteih el Azhar – Professeur des universités. INSA Lyon

Rapportrice

FAKIH Mohamad – Professeur des universités. Lebanese university

Rapporteur

GAUTIER Mathieu – Professeur des universités. INSA Lyon

Président du jury

ACHOUAK Wafa – Directrice de recherche. CNRS / CEA Cadarache

Examinatrice

TECHER Didier – Chargé de recherche. Cerema

Examineur

Bousserrhine Noureddine – Professeur des universités. UPEC

Directeur de thèse

Gromaire Marie-Christine – Directrice de recherche. ENPC

Codirecteur de thèse



Remerciements

Résumé

Suite à l'augmentation massive des surfaces imperméables depuis l'ère industrielle, plusieurs problèmes ont vu le jour. Premièrement, des problèmes de gestion des eaux pluviales au sein des villes apparaissent avec des situations de surcharge des réseaux et d'inondations. Deuxièmement, le transfert des eaux pluviales sur une longue distance pour être rejetées de la ville va entraîner une contamination de ces eaux en micropolluants et cela va également amener à la contamination du milieu receveur. Pour éviter cela un nouveau paradigme à vue le jour qui repose à traiter les eaux pluviales le plus proche possible de son point de chute. Afin de répondre à ces exigences, de nouvelles structures alternatives ont vu le jour qui vont permettre de mimer le cycle naturel de l'eau et de réduire au maximum le trajet des eaux pluviales afin de contrôler au mieux les flux de polluants. L'objectif étant maintenant d'étudier ces structures pour mieux comprendre leur fonctionnement et vérifier qu'elles répondent aux exigences de leur création.

Ce travail de thèse s'intègre dans la phase 5 du programme OPUR s'intéresse donc à l'étude du fonctionnement biologique et la performance des sols des ouvrages de gestion des eaux pluviales. Plus précisément à l'interaction qu'il y a entre les microorganismes et les micropolluants présents dans les sols de ces ouvrages. Comprendre l'implication des microorganismes dans la biodégradation de ces micropolluants étant un objectif à atteindre. Pour cela, trois sites contenant au total 5 ouvrages vont être utilisés pour ces travaux de thèse. Ces sites ont été choisis en fonction de critères particuliers comme la durée de mise en service (site ancien, moyen et jeune), la texture du sol, le type de pollution (de voirie). Les ouvrages ont ensuite été échantillonnés en fonction de la présence ou non de végétation et de la sollicitation hydrique). La zone d'arrivée de l'eau dans les ouvrages sera considérée comme la zone « apport » tandis que la partie de l'ouvrage à distance de l'arrivée hydrique sera considérée comme la zone de « référence ». L'étude de 11 sols provenant de ces 3 sites permettra une comparaison de l'état des sols, de l'activité biologique et puis des capacités de biodégradation microbienne afin de mieux comprendre le fonctionnement biologique de ces ouvrages. Des campagnes d'échantillonnage en été et en hiver ont été réalisées pour aussi apprécier l'impact des saisons sur les communautés microbiennes de ces sols particuliers. Une caractérisation physico-chimique (pH, MO, CEC, capacité au champ, granulométrie) et biologique (biomasse « NPP », activité enzymatique « FDA, déshydrogénase et uréase », activité potentielle « plaque Ecologue », diversité bactérienne et fongique) a été faite à chacune de ces campagnes. Puis des cinétiques de biodégradation en batch liquide et en colonne ont été réalisées pour évaluer la performance de biodégradation des microorganismes autochtones des sols des ouvrages face à un cocktail de micropolluants : BPA, NP et OP.

Les résultats des travaux de cette thèse ont mis en évidence l'aspect important de la durée de mise en service des structures pour avoir des activités microbiennes et des performances de biodégradation importantes dans les sols. Les zones des ouvrages situées dans la zone apport donc qui sont soumises à un apport en eaux pluviales important sont les zones les plus actives. Des préférences de biodégradation des micropolluants ainsi que des vitesses de biodégradation apport/référence au sein d'un même site sont aussi observées au cours de la cinétique en batch liquide. Les études sur la diversité génétique ont aussi montré des structures microbiennes différentes entre les sites et également avec les sols les plus actifs pour la biodégradation des micropolluants. Ces travaux ont aussi pu montrer que les actions d'entretien des ouvrages ont un impact négatif non négligeable sur les sols de ces structures.

Pour conclure, ces travaux permettent de mieux comprendre le fonctionnement biologique qui s'opère au sein des sols des ouvrages et leur implication sur le devenir des micropolluants. A terme, ces travaux participeront à la réflexion pour améliorer la mise en place de ces structures et leur optimisation ainsi que leur entretien.

Mots clés : ouvrages de gestion des eaux pluviales, microorganismes, micropolluants, sol

Abstract

Following the massive increase in impermeable surfaces since the industrial era, a number of problems have arisen. Firstly, stormwater management problems have arisen within cities, leading to network overloading and flooding. Secondly, the long-distance transfer of stormwater for discharge from the city leads to contamination of the water with micropollutants, which in turn contaminates the receiving environment. To avoid this, a new paradigm has emerged, based on treating stormwater as close as possible to its point of discharge. To meet these requirements, new alternative structures have been developed to mimic the natural water cycle and reduce the path of stormwater as much as possible in order to control pollutant flows as much as possible. The aim now is to study these structures to better understand how they work and check that they meet the requirements for their creation.

This thesis is part of phase 5 of the OPUR program, and is therefore concerned with studying the biological functioning and performance of stormwater management facility soils. More specifically, the interaction between microorganisms and the micropollutants present in the soils of these facilities. Understanding the involvement of microorganisms in the biodegradation of these micropollutants is a key objective. To this end, three sites containing a total of 5 structures will be used for this thesis work. These sites were selected on the basis of specific criteria such as length of time in service (old, medium and young sites), soil texture and type of pollution (road). The structures were then sampled according to the presence or absence of vegetation and water stress.) The zone where water enters the structure is considered the “input” zone, while the part of the structure at a distance from the water input is considered the “reference” zone. The study of 11 soils from these 3 sites will enable a comparison of soil condition, biological activity and then microbial biodegradation capacities, in order to better understand the biological functioning of these structures. Summer and winter sampling campaigns were also carried out to assess the impact of the seasons on the microbial communities of these particular soils. Physico-chemical (pH, OM, CEC, field capacity, granulometry) and biological (MPN biomass, FDA, dehydrogenase and urease enzymatic activity, potential Ecologue plate activity, bacterial and fungal diversity) characterization was carried out for each campaign. Liquid batch and column biodegradation kinetics were then carried out to assess the biodegradation performance of native microorganisms in the soil of the structures against a cocktail of micropollutants: BPA, NP and OP.

The results of the work carried out in this thesis have highlighted the importance of the length of time the structures are in service, in order to achieve significant microbial activity and biodegradation performance in soils. The areas of the structures located in the inflow zone, i.e. subject to high stormwater inflow, are the most active zones. Micropollutant biodegradation preferences and input/reference biodegradation rates within the same site were also observed during liquid batch kinetics. Studies on genetic diversity have also shown different microbial structures between sites and also with the most active soils for micropollutant biodegradation. This work has also shown that the maintenance of structures has a significant negative impact on their soils.

In conclusion, this work has enabled us to gain a better understanding of the biological processes that take place within the soils of these structures, and their impact on the fate of micropollutants. In the long term, this work will contribute to a better understanding of how to set up, optimize and maintain these structures.

Keywords: stormwater management facilities, microorganisms, micropollutants, soil

Liste abréviations

OPUR : Observatoire des Polluants Urbains

BPA : Bisphénol A

NP : Nonylphénol

OP : Octylphénol

MP : Micropolluants

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

TPH : Hydrocarbures Pétroliers Totaux

PHE : Phénanthrène

ETM : Eléments Traces Métalliques

MO : Matière Organique

CEC : Capacité d'Echange Cationique

NPP : Nombre le Plus Probable

FDA : Fluorescéine Diacétate

DJA : Dose Journalière Admissible

MW : Masse Molaire

WS : Solubilité

C : Carbone

N : Azote

BSM : Basal Salt Medium

DO : Densité Optique

PCR : Polymerase Chain Reaction

GPS : Global Positioning System

Table des matières

Introduction générale	12
Chapitre 1 : Etat des connaissances	16
I. Les pollutions.....	17
A. Les différents types de pollutions, les sources et impacts	17
B. Paramètres intrinsèques des micropolluants.....	19
C. Description de deux micropolluants	20
II. Ouvrages de gestion des eaux pluviales.....	25
A. Mise en place des ouvrages	25
B. La diversité des ouvrages existants	26
C. L'état des connaissances sur ces ouvrages et le devenir des micropolluants.....	27
III. Etat des connaissances sur la biodégradation microbienne dans les sols pollués par les micropolluants.....	30
A. Introduction à la microbiologie et aux méthodologies d'étude.....	30
1. Présentation des microorganismes	31
2. Possibilités d'utilisation des microorganismes.....	35
3. Méthodologies d'études des microorganismes	36
B. Caractérisation microbienne au sein des sols	40
1. Caractérisation des communautés microbiennes des ouvrages de gestion des eaux pluviales.....	40
2. Caractérisation des communautés microbiennes dans des infrastructures de gestion des eaux de surface et souterraines polluées.....	45
3. Caractérisation des communautés microbiennes dans des sols pollués	46
IV. Les processus de biodégradation des micropolluants dans les sols.....	50
A. La biodégradation, qu'est-ce que c'est ?.....	50
B. Les acteurs de la biodégradation	51
C. Voies de biodégradation pour une sélection de micropolluants typiques du ruissellement urbain	52
1. Voies de dégradation du Bisphénol A	52
2. Les Alkylphénols	55
D. Paramètres abiotiques et biotiques qui vont influencer la biodégradation	56
1. Effets des paramètres physico-chimiques du sol et de l'environnement	56
2. Qualité du sol : activité enzymatique du métabolisme pour mesurer les impacts sur les populations microbiennes.....	58
3. Rôles de la faune et de la flore.....	60

4.	Interaction entre les microorganismes et performance de la biodégradation des micropolluants.....	61
5.	Effets des paramètres intrinsèques des micropolluants et les effets cocktails	62
	Chapitre 2 : Sites d'étude et méthodes d'analyse.....	65
V.	Echantillonnage du sol d'ouvrages de gestion des eaux pluviales.....	66
A.	Description des sites d'études et stratégie d'échantillonnage	66
1.	Le site de Compans	69
2.	Le site de Vitry	71
3.	Le site de Dourdan	73
4.	Préparation et stockage de l'échantillon	74
VI.	Caractérisation des paramètres physico-chimiques et biologiques du sol	75
A.	Introduction.....	75
B.	Mesure des paramètres physico-chimiques du sol	75
1.	Fractionnement granulométrique par sédimentation	75
2.	Mesure du pH.....	76
3.	Dosage de la matière organique et mesure du poids sec	77
4.	Mesure de la capacité au champ	77
5.	Mesure de la capacité d'échange cationique (CEC)	78
C.	Mesure des paramètres microbiologiques du sol	79
1.	Mesure de la biomasse microbienne par la méthode du nombre le plus probable	79
2.	Les analyses Biolog et la diversité fonctionnelle microbienne.....	80
3.	Mesure des activités enzymatiques des sols.....	82
4.	Métabarcoding total	85
VII.	Mises en place des cinétiques de biodégradation des micropolluants organiques en batch et en colonnes	86
A.	Objectifs.....	86
B.	Dispositif expérimental de la cinétique de biodégradation en système batch liquide	86
1.	Préparation du matériel en amont :	86
2.	Préparation des constituants des mésocosmes : milieu de culture, mélange de micropolluants et extrait de microorganismes :	86
3.	Mise en place des mésocosmes :	87
4.	Analyses des solutions prélevées dans les mésocosmes :	88
5.	Sacrifice des mésocosmes, répartition et stockage des solutions	88
6.	Protocoles des analyses	89
C.	Dispositif expérimental de la cinétique en colonne	91

1. Préparation des colonnes.....	91
2. Préparation du reste du matériel.....	92
3. Mise en place des colonnes	93
4. Protocoles des analyses	95
Chapitre 3 : Comparaisons de trois ouvrages de gestion des eaux pluviales au cours des saisons	97
1. Introduction.....	102
2. Materials and methods	103
2.1. Sites description and soil sampling	103
2.2. Soil samples characterization	104
2.2.1. Physical and chemical soils analysis	104
2.2.2. Biological soils analysis.....	105
2.3. Statistical analysis.....	107
3. Results and discussion.....	107
3.1 Physical and chemical properties of the soils	107
3.1.1 Soils physical and chemical properties, comparison between sites	107
3.1.2 Soils physical and chemical properties: comparison of the summer/winter campaigns.....	112
3.2 Biological properties of the soils	115
3.2.1 Microbial biomass and enzymatic activity of summer and winter campaign soils.....	115
3.2.2 Comparison of summer and winter soil microbial biomass and enzymatic activity.....	119
3.2.3 Functional microbial diversity of summer and winter campaign soils.....	122
3.3 Relation between summer and winter campaign soils results	125
3.4 Genetic microbial diversity of summer and winter campaign soils	128
3.4.1 Biodiversity indices.....	128
3.4.2 Microbial community structure in stormwater management soils	129
4. Conclusion	132
5. Acknowledgements.....	132
Chapitre 4 : Etude de la capacité de biodégradation des micropolluants par les microorganismes du sol des ouvrages de gestion des eaux pluviales	133
4.1 Cinétique de biodégradation en batch liquide.....	135
1. Introduction.....	138
2. Materials and methods	142
2.1. Site description and soil sampling.....	142
2.2. Chemicals	143
2.3. Kinetics experimental design	144

2.4.	Analysis.....	144
2.4.1.	Physico-chemical analysis.....	144
2.4.2.	Biological analysis.....	145
2.5.	Statistical analysis.....	146
3.	Results & discussion	147
3.1.	Biological results during kinetics	147
3.2.	Physico-chemical results during kinetics.....	151
3.3.	Microbial community structure.....	155
3.3.1.	Biodiversity indices.....	155
3.3.2.	Characterization of microbial population potentially involved in the micropollutant biodegradation.....	157
4.	Conclusion	161
5.	Acknowledgements.....	162
4.2.	Cinétique de biodégradation en colonnes des sols de Dourdan et de la Noue	163
4.2.1	Analyses physico-chimiques et biologiques au cours de la cinétique en colonnes	163
	Evolution du pH.....	163
	Dosage des micropolluants	165
	Biomasse microbienne	172
	Activité enzymatique	173
	Diversité fonctionnelle.....	174
	Composition des communautés bactériennes par métabarcoding du gène codant l'ARNr 16S.....	175
4.2.2	Conclusions et perspectives.....	180
Chapitre 5 : Evolution au cours du temps des ouvrages de gestion des eaux pluviales situés à Compans		182
1.	Introduction.....	187
2.	Materials and methods	188
2.1.	Site description and soils sampling	188
2.2.	Campaigns soil samples characterization.....	191
2.2.1.	Physical and chemical soils analysis	191
2.2.2.	Biological soils analysis.....	192
3.	Results	195
3.1.	Soils physical, chemical and biological analysis of the 4 sampling campaigns	195
3.2.	Soils physical, chemical and biological properties evolution	203
3.3.	Relation between 2021 and 2022 campaign soils results.....	214
4.	Conclusion	215

5. Acknowledgements	216
Chapitre 6 : Conclusion générale et perspectives	217
Listes des tables et figures	226
Annexes	235
Références bibliographiques	244

Introduction générale

L'eau potable est depuis toujours une denrée essentielle à notre survie et très présente dans notre mode de vie. Déjà à l'époque romaine des structures ont été mises en place spécialement pour le transit de l'eau dans les villes. Au moyen-âge, le développement de la gestion hydraulique n'augmente pas beaucoup et se base principalement sur les vestiges romains (Chouli, 2006). A cette époque (jusqu'à la fin du 18^{ème} s), l'eau potable est rare car n'est disponible qu'à des points d'accès limités dans les villes et il est nécessaire de se déplacer pour la récupérer, dans des citernes qui permettent de la stocker. Par contre, le devenir et la gestion des eaux usées n'étaient pas abordés à cette époque. En effet, ces eaux polluées étaient rejetées directement dans les rues ou dans les rivières selon le principe du « tout à la rue » (Zgheib et al., 2011). Les maladies qu'entraînent cet état insalubre ne sont pas encore associées aux eaux stagnantes. Ce n'est que plus tard lors du développement du mouvement des « hygiénistes » que la question de la propreté des rues devient capitale pour la santé. C'est donc au 19^{ème} s que les égouts vont être construits, d'abord pour la seule évacuation des eaux pluviales, puis selon le principe de « tout à l'égout », en collectant eaux pluviales et eaux usées dans un même réseau dit « unitaire ». Au début du 20^{ème} s, il y aura une séparation entre les eaux pluviales et les eaux usées ce qui donne un réseau séparatif. Ce dispositif va fonctionner pendant une longue période mais avec l'expansion des villes et donc de l'urbanisation (seconde moitié du 20^{ème} s), l'imperméabilisation des sols, les quantités d'eaux à gérer vont augmenter. Cette imperméabilisation croissante des sols va entraîner donc une saturation du réseau d'assainissement existant. La surcharge des réseaux d'assainissement cause des risques d'inondations et de rejets urbains non traités par temps de pluie, ce qui va polluer les milieux naturels récepteurs, en plus des risques de baisse du niveau des nappes phréatiques (déficit d'infiltration). En plus de la saturation des réseaux séparatifs, l'imperméabilisation grandissante des sols en ville empêche l'eau de s'infiltrer. Les eaux pluviales vont ruisseler sur les surfaces imperméables au lieu de s'infiltrer (Miller et al., 2014), ce qui modifie le bilan hydrologique de surface, conduit à un déficit en eau des sols urbains, une plus faible alimentation des nappes souterraines, et plus généralement une perturbation du régime hydrologique des petits cours d'eau urbains. Par ailleurs, ces eaux de ruissellement vont se contaminer par lessivage des surfaces urbaines contaminées par des polluants organiques et inorganiques (Gromaire-Mertz et al., 1999). L'intensification du trafic routier va aussi augmenter la quantité de micropolluants rejetés dans l'environnement, ce qui va également augmenter le niveau de contamination des eaux pluviales (Branchu et al., 2013). La qualité de l'eau rejetée dans l'environnement se retrouve ainsi amoindrie et va causer des impacts néfastes sur la faune et la flore. Certains de ces polluants peuvent être dégradés (malgré une modification des écosystèmes) mais d'autres sont persistants et vont s'accumuler. Le risque de cette accumulation est que ça touche la chaîne trophique avec la biomagnification. La biomagnification (aussi appelé bioamplification) c'est le processus par lequel la concentration des polluants va augmenter à chaque maillon du réseau trophique pouvant de ce fait impacter très négativement les organismes supérieurs de fin de chaîne dont l'Homme (Ali and Khan, 2019; Lu et al., 2023).

Il y a donc une remise en question du paradigme du « tout à l'égout » à la fin du 20^{ème} s. Aussi vont apparaître des ouvrages de gestion alternative des eaux pluviales, des structures qui seront souvent semi-centralisées. Ces ouvrages visent à réguler les débits, par stockage puis restitution des eaux au réseau ou par infiltration. Il faudra attendre les années 2010 pour le développement de la notion

« gestion intégrée des eaux pluviales ». Cette notion va se baser sur le développement de structures qui sont de plus en plus « à la source » et « intégrées à l'urbanisme ». A l'international se développent les notions de « Sustainable Urban Drainage Systems SUDS » et « Low Impact Development LID ». L'objectif n'étant plus seulement de réguler les débits mais de restaurer un bilan hydrologique au sein des villes plus proche du bilan naturel (Sage, 2016). C'est depuis les années 2015 que la notion de solutions fondées sur la nature a fortement été promue (UICN, 2016), notamment dans un objectif d'adaptation au changement climatique. Pour cela, des structures alternatives fondées sur la nature ont vu le jour (Grand Lyon, n.d.). Ces structures, aussi appelées, « ouvrages de gestion alternative des eaux pluviales » vont permettre l'infiltration et/ou la rétention des eaux de pluies à la source, c'est-à-dire au plus près du point d'arrivée de l'eau de pluie au sol, le plus en amont possible de sa source pour éviter le lessivage (Chocat, 2008; Flanagan et al., 2017; Sage, 2016). Ces ouvrages ont pour objectifs de maîtriser les risques d'inondations, de limiter la contamination des milieux naturels.

Suite à la mise en place de ces structures, des travaux ont vu le jour pour comprendre et optimiser leur fonctionnement. Différentes études portant sur la capacité des ouvrages à piéger les micropolluants particuliers ainsi que sur l'accumulation des micropolluants dans le sol des ouvrages ont déjà été menées (Flanagan, 2019; Tedoldi, 2016). Dans le sol (substrats) de ces ouvrages, des organismes vivants (faune, flore et microorganismes) sont présents et vont pouvoir impacter la concentration et la spéciation des polluants. Dans ce contexte le potentiel de biodégradation des micropolluants organique est un phénomène important à considérer dans les sols des ouvrages de gestion des eaux pluviales puisqu'il détermine la capacité épuratoire des ouvrages pour ce genre de polluants. Ce potentiel de biodégradation actuellement peu étudié est cependant capital pour évaluer l'efficacité et la durabilité de ces ouvrages fondés sur la nature.

Afin de pouvoir étudier au mieux ces structures, un programme a été mis en place, il s'agit de OPUR. L'observation d'hydrologie urbaine OPUR a vu le jour en 1994. Il s'agit d'un programme de recherche sur le long terme, s'appuyant sur des interactions fortes entre chercheurs et acteurs opérationnels dans la région Ile de France, et qui vise à améliorer les connaissances concernant la production et le transfert des polluants dans les eaux urbaines, et leur devenir dans les ouvrages de gestion.

Ce travail de thèse s'intégrant dans la 5^{ème} phase du programme OPUR (Observatoire des Polluants Urbains) a débuté en novembre 2020 et s'intitule « **Devenir des micropolluants organiques dans les sols des ouvrages de gestion à la source des eaux pluviales : interactions diversité microbienne et biodégradabilité des micropolluants** ». L'objectif principal de ce projet est d'étudier le potentiel de biodégradation de micropolluants organiques (BPA et Alkylphénols) par les microorganismes du sol de différents ouvrages. Les ouvrages concernés sont des ouvrages de filtration/infiltration de ruissellements urbains qui ont été sélectionnés en fonction de la texture de leur sol, de leur durée de mise en service, du type de pollution auquel ils sont soumis. Ce travail vise à mettre en lien ces capacités de biodégradation avec les propriétés physico-chimiques et biologiques du sol des ouvrages et notamment la structure et la diversité des communautés microbiennes autochtones. Pour cela, cette thèse a été séparée en 2 grandes parties : le 1^{er} objectif étant la caractérisation des communautés microbiennes dans le sol des ouvrages afin de pouvoir expliquer les capacités de biodégradation microbiennes en fonction du contexte, le 2^{ème} objectif concerne l'étude des processus de

biodégradation microbienne via des cinétiques de biodégradation des micropolluants en batch liquide et en colonnes.

Ce manuscrit est structuré en six chapitres dont trois sont sous forme de projet d'articles scientifiques.

Le **premier chapitre** concerne la synthèse bibliographique qui s'articule autour de quatre parties essentielles. La première partie fait le point sur les micropolluants, en particulier les micropolluants organiques. La deuxième partie est sur les ouvrages, leur diversité, leur fonctionnement. La troisième partie fait le point sur la microbiologie avec un rappel sur ses méthodes d'études et une synthèse des travaux regroupant l'étude des microorganismes ayant un potentiel de biodégradation des micropolluants, avec la diversité génétique des communautés impliquées. Enfin la quatrième partie est consacrée à la biodégradation des micropolluants, des exemples de voies de biodégradation et les paramètres biotiques et pédoclimatiques pouvant l'influencer.

Le **deuxième chapitre** se focalise sur la méthodologie d'étude utilisée lors de ma thèse et du descriptif des différentes expériences réalisées. Trois grandes parties constituent ce chapitre. La première concerne les manipulations physico-chimiques du sol (étude du pH, de la matière organique, de la texture, de la capacité d'échange cationique, de la capacité au champ), la deuxième concerne la partie microbiologique du sol (étude de la biomasse, de l'activité et de la diversité microbienne), la dernière partie concerne les cinétiques de biodégradation de 3 micropolluants organiques (BPA, NP et OP) en batch liquide et en colonnes réalisées à partir de mes sols.

Le **troisième chapitre** va porter sur la première partie des résultats avec l'étude des caractéristiques physico-chimique et biologique de différents ouvrages de gestion des eaux pluviales. L'objectif étant d'étudier les différences et ressemblances entre les sols de ces ouvrages. L'impact des saisons sera aussi étudié dans cette partie.

Le **quatrième chapitre** traite de l'efficacité des microorganismes des sols des ouvrages de gestion des eaux pluviales à biodégrader le BPA, le NP et l'OP. La première partie va traiter des capacités de biodégradation bactérienne lors d'une cinétique liquide et la deuxième partie lors d'une cinétique en colonnes.

Le **cinquième chapitre** est consacré à un ouvrage particulier, le site de Compans. L'ensemble des résultats obtenus sur ce site au cours du temps et en fonction des saisons ont été regroupés afin d'étudier plus en détails les sols d'un même site et à son évolution. L'impact humain (maintenance des ouvrages) sera également étudié au cours de ce chapitre.

Dans le **sixième et dernier chapitre**, une synthèse du travail effectué est faite avec la présentation des perspectives de recherches qui s'inscrivent dans la continuité de ce travail de recherche.

Chapitre 1 : Etat des connaissances

I. Les pollutions

A. Les différents types de pollutions, les sources et impacts

Selon la Directive européenne 2000/60/CE du 23 octobre 2000, une Pollution c'est "Introduction directe ou indirecte, par suite de l'activité humaine, de substances ou de chaleur dans l'air, l'eau ou le sol, susceptibles de porter atteinte à la santé humaine ou à la qualité des écosystèmes aquatiques ou des écosystèmes terrestres, qui entraînent des détériorations aux biens matériels, une détérioration ou une entrave à l'agrément de l'environnement ou à d'autres utilisations légitimes de ce dernier."

Dans ce contexte, il est nécessaire de distinguer les termes contaminant et polluant. Un contaminant est une substance qui se retrouve dans une quantité anormale, c'est-à-dire non naturelle. Un polluant c'est lorsque la quantité de la substance en question dépasse un « seuil critique » au-delà duquel elle a une action toxique sur un ou des organismes et/ou engendre des effets néfastes pour l'environnement.

Et enfin, le terme de micropolluant a fait son apparition (Briand et al., 2018). Le micropolluant est « une substance indésirable détectable dans l'environnement à très faible concentration ($\mu\text{g/L}$ voire ng/L) ». Sa présence est, au moins en partie, due à l'activité humaine (procédés industriels, pratiques agricoles ou activités quotidiennes) et peut à ces très faibles concentrations engendrer des effets négatifs sur les organismes vivants en raison de sa toxicité, de sa persistance et/ou de sa bioaccumulation ». Définition du ministère de l'Environnement (devenu ministère de la Transition écologique et solidaire).

Ils existent deux grandes catégories de micropolluants :

- Les micropolluants métalliques : les éléments traces métalliques (ETM) tels que le cadmium, le cuivre, le plomb, le zinc, etc
- Les micropolluants organiques : les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les phtalates, le bisphénol A, les biocides, les médicaments, etc

Les micropolluants ont plusieurs origines, certains ont des origines essentiellement anthropologiques c'est-à-dire qu'ils sont synthétisés par l'homme et ne sont pas présents à l'état naturel dans l'environnement avec le bisphénol A en exemple. D'autres polluants peuvent être déjà présents à l'état naturel ce qui est le cas des métaux, on parle de niveau basal ou fond géochimique du sol en ces éléments.

Les pollutions peuvent résulter d'accidents qui sont des causes ponctuelles mais le plus souvent, ce sont des sources fixes qui posent problèmes (Müller et al., 2020). Comme sources fixes, il y a les dépôts atmosphériques, les matériaux constitutifs des surfaces urbaines et les activités anthropiques. Pour les dépôts atmosphériques, c'est la déposition des micropolluants de l'atmosphère par temps sec ou par lessivage de l'atmosphère lors des précipitations. Ces dépôts peuvent varier en fonction de l'intensité des précipitations (Charters et al., 2016). Les surfaces urbaines sont les routes, les surfaces imperméables et les immeubles en prenant en compte les toits, les façades et leurs matériaux de construction (la pollution relarguée de ces matériaux va dépendre du type de matériau et de son âge, (Robert-Sainte et al., 2009). Les activités anthropiques, génèrent des émissions dynamiques liées aux activités humaines de tous les jours comme le transport en voiture (émission de gaz, usure du véhicule et de la route libérant des particules dans l'environnement), l'entretien des routes, les travaux de construction, les activités industrielles, les activités agricoles (épandage de pesticides) ainsi que les rejets ménagers (concernant les eaux usées, le jardinage, les déchets des animaux de compagnies, etc).

Les micropolluants peuvent être spécifiques d'une source d'émission ou en avoir plusieurs :

Par exemple, les HAP vont avoir comme source d'émission les gaz d'échappement, les phtalates sont retrouvés dans les emballages plastiques, les composants automobiles (Bergé, 2013; Deshayes et al., 2016), les biocides vont se retrouver dans les champs pour l'agriculture mais aussi sur les immeubles pour éviter le développement des algues ou champignons sur les façades et les toits (Paijens et al., 2020). Le terme « micropolluants » recouvre un vaste panel de composés chimiques, aux propriétés diversifiées. Le **tableau 2** donne un exemple de quelques familles de micropolluants organiques – et leurs sous catégories – dont la présence dans le ruissellement urbain est bien documentée, et précise leurs propriétés physico-chimiques. Pour la famille des biocides, voici une liste non exhaustive de molécules qu'elle contient : Diuron, Atrazine, Mécoprop (MCP), Terbutryne, Carbendazime, etc (Zgheib, 2009).

En fonction du milieu étudié, les micropolluants retrouvés ne seront donc pas les mêmes. En étudiant le ruissellement urbain, la composition en micropolluants du ruissellement de voirie et des toitures par exemple sera différente. Les ruissellements de voirie seront plus concentrés en micropolluants provenant du bitume et des voitures tandis que les ruissellements des toitures, des bâtiments seront plus concentrés en biocides (Reiß et al., 2021).

Mais peu importe la diversité des sources et des micropolluants retrouvés, il y a toujours des impacts néfastes pour la santé humaine, l'environnement, la faune et la flore. On parle alors de toxicité pour les humains et d'écotoxicité pour l'environnement (faune et flore).

Cette toxicité peut être aiguë ou chronique. Une toxicité aiguë est un effet fort à court terme tandis qu'une toxicité chronique est un effet plus faible mais sur du long terme ce qui peut aboutir à des effets néfastes irréversibles.

Les effets de ces toxicités vont être cancérigènes, mutagènes, reprotoxiques, neurotoxiques, tératogènes, immunotoxiques ainsi que des perturbations endocriniennes (avec des concentrations très faibles) (Acir and Guenther, 2018; dos Santos et al., 2022). Ces effets peuvent varier en fonction du micropolluant, en fonction de la dose, en fonction de l'âge de développement de l'organisme touché et il est aussi possible d'avoir des effets cocktails. Les effets cocktails c'est quand plusieurs micropolluants sont en mélange et leurs interactions entre eux vont modifier leur action individuelle les rendant potentiellement plus néfastes (Luo et al., 2022; Shao et al., 2019).

Dans l'environnement, la toxicité et le risque d'un micropolluant dépendent de sa biodisponibilité pour les systèmes biologiques. La biodisponibilité (Pauget et al., 2012), c'est la concentration du polluant qui va être disponible et assimilable par un organisme dans son environnement direct. Les organismes peuvent internaliser ces polluants par absorption si le polluant est sous forme dissoute, et par ingestion directe ou indirecte (via des aliments contaminés) si le polluant est sous forme solide (Bergé, 2013).

Dans ce contexte, il est important de faire la différence entre la concentration/quantité du polluant qui est disponible dans le milieu, la quantité qui est biodisponible pour les organismes vivants et la quantité que l'on retrouvera ensuite dans les organismes qui pourra entraîner un impact sur l'organisme. On distingue de ce fait trois concepts liés à la biodisponibilité (Harmsen, 2007) :

- La disponibilité environnementale : c'est la quantité de polluants qui se trouvent dans le milieu, et qui est susceptible de pénétrer dans un organisme. C'est une concentration que l'on peut obtenir en utilisant des extractants chimiques visant à mimer le processus de prise en charge par un organisme, mais les organismes n'entrent pas en compte dans ces analyses (Smolders et al., 2009).
- La biodisponibilité environnementale : cette fois c'est l'interaction entre les polluants du milieu et les organismes vivants qui est prise en compte, donc la quantité des polluants

effectivement accessibles aux organismes. En effet, les micropolluants peuvent être présents sous plusieurs formes chimiques (Varrault et al., 2012), complexées ou libres. On parle alors de spéciation. Dans le cas des ETM par exemple, c'est la forme ionique qui sera assimilable par les organismes, les complexes qui se forment avec les minéraux ou la matière organique n'étant pas ou peu accessibles. C'est pourquoi, il faut comprendre que ce n'est qu'une partie de la concentration initiale des polluants qui va pouvoir impacter les organismes de l'écosystème (Harmsen, 2007).

- La biodisponibilité toxicologique : on parle ici seulement de l'organisme, le milieu n'entre plus en compte. En effet, des systèmes de défense sont présents dans les êtres vivants et il faut les prendre en compte quand on parle de la biodisponibilité car cela peut fortement impacter les concentrations internes de polluants.

Dans ces travaux, c'est la biodisponibilité environnementale qui nous intéresse. Il faut donc s'intéresser aux micropolluants dissous (Briand et al., 2018). En effet, il faut faire attention à cette biodisponibilité car dans un milieu liquide, la biodisponibilité sera élevée et donc les effets immédiats aussi tandis que dans un sol où la biodisponibilité sera plus faible, un relargage des micropolluants (MP) pourra se faire au cours du temps et impacter un écosystème sur du plus long terme. L'accès à la fraction biodisponible dans un sol se fait via la phase aqueuse de celui-ci (De Weert et al., 2008; Delgadillo-Mirquez et al., 2011).

La fraction dissoute est usuellement définie comme la fraction passant au travers d'un filtre de taille de pores à 0.45µm, la fraction retenue sur le filtre constituant la phase particulaire. Les micropolluants de la fraction dissoute peuvent être sous forme libre sinon il est possible de les retrouver complexés à la matière organique dissoute, ou à des particules colloïdales (argiles par exemple). Les micropolluants (MP) de la fraction particulaire, eux, seront adsorbés sur la phase solide (organique ou minérale) ou constitutifs de sa matrice (ex : particule d'usure de pneu).

La fraction dissoute des micropolluants organiques est celle qui va subir le plus de processus dissipatifs via des processus comme la volatilisation, l'hydrolyse, la photolyse et la biodégradation (Briand et al., 2018).

Cependant le devenir des MP (dissous/particulaire) est dépendant de leurs propriétés intrinsèques.

B. Paramètres intrinsèques des micropolluants

Les sources, les impacts et le devenir des MP en général ayant été abordés, il faut maintenant spécifier les différences entre les MP que l'on peut observer grâce à leurs propriétés intrinsèques.

Les principales propriétés intrinsèques des MP sont (Briand et al., 2018) :

- La structure chimique : la taille de la molécule et la présence de groupements chargés vont influencer les phénomènes d'adsorption sur les substrats, la taille va aussi intervenir lors de la biodégradation ainsi que la complexité de la molécule (plus une molécule est grande et complexe plus elle sera difficile à biodégrader).
- Le temps de demi-vie : c'est le temps nécessaire pour que la concentration d'une molécule soit réduite de moitié du fait de processus de dégradation biotiques ou abiotiques. Elle va permettre de déterminer la persistance de la molécule (capacité à rester dans le milieu sans être dégradée).

- L'hydrophobicité : c'est le comportement d'une molécule vis-à-vis de l'eau, une molécule hydrophobe « n'aime pas l'eau » et va s'adsorber sur les particules. C'est donc un critère qui permet de définir la tendance d'un micropolluant organique à soit aller s'adsorber soit rester en phase dissoute. Le coefficient de partage octanol/eau est utilisé pour ce critère.
- La solubilité : c'est la capacité d'une molécule à se dissoudre dans un liquide (ex : l'eau). Elle intervient dans la spéciation des micropolluants (dissous ou particulaires).
- La volatilité : c'est la capacité d'une molécule dissoute à se partager entre les phases gazeuse et liquide. La constante de Henry est utilisée pour ce critère.

Des paliers existent pour différencier les intensités des micropolluants : faible, moyen et fort comme il est possible de le voir ci-dessous.

(Briand et al., 2018; Scholes et al., 2008)

Tableau 1 : Paramètres et valeurs seuils d'intensités obtenues par modélisation pour l'élimination des micropolluants dans l'eau proposés par le programme ScorePP

Processus	Paramètres	Unités	Seuils d'intensités		
			Faible	Moyen	Fort
Volatilisation	K_H : constante de Henry	atm.m ³ /mol	<10 ⁻⁷	10 ⁻⁷ -10 ⁻³	>10 ⁻³
Adsorption	K_{OC} : coefficient partage eau/carbone organique	L/g	<10 ²	10 ² -10 ⁵	>10 ⁵
Solubilisation	Solubilité	mg/L	<10 ²	10 ² -10 ⁵	>10 ⁵
Bioaccumulation	log K_{OW} : coefficient de partage octanol/eau	adimensionnel	<2	2-6	>6

C. Description de deux micropolluants

Un intérêt particulier va se porter sur deux micropolluants organiques. Le bisphénol A et les alkylphénols car ce sont des molécules que l'on va régulièrement retrouver dans les eaux de ruissellement des voiries et qui vont de ce fait impacter les sols des ouvrages de gestion des eaux pluviales. L'intérêt est d'étudier le devenir de ces micropolluants organiques dans ces ouvrages pouvant aller jusqu'à la dissipation totale et pas juste de la bioaccumulation.

Le bisphénol A est un composé anthropique, c'est-à-dire qu'il n'est pas naturel et produit exclusivement par l'homme. Il est utilisé dans la fabrication du plastique et des résines époxydes, ce sont ses propriétés antioxydante et durcissant qui intéressent les industriels. La quantité de production et de consommation du bisphénol A (BPA) n'a fait qu'augmenter au cours des années passant de 1,7 millions de t/an en 1997 à 3,2 millions de tonnes par an en 2005 dans le monde (Cladière, 2012), atteignant 6,5 millions de tonnes en 2012 (Im and Löffler, 2016). Malgré l'évolution de la réglementation, la quantité de production du BPA dans le monde continue d'augmenter. En 2015, la production globale atteint 7,7 millions de tonnes (Almeida et al., 2018) et en 2019, plus de 8 millions de tonnes de BPA sont présents à travers le globe (Galloway et al., 2018). Le nom complet du BPA est 4,4'-isopropylidenediphénol ou encore 2,2bis(4hydroxyphényl)-propane. Le BPA fait partie de la famille des phénols et il est constitué de résidus hydroxyles qui sont fixés sur le noyau aromatique

(Michałowicz, 2014). Plusieurs directives, valeurs de suretés ont été émises pour réglementer ce composé. Par exemple, l'EFSA (Autorité européenne de sécurité des aliments) établit en 2006 une dose journalière admissible ; DJA = 0,05mg/kg qui est validée de nouveau en 2010. Une autre directive du 2011/8/UE a vu le jour afin d'interdire l'utilisation du BPA dans la fabrication des biberons. (Cladière, 2012). En France, la décision QPC n°2015-480 interdit l'utilisation du BPA dans tous les contenants alimentaires, cette interdiction n'est cependant pas encore d'actualité au niveau Européen. En 2018, une nouvelle directive (EU 2018/213) intervient limitant l'apport journalier à 4 µg/kg (Hahladakis et al., 2023).

Cette réglementation du BPA a vu le jour car c'est un composé que l'on sait être un perturbateur endocrinien. Il a en effet une similarité d'un point de vue de la structure chimique avec l'œstradiol estrogène-17-béta. Mais il a d'autres impacts sur la santé avec une hépatotoxicité, une neurotoxicité, une immunotoxicité et il est également mutagène ainsi que cancérigène (Michałowicz, 2014).

Cette molécule a un poids moléculaire de 228g/mol et à un log kow de 3,4, elle est donc hydrophile (Briand et al., 2018). La solubilité du BPA est de 300mg/l à 20°C ce qui démontre une solubilité moyenne (voir **tableaux 1 et 2** ; (Deshayes et al., 2016)).

Suite aux activités et aux émissions industrielles, le BPA est retrouvé dans tous les compartiments environnementaux comme l'atmosphère, le sol, l'eau, les sédiments. Des travaux ont montré son ubiquité dans l'atmosphère, cela à cause de sa capacité à être transporté dans l'air (Fu and Kawamura, 2010). Le BPA étant un composé dangereux pour la santé et présent partout dans l'environnement, il est primordial de connaître son devenir, c'est-à-dire sa durée de vie dans l'écosystème.

Les alkylphénols sont des composés également d'origines anthropiques. Contrairement au BPA, les alkylphénols représentent une famille de composé. On peut parler de la famille des alkylphénols polyéthoxylés (APnEO) qui est constituée principalement des nonylphénols polyéthoxylés (NPnEO) et minoritairement des octylphénols polyéthoxylés (OPnEO). Ces alkylphénols sont constitués d'un groupement phénolique et d'une chaîne alkyle qui sera plus ou moins longue. Ces composés sont utilisés comme agents mouillants et détergents dans de multiples secteurs d'activités comme l'agriculture, l'entretien du domaine public et l'industrie du textile. Ils permettent aussi la production de résines époxydes. La directive n° 2008/105/CE du 16 décembre 2008, annexe II, installe le 4-NP et le 4-t-OP sur la liste des polluants prioritaires. Ils ont ensuite été classés en tant que substances prioritaires dangereuses et leur présence dans le milieu aquatique doit être réduite au maximum. Des normes de qualité environnementale dans l'eau (NQE) du 4-NP et 4-t-OP ont été fixées. La concentration moyenne annuelle en 4-NP ne doit pas dépasser 300ng/L (Cladière, 2012).

Le poids moléculaire du NP est de 220 g/mol avec un log kow allant de 4,4 à 4,8. Le NP est une molécule amphiphile avec un côté de la molécule hydrophile et l'autre côté hydrophobe. Sa solubilité est de 5,4mg/L à 20°C faisant d'elle, une molécule légèrement soluble qui va également se retrouver principalement dans les sols (**voir tableaux 1 et 2** ; (Bergé et al., 2012a; Deshayes, 2016).

Les alkylphénols sont présents dans tous les compartiments environnementaux comme pour le BPA avec une présence dans l'atmosphère due aux trafics routier, l'incinération des déchets d'ordures ménagères, présence également dans les eaux de ruissellement due aux émissions par les matériaux de construction et par le trafic routier qui ensuite vont contaminer les eaux du milieu naturel. Les alkylphénols étant présents partout, les contaminations sont multiples et peuvent se faire par voie

alimentaire, respiratoire et cutanée (cosmétiques et détergents). Ce sont des perturbateurs endocriniens avec comme particularité d'avoir un effet qui est inversement proportionnel à la longueur de la chaîne éthoxylée (Ying et al., 2002). Ils sont aussi cancérigènes et mutagènes avec un risque neurotoxique (Bergé et al., 2012a; Deshayes, 2016).

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques d'un ensemble de polluants ainsi que leur occurrence et concentration dans les eaux de ruissellements ; a = (Deshayes et al., 2016) ; b = (Gasperi et al., 2014) ; c =

(Stachel et al., 2010) ; d = (Ahel and Giger, 1993a) ; e = (Bergé et al., 2012b) ; f = (Dachs et al., 1999) ; g = (Ahel and Giger, 1993b) ; i = (Sebastian, 2013) ; j = (Björklund et al., 2009a) ; k = (Bressy, 2010) ; l = Portail INERIS ; m = (Paijens et al., 2020) ; n = (Bollmann et al., 2014) ; o = (Paulus, 2005) ; p = (Lapworth, et al., 2005) ; q = (Wittmer et al., 2010) ; r = (Wick et al., 2010) ; t = (Zgheib et al., 2012) ; u = (Zgheib, 2009) ; v = (Dominique, 2000) ; w = (Bourceret et al., 2016) ; x = (Staples et al., 1997) ; y = (Bergé et al., 2013) ; z = (Wu et al., 2019) ; ai = (Gasperi et al., 2022) ; bi = (Wicke et al., 2021) ; * : concentration moyenne annuelle admissible du Centre Ecotox Suisse (µg/l) ; # : VGE (valeur guide environnementale)

Famille	Nom de la molécule	N° CAS	Formules	Masse molaire (g/mol) MW	Solubilité à 20°C (mg/l) WS	Hydrophobicité (Log Kow)	Occurrence (%) dans les eaux de ruissellement	Concentration dans eaux de ruissellement	NQE (µg/l)
Bisphénol	Bisphénol A (BPA)	80-05-7	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228,3	300 (a)	3,4 (a)	> 80 (a,b)	552ng/l (moy ; b) ; 513ng/l (med ; ai) ; 1400ng/l (med ; c) (a)	0,2 (240ng/l) (*,a)
Alkylphénol (AP)	4-Nonylphénol (NP)	84852-15-3	C ₁₅ H ₂₄ O	220,3	5,43(d,e)-5,40(a)	4,48(g,a) - 4,80(e)	Entre 57 (j) et 100(a,i)	470 ng/l (med ; k) ; 699ng/l (med ; ai) ; 780ng/l (med ; c)(a)	0,3 (330ng/l)(a)
	Nonylphénol monoéthoxylé (NP1EO)	27986-36-3	C ₁₇ H ₂₆ O ₂	281,4 (264 (e))	3,02 (d,a)	4,17 (g,a)	Entre 8 (j) et 100 (i)(a)	347ng/l (moy ; b,a) ; 125ng/l (med ; ai)	/
	Nonylphénol diéthoxylé (NP2EO)	27176-93-8	C ₁₉ H ₃₂ O ₃	308,5	3,38(d,a)-3,28(f)	4,21(g,a)	Entre 8 (j) et 100 (i)(a)	164ng/l (moy ; b,a)	/
	Nonylphénol monocarboxylé (NP1EC)	3115-49-9	C ₁₇ H ₂₆ O ₃	278	/	4,12 (e)	/	466ng/l (moy ; b,a)	/
	Nonylphénol dicarboxylé (NP2EC)		C ₁₉ H ₃₀ O ₄	322	/	/	/	/	/
	4-tert-Octylphénol (OP)	140-66-9	C ₁₄ H ₂₂ O	206,3	12,6(d,a)	4,1(g,a)	79(a) et 100(k)(a)	110ng/l (med ; t) ; 197ng/l (med ; ai) ; 320ng/l (med ; c)(a)	0,1 (100ng/l)(a)
	Octylphénol monoéthoxylé (OP1EO)	2315-67-3	C ₁₇ H ₂₆ O ₃	250	8,0(d,a)	4,1(g,a)	50 à 100(b,a)	23ng/l (moy ; b,a)	/
	Octylphénol diéthoxylé (OP2EO)	2315-61-9	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294	13,2(d,a)	4,0(g,a)	63(a) et 100(i)(a)	10ng/l (moy ; b,a)	/

Biocide	Triclosan	3380-34-5	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂	289,5	12 (i)	4,8 (i)	/	/	0,05 (#,i)
	Diuron	330-54-1	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O	233,1	102 (m,n)	2,71(o) - 2,85 (m,p,q,r)	36(a) à 100(t,a)	0,37µg/l (med ; t) ; 0,03 -0,26µg/l (moy ; a) ; 0,076µg/l (moy ; bi)	0,2 (a,u)
	Atrazine	1912-24-9	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215,69	30 (i)	2,68 (p) ; 2,33-2,71 (v)	55(a) à 100(i,a)	0,002µg/l (med ; i,a)	0,6 (a,u)
	Mécoprop (MCP)	16484-77-8	C ₁₀ H ₁₁ ClO ₃	214,6	471 (m,n)	(-0,19-0,1(m,r,q)	33(i) à 50(b, a)	0,003µg/l (moy ; b,a)	3,6 (*,a)
	Terbutryne	886-50-0	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S	241,4	42 (m,n)	3,65(m,q,r)	20(b) à 100(a)	0,01µg/l (moy ; a) ; 0,051µg/l (moy ; bi)	0,065 (a)
	Carbendazime	10605-21-7	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	191,2	1,55 (m,n)	1,51(m,r)	43(a) à 100(i,a)	0,213µg/l (moy ; b) ; 0,02µg/l (moy ; a)	0,34 (*,a) 0,1 (#)
Hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP)	Naphtalène (Nap)	91-20-3	C ₁₀ H ₈	128.2	31 (w)	3,4 (w)	100(u)	131ng/l (med ; u) ; 34ng/l (med ; ai)	2,4 (u)
	Anthracène (Ant)	120-12-7	C ₁₄ H ₁₀	178.2	0,05 (w)	4,5 (w)	100(u)	43ng/l (med ; u) ; 45ng/l (med ; ai)	0,1 (u)
	Fluoranthène (Fluo)	206-44-0	C ₁₆ H ₁₀	202.3	0,26(w)	5,2(w)	100 (u)	384ng/l (med ; u) ; 302ng/l (med ; ai)	/
	Pyrène (Pyr)	129-00-0	C ₁₆ H ₁₀	202.3	0,13(w)	5,18(z) – 5,2 (w)	100 (u)	339ng/l (med ; u)	/
Phtalate (PAE)	Di (2-éthylhexyl)phtalate (DEHP)	117-81-7	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390,6	3,0.10 ⁻³ (x,y)	7,5(x,y)	Entre 23 et 100(a)	22µg/l (med ; t) ; 8,6µg/l (med ; c)	1,3(a,i)
	Phtalate de dibutyle (DnBP ou DBP)	84-74-2	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278,4	1,1.10 ¹ (x,y)	4,57(x,y)	/	1,3µg/l (med ; ai)	/

II. Ouvrages de gestion des eaux pluviales

A. Mise en place des ouvrages

Les MP vont donc se retrouver dans plusieurs compartiments (eau, sol, air) aussi bien dans les milieux ruraux que urbains. Ayant des impacts toxiques sur la santé, il est nécessaire de diminuer leur quantité le plus possible. Cela se fait en amont en limitant leur utilisation, ou même en les interdisant. Cependant, il n'est pas possible d'empêcher complètement le rejet des MP dans l'environnement. C'est pourquoi, il faut agir en aval en limitant au maximum leurs propagation. Cette thèse va se concentrer sur la limitation de la propagation des MP via les eaux pluviales en milieu urbain.

Dans un milieu naturel, les eaux de pluie vont en majeure partie s'infiltrer dans le sol, seule une faible fraction de la pluviométrie annuelle (environ 10%) générant du ruissellement de surface. L'eau infiltrée va en partie être stockée puis évapotranspirée, et pour le reste s'écouler en profondeur allant jusqu'à la nappe phréatique ou en subsurface pour rejoindre un cours d'eau. L'urbanisation induit une forte augmentation des surfaces imperméables qui vont empêcher l'infiltration de l'eau dans le sol. Cela va altérer le cycle naturel de l'eau car ça entraîne un déficit d'alimentation en eau du sol et des nappes phréatiques. L'autre aspect de cette imperméabilisation des surfaces urbaines c'est l'augmentation du volume de ruissellement à gérer, en effet, dans une ville le ruissellement des eaux pluviales est de 55% au lieu des 10% en milieu naturel (<https://www.sage-garonne.fr/thematiques/eau-et-amenagement/>, (Lyon, 2008)). Le modèle historique de la gestion des eaux pluviales est basé sur la collecte et l'évacuation de l'eau le plus vite et le plus loin possible. Ce modèle présente aujourd'hui ses limites car il y a une surcharge des réseaux avec des phénomènes d'inondations et de surverses unitaires mais aussi un lessivage des surfaces urbaines par les eaux pluviales à l'origine d'une pollution diffuse des milieux aquatiques.

A notre époque où les problématiques environnementales sont très importantes, la réduction des flux polluants associés à ces eaux pluviales est un enjeu majeur. Mais dépolluer ces eaux pluviales une fois qu'elles sont envoyées au loin et chargées en micropolluants est contre-productif. Il faut en effet pouvoir traiter ces eaux avant qu'elles ne ruissellent sur de longues distances en ville donc le plus en amont possible de leur point de chute. C'est pourquoi, des structures alternatives basées sur le principe de l'infiltration ou de la rétention des eaux pluviales à la source ont vu le jour. Ce sont des structures qui sont fondées sur la nature c'est-à-dire qui vont restaurer le fonctionnement hydrologique naturel au sein des villes et cela permet également de pouvoir maîtriser le flux des polluants (Bressy, 2010; Chocat, 2008; Chouli, 2006; Sage, 2016; Sauve et al., 2014; Weiss et al., 2008)

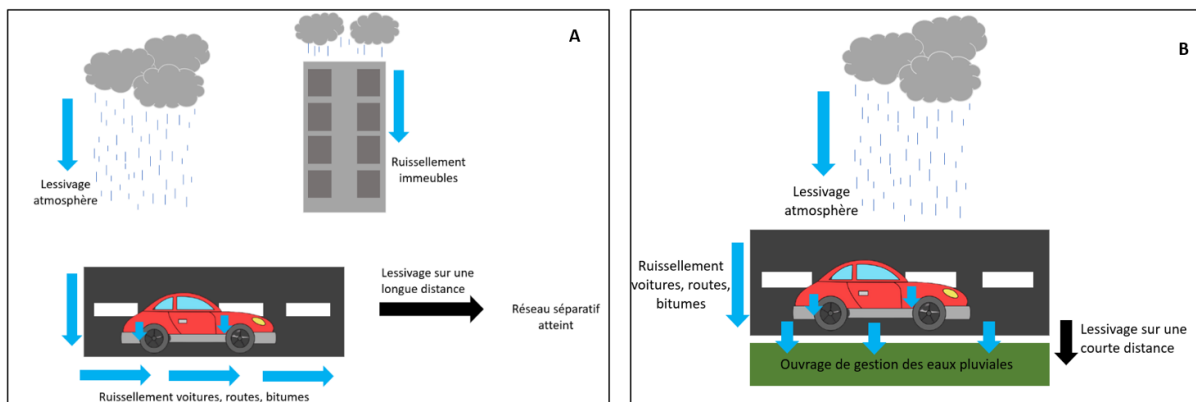


Figure 1 : schéma représentant le cheminement des eaux pluviales en milieu urbain

Sur le **schéma 1A de la figure 1**, l'eau de pluie va d'une part lessiver l'atmosphère puis ruisseler sur les immeubles entraînant toutes les particules en même temps. Ensuite, une fois que l'eau de pluie arrive au sol dans un parcours traditionnel, le lessivage va continuer le long des routes, des trottoirs entraînant cette fois-ci les particules que vont libérer les voitures. Et après un lessivage des surfaces imperméables des villes, ces eaux de pluies fortement chargées en MP vont rejoindre le réseau séparatif pour ensuite être acheminées au loin.

Sur le **schéma 1B**, le lessivage de l'atmosphère a toujours lieu ainsi que le ruissellement sur les routes et les voitures. Ce qui va changer c'est la surcontamination des eaux pluviales durant le transport en réseau qui va être réduite. La gestion à la source va permettre une réduction du volume de ruissellement grâce aux ouvrages d'infiltration et d'évapotranspiration, tout en favorisant dans ces ouvrages des processus naturels de filtration, d'adsorption et de biodégradation.

B. La diversité des ouvrages existants

Quand on parle de ces structures alternatives, on va parler d'ouvrages de gestion des eaux pluviales. Il en existe plusieurs catégories qui seront utilisées en fonction de l'objectif recherché, de la morphologie et de la composition du terrain. Il est possible de classer ces ouvrages en se basant sur plusieurs critères comme le lieu d'utilisation, le type d'ouvrage, le type d'alimentation ou encore le type de vidange (Bressy, 2010; McFarland et al., 2019). Dans ce rapport, la séparation se fera sur le principe des systèmes de rétention (Vijayaraghavan et al., 2021) et d'infiltration :

- Les structures de rétention sont de deux types :
 - Des dispositifs de collecte et stockage à destination d'utilisation de l'eau (dans le bâtiment ou pour l'arrosage) qui ne sont pas vidangés immédiatement après l'événement pluvieux.
 - Des dispositifs de stockage/restitution qui permettent un stockage temporaire de l'eau pendant l'événement pluvieux et sa restitution au réseau à débit régulé



Figure 2 : exemples de structures d'infiltration végétalisées (Sauve et al., 2014; Tedoldi, 2017b)

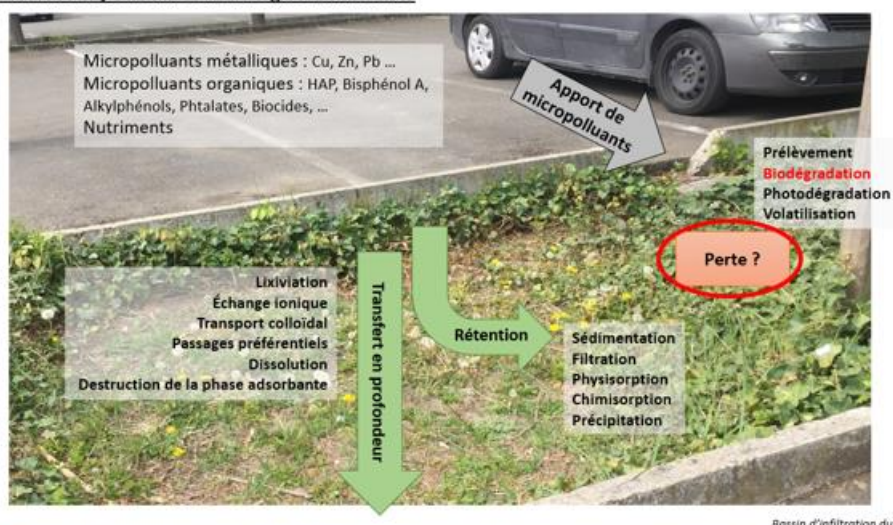
- Les structures d'infiltration sont souvent végétalisées avec par exemple des noues d'infiltration, des fossés, des bassins ou encore des jardins de pluies, bien que des dispositifs non végétalisés tels que les tranchées, puis d'infiltration, chaussées réservoir exfiltrantes existent également (Chocat, 2008; Sauve et al., 2014)
 - Noues : dans les noues, les eaux pluviales sont collectées après ruissellement sur les surfaces et elles vont être évacuées par infiltration dans le sol ou à débit régulé vers un exutoire qui peut être divers comme un réseau de collecte, un bassin de rétention ou encore une rivière.

- Tranchées : deux types possibles de tranchées, une tranchée drainante donc qui est constituée d'un drain qui va permettre l'évacuation des eaux pluviales vers un exutoire et une tranchée infiltrante qui permet donc d'évacuer directement les eaux pluviales dans le sol par infiltration
- Bassins : les eaux pluviales sont collectées grâce à une canalisation ou directement après ruissellement sur les surfaces, elles vont ensuite être évacuées soit par infiltration au niveau d'une zone spécialement construite à cet effet ou soit vers un exutoire qui peut être un réseau de collecte ou une rivière

Après l'introduction de ces structures, une nouvelle problématique a vu le jour concernant les micropolluants. Ces ouvrages permettent bien de récupérer les eaux pluviales le plus en amont possible et permettent d'éviter la propagation des pollutions ainsi que de dépolluer ces eaux grâce au sol qui fait office de système filtrant. Mais, le sol va retenir les micropolluants dont le devenir dans le temps entre accumulation et dégradation reste à comprendre (Mikkelsen et al., 1997)

C. L'état des connaissances sur ces ouvrages et le devenir des micropolluants

Processus en jeu dans les ouvrages d'infiltration



Bassin d'infiltration du Sausset

Figure 3 : schéma représentant les processus mis en jeu dans des ouvrages d'infiltration

La **Figure 3** illustre le cas d'un ouvrage d'infiltration à la source du ruissellement, alimenté par ruissellement direct depuis une surface de parking. Les eaux pluviales vont s'écouler le long du bitume pour ensuite atteindre l'ouverture de l'ouvrage puis s'infiltrer dans le sol. Il va donc avoir un apport en MP dans le sol de l'ouvrage que ce soit des MP métalliques ou organiques. A ce niveau-là, il y aura deux catégories de processus qui interviendront : des processus physico-chimiques et des processus biologiques (Bhatt et al., 2022; Pereira, 2017).

Pour les processus physico-chimiques, cela concerne la rétention des MP dans les couches supérieures du sol, c'est-à-dire dans les premiers centimètres : rétention des micropolluants particuliers par filtration, rétention des micropolluants dissous par sorption, par précipitation, etc. Il reste ensuite une fraction des MP non retenue dû fait du transport colloïdal, de la complexation avec la MOD, de la lixiviation qui va aboutir à un transfert en profondeur. Ces processus ont beaucoup été documentés avec les travaux de

(Blecken et al., 2009; Flanagan, 2019; Napier et al., 2009; Runes et al., 2003; Singh et al., 2014; Tedoldi, 2016; Zhang et al., 2008), etc. Par exemple, dans les travaux de DiBlasi et al. (2009) et David et al. (2015), on peut voir les efficacités épuratoires des sols de ces ouvrages. Avec les résultats de DiBlasi et al. (2009), les structures étudiées montrent une moyenne de rétention à 90% des HAP. Pour David et al. (2015), une réduction de 82% des PCB et de 97% des HAP sont observées dans les eaux pluviales après passage dans une structure de biorétention.

Pour finir sur cette partie, l'écoulement, la distribution spatiale des MP, doit être considérées de deux façons. D'une part, il y a la distribution horizontale : forte concentration au point d'entrée puis diminution en s'éloignant de ce dernier. La distribution verticale s'observe avec le transfert en profondeur (concentration qui diminue en s'enfonçant).

Les travaux de Dechesne et al. (2004), Tedoldi et al. (2017) ainsi que Rommel et al. (2019) illustrent bien cette distribution spatiale (**Figure 4**). Pour Dechesne, l'objectif était d'étudier la distribution spatiale de polluants dans un bassin d'infiltration. Pour cela, des échantillons de sol à plusieurs endroits (10 points) et à plusieurs profondeurs ont été récoltés : surface, 30-40cm, 60-70cm et 100-110cm. Les micropolluants étudiés sont les métaux (plomb, zinc), les hydrocarbures (et les nutriments). Sur les graphiques ci-dessous, il est possible de voir les concentrations des micropolluants métalliques (plomb et zinc) et organiques (THC) en fonction des points d'échantillonnages horizontalement et verticalement. Les concentrations ne sont pas les mêmes à la surface en fonction des 10 points puis les concentrations vont se rejoindre en profondeur pour les 10 points pour atteindre une concentration proche de zéro, phénomène que l'on voit pour les 3 micropolluants étudiés.

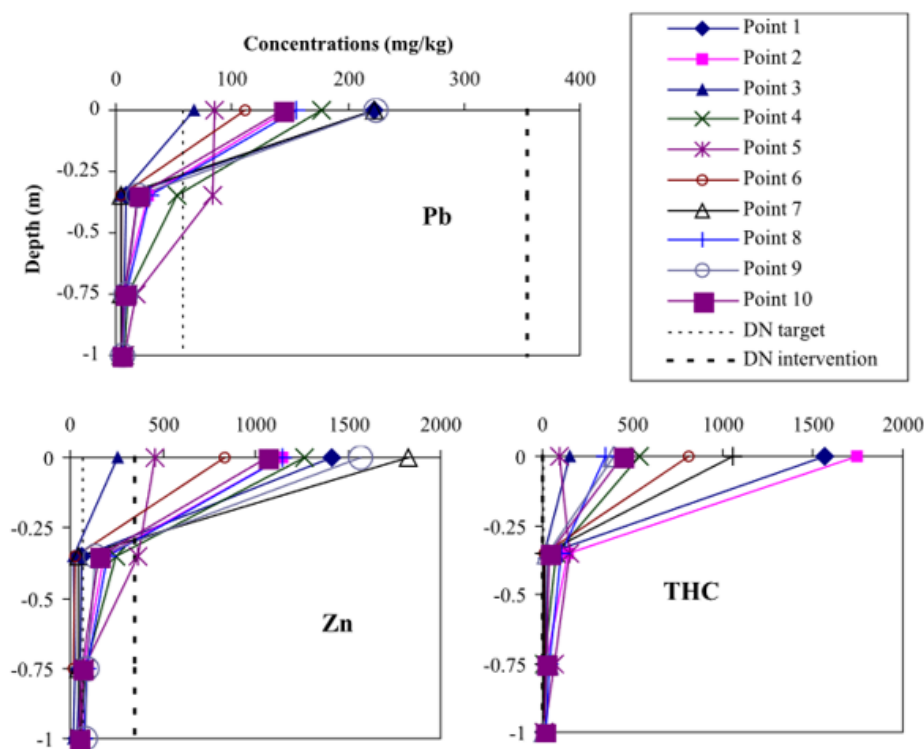


Figure 4 : profils de concentration de plomb, de zinc et d'hydrocarbures totaux

Pour Rommel, l'objectif est d'étudier la distribution spatiale du zinc dans une noue végétalisée recevant les eaux de pluies des toitures (couverture en zinc). Quatre noues sont positionnées aux quatre coins du toit étudié (**Figure 5A**).

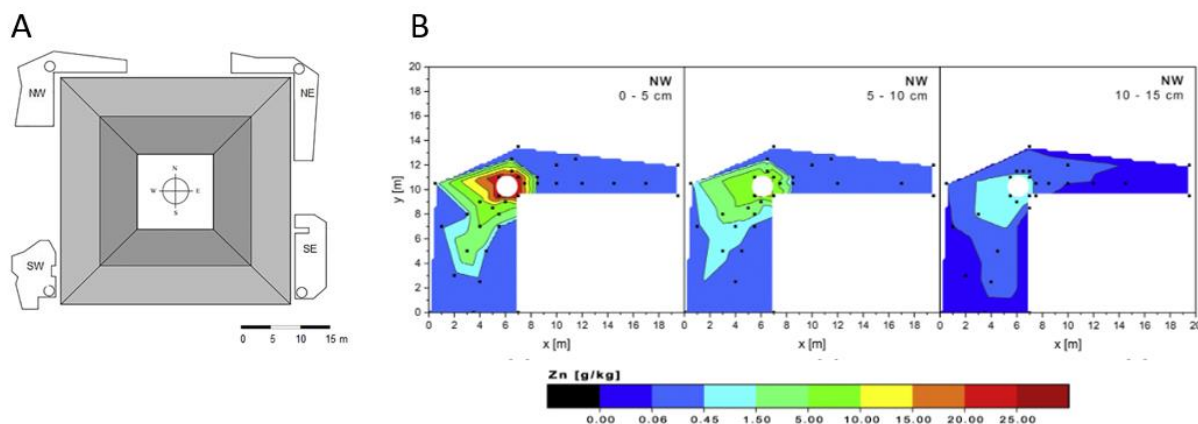


Figure 5 : schéma des noues étudiées (Rommel et al., 2019)

A : plan de la dispositions des noues

B : distribution horizontale et verticale du Zn dans le sol des différentes noues d'infiltration NW et NE

Pour la noue située au NW, on voit une concentration importante du zinc juste au niveau du point de chute des eaux pluviales pour ensuite diffuser sur les côtés avec des concentrations beaucoup plus faibles (graphique de droite, 1^{er} carré : 0-5cm de profondeur). Ensuite, si on regarde le devenir du zinc en fonction des différentes profondeurs étudiées, on voit une nette diminution de la concentration en zinc en relation avec la profondeur (**Figure 5B**).

Le niveau de contamination du sol est donc fortement dépendant de l'endroit où l'échantillon est prélevé et notamment de la distance du point de prélèvement par rapport au point d'arrivée d'eau – et de la profondeur. Différents travaux Tedoldi et al. (2017) et (2016) ont montré que les micropolluants ont tendance à s'accumuler dans les premières couches du sol. Il est donc important de bien prendre en compte la position d'échantillonnage aussi bien verticale qu'horizontale.

Des processus biologiques de biodégradations des MP organiques peuvent également avoir lieu, sous l'action des organismes vivants dans le sol de ces ouvrages qui sont la faune, la flore et les microorganismes (Bashir et al., 2022). Si la faune et la flore ne sont pas décrits comme étant les acteurs les plus efficaces pour faire directement la biodégradation des MP organiques (Eapen et al., 2007). Ils sont considérés comme pouvant influencer les communautés microbiennes présentes dans les sols et agir de ce fait de façon indirecte sur la stimulation de biodégradation microbienne des MP organiques. Bien qu'il ne fasse aucun doute que cette biodégradation microbienne soit importante dans les sols, rare sont les travaux qui se sont intéressés à cet aspect dans les sols des ouvrages de gestion des eaux pluviales.

Voici un exemple de travaux que l'on peut trouver sur l'influence des plantes dans la biodégradation des MP organiques dans le sol des ouvrages de gestion des eaux pluviales urbaines (Leroy et al., 2015) :

Dans ces travaux, des mésocosmes extérieurs à grande échelle ont été mis en place pour simuler le fonctionnement des noues en bord de route afin d'étudier la dissipation des HAP en présence de plantes. Quatre mésocosmes ont été construits et co-contaminés avec des métaux (Cd : 2, Pb : 100 et Zn : 300mg/kg) et des HAP (Phen, Pyr, BaP 10mg/kg), avec à côté les témoins à chaque fois. Trois types de

plantes ont été testés pour augmenter la biorémédiation des HAP qui sont *Juncus effusus*, *Iris pseudacorus*, *Phalaris arundinacea* ainsi qu'un mélange d'herbes, un type de plante par mésocosme. Les différents paramètres étudiés sont représentés sur la **figure 6** ci-dessous.

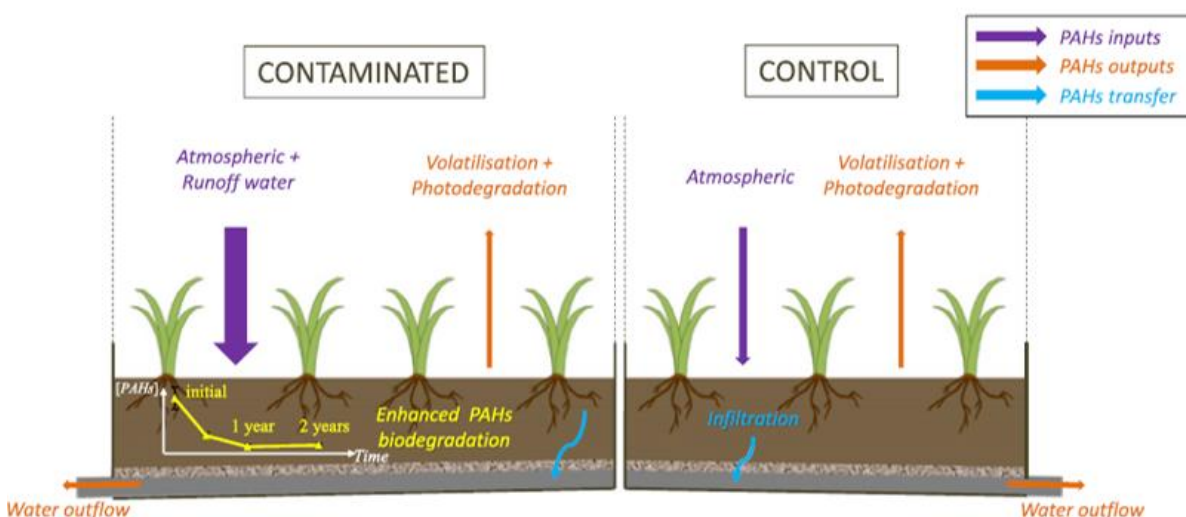


Figure 6 : schéma des mésocosmes étudiés dans les travaux de Leroy et al., 2015

Les résultats ont montré que seulement 0,07 à 0,22% du total des HAP ont été libérés en sortie d'eau après un an. Deux ans après la contamination du sol, les analyses de sol ont montré une dissipation de 99,6% du phénanthrène et 99,4% du pyrène. Pour le benzo[a]pyrène, des variations entre 75,5 et 91% de dissipation sont possibles en fonction du type de plantes. Le mélange d'herbes permet de faciliter la biodégradation du benzo[a]pyrène sur le long terme. La contribution potentielle des processus de photodégradation ainsi que de volatilisation sur la dissipation des HAP a également été évaluée et les auteurs ont conclu que ces processus étaient minimes et ne pouvaient expliquer les fortes dissipations des HAP. La séquestration des HAP par les plantes ne pouvant pas non plus expliquer leurs fortes dissipations, l'hypothèse de la biodégradation microbienne est retenue.

Au final, beaucoup d'études ont été menées sur les phénomènes de rétention des MP dans les sols des ouvrages mais la réflexion s'arrête là. Une fois les MP retenus par le sol, le devenir de ces MP est peu étudié. Des travaux sur l'étude des plantes ou de la photodégradation dans les ouvrages sont disponibles avec les articles de (Armeni, 2010; Hensen et al., 2018; Jalali and Rabotyagov, 2020; Payne et al., 2018, 2014).

Les études portant sur la biodégradation, principalement microbienne sont moins disponibles dans la littérature. Pourtant la biodégradation microbienne explique l'essentiel du devenir des micropolluants dans les sols et probablement dans les sols d'ouvrages. C'est pourquoi la partie suivante sera concentrée sur les travaux qui traitent de l'étude des microorganismes au sein des ouvrages de gestion des eaux pluviales et de leur rôle dans la biodégradation des micropolluants organiques

III. Etat des connaissances sur la biodégradation microbienne dans les sols pollués par les micropolluants

A. Introduction à la microbiologie et aux méthodologies d'étude

Les ouvrages de gestion des eaux pluviales sont basés sur la filtration de l'eau par les éléments du sol pour retenir les polluants et éviter leurs propagations. Cependant un sol n'est pas juste un substrat fixe et immuable. Un sol a une structure, une composition qui peut varier avec le temps et sous l'effet des conditions environnementales. Il contient des organismes vivants qui vont interagir entre eux et avec

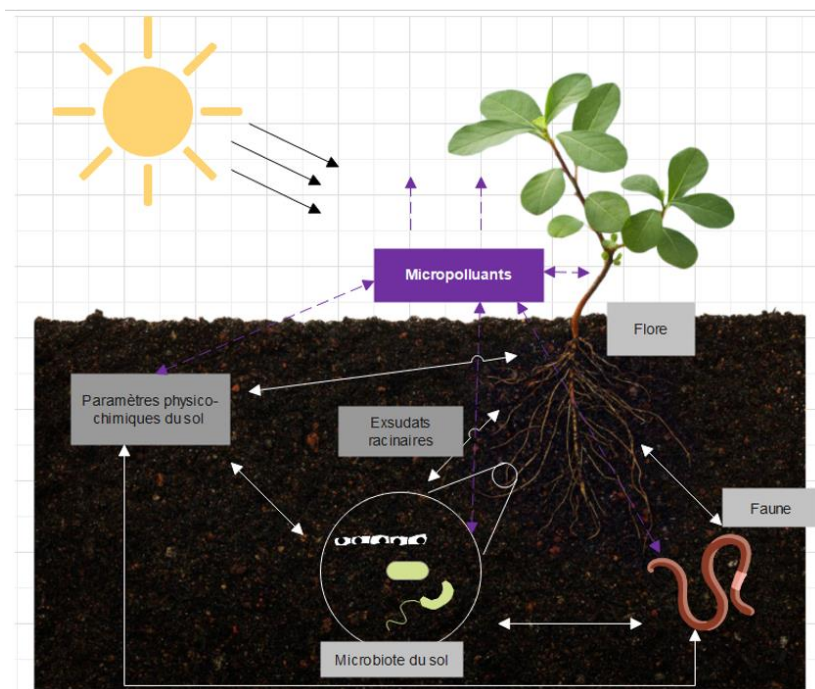


Figure 7 : schéma représentant les différentes interactions dans un sol : en gris, les interactions habituelles et en violet, les nouvelles interactions en présence des micropolluants.
(<https://app.biorender.com/>)

le sol impactant également sa composition et ses propriétés (Fujii, 2014) comme il est possible de le voir sur la **figure 7**. Des interactions se font continuellement entre les différents composants du sol. En présence des micropolluants, des nouvelles interactions vont avoir lieu qui pourront ensuite modifier indirectement le reste des interactions du sol. Afin de comprendre le devenir des micropolluants dans les ouvrages, il est nécessaire de prendre ces différents composants en compte, surtout que ces organismes susceptibles de biodégrader et bioaccumuler ces micropolluants. Il est donc important de comprendre leur rôle dans ce vaste système que sont les ouvrages de gestion des eaux pluviales. Dans notre rapport, l'accent est d'abord mis en avant sur les microorganismes et leur capacité de biodégradation suivi d'une description des paramètres influençant cette biodégradation (Berg and Smalla, 2009) qui pourront moduler cette biodégradation. Notre rapport se poursuit par un état des connaissances sur les communautés microbiennes des sols des ouvrages de gestion des eaux pluviales.

1. Présentation des microorganismes

Les microorganismes sont ubiquitaires dans l'environnement, c'est-à-dire que l'on va les retrouver partout sur la terre et quel que soit l'écosystème. Ils peuvent être dans les sols, dans les milieux forestiers, les milieux arides, dans les lacs acides ou encore au niveau des geysers sous-marins. Leur existence dans l'atmosphère est soupçonnée depuis le XVIIIème siècle avec Antonie van Leeuwenhoek (Gregory, 1971).

On retrouve dans les microorganismes les bactéries, les archaebactéries qui font parties des procaryotes (organisme unicellulaire), les virus, ainsi que des eucaryotes qui regroupent les champignons, les protistes, les algues. En plus d'être ubiquistes dans l'environnement, ce sont également les organismes les plus abondants sur la planète, on va retrouver environ 10^9 bactéries par g de sol (Ranjard and Richaume, 2001).

Leur présence et leur abondance sont égales à leur rôle primordial dans l'environnement. Ils sont en effet essentiels dans le fonctionnement des écosystèmes. Ils vont intervenir dans les cycles biogéochimiques tel que le cycle de l'azote, du carbone, du soufre etc. Ils vont aussi participer au recyclage de la matière organique où qu'elle soit.

Vu leur nombre, il est normal de considérer plusieurs types d'interactions possibles entre eux mais aussi avec les autres organismes vivants comme les plantes, les animaux et les hommes (Moënné-Loccoz et al., 2015).

- Les relations positives : il y a la coopération et la symbiose, ce sont des interactions avec des effets bénéfiques pour les deux partenaires (l'une est facultative tandis que l'autre est obligatoire). Le commensalisme existe aussi, l'effet positif ne se fait dans ce cas ressentir que par un seul des partenaires.
- Les relations négatives : la compétition, le parasitisme, la prédation et l'amensalisme, ce sont donc des interactions avec des effets négatifs. La compétition intervient lorsque la même ressource, ou le même milieu est utilisé par deux espèces. L'effet négatif se fait ressentir par les deux partenaires, tandis que pour l'amensalisme, l'effet négatif n'est ressenti que par un seul des partenaires et intervient plutôt dans des situations indirectes (modification du milieu de vie par une espèce qui impacte une autre espèce sans que ce soit le but recherché). La prédation, c'est le prédateur qui chasse sa proie donc impact négatif sur un seul partenaire. Et pour finir, le parasitisme, interaction négative sur la durée pour un des partenaires.

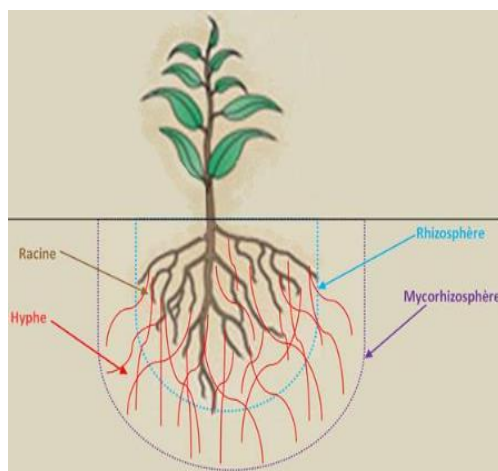


Figure 8 : représentation schématique de la rhizosphère

Les microorganismes peuvent avoir des effets néfastes, on parle par exemple de microorganismes pathogènes quand ils sont responsables de maladies (phytopathogènes quand ça concerne les plantes) et d'autres bénéfiques. Au cours du temps, les microorganismes ont évolué aux côtés de leurs partenaires appartenant aux autres groupes d'organismes comme les plantes. Cette évolution commune a permis la

mise en place d'une interaction complexe entre eux, une véritable communication entre ces deux partenaires. L'interaction entre les plantes et les microorganismes peut se faire au niveau des feuilles mais ce n'est pas le lieu le plus optimal pour se faire, en effet les feuilles sont soumises aux aléas de l'environnement (vent, pluie, ...) et il y a peu de ressources. Le principal lieu d'interaction se trouve au niveau des racines des plantes dans le sol. Cette zone spéciale s'appelle la rhizosphère (**Figure 8**), c'est le lieu de contact direct entre les racines et le sol (Badri and Vivanco, 2009; Berg and Smalla, 2009).

Les plantes vont à ce niveau faire une rhizodéposition de substrats, de molécules, etc qui vont sélectionner les microorganismes les plus bénéfiques pour elles et les microorganismes vont de même interagir avec les plantes pour promouvoir leur croissance avec la production de molécules telles que les auxines par exemple (Spaepen et al., 2007), ou encore les protéger des phytopathogènes. On peut retrouver des microorganismes types qui font ces interactions qui sont surnommés des PGPR (plant-growth-promoting-rhizobacteria) (Badri and Vivanco, 2009; Singh et al., 2020) tel que *Azospirillum*, *Azotobacter*.

Les interactions peuvent aussi avoir lieu avec la faune du sol, par exemple avec les nématodes. Kersanté et al. (2006) ont étudié le rôle des vers de terre dans la stimulation ou l'inhibition de la minéralisation de l'Atrazine (herbicide). Pour cela, ils ont mis en place des microcosmes contenant du sol de culture de maïs avec et sans vers de terre, avec et sans *Pseudomonas* sp. ADP (une souche dégradant l'atrazine), avec et sans atrazine. Des analyses sur l'activité de dégradation de l'atrazine, sur l'abondance des séquences de *atzA*, *B* et *C* (enzymes qui interviennent dans la voie de dégradation de l'atrazine) et sur le changement de la structure microbienne sont faites. Ils obtiennent comme résultats une diminution de la minéralisation de l'atrazine, une modification de la communauté microbienne et une diminution de *Pseudomonas* en présence des vers de terre. On observe donc ici un exemple de régulation négative des communautés microbiennes par les vers de terre mais d'autres travaux sur le sujet existent relativisant ces résultats : des travaux ont montré également une réduction de la minéralisation de l'atrazine (Binet et al., 2006; Farenhorst et al., 2000) et d'autres une augmentation (Meharg, 1996). Mais ce qui est sûr c'est que les vers de terre peuvent influencer les communautés microbiennes du sol en affectant la structure du sol, en redistribuant la matière organique dans le sol et en augmentant l'apport de C et N disponible à partir des déchets métaboliques tels que l'urine, le mucus et les tissus.

En plus de ces interactions qui vont entraîner une modulation des communautés microbiennes, il faut aussi prendre en compte les paramètres physico-chimiques environnementaux qui vont également influencer les microorganismes. Les paramètres environnementaux vont induire des pressions de sélection, ce qui va façonner les communautés microbiennes de l'écosystème, et dans des milieux perturbés ; cela peut permettre la sélection des communautés qui vont pouvoir prospérer face au contaminant. Les paramètres environnementaux sont le pH, la température, la structure du sol et sa composition, les plantes et même la faune présente (Berg and Smalla, 2009).

Janssen. (2006) a recensé les phylums bactériens dominants dans les sols provenant de différents pays. Les phyla bactériens dominants sont les *Proteobacteria* (avec les classes Alpha-, Beta-, Gamma-, Delta-, Epsilon-) les *Acidobacteria*, les *Actinobacteria* (*Acidimicrobiales*, *Actinobacteriales*, *Rubrobacteriales*), les *Verrucomicrobia* (*Verrucomicrobiales*, *Spartobactéries*,...), les *Bacteroidetes* (*Flavobactéries*, *Sphingobactéries*), les *Chloroflexi*, les *Planctomycetes*, les *Gemmatimonadetes* (*Gemmatimonas*) et les *Firmicutes* (*Bacilles*, *Clostridia*). Pour les phylum fongiques, *Ascomycota* et *Basidiomycota* (Buée et al., 2009; Klaubauf et al., 2010) dominent dans les sols. Les proportions de ces phylums bactériens et

fongiques vont cependant dépendre de différents paramètres tels que les propriétés physico-chimiques du sol et les conditions environnementales.

Différences entre analyses de différent pays :

Mackelprang et al. (2018) ont étudié la différence de la structure et de la communauté microbienne entre un sol cultivé (depuis plus de 50 ans) et un sol de prairie (jamais cultivé) aux États-Unis pour pouvoir comprendre les impacts agricoles sur les communautés microbiennes sur le long terme. Pour cela une analyse génétique basée sur le séquençage du gène de l'ARN16S est faite ainsi que l'analyse des lipides pour déterminer la biomasse microbienne. La biomasse microbienne dans les échantillons de prairie était deux fois plus importante que dans les échantillons cultivés cependant la diversité des alphas était plus importante dans les sols cultivés (ce qui correspond à d'autres travaux (Barber et al., 2017)). Les familles les plus abondantes dans le sol cultivé sont les *Nitrosomonadaceae*, *Nitrospiraceae*, trois familles inconnues de *Gemmatimonadetes* et deux familles inconnues de *Anaerolineae*. Pour le sol de prairie, les familles les plus abondantes sont *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Mycobacteriaceae* et *Ktedonobacteraceae*. Ceci montre un changement structural de la communauté microbienne suite à des pratiques culturales sur du long terme, les *Nitrosomonadaceae* et *Nitrospiraceae* étant impliqués dans la nitrification (augmentation de la nitrification suite aux ajouts de fertilisants nitrogènes) et les *Rhizobiaceae* étant impliqués dans les rhizosphères.

D'autres travaux comme ceux de Tripathi et al. (2019) montrent des changements au sein des communautés microbiennes, cette fois avec la prise en compte de la profondeur du sol. Une analyse biomoléculaire sur le gène de l'ARN16S et avec du pyroséquençage est réalisée. Les phylums les plus importants détectés dans tous les échantillons sont les *Actinobacteria* (~24%) suivis ensuite des *Proteobacteria* (avec les classes Alpha-, Beta-, Gamma-, et Delta) et après les *Acidobacteria*, *Firmicutes*, *AD3*, *TM7*, *Bacteroidetes*, *Caldiserica*, *Verrucomicrobia*, *OD1*, *Chloroflexi*, *Planctomycetes* et les *Cyanobacteria*. Cependant, il est observé des modifications significatives dans ces abondances entre les différents horizons du sol. Dans l'horizon du sol supérieur, ce sont les *Proteobacteria* (Alpha- et Gamma-classes), *Acidobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Planctomycetes*, et les *Cyanobacteria* qui sont les plus abondants, tandis que l'horizon en-dessous est dominé par *Betaproteobacteria*, *Firmicutes*, *AD3*, *Bacteroidetes*, *Caldiserica*, *OD1*, et les *Chloroflexi*. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux comme (Deng et al., 2015) avec comme explication la biodisponibilité des sources de carbone et d'azote plus importante dans la couche supérieure du sol car zone principale des exsudats racinaires.

Les travaux de Tripathi et al. (2017) montrent également les changements des communautés microbiennes dans le sol en fonction des conditions environnementales, c'est-à-dire des paramètres exogènes au sol, avec les précipitations. Ils comparent les microorganismes des sols en fonction de conditions climatiques en Israël : des zones arides, semi-arides, méditerranéenne et humide méditerranéenne en faisant un séquençage métagénomique Shotgun (séquençage par Illumina de l'ensemble de l'ADN extrait provenant du sol puis nettoyage des séquences avec MG-RAST et identification des séquences avec BLASTx). Ils obtiennent 97,5% de séquences de bactéries et 1,3% de séquences eucaryotes et 1,1% d'archées. Parmi les bactéries, les *protéobactéries* étaient les plus abondantes dans tous les sites en moyenne à 38,8%, suivis par *Actinobacteria* (25.7%), *Bacteroidetes* (6.5%), *Firmicutes* (5.6%) et enfin avec *Acidobacteria* (4.0%), *Verrucomicrobia* (3.5%), *Chloroflexi* (3.9%), *Planctomycetes* (3.2%), *Cyanobacteria* (3.1%), and *Gemmatimonadetes* (1.7%).

Ensuite en comparant les sites entre eux, ils observent qu'il y a peu de différences dans la diversité des bactéries mais qu'il y a des différences significatives dans les fonctions microbiennes trouvées. Sur la **figure 9**, on voit les abondances microbiennes pour chaque phylum en fonction des sites avec des différences qui ne sont pas significatives ($P = 0,62$). Sur la **figure 10**, c'est la diversité fonctionnelle qui est observée où l'on aperçoit des différences significatives, les sites semi-arides et méditerranéens humides présentant significativement plus de fonctions que les sites arides et méditerranéens ($P < 0,05$).

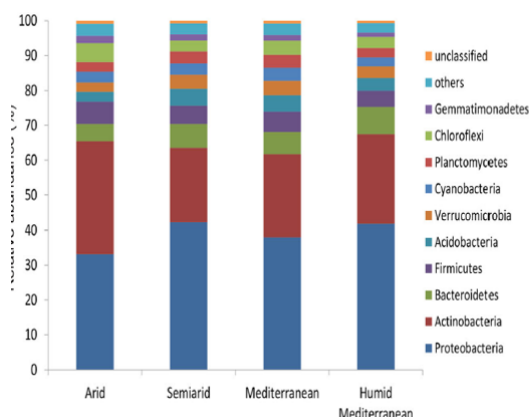


Figure 9 : abondance relative des phyla bactériens dominants observés dans les données de séquences métagénomiques Shotgun le long du gradient de précipitations

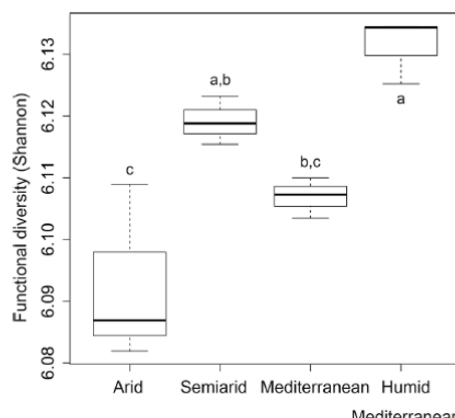


Figure 10 : Diversité fonctionnelle (indice de Shannon) du microbiome du sol le long du gradient de précipitations. Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les groupes au niveau significatif de $P < (A-SA : P = 0,02, A-HM : P = 0,002, \text{ et } M-HM : P = 0,02)$.

2. Possibilités d'utilisation des microorganismes

Les microorganismes ont beaucoup d'actions naturelles au sein de l'environnement mais au cours des années, ils ont été étudiés afin de pouvoir être utilisés par l'homme. Plusieurs domaines d'utilisation sont ciblés comme les industries, la santé, l'agriculture et récemment le domaine du développement durable (Datta et al., 2020). Les microorganismes ont des fonctions tellement variées qu'ils peuvent être utilisés dans tous ces domaines. Il suffit juste d'identifier la fonction d'intérêt et l'espèce associée pour ensuite les travailler en laboratoire pour optimiser leur utilisation. Par exemple dans les biotechnologies, ce qui est beaucoup retrouvé, ce sont les cultures massives d'une souche afin de produire une enzyme d'intérêt (cellulase, β -glucosidase, etc) pour les industries. Ces enzymes ont diverses utilités : blanchissement de papier, préservation des aliments, dans le textile, etc. D'autres approches ont émergé ces dernières années avec l'utilisation des microorganismes (PGPR) pour stimuler la croissance des plantes à la place des engrais (Vejan et al., 2016). Et en dernier, la biorémédiation, ce domaine d'application où les microorganismes sont utilisés pour dépolluer un milieu contaminé. Il existe plusieurs méthodes pour dépolluer un sol avec leurs points positifs et négatifs, aucune méthode n'étant parfaite. Les techniques de bioremédiation peuvent avoir lieu in situ mais aussi ex situ (le sol n'est pas traité sur place). Les techniques in situ de bioremédiation sont le bioventing (ajout de nutriment et d'air via des puits), le biosparging (ajout d'air sous pression pour augmenter l'activité microbienne), la bioaugmentation (ajout de microorganismes spécifiques sélectionnés en fonction du micropolluant à biodégrader) et la biostimulation (ajout de nutriment pour optimiser la croissance et l'activité des populations indigènes) (Haripriyan et al., 2022; Tyagi and Kumar, 2021; Tyagi et al., 2011).

3. Méthodologies d'études des microorganismes

Quand on parle de caractérisation microbiologique, c'est l'étude des caractéristiques des microorganismes de l'écosystème que l'on veut traiter afin de déterminer les communautés présentes, leur nombre et leurs fonctions ainsi que les impacts de l'environnement sur les microorganismes. Pour cela, il est donc nécessaire de déterminer la diversité, l'abondance et l'activité microbienne. Pour étudier ces paramètres, il existe différentes méthodes typiques telles que la biologie moléculaire, l'enzymologie ou encore la respiration induite par substrat (SIR).

- Pour étudier la **diversité microbienne**, 2 approches sont possibles soit étudier la diversité globale c'est-à-dire l'ensemble des communautés que l'on retrouve dans les échantillons à un temps donné soit étudier la diversité fonctionnelle avec l'identification des communautés qui auront les gènes de la fonction étudiée. Pour étudier la diversité, il est préférable de passer à la biologie moléculaire car il n'y a qu'approximativement 1% des bactéries qui sont cultivables en laboratoire (Niwa et al., 2011).

Les techniques de biologie moléculaire se basent sur l'étude des gènes et leurs produits, on parle des approches « -omiques » avec la génomique, la transcriptomique, la protéomique et la métabolomique. Afin d'étudier la diversité microbienne, il faut utiliser des amorces qui vont cibler des gènes spécifiques dans le génome des microorganismes lors d'une PCR et les produits de cette PCR seront ensuite séquencés par des approches NGS comme le séquençage Illumina. Les séquences récupérées seront ensuite identifiées par comparaison sur des banques de données telle que BLAST. Pour étudier la diversité des procaryotes, les amorces ciblent le plus souvent le gène de l'ARN16S (Gupta et al., 2020).

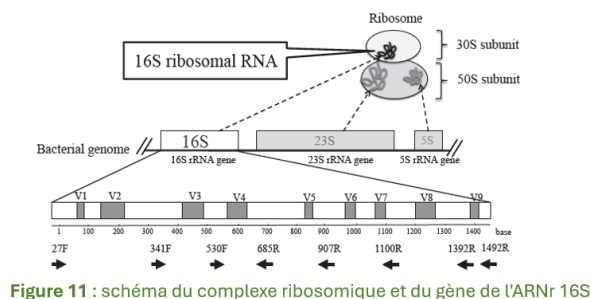


Figure 11 : schéma du complexe ribosomique et du gène de l'ARNr 16S

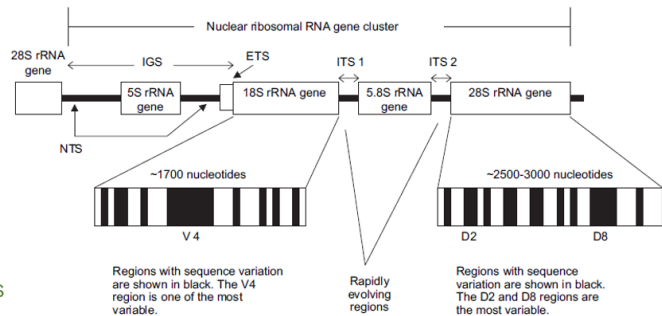


Figure 12 : groupe de gènes de l'ARN ribosomal. Le groupe comprend trois gènes principaux (molécules d'ARNr 5,8S, 18S et 25S ou 28S) intercalés entre des régions d'espacement (IGS - espacement intergénique, NTS - espacement non transcrit, ETS - espacement transcrit externe, ITS - espacement transcrit interne).

Comme il est possible de le voir sur la **figure 11** provenant de (Fukuda et al., 2016), différentes amorces sont possibles (liste non exhaustive), qui vont cibler diverses régions du gène de l'ARN16S. C'est un gène qui est plutôt court et qui est commun parmi les procaryotes avec des régions hypervariables (V1 à V9 sur schéma) ce qui permet de différencier les espèces entre elles.

Pour les eucaryotes c'est le gène de l'ARN 18S qui est principalement ciblé ainsi que les ITS (espaces internes transcrits) comme cela est présenté sur la **figure 12** de (Mitchell and Zuccaro, 2006). Les gènes de l'ARN 5,8S et 28S peuvent aussi être utilisés avec des amorces spécifiques.

Lorsque ces amorces sont utilisées pour déterminer la diversité totale d'un échantillon, il est possible de parler de métagénomique ciblée (métabarcoding), ce qui diffère de la métagénomique globale qui est

aussi utilisée en biologie moléculaire. La métagénomique globale consiste en la fragmentation de tous les ADN présents dans l'échantillon en court fragments pour ensuite faire du séquençage haut-débit. Les séquences sont ensuite rassemblées informatiquement pour reconstituer les génomes bactériens, on parle de « Shotgun sequencing ».

Il est possible d'utiliser ces outils dans beaucoup de situations comme lorsque l'on veut savoir les communautés présentes dans un lieu pollué, tel qu'il est possible de le voir avec les travaux de Matsumura et al. (2009) qui étudie les bactéries dégradant le bisphénol A (BPA) dans des sols japonais. Pour cela, un milieu BSM (basal salt medium) est dopé avec du BPA (précédemment dissout dans de l'éthanol afin d'augmenter sa solubilité), milieu final surnommé BSMBE. 0,5g de sol de chaque échantillonnage (107 sols testés) est utilisé pour ensemencer 10ml de milieu BSMBE, à 30°C pendant 24h, cycle à répéter 4 fois pour confirmer la croissance des bactéries dégradant le BPA. L'analyse biomoléculaire du gène de l'ARN16S se fait sur les bactéries isolées. L'ADN est isolé et purifié avec « Wizard Genomic DNA Purification System ; Promega ». Une région partielle du gène de l'ARN16S est amplifiée par PCR (avec les amorces 27f et 1525r). Le fragment amplifié est séparé sur gel d'agarose puis purifié avec « QIAquick Gel Extraction Kit ; Qiagen ». Le fragment purifié est cloné dans pCR2.1 avec « TOPO TA Cloning system ; Invitrogen » et séquencé avec « BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit on an ABI PRISM 3100 Genetic analyzer ; Applied Biosystems ». 26 souches ont de ce fait été sélectionnées pour leur grande capacité de dégradation du BPA, 22 souches sont des Gram négatives : 3 sont des *alpha*-protéobactéries (*Sphingomonas* sp.), 3 des *bé*ta-protéobactéries (*Pandoraea* sp., *Alcaligenes* sp., *Bordetella* sp.) et 16 sont des *gamma*-protéobactéries (*Pseudomonas* sp., *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Serratia* SP.). Une souche (HN8) n'a pas pu être classifiée et les 3 autres sont des Gram positives (*Bacillus* sp.).

D'autres couples d'amorces avec des spécificités pour faciliter le séquençage peuvent aussi être utilisés. Les travaux de Gao. (2020) sur les réponses des communautés bactériennes des rhizosphères de blé à la contamination des sols par du di-*n*-butylephthalate (DBP) et du di(2-éthylhexyl)phtalate (DEHP) sont un exemple de cette spécificité. L'objectif étant d'utiliser le séquençage haut-débit de l'ADNr 16S pour observer les impacts d'un gradient de concentration de ces polluants sur la structure et la diversité fonctionnelle des communautés du sol. L'expérience a duré au total 89 jours, le temps de la maturation des graines de blé puis le sol de la rhizosphère a été prélevé pour pouvoir faire les analyses biomoléculaires, 3 types de sol ont été testés avec 7 traitements (témoin, DBP et DEHP avec 3 concentrations : 10, 20 et 40mg/kg). L'extraction de l'ADN microbien s'est fait en utilisant le kit « FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, CA, USA) » puis la qualité et la quantité de l'ADN extrait ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose. Les amorces pour la PCR utilisées sont la 515F et la 806R qui vont amplifier la région hypervariable V4 du gène de l'ARN16S. La spécificité est que les amorces utilisées pour le séquençage sont composées d'un adaptateur Illumina approprié, d'un pad linker et de l'amorce spécifique au gène, et un code-barres de 6 nt unique à chaque échantillon a été attaché à l'amorce inverse. Une fois la PCR terminée et les produits PCR purifiés utilisant un kit d'extraction de gel, les échantillons sont préparés pour le séquençage en utilisant le kit « TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) ». Et enfin le séquençage Illumina se fait suivi par le nettoyage des séquences obtenues par le site de « Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, v. 1.7.0) » et l'identification des séquences par UPARSE, les séquences retenues ont des OTU (operational taxonomic unit) à 97% de similarité. Les bactéries les plus dominantes dans les 3 types de sol sont les *protéobactéries* (52 à 75%) puis les *bactéroidetes* (9 à 25%), les *firmicutes* (3 à 12%), les *actinobacteria* (4 à 8%), les *gemmatimonades* (2 à 3%) et les *acidobacteria* (2 à 3%). Des différences dans la répartition de ces groupes

apparaissent entre les sols de constitution différente et les différents gradients de concentrations des polluants.

Le gène de l'ARN16S est couramment utilisé pour étudier l'ensemble de la diversité bactérienne mais il y a également des limites avec le choix des amorces par exemple. Toutes les amorces ne vont pas être conservées à 100% dans toutes les bactéries. Fukuda et al. (2016) ont montré que les amorces 341F, 530F, 907R et 1392R ont été complètement conservées dans plus de 90 % des 9 752 séquences d'ADNr 16S (séquences étant supérieures à 1 200 pb avec une bonne qualité) et que l'amorce 1492R à seulement 40% de conservation avec les souches bactériennes (**tableau 3**). Il est nécessaire d'avoir des séquences suffisamment longues mais aussi avec suffisamment d'informations génétiques pour les identifier. Il faut aussi prendre en compte que des souches peuvent être dépourvues du gène recherché ou alors avoir plusieurs copies du même gène.

Tableau 3 : taux de conservation des amorces universelles dans les souches bactériennes

Name	Sequence (5' to 3')	Probe match result	Coverage (%)	reference
27F	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	1846/9752	18.9	[8]
109R	ACGYGTTACKACCCGT	6741/9752	69.1	↗
341F	CCTACGGGAGGCAGCAG	9261/9752	94.9	↗
530F	GTGCCAGCMGCCGCGG	9576/9752	98.2	↗
685R	TCTRCGCAATYCACCGCTAC	5976/9752	61.3	↗
907R	CCGTCAATTCMTTTRAGTT	9047/9752	92.8	↗
1100R	GGGTTCGCTCGTTG	8424/9752	86.4	↗
1392R	ACGGGCGGTGTGTRC	9237/9752	94.7	↗
1492R	TACGGYTACCTGTACGACTT	3687/9752	37.8	↗

Ce sont des limites de la biologie moléculaire qui montrent que la méthode n'est pas parfaite mais néanmoins ces limites restent peu nombreuses par rapport aux bénéfices que l'on récupère par son utilisation.

L'ADNr16S est utilisé pour obtenir la diversité totale mais quand on veut étudier des diversités spécifiques pour une fonction donnée, il est possible de cibler d'autres gènes. Ce qu'il faut c'est cibler des gènes qui sont primordiaux pour le fonctionnement du métabolisme/de la fonction que l'on cible car ils seront alors conservés avec juste quelques différences qui permettront de différencier les espèces. Par exemple, des gènes majeurs intervenant dans les cycles biogéochimiques du carbone ou de l'azote (Gill et al., 2017). En ciblant ces gènes et leurs fonctions, cela donne une idée sur l'état de fonctionnement de l'écosystème donné.

- Pour étudier la **fonction microbienne**, il y a plusieurs possibilités. Comme cité précédemment, la biologie moléculaire est une manière de faire avec une extraction ADN ou ARN puis une qPCR. Travailler avec l'ARN est plus compliqué mais permet d'avoir les populations actives de la communauté pour la fonction étudiée tandis qu'avec l'ADN cela ne donne que les populations potentiellement actives. La qPCR permet d'avoir une idée sur la quantité d'expression des gènes ciblés, c'est une PCR en temps réelle (Cyzdik-Kwiatkowska et al., 2020). Mais il y a d'autres techniques, avec par exemple l'étude enzymatique ou les plaques Biolog.

Pour étudier l'activité enzymatique, il faut préparer les échantillons spécialement en fonction de chaque enzyme puis de les passer au spectrophotomètre avec une absorbance encore une fois spécifique à chaque enzyme. C'est donc un autre moyen pour déterminer les fonctions microbiennes de l'écosystème

étudié car on peut déterminer la concentration d'enzyme du milieu. Il faut cependant cibler les enzymes que l'on veut étudier (Natal-da-Luz et al., 2012; Wu et al., 2019).

Les plaques Biolog permettent de faire des analyses plus larges, moins ciblées. Quand ce sont des échantillons environnementaux, ce sont plutôt des plaques Ecolog qui sont utilisées, plus adaptées aux substrats environnementaux. Ce sont des microplaques de 96 puits avec 31 substrats carbonés (triplicat) et un contrôle négatif (triplicat). Ces substrats carbonés représentent 6 classes différentes : amines/amides, hydrates de carbone, polymères de carbone, acides carboxyliques, acides aminés, phosphates organiques (Preston-Mafham et al., 2002), ce sont les sources que l'on va retrouver dans l'environnement le plus souvent. Pour observer l'activité microbienne, un sel de tétrazolium qui sert d'indicateur coloré positif est ajouté dans chaque puit. Quand les microorganismes vont métaboliser les substrats carbonés, le sel sera réduit irréversiblement en formazan (Tachon et al., 2009). Le formazan étant un composé violet, il va pouvoir être quantifié par mesure de la densité optique à 590nm et son absorbance sera alors proportionnelle à la consommation du substrat carboné.

Par contre, seules les bactéries peuvent être étudiées par les biolog Ecoplate car le sel de tétrazolium n'est pas adapté au métabolisme des champignons (Preston-Mafham et al., 2002). Il est aussi important à noter que les conditions dans les plaques ne seront pas exactement les mêmes que dans le sol et les pressions de sélections seront donc différentes ce qui pourra être traduit par des activités microbiennes pas entièrement représentatives du sol. Plutôt que les fonctions réelles du sol, cela donne les fonctions potentielles que l'on peut retrouver dans le sol.

- Et enfin **l'abondance microbienne**. Autre paramètre très important car on peut obtenir le même résultat au cours d'une expérience avec une abondance microbienne très différente. Avec d'un côté, des espèces très actives et peu abondantes et de l'autre côté, des espèces peu actives mais très abondantes, on aura en final la même capacité de production enzymatique par exemple, alors que pour les biotechnologies ou pour la biorémédiation ce sont celles très actives qui seront intéressantes et à cibler. Afin de déterminer l'abondance microbienne d'un système, on peut utiliser la méthode de la « respiration induite » (SIR).

La SIR se base sur la mesure de la respiration du sol (c'est-à-dire la mesure de la production du CO_2 et de la consommation de l'O_2) suite à l'addition d'un substrat tel que le glucose. Cette méthode a été mise au point par (Anderson and Domsch, 1978). Dans la review de Anshuman Swain et al. (2014), ils vont tester la validité de la méthode SIR en tant que bon indicateur de la biomasse microbienne. Dans un flacon conique, 10g de sol est ajouté avec du glucose à une concentration permettant d'obtenir une capacité de rétention de l'eau à 50%. Le flacon est fermé par un bouchon spécial (possédant une ouverture), qui permet de rejoindre un deuxième flacon grâce à un raccord. Dans l'autre flacon se trouve une solution de NaOH qui va pouvoir absorber le CO_2 libéré. La quantité de CO_2 libérée et absorbée par la solution de NaOH est déterminée par titrage contre l'HCl de concentration connue après addition de BaCl_2 ou $\text{Ba(NO}_3)_2$ afin de précipiter le carbonate, et en utilisant la phénolphtaléine comme indicateur. Les auteurs ont trouvé un maximum de respiration à 0,4g/10g de sol et en-dessous de cette concentration, la quantité de respiration était plus faible car moins de glucose disponible et inversement avec des concentrations plus fortes, validant cette technique pour une bonne mesure de la biomasse microbienne du sol.

D'autres méthodes permettent également d'avoir une idée de la biomasse microbienne :

- Mesure de la DO à 600nm.

- Méthode du « Nombre le Plus Probable » = NPP.
Cette méthode repose sur la croissance ou non d'échantillons dilués en cascade mis en culture et en fonction des résultats, un calcul statistique estime la biomasse présente dans l'échantillon de départ.
- La cytométrie en flux.

B. Caractérisation microbienne au sein des sols

La caractérisation des communautés microbiennes au sein des ouvrages de gestion des eaux pluviales a été peu étudiée. On retrouve surtout dans les études, la caractérisation des pollutions qui se trouvent dans ces eaux et dans ces structures alternatives. Des études vont aussi déterminer s'il y aura des différences sur la capacité d'élimination des polluants en fonction de la nature des composants des ouvrages et les capacités de sorption des micropolluants sur ces composants. Mais pour la partie biologique, il y a peu d'études. On retrouve des articles sur le rôle de phytoremédiation que peuvent avoir les plantes, impact qui va varier en fonction des espèces. On retrouve également des études de caractérisation microbienne dans les sols, dans les sédiments et rivières qui sont soumis à des pollutions, pas en grand nombre mais suffisamment pour avoir déjà des données sur la caractérisation microbiologique pour plusieurs polluants, en fonction de paramètres environnementaux comme les saisons par exemple. Mais l'étude des sols au sein des ouvrages est peu traitée et il est difficile de trouver des données de caractérisation microbiologique pour des polluants en particulier.

1. Caractérisation des communautés microbiennes des ouvrages de gestion des eaux pluviales

Afin de pouvoir optimiser la gestion des eaux de pluies dans des ouvrages tels que des systèmes d'infiltration Fraser et al. (2018) ont étudié l'évolution des communautés bactériennes dans un filtre à sable au cours du temps. Pour ce faire, les auteurs ont inoculé des colonnes de sols avec de l'eau pluviale (collectée à l'exutoire d'un égout pluvial après un orage) puis des simulations de précipitations sont faites en ajoutant de l'eau pluviale synthétique stérile (même vitesse et durée : 15cm/h pour 3h ce qui correspond à 78ml de volume ajouté) aux jours 3, 6, 10, 13, 17 et 20. Ils ont d'abord suivi la diversité totale bactérienne puis spécifiquement les pathogènes et les bactéries dénitrifiantes. Pour faire ce ciblage, un séquençage est fait à partir du gène de l'ARN16S pour la diversité totale ainsi que les pathogènes et du gène *nosZ* pour les dénitrifiants. Les auteurs ont choisi ces 2 critères car la biotransformation des nutriments et l'élimination des pathogènes au sein des ouvrages sont encore méconnus. Ils ont observé initialement dans l'eau de l'exutoire (utilisée pour l'inoculum des colonnes) une prédominance des protéobactéries à 76%. Suite à la période expérimentale de 24 jours, une modification des communautés est observée avec la présence des Protéobactéries à 51%, des Bacteroidetes à 18% et des Firmicutes à 9%. Il est également observé un changement rapide des communautés au cours des 10 premiers jours puis ces communautés vont se stabiliser vers 17-24 jours. Les dénitrifiantes retrouvées font partie de plusieurs taxons possibles avec les alphas, betas, gammas, et protéobactéries. Pour les pathogènes, des prédominances sont retrouvées avec les genres *Stenotrophomonas* et *Acinetobacter*. Au bout des 24 jours expérimentaux, une diminution des pathogènes est observée tandis qu'une augmentation de l'expression du gène *nosZ* se fait dans les colonnes. Une élimination des pathogènes et des nutriments nitrates apparaît bien au sein de cet ouvrage. Mais plus important encore, on voit bien une différence entre les communautés microbiennes entre les

colonnes inoculées avec l'eau pluviale et les colonnes témoins sans inoculation. Cela montre une évolution naturelle des communautés qui colonise les ouvrages et que l'inoculation peut aider à diminuer les populations pathogènes au profit d'autres plus intéressantes pour le fonctionnement des ouvrages. Il faut cependant relativiser cette information car il peut être difficile de maintenir une communauté extérieure dans un ouvrage à cause des populations autochtones et le risque de compétition pour la niche écologique.

Les ouvrages d'infiltrations qui utilisent le sol comme acteur principal pour la rétention et la dégradation des micropolluants ont des problématiques qui leur sont propre avec par exemple la question de la bioaccumulation des micropolluants dans le sol au cours du temps. Pour vérifier la capacité de biodégradation des micropolluants par les microorganismes et ainsi limiter le phénomène de bioaccumulation, LeFevre et al. (2012) ont étudié l'efficacité de biodégradation des hydrocarbures pétroliers totaux (TPH) provenant de sols de jardins de pluies. Pour cela, 75 sols ont été étudiés (en comptant les témoins), ces sols vont varier en fonction de l'apport en eaux pluviales (provenant des routes, des toits des résidences, des parkings), en fonction du couvert végétal (plantes natives fortement enracinées, des cultivars décoratifs, du gazon ou sans plante). Ils vont étudier l'abondance microbienne avec le nombre de copie du gène de l'ARN16S (permet de quantifier la concentration du gène cible) et l'activité potentielle de gènes cibles connus pour être impliqués dans la biodégradation du naphtalène : les gènes codants pour la naphtalène dioxygénase et pour la phénol monooxygénase (Baldwin et al., 2009; Hendrickx et al., 2006) lors d'une qPCR. Suite à leurs analyses, ils ont pu montrer qu'il y avait bien une différence de concentration en TPH avec les sols témoins. Mais la concentration en TPH dans les sols restait très faible (en dessous de 3µg/kg) et de façon homogène pour tous les sites. Comme il est possible de le voir sur les **tableaux 4 et 5** le nombre de copie des gènes ne varie pas significativement entre les différents jardins de pluies et les sites témoins ($p > 0,099$). Les 2 gènes fonctionnels semblent de ce fait être uniformément répartis entre les environnements. Par contre, les sites avec les plantes natives et les cultivars ont une densité statistiquement plus élevée des 3 gènes (p -values : PHE<0.0001, NAH = 0.036, gène de l'ARN16S = 0.0084) par rapport aux sites avec du gazon ou sans végétation. Ce qui est normal car la densité bactérienne est plus importante à proximité de plantes.

Tableau 4 : effet de l'utilisation des terres du bassin versant sur le nombre de copies de gènes dans les sols des jardins de pluie et comparaison avec les sols des hautes terres

Catchment land use	n ^a	Phenol monooxygenase (PHE)	Naphthalene dioxygenase (NAH)	Total Eubacteria (16S rRNA)
High intensity commercial parking lot	15	12.0 ± 0.42	6.8 ± 2.0	12.9 ± 0.36
Light-use parking lot	18	11.9 ± 0.71	7.2 ± 1.4	12.9 ± 0.44
Residential street	25	12.6 ± 0.25	7.7 ± 1.8	13.1 ± 0.39
Residential roof	13	12.6 ± 0.14	7.9 ± 1.6	13.2 ± 0.22
Upland (non raingarden)	4	11.5 ± 0.67	7.3 ± 1.3	12.6 ± 0.42

a number of samples in the respective category.

Tableau 5 : effet du régime de végétation dominant présent dans les jardins de pluie sur le nombre de copies de gènes dans les sols jardins de pluie

Vegetation type	n ^a	Phenol monooxygenase (PHE)	Naphthalene dioxygenase (NAH)	Total Eubacteria (16S rRNA)
Native vegetation plantings	36	12.3 ± 0.51	8.0 ± 2.2	12.3 ± 0.41
Decorative cultivars	26	12.5 ± 0.22	7.1 ± 1.9	13.2 ± 0.29
Turf grass	6	11.2 ± 0.40	7.2 ± 1.0	12.6 ± 0.48
Unplanted	7	11.6 ± 0.56	7.0 ± 1.1	12.3 ± 0.30

a number of samples in the respective category.

Enfin, ils ont observé une corrélation entre la capacité de biodégradation du naphtalène et le nombre de copies du gène de l'ARN16S ($R^2 = 0,65$, $p = 0,016$) qu'il est possible de voir en **figure 13**. Cette corrélation

n'est toutefois pas retrouvée avec les gènes fonctionnels (PHE et NAH), montrant l'importance de l'abondance bactérienne du sol avec l'étude des consortiums et l'étude d'autres enzymes possiblement impliquées dans cette biodégradation.

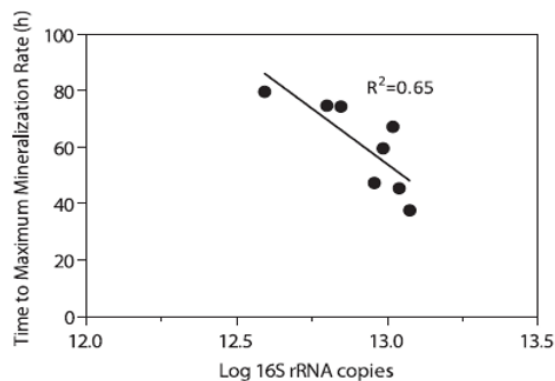


Figure 13 : relation entre le nombre total initial de bactéries par flacon et le temps nécessaire pour atteindre le taux maximal de minéralisation (h)

Ces résultats démontrent la capacité des microorganismes présents dans le sol des jardins de pluies à dégrader les TPH, permettant de maintenir ces polluants sous le seuil réglementaire. Le rôle du choix des végétaux est aussi mis en avant et souligne bien l'importance du choix végétal quand on construit un ouvrage afin d'optimiser l'efficacité de biodégradation.

La mise en place de ces techniques alternatives dans les zones urbaines promet beaucoup d'avantages pour la biodiversité, le contrôle des pollutions, la qualité de l'eau mais les données sur leurs fonctionnements sont trop limitées. Le rôle des microorganismes au sein de ces structures est trop peu documenté alors qu'ils sont des acteurs essentiels dans le fonctionnement d'un écosystème. C'est pourquoi, des études ont vu le jour pour combler ces lacunes, bien qu'elles soient encore peu nombreuses. Des études avec la comparaison de l'impact des micropolluants sur les microorganismes dans les sols de structures alternatives et dans les sols sans structure particulière (comme les parcs) se font avec les travaux de (Gill et al., 2017). L'objectif de ces travaux est de montrer la différence dans la structure des communautés microbiennes et dans leurs fonctionnalités en fonction de l'origine du sol (soit provenant d'une infrastructure verte soit dans un sol sans infrastructure). La compréhension de cette différence est le point clé pour comprendre le fonctionnement des structures et améliorer la gestion des techniques alternatives. Pour étudier ces communautés, 7 gènes associés à des voies fonctionnelles impliqués dans les cycles biogéochimiques et dans la biodégradation des micropolluants sont choisis. Ces gènes sont *cbbL-R* (fixation du CO₂), gènes SDIMO (dégradation des hydrocarbures), *bphA* (dégradation des PCB), *tfdA* (dégradation des phénoxy herbicides), *nosZ* (Dénitrification), *amoA* (nitrification) et *apsA* (oxydation du sulfure et fixation du carbone). L'étude du gène de l'*ARN16S* se fait également. Les auteurs ont un autre objectif qui est de comparer les résultats de séquençage de l'ADN et de l'ARN afin d'estimer le meilleur moyen pour étudier la diversité microbienne fonctionnelle. L'extraction ADN et ARN se fait directement sur les échantillons de sol provenant d'infrastructure verte comme les bioswales et de sol provenant de lieu sans infrastructure comme les parcs ou les fosses d'arbres. Les échantillons sont ensuite préparés pour le séquençage qui se fait avec les amorces spécifiques pour chaque gène étudié. Les auteurs

ont observé que les communautés bactériennes étaient différentes dans les sols avec infrastructure par rapport aux sols sans ($P < 0,001$). Sur la **figure 14**, il est possible de voir que les sites avec infrastructure avaient une abondance plus importante de Protéobactéries et de Bacteroidetes tandis que sans infrastructure ce sont les Actinobactéries et les Verrucomicrobia qui étaient les plus abondants. Les résultats montrent une plus grande diversité ADN et ARN dans les sols avec infrastructure, ainsi qu'une plus grande abondance et une plus grande activité fonctionnelle. Ces différences dans la structure microbienne peuvent être dues au pH, au couvert végétal plus riche dans les infrastructures vertes mais également à l'apport des eaux pluviales (taxons retrouvés spécifique de contamination aux micropolluants avec les méthanotrophes par exemple). Et pour finir, l'étude de l'ARN est à privilégier quand on se concentre sur la diversité des populations fonctionnelles car c'est l'indicateur de l'activité du sol tandis que l'ADN donne seulement le potentiel de l'activité du sol.

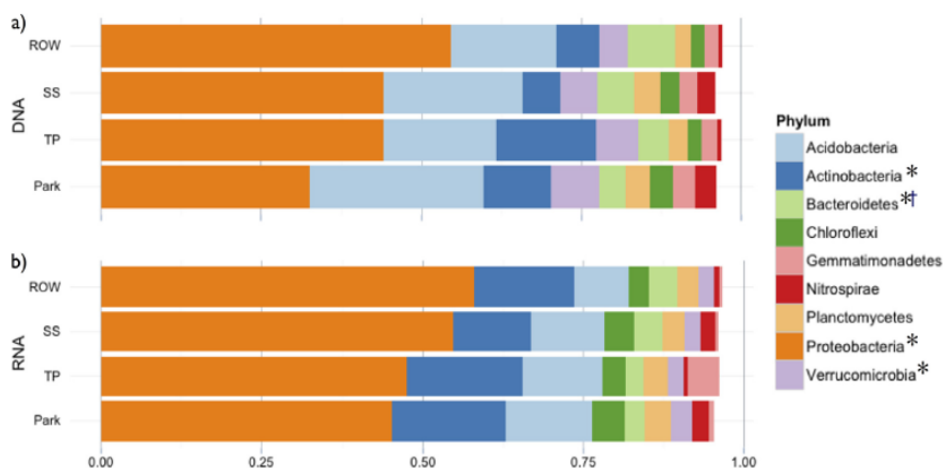


Figure 14 : Abondance relative des phylotypes d'ADN (a) et d'ARN (b) dans les quatre types de sol, pour tous les phylums dont l'abondance globale est supérieure à 1 %. Les embranchements dont l'abondance des phylotypes est significativement différente dans les sites aménagés par rapport aux sites non aménagés sont indiqués pour l'ADN (*) et l'ARN(†) (signification ajustée pour le taux de fausse découverte de $P < 0,05$). TP, fosses d'arbre

Afin de montrer l'importance et le rôle des microorganismes dans les ouvrages de gestion des eaux pluviales, un autre exemple d'étude sur les communautés microbiennes peut être cité avec les travaux de (Rotaru et al., 2011). Cette étude analyse la diversité des communautés microbiennes au sein d'un bassin d'infiltration de ruissellements d'autoroutes (avec des polluants tels que des agents de déglacage organiques) en fonction de la présence d'oxygène. Les polluants peuvent être considérés comme des substrats pour les microorganismes et pour les métaboliser, ils vont avoir besoin d'une quantité plus importante d'oxygène, cela crée une demande biologique en oxygène qui peut modifier l'environnement. Un panache au sein du bassin va donc se former, avec au niveau supérieur des conditions anoxiques tandis qu'en-dessous du panache des conditions d'aération normale sont trouvées. Deux zones ont été prélevées (BMS et BCS voir sur la **figure 15**). Des analyses chimiques et de biologie moléculaire (PCR sur le gène de l'ARN16S) sont utilisées pour montrer que la quantité d'oxygène dissous et la structure bactérienne vont changer en fonction de ces points d'échantillonnages dans le panache. En effet, les auteurs vont observer des zones pauvres en oxygène dans le bassin augmentant la diversité des bactéries anaérobies ou facultatives qu'il est possible de voir dans la **figure 16**.

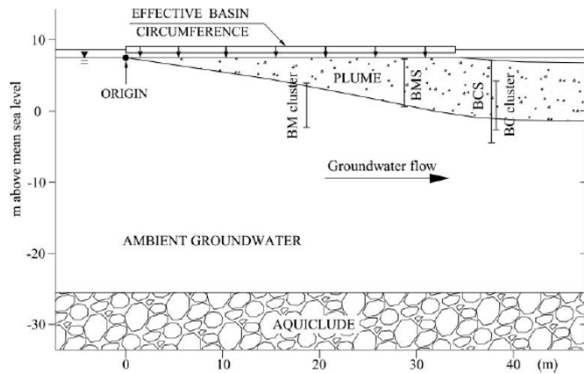
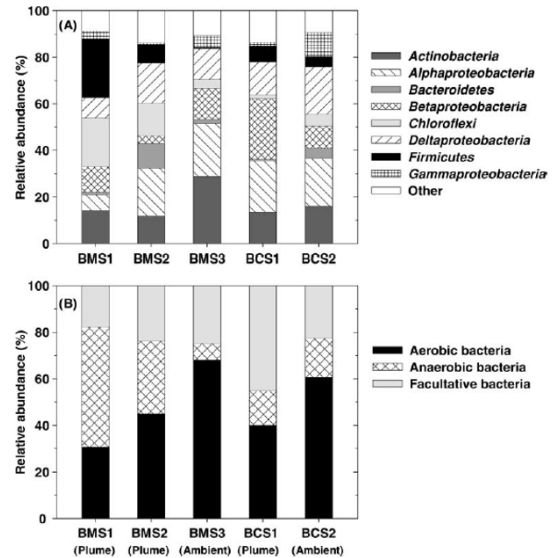


Figure 15 : Profile view of groundwater plume, well clusters BM and BC well-screen elevations and BMS and BCS sampling elevations

Figure 16 : Changements dans la structure de la communauté bactérienne. (A) Distribution des groupes phylogénétiques bactériens et (B) distribution des communautés bactériennes en fonction de l'utilisation de l'oxygène.



Le panache étant fortement appauvri en oxygène, les bactéries sont mieux adaptées à un milieu anoxique tandis qu'en-dessous du panache où on a une augmentation de l'oxygène dissous, les bactéries sont moins sélectionnées. On a donc des différences au sein de la communauté bactérienne en fonction de la profondeur et de la disponibilité en oxygène dissous qui varie suite à la métabolisation des polluants.

Au sein des structures végétalisées, il y a des interactions entre la plante et les microorganismes qui sont essentielles pour le bon fonctionnement du système et permettre une bonne biodégradation des micropolluants. En partant de cette idée, Deeb et al. (2018) ont voulu étudier les cycles biogéochimiques (Delolme et al., 2005) au sein de différentes structures vertes. Ils ont voulu voir si en fonction de la forme, de la taille et la connexion plus ou moins directes avec les ruissellements urbains, l'âge, le fonctionnement des cycles biogéochimiques pouvaient varier. Les cycles de l'azote (N) et du carbone (C) étant essentiels pour le bon développement des plantes, une altération impacterait tout le processus de biodégradation des micropolluants. Pour étudier ce phénomène, les auteurs ont choisi trois types de structures vertes : des arbres alignés, des rigoles d'infiltration et des rigoles végétalisées. Ils étudient la nitrification, la dénitrification, la respiration microbienne, la teneur en carbone et azote de la biomasse microbienne et ils vont aussi regarder les impacts de métaux tels que le plomb et le zinc, les sels, et les hydrocarbures pétroliers totaux (TPH). Les teneurs en C et N de la biomasse microbienne ont été mesurées par la méthode de fumigation-incubation au chloroforme. L'analyse du potentiel de dénitrification utilise l'essai sur l'activité enzymatique de dénitrification (DEA) décrit par (Smith and Tiedje, 1979). Les résultats montrent peu de contamination par les micropolluants et que cette contamination est encore plus faible lorsque les structures végétales sont plus larges. La biomasse et l'activité microbienne se retrouvent corrélées positivement avec le C_{org} , N_{total} , le pH et les TPH. Ils ont aussi montré un meilleur fonctionnement dans les structures plus jeunes. Ils ont ainsi mis en évidence le lien entre la conception des structures vertes et le fonctionnement des cycles biogéochimiques ainsi que l'activité microbienne. Cependant ils ont étudié des structures jeunes (<10 ans) et dans la nécessité de compléter ces résultats, des analyses sur des structures contaminées sur du long terme seraient favorables. Dans la même optique, les travaux de Joyner et al. (2019) se basent sur le même concept que Deeb et al. (2018) mais en voulant montrer que la conception des structures vertes influence les communautés au sein des sols urbains.

2. Caractérisation des communautés microbiennes dans des infrastructures de gestion des eaux de surface et souterraines polluées

L'importance des microorganismes dans le fonctionnement des infrastructures pour traiter l'eau commence à voir le jour dans les ouvrages de gestion des eaux pluviales mais on peut retrouver des données microbiologiques sur des systèmes voisins traitant aussi des micropolluants. Si cette approche ne nous donne pas d'informations sur les ouvrages, sur leur fonctionnement, les questions posées et les résultats obtenus permettent d'orienter notre réflexion.

L'étude des microorganismes et leurs actions sur les micropolluants au sein des structures dites alternatives peut également se faire dans des domaines précis. On a par exemple les travaux de Hedegaard et al. (2018) sur l'étude de la cométabolisation du bentazone au sein d'un filtre à sable dans une usine de distribution de l'eau avec des eaux souterraines riches en méthane. Le bentazone est un herbicide, il est donc récalcitrant et mobile dans le milieu aquatique et peut se retrouver dans les eaux souterraines. Les auteurs ont voulu mettre en évidence le lien entre la biodégradation du bentazone et la présence du méthane, pour cela, ils ont fait des microcosmes avec un enrichissement d'une culture de méthanotrophes, en présence du bentazone et du méthane. Plusieurs paramètres ont été étudiés afin de mettre en évidence ce lien de cométabolisme. Ils ont d'abord regardé le taux de biodégradation du bentazone en présence et absence du méthane. La dégradation du bentazone avec méthane est de 53% tandis que sans le méthane, la biodégradation chute à 31%. Ensuite, ils ont inhibé l'oxydation du méthane avec de l'acétylène et ils ont vu que cela entraînait également l'inhibition de la biodégradation du bentazone. A ce niveau, ils ont vérifié par qPCR, l'abondance du nombre de copie du gène *pmoA* (codant pour une méthane monooxygénase) afin de vérifier que les différences entre les microcosmes témoins et inhibés n'étaient pas dues à une différence dans l'abondance des méthanotrophes. Un phénomène de compétition pour le substrat a aussi vu le jour car en présence d'une forte concentration de bentazone (1mg/L), la consommation du méthane est moins rapide que lorsqu'il y a une faible concentration du bentazone (1µg/L). Et à la fin, ils ont aussi montré que la présence du méthane permet de stimuler la production des métabolites du bentazone.

Il existe d'autres infrastructures qui peuvent traiter les eaux de surfaces et souterraines micro-polluées avec les zones humides construites (« Constructed Wetlands »).

Huang et al. (2012) ont voulu étudier l'importance des microorganismes dans la biodégradation des micropolluants au sein d'une zone humide construite, voir l'importance de leur activité enzymatique (déshydrogénase, catalase et uréase) et ce que cela donne sur le taux de biodégradation. Ils ont aussi regardé le rôle des plantes. Ils ont dans un premier temps observé que le taux de biodégradation, le nombre de microorganismes du sol et l'activité enzymatique du sol étaient tous plus importants dans les zones humides plantées que dans les zones humides non plantées. Le ratio entre les microorganismes correspondait à bactérie > actinomycète > champignon. Ils ont aussi mis en évidence une corrélation entre la température et les activités enzymatiques et la biodégradation de l'azote. Les auteurs considèrent qu'il est possible d'améliorer l'activité biologique de ces zones humides en installant des plantes spécifiques : *Arundo donax* permettrait une meilleure activité en été tandis que *Acorus calamus* permettrait une meilleure activité en hiver. Chazarenc et al. (2010) ont travaillé sur le même type d'infrastructure, des zones humides construites, mais leur approche est plus focalisée sur mettre en évidence le facteur le plus important qui pourrait générer de la variabilité entre les communautés microbiennes et qui pourrait ainsi impacter les performances de traitement du système. Deux campagnes d'échantillonnages sont réalisées

afin de répondre à deux questions : la première, l'influence des saisons (Matamoras and Salvadó, 2012) sur les communautés microbiennes et la deuxième, l'influence de la zone d'échantillonnage et de l'ancienneté du système sur les communautés microbiennes. L'activité fonctionnelle microbienne est étudiée grâce à des plaques « Biolog Ecoplate ». Ils observent la meilleure activité microbienne avec le système le plus ancien lors de l'échantillonnage en été (**Figure 17**) et ils observent des différences de profil en fonction des profondeurs des échantillonnages. Toutefois, ils préviennent des limites de l'utilisation des Biolog Ecoplate qui ne permettent pas d'étudier les populations anaérobies strictes, ce qui enlève une partie des populations qui pourraient utiliser des voies de biodégradations différentes.

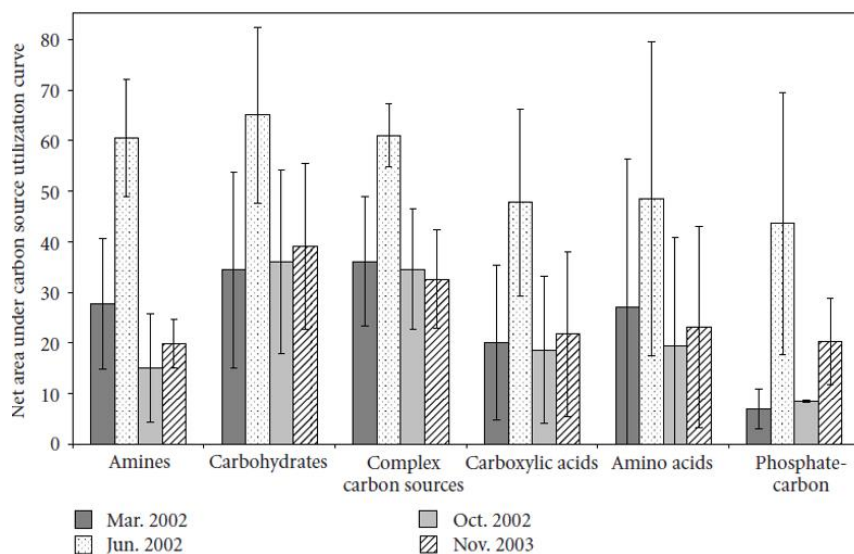


Figure 17 : observation des changements de la réponse métabolique de la communauté bactérienne en fonction des saisons

Malgré le peu de données sur l'importance des microorganismes dans la biodégradation des micropolluants au sein des ouvrages de gestion des eaux pluviales, l'étude sur les capacités de biodégradation des micropolluants par les microorganismes se retrouve quand même dans la littérature. Il est possible de trouver de multiples articles traitant des fonctions microbiennes dans des sols pollués. Ces données ne sont pas suffisantes pour comprendre le fonctionnement des ouvrages de gestion des eaux pluviales mais elles peuvent aussi servir de base pour mettre en place les protocoles expérimentaux, d'avoir une idée des mécanismes microbiens que l'on pourrait retrouver, des facteurs importants à prendre en compte qui pourraient influencer les mécanismes de biodégradation, c'est pourquoi la dernière partie de ce chapitre concerne l'étude plus large de la caractérisation et du fonctionnement des communautés microbiennes au sein des sols pollués.

3. Caractérisation des communautés microbiennes dans des sols pollués

Il y a des paramètres importants quand on étudie le sol qui ne ressortent pas assez dans les études sur les techniques alternatives comme l'activité microbienne enzymatique totale ou pour la biodégradation des micropolluants organiques et l'interaction avec les plantes. Il n'y a pas encore assez d'études sur ces paramètres qui sont pourtant essentiels pour comprendre les mécanismes de biodégradation au sein d'un sol pollué (présent ou non dans des ouvrages de gestion des eaux pluviales).

Ces critères se retrouvent dans plusieurs exemples d'études sur les sols pollués par des hydrocarbures. Les travaux de Andreoni et al. (2004) et de Brohon et al. (2001) portent sur l'étude des activités microbiennes enzymatiques du sol pour évaluer les capacités de biodégradation des HAP par les communautés microbiennes. Les enzymes étudiées sont la déshydrogénase, la FDA (l'hydrolase du diacétate de fluorescéine), la phosphatase et l'uréase. Ces auteurs, ont montré que l'activité enzymatique peut être utilisée pour évaluer la qualité d'un sol donné car on va avoir des phénomènes d'inhibition des enzymes en présence de métaux (inhibition de 31% de l'uréase et 50% de la déshydrogénase dans les sols les plus contaminés par rapport au sol témoin) ou avec des concentrations trop fortes en micropolluants qui induiraient une trop grande toxicité pour les bactéries. Les cultures bactériennes dégradant le phénanthrène le plus rapidement dans des batch liquides sont *Achromobacter xylosoxidans*, *Methylobacterium sp.*, *Rhizobium galegae*, *Rhodococcus aetherovorans*, *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Alcaligenes sp.* et *Aquamicrobium defluvium*.

Toujours en rapport avec l'étude des hydrocarbures, l'importance des plantes est mise en avant avec les travaux de (Corgie et al., 2003). Ils veulent étudier les capacités de biodégradation du phénanthrène (PHE) par les microorganismes en fonction de la proximité des racines des plantes. Ils veulent donc étudier la rhizodégradation et voir le rôle des exsudats racinaires sur les processus microbiens. Ils utilisent le ray-grass (*Lolium perenne L.*) et regardent la capacité de biodégradation des microorganismes à trois distances par rapport aux racines (0–3, 3–6, 6–9 mm) qu'il est possible d'observer sur la **figure 18**.

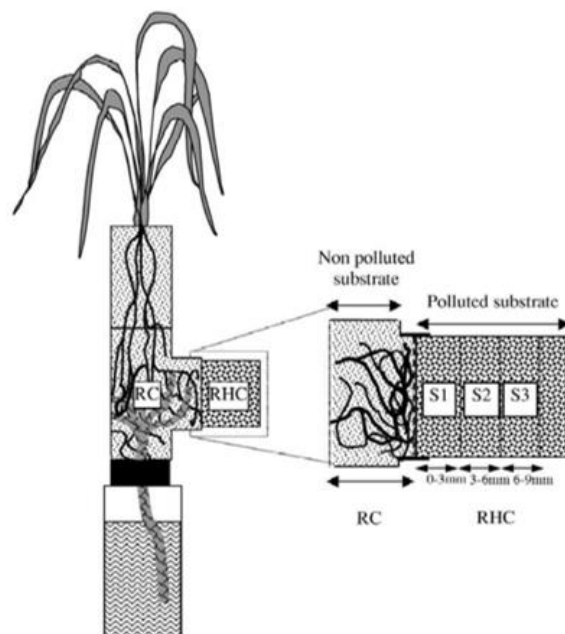


Figure 18 : pot compartimenté composé d'un compartiment racinaire (RC) et d'un compartiment rhizosphère (RHC) coupé en trois sections (S1, S2, S3) à la récolte

Ils montrent un gradient de biodégradation en lien avec les racines : 0-3mm => 86% de biodégradation du PHE, 3-6mm => 48% de biodégradation et 6-9mm => 36% de biodégradation.

Tableau 6 : exemples de remédiation réussie des hydrocarbures dans le sol par l'utilisation combinée de plantes et de bactéries endophytes

Plant used	Rhizobacteria	Bacterial characteristics	Reference
Italian ryegrass (<i>L. multiflorum</i> var. Taurus)	<i>Pseudomonas</i> sp. strain ITRI53, <i>Pseudomonas</i> sp. strain MixRI75	Hydrocarbon degradation	Afzal et al. (2011) and Afzal et al. (2012)
Italian ryegrass (<i>L. multiflorum</i> var. Taurus), birdsfoot trefoil (<i>L. corniculatus</i> var. Leo) and alfalfa (<i>M. sativa</i> var. Harpe)	<i>E. ludwigii</i> strains	Hydrocarbon degradation and ACC deaminase activities	Yousaf et al. (2011)
Italian rye grass (<i>L. multiflorum</i> var. Taurus) and birdsfoot trefoil (<i>L. corniculatus</i> var. Leo)	<i>Pantoea</i> sp. strain ITS110, <i>Pseudomonas</i> sp. strain ITRI15	Hydrocarbon degradation	Yousaf et al. (2010b)
Wheat (<i>Triticum</i> sp.) and maize (<i>Z. mays</i>)	<i>Burkholderia cepacia</i> strain FX2	Toluene degradation	Wang et al. (2010)
Poplar	<i>P. putida</i> W619-TCE	Trichloroethylene degradation	Weyens et al. (2010c)
Yellow lupine	<i>B. cepacia</i> VM1468	Trichloroethylene degradation and Ni resistance	Weyens et al. (2010a)
Pea (<i>Pisum sativum</i>)	<i>P. putida</i>	Naphthalene degradation	Germaine et al. (2009)
Italian rye grass (<i>L. multiflorum</i> var. Taurus)	<i>Pseudomonas</i> sp. strain ITRI53	Hydrocarbon degradation	Andria et al. (2009)
Wheat (<i>Triticum</i> sp.) and maize (<i>Z. mays</i>)	<i>Enterobacter</i> sp. 12J1	Pyrene degradation, indole acetic acid (IAA), siderophore production and inorganic phosphate solubilization	Sheng et al. (2008a)

Les travaux de Khan et al. (2013) traitent aussi de l'importance de la rhizosphère et de l'importance de l'interaction entre la plante et les microorganismes sur la biodégradation des hydrocarbures. Ils ont d'ailleurs regroupé un ensemble de plantes et les microorganismes avec lesquels elles interagissent dans le **tableau 6** ci-dessus.

Et enfin, un dernier exemple montre que la structuration du sol entraîne également une sélection sur les communautés microbiennes avec les travaux de (Nunan et al., 2003). Ils montrent en effet la relation entre la distribution spatiale des communautés bactériennes et la microarchitecture du sol (en fonction des pores) par exemple avec des échantillons d'un sous-sol, la densité bactérienne était la plus élevée près des pores pour diminuer en s'en éloignant. Cela permet de montrer que même sans micropolluants ou plantes, il y a déjà des effets des paramètres du sol sur la diversité et la structure des communautés du fait de l'interaction entre les bactéries et les constituants du sol ainsi que l'interaction entre les bactéries elles-mêmes (relation de coopération, compétitive, etc).

Les recherches sur les sols pollués même si ce n'est pas au sein des ouvrages de gestion des eaux de pluies permettent également d'avoir une base de travail pour étudier les micropolluants et les microorganismes associés. En effet, pour le bisphénol A par exemple, les travaux sont plus nombreux dans les sols pollués et cela permet d'obtenir la diversité génétique des espèces bactériennes que l'on va pouvoir retrouver faisant la biodégradation de ce micropolluant (Matsumura et al., 2009).

Sur la **figure 19**, il est possible d'observer l'analyse phylogénétique bactérienne de souches dégradant le BPA. Quatre grands groupes sont trouvés avec quelques *alphaprotéobactéries*, *bétaprotéobactéries*, quelques *firmicutes* et une forte majorité d'*alphaprotéobactéries* dont de multiples espèces de *Pseudomonas*, des *Enterobacter*, etc.

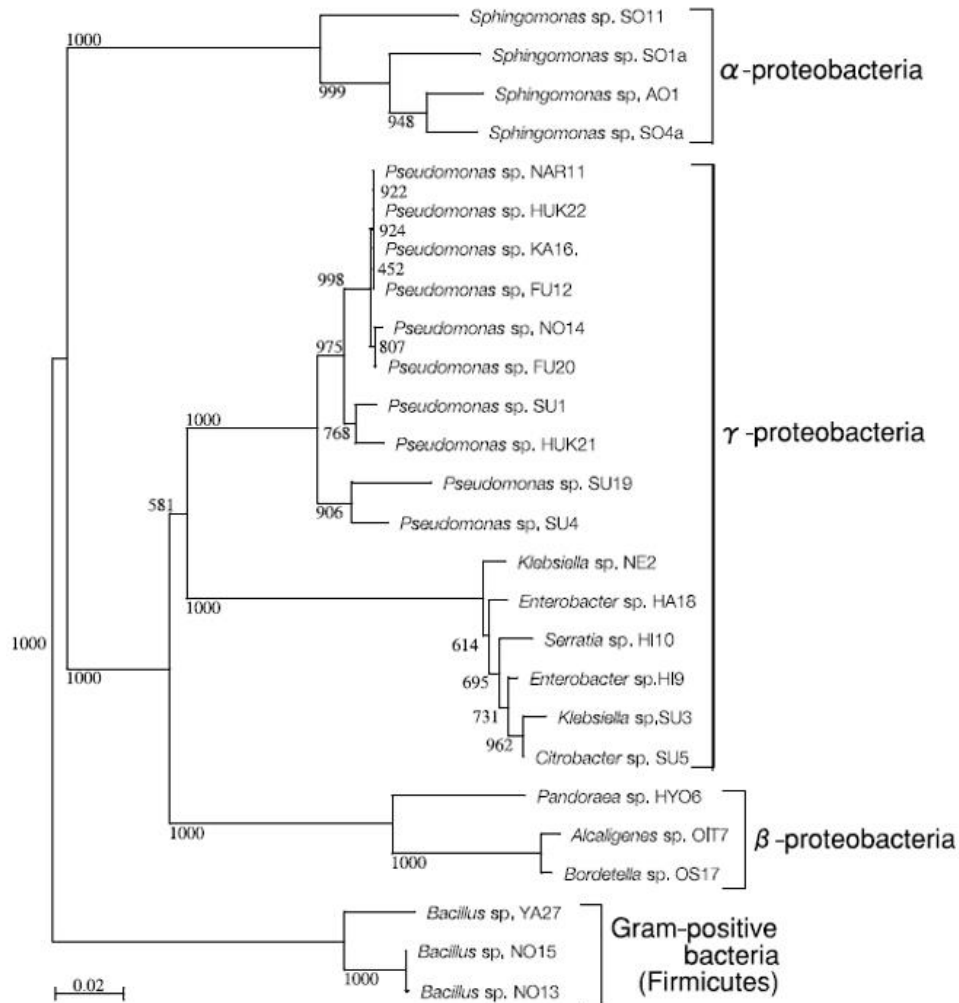


Figure 19 : arbre phylogénétique basé sur la comparaison des séquences partielles du gène de l'ARNr 16S des bactéries dégradant le BPA

On remarque lorsque l'on fait la synthèse de tous ces travaux sur les sols des ouvrages de gestion des eaux de pluies, sur les sols des techniques alternatives utilisées pour traiter les micropolluants avec d'autres types d'eau ou encore dans des sols simples pollués qu'il y a un ensemble de paramètres à prendre en compte pour pouvoir comprendre le fonctionnement de biodégradation des micropolluants dans ces systèmes particuliers. La biodégradation au sein des ouvrages de gestion des eaux pluviales se fait en interaction des microorganismes avec d'une part les micropolluants et leurs propriétés intrinsèques mais aussi avec le sol et ces paramètres physico-chimiques, avec les saisons et les différences de température au cours de l'année et enfin avec les plantes et les processus de sélection par ces derniers. Et si on étudie la biodégradation d'un ou plusieurs micropolluants dans ces systèmes, en laissant de côté un seul de ces partenaires alors les données récupérées seront incomplètes et non suffisantes pour pouvoir mettre au point un modèle de prédiction du fonctionnement des ouvrages dans le temps.

En conclusion, on peut retrouver comme travaux sur les ouvrages de gestion des eaux pluviales, des travaux sur l'étude des polluants métalliques, des polluants azotés/phosphorés et les pathogènes. Les travaux sur les HAP commencent à se faire (Liu et al., 2011) on retrouve quelques articles dessus mais il

manque les travaux sur les autres polluants organiques au sein de ces ouvrages et surtout du point de vue de la biodégradation microbienne. C'est pourquoi, les travaux pour compléter ces données sont recherchés et intéressants à réaliser. Pour pouvoir aider à l'étude de ces mécanismes, une recherche sur la biodégradation des micropolluants dans les sols est réalisée en détails

IV. Les processus de biodégradation des micropolluants dans les sols

A. La biodégradation, qu'est-ce que c'est ?

Pour commencer, la biodégradation, c'est la dégradation d'une molécule par des organismes vivants qui peuvent être des bactéries, des champignons, des algues ou encore des plantes. Elle peut avoir lieu dans toutes sortes de substrats, eau, sol, etc. Dans le cas des microorganismes, objets de la présente étude, différents processus de biodégradation peuvent être décrits (Bidaud, 1998).

- La biodégradation directe : les microorganismes dégradent le polluant de façon directe, le polluant est la source de carbone, il va servir à fournir de l'énergie à l'organisme, va permettre la croissance. Les microorganismes ciblent le polluant pour tirer profit de cette biodégradation.
- Le cométabolisme : les microorganismes ne ciblent pas le polluant, la biodégradation se fera de façon fortuite. Lors de la dégradation d'une source de carbone, le polluant se fera dégrader en même temps. La biodégradation ne sera pas forcément très élevée et les microorganismes qui dégradent le polluant ne vont pas forcément retirer des bénéfices de cette biodégradation. Par contre, d'autres organismes peuvent bénéficier des produits de cette dégradation.
- La biodégradation non enzymatique : dégradation ou diminution de la biodisponibilité en agissant sur l'environnement des polluants au lieu d'agir sur les polluants directement. Les microorganismes vont suite à leurs activités modifier leurs environnements en agissant par exemple sur le pH (acidification ou alcalinisation).

Cette biodégradation peut être incomplète ou ultime (minéralisation complète de la molécule). La biodégradation ultime est très intéressante car cela permet la dépollution des milieux contaminés et constitue la base de la bioremédiation. Cependant, dans l'environnement rien n'est aussi simple et il y a beaucoup de biodégradation incomplète qui va se faire. Le principe de cette biodégradation incomplète est que les microorganismes vont dégrader le micropolluant parent pour donner une nouvelle molécule et le problème à ce niveau, c'est que cette molécule peut être aussi toxique, voire plus toxique que la molécule mère. Les molécules filles produites sont nommées des métabolites et nécessitent une part importante de recherche (Briand et al., 2018).

La biodégradation va varier en fonction de multiples facteurs : les conditions environnementales (température, milieu), les paramètres physico-chimiques du sol (pH, granulométrie), les communautés présentes dans le milieu (faunes, flores et consortium microbien). Il faut aussi prendre en compte l'impact, le stress que vont induire les micropolluants sur les microorganismes du milieu (ici, le sol). Tous ces facteurs vont influencer sur les voies utilisées par les microorganismes pour faire la biodégradation et des métabolites différents pourront être produits en fonction de ces voies !

Donc pour comprendre comment un processus de dépollution fonctionne d'un point de vue biologique comme au sein des ouvrages de gestion des eaux pluviales, il faut prendre en compte tous ses paramètres pour avoir une vue d'ensemble sur le système, le mécanisme de biodégradation qui prend place dans le milieu.

La suite de cette partie présentera deux exemples de biodégradation de micropolluants présents dans les eaux de ruissellement (le Bisphénol A et les alkylphénols). Et la fin décrira les différents paramètres physico-chimiques du sol, la qualité du sol, les organismes vivants du sol comme les plantes, les vers de terres, les microorganismes et enfin un rappel sur les propriétés physico-chimiques des micropolluants qui vont aussi pouvoir impacter la biodégradation.

B. Les acteurs de la biodégradation

Les microorganismes vont biodégrader les substrats (les MP) en produits mais comment ? Cela se fait via la production d'enzymes. Les microorganismes vont détecter un substrat (ou MP) par une protéine régulatrice. Cette protéine va ensuite se fixer sur la région promotrice de l'opéron cible (du gène d'intérêt), se donnant ainsi le rôle d'activateur ou de répresseur de la voie de biodégradation. Dans le cas de l'activation de la voie, les gènes vont être activés et cela va aboutir à la production d'enzymes (via des mécanismes de transcription et traduction). Ces enzymes ont pour fonction d'utiliser le substrat pour lequel elles ont une affinité et vont le dégrader. Là-aussi, il est possible d'avoir des cascades de biodégradation, une enzyme va biodégrader son substrat et libérer un produit qui lui-même va être biodégradé par une enzyme spécifique en un autre produit et ainsi de suite jusqu'à la dernière étape de minéralisation complète. Les enzymes peuvent être soit spécifiques d'un substrat en particulier soit au contraire avoir un large champ d'action.

Les enzymes qui vont biodégrader les MP ne sont pas des enzymes qui existent spécifiquement pour les MP. Ce sont des enzymes qui existaient déjà dans les microorganismes (avec une autre fonction) et qui vont avoir une nouvelle utilité. Cela signifie que suite à la présence des MP en augmentation dans l'environnement, les microorganismes se sont adaptés et ont développé des systèmes qui permettent de réguler l'expression des gènes qui codent pour les enzymes intervenant dans la biodégradation de ces MP.

Plusieurs enzymes intervenant dans des voies de biodégradation :

- La laccase et la peroxydase peuvent intervenir dans de nombreuses voies de biodégradation des micropolluants comme le BPA et les Alkylphénols (Mtibaà et al., 2018)
- La cytochrome P450 monooxygénase va intervenir dans la voie de biodégradation du BPA de quelques espèces seulement
- L'ammonia monooxygénase va pouvoir intervenir pour dégrader le BPA
- La phénol hydroxylase intervient dans la biodégradation des alkylphénols
- Les dioxygénases :
 - o La catéchol 2,3-dioxygénase et la catéchol 1,2-dioxygénase vont intervenir dans la biodégradation des alkylphénols
 - o La naphtalène dioxygénase va intervenir dans la biodégradation des HAP (Waigi et al., 2015; Yang et al., 2014)
- Les oxygénases que l'on peut retrouver dans la biodégradation des pesticides (Cheng et al., 2022)

Il faut aussi se rappeler que tous les microorganismes n'auront pas les mêmes gènes (d'une espèce bactérienne à l'autre ou entre bactéries et champignons). Aussi toutes les bactéries capables de dégrader le BPA ne vont pas forcément avoir tous les gènes pour coder ces enzymes (Husain and Qayyum, 2013).

Description des enzymes intervenant dans les voies de biodégradation du BPA et des Alkylphénols :

- *bisDA* (code ferredoxine reductase) et *bisdB* (code pour P450) de la P450 bactérienne provenant de *Sphingomonas bisphenolicum* strain AO1. La P450 va intervenir dans la première étape de la réaction d'hydroxylation de la dégradation du BPA (Matsumura et al., 2009). Les métabolites retrouvés avec la P450 sont 1,2-bis(4-hydroxyphenyl)-2-propanol et 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)-1-propanol (Peng et al., 2015; Sasaki et al., 2008). Il est possible de retrouver des gènes particuliers chez les champignons également (Subramanian and Yadav, 2009).
- *pheA* et *LmPH* peuvent être retrouvés pour coder la phénol hydroxylase. *LmPH* est plus répandu dans l'environnement et fait partie de la famille à multicomposé tandis que *pheA* fait partie de la famille à un composé (Harzallah et al., 2017). La phénol hydroxylase intervient dans la première étape de dégradation des phénols (Mao et al., 2012). Et les catéchols 1,3/2,3 dioxygénase vont intervenir dans la 2^{ème} étape de dégradation des phénols (Tuan et al., 2011).
- *amoA* va coder pour l'ammonia monooxygénase, elle est retrouvée chez les bactéries et les archées (Marshall et al., 2018). Elle est impliquée dans le cycle de l'azote et intervient donc un processus de cométabolisme pour la dégradation du BPA (Cyzdik-Kwiatkowska et al., 2020).
- Les métabolites de la laccase retrouvés sont les 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-2-hydroxypropionaldehyde, 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-2,3-dihydroxypropionaldehyde, et p-1,2-dihydroxyisopropyl phenol (Peng et al., 2015; Telke et al., 2009).

C. Voies de biodégradation pour une sélection de micropolluants typiques du ruissellement urbain

1. Voies de dégradation du Bisphénol A

La biodégradation du BPA peut se faire par de multiples microorganismes, plusieurs travaux ont identifié des souches capables de faire cette biodégradation avec par exemple les travaux de (Cyzdik-Kwiatkowska et al., 2020; Matsumura et al., 2009; Peng et al., 2015; Telke et al., 2009; Zaborowska et al., 2020; Zhang et al., 2013) ou encore de (Mtibaà et al., 2018). Ce sont des travaux où ils ont mis en évidence la capacité de biodégradation du BPA chez des bactéries et des champignons isolés ou en mélanges dans différents substrats comme le sol, le sédiment, des boues. Il n'y a cependant pas d'identification de ces communautés au sein des ouvrages de gestion des eaux de pluies.

Il est possible de voir dans le **tableau 7** précédent, un regroupement des espèces bactériennes identifiées étant capables de faire la biodégradation aérobie du BPA en fonction de leur origine. Dans les sols, beaucoup de bêta-protéobactéries et gamma-protéobactéries sont trouvées avec *Alcaligenes sp.* strain OIT7, *Nitrosomonas europaea*, plusieurs *Serratia* et *Enterobacter*, il y a aussi des *Bacillus*, *Arthrobacter sp.* strain YC-RL1 des actinobactéries ainsi que quelques alphaprotéobactéries avec *Sphingomonas* et *Novosphingobium sp.*

Tableau 7 : regroupement d'espèces microbiennes capables de faire la biodégradation du BPA (Im and Löffler, 2016)

classes	bacterial isolates	origin ^a	references
α -proteobacteria	<i>Ensifer adhaerens</i> strain J3	FW	198
	<i>Sphingomonas bisphenolicum</i> strain AO1, <i>Sphingomonas</i> sp. strains MV1, AO1, SO11, BP7 and TTNP3	SS, WTP, SW	42, 47, 53, 56, 57, 199
	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> strain BP-11R and <i>Sphingobium</i> sp. strains BiD32 and YL23	FW, WTP	50, 52, 200
	<i>Novosphingobium</i> sp. strains FID3 and TYA-1	SS	51, 201
	<i>Sphingopyxis</i> sp. strain BiD10	WTP	52
	<i>Ochrobactrum</i> sp. strain T	EW	133
β -proteobacteria	<i>Alcaligenes</i> sp. strain OIT7	SS	56
	<i>Bordetella</i> sp. strain OS17	SS	56
	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain B-16	CL	202
	<i>Nitrosomonas europaea</i>	SS	74
	<i>Pandoraea</i> sp. strain HYO6	SS	56
	<i>Cupriavidus basilensis</i> strain JF1	WPT	65
	<i>Variovorax</i> sp. strain HCA	SS	^b
γ -proteobacteria	<i>Serratia rubidae</i> strain LCA3 and <i>Serratia</i> sp. strain HI10	SS, FW	56, 203
	<i>Enterobacter gergoviae</i> strain BYK-7, <i>Enterobacter</i> sp. strains HI9, HA18, BPR1 and BPW5	SS, WTP	56, 116, 204
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain BYK-9, <i>Klebsiella</i> sp. strains NE2, SU3 and SU5	SS, WTP	56, 204
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	SS	205
	<i>Pseudomonas montellii</i> strain N-502, <i>Pseudomonas paucimobilis</i> strain FJ-4, <i>Pseudomonas knackmussii</i> strain B13, <i>Pseudomonas putida</i> strain KAS, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strains LCS1, 1, and 2, <i>Pseudomonas</i> sp. strains LBC1, KA4, SU1, SU4, SU19, KU1 and KU2	SS, WTP, SW, FW, UI	56, 59, 82, 123, 203, 206–209
bacillus	<i>Bacillus cereus</i> strain BPW4, <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain Bak15a, <i>Bacillus</i> sp. strains BP-2CK, BP-21DK, GZB, NO13, NO15, YA27 and KU3	SS, WTP, SW, FF	56, 107, 138, 209–211
actinobacteria	<i>Streptomyces</i> sp.	FW	212
	<i>Mycobacterium vanbaalenii</i> strain PYR-1	FW	71
	<i>Arthrobacter</i> sp. strain YC-RL1	SS	213

^aSS: soil/sediment; WTP: wastewater treatment plant; SW: seawater; FW: freshwater; EW: electric waste recycling site; CL: compost leachate; UI: unidentified; FF: fermented food. ^bIm et al., unpublished.

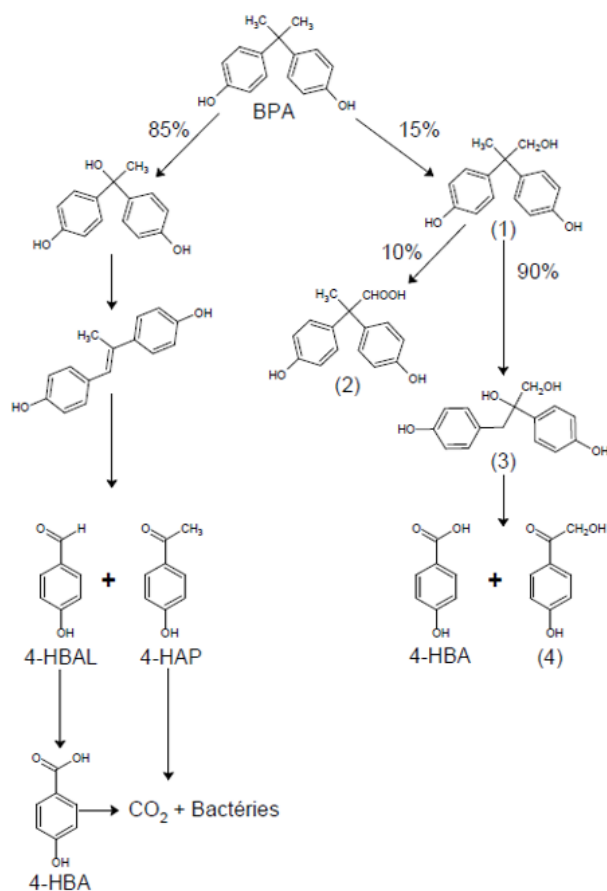


Figure 20 : mécanismes de biodégradation du BPA (Spivack et al., 1994)

Comme citées dans les parties précédentes, plusieurs voies de biodégradations seront possibles en fonction des facteurs environnementaux et des microorganismes présents. Des enzymes spécifiques seront produites pour faire ces voies et des métabolites encore une fois spécifiques seront obtenus en fonction de ces voies.

Les deux voies de biodégradation les plus connues sont des voies bactériennes que l'on retrouve dans les travaux de (Spivack et al., 1994).

Sur cette **figure 20**, ces deux voies sont représentées avec une voie principale (85%) tandis que l'autre est une voie secondaire (15%). Quatre métabolites principaux sont identifiés en résultat de ces voies. Les métabolites sont 4-hydroxyacetophénone (4-HAP), acide 4-hydroxybenzoïque (4-HBA), 4-hydroxybenzaldéhyde (4-HBAL), (4) 4-hydroxyphenacyl alcool (4-HPA). Un autre métabolite mineur est aussi trouvé en (2) le 2,2-bis acide propionique (4-hydroxyphényl). Il est aussi possible que cette biodégradation soit ultime donc que le BPA soit complètement minéralisé en CO_2 et H_2O .

Mais il existe des voies moins connues comme celles qui s'effectuent par cométabolisme ou encore par d'autres organismes tels que les champignons, les algues, les plantes et enfin par des processus abiotiques (Im and Löffler, 2016) que l'on va retrouver dans la **figure 21**.

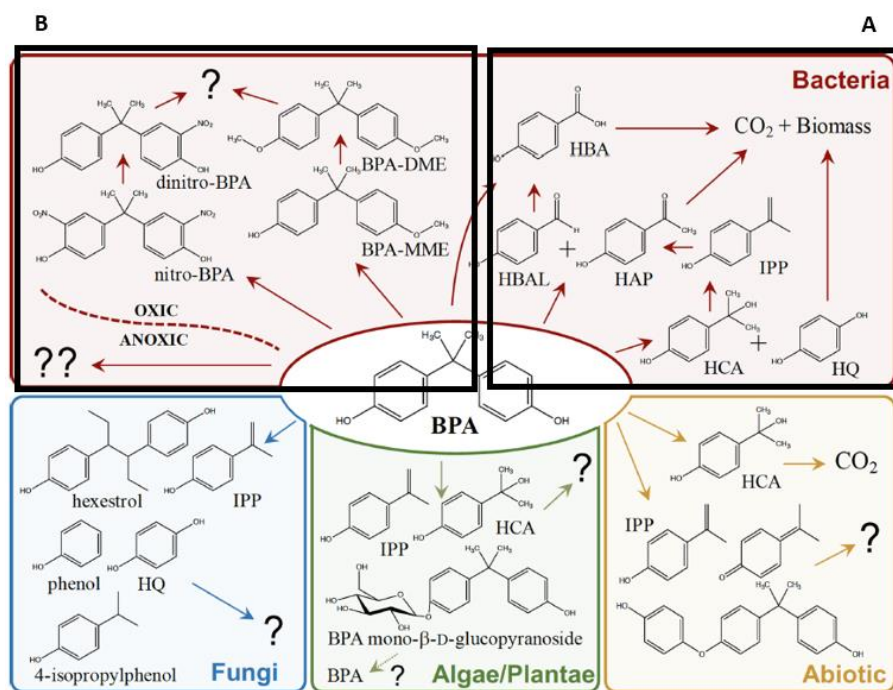


Figure 21 : isolats bactériens capables de dégrader le BPA en conditions oxiques et leur origine (Im and Löffler, 2016)

Au niveau du carré noir A : les principales voies bactériennes sont retrouvées.

Avec le carré B, ce sont d'autres voies bactériennes minoritaires qui s'effectuent lors du cométabolisme avec par exemple *Mycobacterium sp.* qui va catalyser une O-méthylation du BPA pour donner des éthers de mono et diméthyl (BPA-MME et BPA-DME).

Les voies des champignons, des plantes et des processus abiotiques sont retrouvées dans les carrés bleu, vert et jaune.

2. Les Alkylphénols

Comme pour le BPA, la biodégradation des alkylphénols peut se faire par de multiples espèces que l'on peut retrouver dans les travaux de (Bergé, 2013; De Weert et al., 2010; Moon and Song, 2012; Nowak et al., 2019; Subramanian and Yadav, 2009), (**Tableau 8**, Moon and Song, 2012). Il est possible de retrouver dans les bactéries : *Acinetobacter baumannii*, *Arthrobacter nicotianae*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, *Sphingomonas sp.* Et pour les champignons, les espèces qui peuvent être retrouvées sont *Bjerkandera sp.*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus* et *Trametes versicolor* (Bergé, 2013). Les sources de ces microorganismes étant aussi variées que pour le BPA.

Tableau 8 : dégradation de 100mg/L d'alkylphénols par plusieurs champignons de pourriture blanche cultivés pendant 5 jours dans 20ml de milieu YMG

Fungal strain	Octylphenol removal (%)		Nonylphenol removal (%)		Phenylphenol removal (%)	
	3 h	2 days	1 days	3 days	3 h	2 days
<i>I. lacteus</i>	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0
<i>T. versicolor</i>	79.2±4.7	100±0	33.5±6.3	81±0	98.7±1.7	100±0
<i>T. versicolor</i> MrP1	46.3±8.0	100±0	62.5±12.2	100±0	100±0	100±0
<i>T. versicolor</i> MrP13	Not tested	83.7±13.9	17±2.8	48±0	40.3±9.6	100±0
<i>T. versicolor</i> MnP2-6	100±0	100±0	95.2±4.7	100±0	100±0	100±0
<i>P. brumalis</i>	Not tested	76.6±0	0±0	58.5±12.0	100±0	100±0
<i>Fomitella fraxinea</i>	50.1±7.1	100±0	60.5±3.5	68±5.6	92.2±0.96	100±0
<i>P. ostreatus</i>	16.5±2.0	100±0	Not tested	Not tested	36.6±0	100±0
<i>S. commune</i>	Not tested	9.6±4.3	9.5±0.7	83±4.2	Not tested	0±0

Par contre, les voies de biodégradations des Alkylphénols sont plus complexes que pour le BPA. Sur la **figure 22** en-dessous, la voie des Nonylphénols polyéthoxylés est représentée.

En partant des Nonylphénols polyéthoxylés (NPnEO), il y a 2 devenirs possibles. D'un côté, la voie non oxydative avec la dégradation de la chaîne polyéthoxylée, ce qui va la raccourcir rapidement allant jusqu'à NP1-2EO puis obtention du 4-NP. De l'autre côté, la voie oxydative, c'est-à-dire que le NPnEO va subir une oxydation de la chaîne éthoxylée ce qui va donner du NPnEC. Le NPnEC va comme pour le NPnEO se dégrader pour donner des chaînes courtes NP1-2EC. A ce niveau, en fonction de l'environnement le NP1-2EC va donner en milieu aérobie du 4-NP ou en milieu micro-aérobie du CAPnEC. Une fois au 4-NP, la deuxième étape de la biodégradation se fait en milieu aérobie uniquement et le NP va subir une minéralisation complète pour donner une chaîne alcool, généralement ramifiée, et une hydroquinone puis du CO₂ et de l'H₂O (Bergé, 2013; Cladière, 2012; Giger et al., 2009; Jonkers et al., 2001; Lardy-Fontan, 2008; Mao et al., 2012).

- La température : elle va influencer la solubilité des micropolluants et aussi influencer les communautés microbiennes présentes ou simplement sur leurs activités métaboliques. Les impacts des saisons sont donc importants à prendre en compte (Rasche et al., 2011).
- La teneur en eau : elle permet d'avoir des informations sur l'agrégation du sol, la structure et l'aération du sol. Il faut définir pour cela la capacité aux champs.
- La capacité d'échange cationique : La CEC exprime la charge totale de cations échangeables qu'une masse unitaire de sol sec est capable de retenir dans des conditions de pH bien définies (Sposito., 2008).

Tous ses paramètres sont importants et il faut pouvoir les prendre en compte au maximum pour être le plus précis dans la description des mécanismes de biodégradation. Des modifications dans un de ses paramètres peuvent entraîner des modifications sur les communautés microbiennes qui impacteront indirectement la biodégradation et fausseraient la mise en place d'un modèle.

Par exemple dans les travaux de Gomez et al. (2006), il est possible de voir l'influence d'amendement de matière organique sur les communautés microbiennes sur du court terme.

Ces travaux portent sur l'impact d'un amendement sur un site horticole dans une optique de gestion durable de restauration du sol, en se concentrant sur l'aspect microbiologique car les réponses aux changements environnementaux sont plus rapides que pour les propriétés physiques et chimiques. Pour cela, un site en culture horticole depuis plus de 20 ans a été testé, un amendement en vermicompost a été fait en mai et les échantillonnages ont été réalisés en avril et novembre de la même année sur les 15 premiers centimètres du sol. Un site témoin sans amendement et sans culture a aussi été prélevé en parallèle. Les profils de fonctionnement physiologiques des communautés microbiennes ont été mesurés par des plaques Biolog EcoPlate et le carbone organique du sol a aussi été estimé par oxydation de la matière organique. Les résultats montrent des changements de la diversité fonctionnelle microbienne dans les plaques Biolog sur du court terme en réponse aux applications d'amendement. On observe une stimulation de l'activité des populations microbiennes suite aux amendements qui pourrait s'expliquer par l'augmentation de la biodisponibilité du carbone organique (apporté par les amendements).

En lien avec la richesse du sol, la profondeur du sol dans laquelle l'étude des microorganismes s'effectue est aussi importante à prendre en compte car les activités vont se trouver plutôt à la surface du sol tandis qu'en profondeur il y aura moins d'activité sûrement dû au manque de source carbonée (Fierer et al., 2003).

Il est aussi possible de voir l'impact du pH sur les populations et les activités microbiennes grâce aux travaux de (Pietri and Brookes, 2008). Ils souhaitent dans leurs travaux montrer l'effet du pH sur les populations microbiennes sans que la composition du sol ou les différences en gestion du sol interviennent. C'est pourquoi ils utilisent un site expérimental, la bande acide de Hoosfield (« the long term arable field experiments at Rothamsted Research, UK ») qui possède un gradient de pH allant de 3,7 à 8,3 avec un seul type de sol. Le sol a été échantillonné sur une profondeur de 23 cm sur les zones de pH différentes. Le pH (pH-mètre dans de l'eau), la biomasse microbienne (méthode de l'extraction-fumigation) et l'activité microbienne (mesure de la production du CO₂) ont été étudiés. Ils ont trouvé une relation significative entre le pH et la biomasse microbienne confirmant l'importance de la matière organique du sol et du pH dans la stimulation de la croissance microbienne. La biomasse microbienne et l'activité microbienne se stabilisent autour d'un pH 5-7 mais augmentent aux pH extrêmes (acide ou

basique) synonyme de stress pour les microorganismes. Ils montrent ainsi l'effet d'un gradient de pH sur les populations microbiennes sans que les autres paramètres du sol n'induisent de biais.

2. Qualité du sol : activité enzymatique du métabolisme pour mesurer les impacts sur les populations microbiennes

Lorsque l'on étudie les pollutions de sol, il est important de prendre en compte l'état du sol en premier lieu d'un point de vue physico-chimique comme aperçu dans le point précédent mais aussi biologique (Fierer et al., 2021). Cela permet d'avoir un point de départ et un suivi de l'impact du stress des micropolluants sur le métabolisme des microorganismes et cela peut passer par l'analyse enzymatique du sol qui va nous donner l'état global de la communauté microbienne. Il y a plusieurs enzymes qui peuvent être étudiées pour déterminer la qualité d'un sol comme la déshydrogénase, l'uréase, la catalase ou encore l'hydrolase de diacétate fluorescéine (FDA) et bien d'autres. Le diacétate de fluorescéine peut être hydrolysé par un ensemble d'enzymes non spécifiques dans l'environnement (protéase, lipase, estérase) qui interviennent dans la décomposition de tissu. Ces enzymes non spécifiques vont beaucoup se retrouver dans les microorganismes décomposeurs tels que les bactéries et les champignons. Ces décomposeurs représentant une part importante de l'activité du sol, ils peuvent être considérés comme de bons bioindicateurs de l'activité microbienne du sol (Adam and Duncan, 2001).

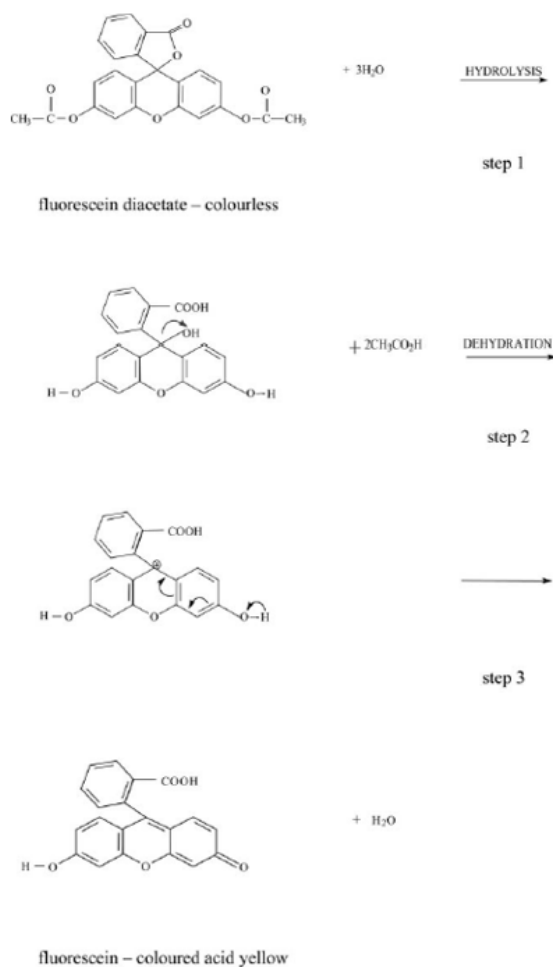


Figure 23 : réaction de transformation de la fluorescéine diacétate en fluorescéine

Sur la **figure 23** (Adam and Duncan, 2001), il est expliqué le détail de la voie de conversion du diacétate de fluorescéine. C'est un composé qui est incolore et suite à son hydrolyse, il va donner la fluorescéine qui est un composé coloré jaune/vert brillant. La fluorescéine va avoir une absorbance à 490nm qui pourra être mesurée par un spectrophotomètre. Il sera possible de déterminer l'activité microbienne par rapport à la quantité de fluorescéine produite par la FDA.

Plusieurs recherches ont été faites dans des milieux pollués avec des métaux ou encore des HAP pour vérifier l'utilité de la FDA comme indicateur biochimique pour évaluer la qualité d'un sol (Tao et al., 2021).

La déshydrogénase est une des plus importantes enzymes utilisées car elle est présente dans tous les microorganismes (Kaczyńska et al., 2015). C'est une enzyme qui va oxyder la matière organique du sol en transférant des protons et électrons des substrats organiques aux accepteurs inorganiques. Elle est très sensible aux changements qu'ils soient chimiques ou physiques. L'activité de la déshydrogénase est utilisée comme indicateur de l'activité respiratoire microbienne du sol (Campos et al., 2019). Contrairement au diacétate de fluorescéine qui peut être hydrolysé par un ensemble d'enzymes (FDA) intracellulaire ou extracellulaire, la déshydrogénase fait partie intégrante des cellules microbiennes et représente l'activité oxydative microbienne du sol (Zabaloy et al., 2008). Son activité est déterminée par la réduction du chlorure de triphényltétrazolium (TTC, blanc) en triphénylformazan (TPF, rouge). Cette couleur rouge va ensuite pouvoir être lue au spectrophotomètre à une absorbance de 485nm.

Pour la FDA et la déshydrogénase, c'est l'activité microbienne du sol qui va être ciblée grâce à leur rôle dans la décomposition de la matière organique du sol mais il y a un autre critère à regarder comme la fertilité du sol avec l'implication des microorganismes dans les cycles biogéochimiques. L'analyse enzymatique des enzymes intervenant dans ces cycles permet de s'assurer le bon fonctionnement de l'écosystème. Les cycles biogéochimiques à cibler sont par exemple le cycle de l'azote ou encore le cycle du phosphore (Brohon et al., 2001). L'uréase est une enzyme qui intervient dans le cycle de l'azote. Elle va hydrolyser l'urée en ammoniac et l'absorbance à utiliser est 578nm.

Dans les travaux de Kizilkaya et al. (2004) :

Pour la déshydrogénase : 10g de sol humide avec 10ml de TTC à 0,8% dans du tampon Tris (pH 7,6) incubés à 30°C pendant 24h à l'obscurité. Le TPF formé a été extrait avec 50ml d'une solution d'extraction (90% acétone et 10% CCl₄) par agitation vigoureuse (1min) puis filtration sur papier filtre Whatman 42. Le TPF est ensuite mesuré par spectrophotométrie à 485nm en utilisant la solution d'extraction comme blanc.

Pour l'uréase : 10g de sol sec ont été incubés avec un tampon citrate de 7,5ml (pH 6,7) et 10ml de solution de substrat d'urée à 10% à 37°C pendant 3h. Le volume a été porté à 100ml d'eau distillée à 37°C. Ensuite filtration sur papier filtre Whatman 42, 1ml de filtrat a été dilué à 10ml avec de l'eau distillée et 4ml de phénolate de sodium (12,5% de phénol et 5,4% de NaOH) ainsi que 3ml d'hypochlorure sodium à 0,9% ont été ajoutés. La quantité d'ammonium libéré a été déterminée par spectrophotométrie à 578nm.

Dans les travaux de Brohon et al. (2001) :

Pour la phosphomonoestérase : 2g de sol ont été mélangés avec 8ml de tampon Tris pH 8, 0,5ml de toluène et 2ml 0,01M pNPP (p-nitrophényl phosphate) et ont été incubés dans un bain à 37°C pendant 1h. Après incubation, 1ml de CaCl₂ (0,5M) et 2ml de NaOH (1M) ont été ajoutés et la suspension a été centrifugée 10min à 2500g avant filtration. La mesure du pNP (p-nitrophénol) a été faite au spectrophotomètre à 400nm.

Pour bien illustrer l'importance de l'étude des enzymes du sol, les travaux de Kaczyńska et al. (2015) sont un bon exemple. Ils ont voulu observer les effets que pouvaient avoir des produits pétroliers sur les déshydrogénases du sol et ensuite évaluer la biostimulation avec du compost de la restauration de l'homéostasie du sol pollué. L'expérience en laboratoire a duré 180 jours et 100g de sable limoneux ont été utilisés (provenant du site de la station expérimentale). Les concentrations des produits pétroliers (biodiesel, gasoil, fioul et essence) étaient de 0 ; 2 ; 4 ; 8 et 16 g/kg de MS de sol. L'incubation s'est faite à 25°C à l'obscurité et avec une humidité maintenue à 50% de la capacité au champ. L'analyse de la déshydrogénase s'est faite à 15, 30, 60, 90 et 180 jours avec la lecture de l'absorbance à 485nm au spectrophotomètre (après préparation des solutions). Plusieurs impacts ont été montrés : le biodiesel, le gasoil et le fioul stimulent les déshydrogénases tandis que l'essence va les inhiber. Ce sont des résultats qui sont corrélés avec le type des produits pétroliers et qui sont retrouvés dans d'autres travaux (Kucharski and Jastrzębska, 2006; Wyszowska et al., 2002). La stimulation des déshydrogénases pourrait s'expliquer par le fait que le fioul, le gasoil sont des sources de substrats pour les microorganismes. Et enfin la biostimulation du sol par le compost peut permettre la stimulation des déshydrogénases et accélérer la dégradation microbiologique des produits pétroliers.

3. Rôles de la faune et de la flore

Les organismes vivants autres que les microorganismes vont aussi avoir des rôles très importants dans le sol et ils vont interagir directement ou indirectement avec les microorganismes ce qui va influencer la biodégradation des micropolluants.

D'un côté, il y a la faune avec notamment les vers de terre, ce sont des ingénieurs du sol. Ils vont modifier leur habitat et celui des autres organismes (Bohlen and Edwards, 1995). Ils vont modifier la biodisponibilité de la matière organique présente dans le sol, ils vont aérer le sol et permettre une meilleure infiltration de l'eau. Ceci impacte indirectement les microorganismes en modifiant leur environnement mais il peut également y avoir des impacts directs avec la stimulation spécifique de microorganismes via leur passage par les intestins des vers de terre ce qui va modifier la diversité microbienne (Amossé et al., 2013). Cette interaction qu'il est possible de trouver entre vers de terre et microorganismes peut être étudiée plus en profondeur pour observer un effet domino. En effet dans les travaux de Ning et al. (2019), il est possible d'observer que lors d'une exposition au cadmium les vers de terre vont modifier leurs fonctions physiologiques en réponse au stress ce qui va par la suite induire un changement dans la communauté microbienne.

D'un autre côté, il y a la flore dont les interactions avec les microorganismes via les exsudats racinaires ont déjà été vus dans la partie 3. Cependant les plantes ne vont pas seulement interagir avec les microorganismes dans les sols, ils peuvent également modifier leur environnement avec par exemple l'acidification des sols (Gruba and Mulder, 2015). Cette acidification va modifier les paramètres physico-chimiques du sol et cela peut encore une fois impacter indirectement les capacités de biodégradation des microorganismes. Le point intéressant à retenir dans cette interaction plante-microorganisme est de pouvoir avoir un système de dépollution synergique, c'est-à-dire de trouver de bons partenaires qui vont se stimuler pour avoir un taux de biodégradation des polluants plus importants que s'ils avaient été seuls (Chaudhry et al., 2005).

4. Interaction entre les microorganismes et performance de la biodégradation des micropolluants

Il y a différentes formes d'interactions entre les microorganismes qui peuvent être positives, négatives ou neutres et cela va pouvoir moduler les capacités de biodégradation en les stimulant ou les inhibant (Bidaud, 1998). Parmi les interactions qui nous intéressent, il y a le commensalisme, le synergisme, la compétition et l'antagonisme.

Ces différentes interactions que l'on trouve entre les microorganismes montrent bien l'importance d'étudier le consortium du sol plutôt que des microorganismes isolés car la capacité de biodégradation sera différente par une espèce seule ou au sein d'une communauté. Et comme les communautés peuvent changer en fonction de la pression de sélection du sol étudié, on peut avoir des communautés qui seront plus ou moins adaptées au micropolluant étudié, plus ou moins efficaces pour le biodégrader. Ces communautés peuvent bien sûr s'adapter au micropolluant suite à la pression de sélection qu'il applique dans le sol (Paissé et al., 2008; Schimel et al., 2007).

Ce concept d'adaptation par les microorganismes peut être illustré dans les travaux de (Bourceret et al., 2016). Ils ont voulu étudier l'adaptation des microorganismes dans un sol pollué par les métaux et les HAP depuis de longues années. Pour cela, ils ont récupéré du sol contaminé provenant d'un site d'étude créé en septembre 2005. Deux parcelles ont été étudiées, un sol nu (BS) et un sol avec de la luzerne co-inoculé avec 2 souches de champignons *Funneliformis mosseae* et *Rhizophagus intraradices* (Msm). Les parcelles ont été suivies deux fois par an (mai et septembre) pendant six ans. Les communautés microbiennes et leurs activités ont été suivies par une analyse de biologie moléculaire. L'ADN génomique total du sol a été extrait pour ensuite être utilisé pour faire une qPCR pour déterminer l'abondance bactérienne (amorces 968F/1401R pour cibler le gène de l'ARN 16S) et l'abondance fongique (amorces FF390R/Fung5F pour cibler le gène de l'ARN 18S). L'ADN extrait a aussi été utilisé pour faire du séquençage. Amplification de la région V4-V5 du gène de l'ARN 16S par les amorces 515F/907R pour les bactéries et de la région ITS1 par les amorces ITS1F/ITS2 pour les champignons par PCR. Les produits PCR ont ensuite été pyroséquencés. Les auteurs ont observé qu'au cours du temps, l'abondance bactérienne (moyenne de $1.69 \times 10^9 \pm 0.58 \times 10^9$ de copie du gène de l'ARN 16S/g dw soil) est 10 fois plus importante que l'abondance fongique (moyenne de $2.14 \times 10^8 \pm 0.15 \times 10^8$ de copie du gène de l'ARN 18S / g dw soil).

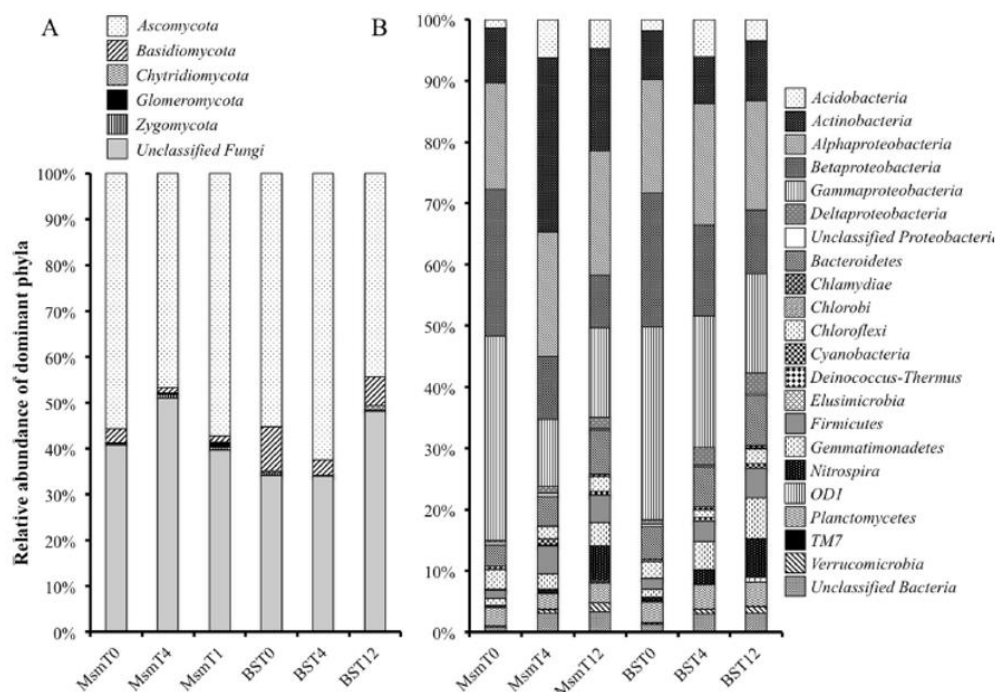


Figure 24 : visualisation des changements au sein des structures bactériennes (droite) et fongiques (gauche) au cours du temps entre les 2 traitements (sol nu « BS » et planté « Msm ») à 3 moments (T0, T4 = 2 ans et T12 = 6 ans)

Il est possible de voir des augmentations ou des diminutions de l'abondance au sein de ces phylums comme pour les actinobactéries qui vont beaucoup augmenter à T4 pour ensuite diminuer à T12 (**Figure 24**). Les Gammaprotéobactéries et Bétaprotéobactéries vont eux diminuer au cours du temps. Même chose pour les champignons, des différences sont à observer avec par exemple l'augmentation significative des Glomérormycètes à T12. De la même façon, il est possible de voir des changements au sein des communautés en présence ou non des plantes. L'augmentation de l'abondance chez les Actinobactéries et les Glomérormycètes ne s'observe qu'en présence des plantes. Ils observent donc une forte abondance microbienne sûrement due à la forte présence de carbone apporté par les polluants. Une sélection de microorganismes au cours du temps est observée avec aussi la sélection rhizosphérique. Les plantes vont fournir d'autres sources de carbone plus faciles à dégrader que les polluants ce qui augmente la diversité microbienne.

5. Effets des paramètres intrinsèques des micropolluants et les effets cocktails

Pour rappel, les différentes propriétés physico-chimiques des micropolluants sont la structure chimique, la solubilité, l'hydrophobicité et la persistance. Ces paramètres influencent leurs comportements dans le milieu (sol, eau, air) c'est-à-dire s'ils vont s'accumuler dans le sol (bioaccumulation), s'ils vont avoir une grande mobilité et pouvoir rejoindre les nappes phréatiques ou s'ils vont se volatiliser. Dans les ouvrages de gestion des eaux pluviales, l'objectif est d'éviter la dispersion, la bioaccumulation des micropolluants et la biodégradation est une étape clé pour éviter ces deux phénomènes. Il faut cependant ne pas oublier que les microorganismes ne vont pas pouvoir biodégrader les MP s'ils n'y ont pas accès, si les MP ne sont

pas biodisponibles. La biodisponibilité correspond donc aux « interactions physiques, chimiques et biologiques individuelles qui déterminent l'exposition des organismes aux produits chimiques associés aux sols et aux sédiments » (Ehlers and Luthy, 2003). Les processus de sorption des micropolluants sur les substrats vont donc limiter leur biodégradation par les microorganismes. Cependant, il y a différents types de microorganismes dont certains qui se seront adaptés aux molécules difficilement accessibles. Il y a les microorganismes qui vont produire des biosurfactants pour désorber les micropolluants (Bezza and Chirwa, 2017) ou encore des enzymes extracellulaires pour biodégrader les micropolluants à distance et enfin il y a les opportunistes qui vont récupérer les micropolluants désorbés par les autres (Ren et al., 2018).

En regroupant les propriétés du sol et des micropolluants, il est possible d'aller jusqu'à dire que la constitution du sol plus ou moins riche en matière organique va influencer la capacité des micropolluants à s'adsorber (Lima et al., 2012) et donc influencer la biodégradation microbienne. C'est tout un cheminement qu'il faut prendre en compte pour pouvoir expliquer la biodégradation microbienne dans les sols afin de récupérer des données pour expliquer le fonctionnement des ouvrages.

Il y a un autre aspect des micropolluants qu'il faut prendre en compte. Dans un sol, que ce soit un sol nu, un sol avec des plantes ou encore un sol au sein des ouvrages, tous les micropolluants sont en contacts. Que ce soit des micropolluants métalliques, organiques ou même des fortes concentrations en nutriments. Il est donc important d'étudier des cocktails de micropolluants afin de prendre en compte cette interaction. En effet, l'interaction entre micropolluant peut modifier leur comportement dans le sol (dos Reis et al., 2017), peut augmenter ou diminuer leur toxicité (Chaperon and Sauvé, 2007; El-Nahhal and Hamdona, 2017) et peut de ce fait encore une fois impacter la biodégradation dans le sol (microbienne ou autre).

Dans les travaux de El-Nahhal and Hamdona. (2017), les auteurs ont voulu montrer les effets (synergie ou antagonisme) que pouvaient avoir un mélange d'herbicides sur les cultures. Pour cela, ils ont utilisé trois herbicides (l'alachlore, le bromacil et le diuron) seuls ou en mélange sur trois plantes (le melon, le Molokhia et le blé). Ils ont regardé la capacité d'adsorption, le potentiel de lessivage et la phytotoxicité des trois herbicides. Pour la phytotoxicité, ils ont estimé l'inhibition de la croissance en calculant la hauteur des plantes (les données ont été utilisées pour calculer la CE_{50} de chaque herbicide et la valeur la plus basse de CE_{50} correspond à la phytotoxicité la plus élevée). Ils ont pris des graines des 3 plantes pour les expériences provenant d'un magasin local à Gaza et ils ont récupéré du sol (30 premiers centimètres) à Gaza provenant d'un site agricole qui n'a pas eu d'herbicides depuis au moins 5 ans. En résultats, ils ont obtenu que l'alachlore s'accumulait en profondeur dans le sol (plus aucune trace dans les 5 premiers centimètres), tandis que le bromacil et le diuron s'accumulaient dans les 8 premiers centimètres du sol. Pour la phytotoxicité avec les herbicides seuls, les CE_{50} les plus faibles obtenus sont 1,64 pour le melon et 0,15 pour le Molokhia avec le diuron et le blé à 0,08 avec le bromacil (CE_{50} exprimé en mg/kg de sol). Avec les mélanges, des différences apparaissent car le mélange alachlore et diuron était le plus toxique pour le melon alors que le mélange alachlore et bromacil était le plus toxique pour le Molokhia et le blé. Avec le mélange des trois herbicides, la toxicité (CE_{50} exprimé en TU/kg de sol) était la plus importante sur le Molokhia (3,02) que le melon (32,17) et le blé (633,9). Ce qui montre au final que le Molokhia est la plante la plus sensible. Pour les mélanges de polluants, il a été observé des effets synergiques (diuron avec alachlore ou bromacil) mais également des effets antagonistes (bromacil et alachlore) qui peuvent

s'expliquer par des interactions hydrophobiques entre les herbicides ce qui aboutit à former un complexe qui emprisonne les molécules d'herbicides en les relâchant très lentement ce qui diminue la phytotoxicité.

Et de façon indirecte, des interactions entre micropolluants vont modifier les capacités de biodégradation du sol en agissant sur les enzymes comme il est possible de le voir dans les travaux de (Chaperon and Sauvé, 2007).

Pour conclure, des études se font sur l'efficacité d'épuration de ces ouvrages via la rétention des micropolluants dans le sol ou dans le substrat (ex : sable) mis en place de l'ouvrage (Fardel et al., 2020; Zarezadeh et al., 2018) mais sans savoir ce que deviennent ces micropolluants ensuite.

La problématique qui émerge est donc de savoir ce que deviennent les micropolluants organiques ? les micropolluants organiques contrairement aux micropolluants métalliques qui sont conservatifs (s'accumulent dans le sol) vont avoir la possibilité d'être dégradés, ils sont dégradables. Mais comment sont-ils dégradables ? Quels processus sont mis en place ? Quels organismes interviennent ? Avec quelle efficacité ces micropolluants organiques sont-ils dégradés ?

Il manque la partie « perte » dans les études sur les ouvrages de gestion des eaux pluviales. Bien sûr, depuis que cette problématique a émergé différents travaux ont vu le jour sur ces processus impliquant une perte des micropolluants organiques au sein de ces ouvrages. Cependant, ces travaux restent très peu nombreux. Il y a beaucoup de processus à étudier car une diminution de la concentration des micropolluants peut subvenir à cause de phénomènes de volatilisation par exemple, la photodégradation peut aussi avoir lieu et les organismes vivants du sol peuvent également réaliser de la biodégradation. En plus de ces processus multiples, il y a de multiples familles de micropolluants comme vu précédemment dans la partie 1 qui vont avoir des comportements différents dans le sol impactant le type de dégradation qui pourra avoir lieu. Ce pan sur l'étude des pertes des micropolluants organiques au sein des ouvrages est donc très large et malgré l'apparition d'études sur le sujet cela reste encore insuffisant pour comprendre les mécanismes qui interviennent.

Chapitre 2 : Sites d'étude et méthodes d'analyse

V. Echantillonnage du sol d'ouvrages de gestion des eaux pluviales

Les sols ont été échantillonnés au niveau de trois sites d'étude, choisis parmi ceux précédemment étudiés dans la thèse de Tedoldi (2017). Il s'agit de sites de voiries dont les eaux de ruissellement sont gérées à la source par infiltration dans des sols végétalisés : la RD212 à Compans (77), la rue Charles Heller à Vitry (94) et la RD116 à Dourdan (91). Ces sites correspondent à une même nature de ruissellement (voirie) et présentent une forte contamination des sols au niveau des zones d'arrivée du ruissellement d'après les travaux de Tedoldi (2017).

Six ouvrages de gestion des eaux de ruissellement (ou sections d'ouvrages indépendantes) ont été identifiés et étudiés sur ces trois sites. Ils diffèrent de part :

- La nature du sol (limon argileux, limon ou limon sableux),
- Le mode d'alimentation en eau (alimentation par ruissellement diffus ou apport centralisé),
- L'âge de l'ouvrage, ou la durée depuis la dernière maintenance lourde,
- La nature du couvert végétal.

Sur chaque site, les points d'échantillonnage ont été choisis de façon à pouvoir comparer la zone la plus sollicitée par les eaux de ruissellement (zone « amont ») avec une zone témoin rarement sollicitée par le ruissellement (zone « aval »).

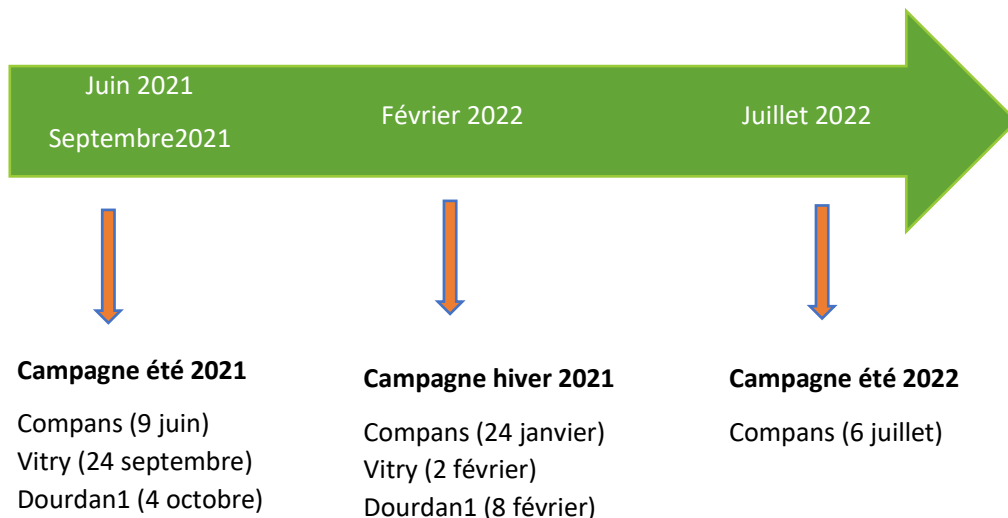


Figure 25 : détails des campagnes de prélèvements des sols sélectionnés pour étude

Plusieurs campagnes ont été réalisées entre juin 2021 et juillet 2022 afin d'analyser la variabilité saisonnière (différence été/hiver) et l'évolution temporelle (**figure 25**) :

- Les campagnes réalisées en été 2021 et en hivers 2021 sur les 3 sites vont permettre la comparaison des ouvrages entre eux et également étudier l'effet saisonnier.

Les campagnes centrées sur Compans, en été 2021 et été 2022 vont permettre d'étudier l'évolution de cet ouvrage au cours du temps.

A. Description des sites d'études et stratégie d'échantillonnage

Tableau 9 : tableau regroupant les sites et sols étudiés

Sites	Pollution	Type de la structure	Texture du sol	Âge au moment de l'échantillonnage
Dourdan	Forte pollution de voirie	Bassin d'infiltration	Limoneux sableux	25 ans
Vitry	Pollution de voirie moyenne	Noue	Argileux	15 ans
Compans	Forte pollution de voirie	Une noue / deux bandes enherbées	Limoneux sableux (avec un substrat filtrant : B2 et N)/ Argile fine(B1)	5 ans / 1 an

Les données obtenues lors de la thèse de Tedoldi (Tedoldi, 2017b) sur les travaux des trois sites nous ont donné des indications sur la distribution spatiale des métaux. Comme il est possible de le voir sur la **figure 26**, les concentrations sont fortes au niveau de l'arrivée des eaux mais diminuent rapidement en s'éloignant de l'arrivée pour atteindre un niveau de bruit de fond. Sur la **figure 27**, les profils verticaux ont montré l'accumulation des métaux (ex du zinc) dans la couche supérieure du sol. Pour le site de Compans et de Dourdan, les micropolluants s'accumulent sur les 10 et 30 premiers centimètres du sol, pour le site de Vitry, l'accumulation des micropolluants se fait sur les cinq premiers centimètres. En dessous de la couche supérieure du sol, la concentration en polluants chute rapidement pour rejoindre celle du sol témoin. La profondeur d'échantillonnage est choisie pour correspondre à cette couche de surface contaminée.

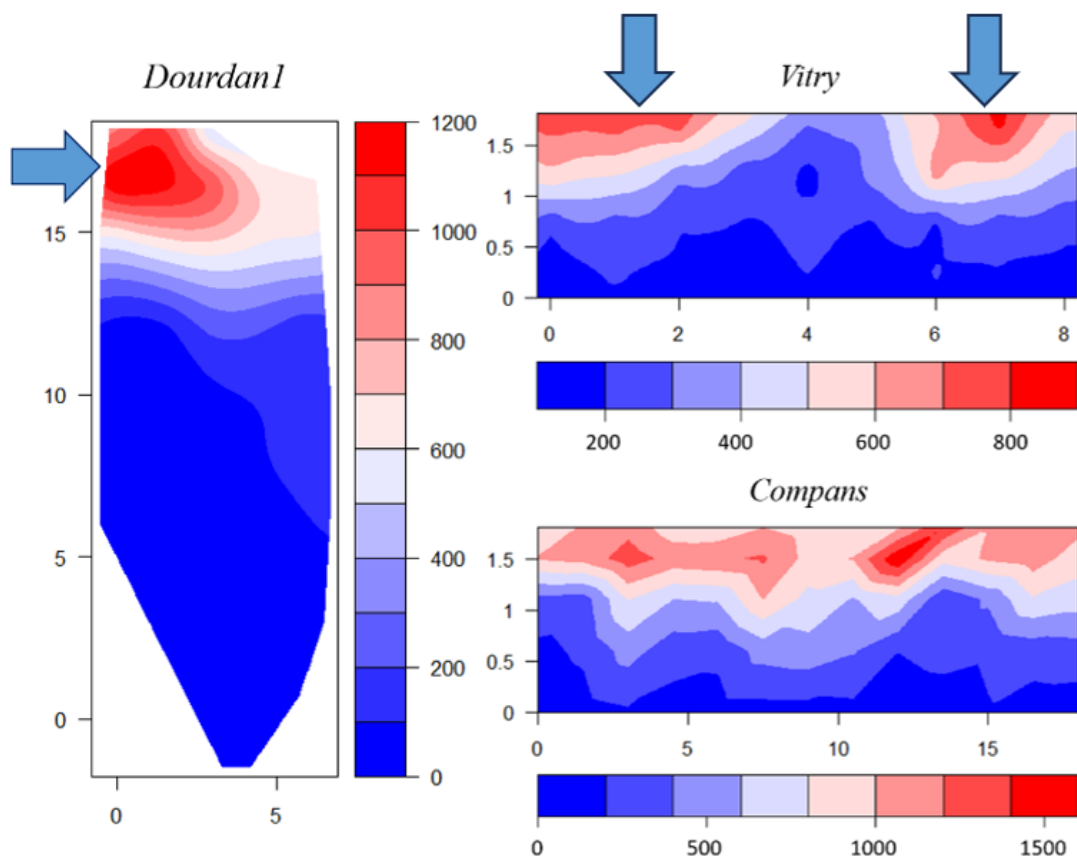


Figure 26 : Exemple de distribution spatiale du zinc [mg/kg] à la surface des ouvrages dans les sites de Dourdan, Vitry et Compans. Les flèches matérialisent l'arrivée de l'eau dans les ouvrages, par ruissellement superficiel (Vitry et Compans), ou par tuyau (Dourdan). Les coordonnées indiquées sur les axes sont en mètres.

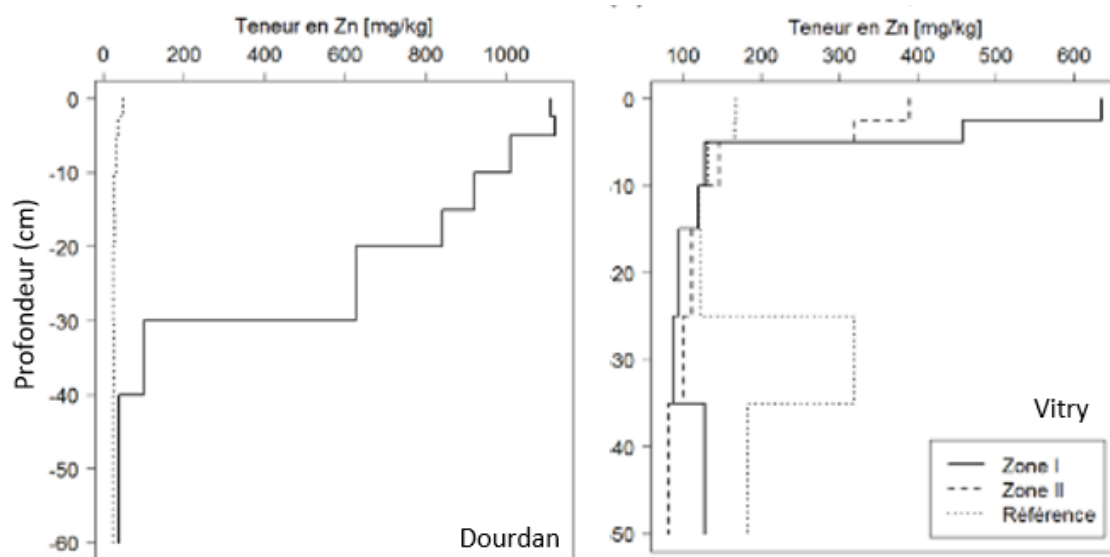


Figure 27 : Exemple de profils de contamination en zinc [mg/kg] dans les sites de Dourdan et Vitry.

Tableau 10 : tableau regroupant les concentrations en zinc dans le sol de la Noue de Compans à trois niveaux de profondeur : 0-5cm, 5-15cm, 15cm-fond (Flanagan, 2017)

	Zn ($\mu\text{g/g}$)
0-5cm	86,4
5-15cm	47,2
15-fond	38,4

1. Le site de Compans



Figure 28 : A. localisation du site de Compans, encadré rouge entourant la zone sélectionnée d'échantillonnage ; B. 1^{ère} portion du site, bande enherbée 1 ; C. 2^{ème} portion du site, bande enherbée 2 ; D. 3^{ème} portion du site, noue de biofiltration

Le site de Compans (**Figure 28**) se situe dans la zone industrielle de Mitry-Compans, le long de la route D212 77290 Compans. Les données GPS sont 48.9959135 2.6475648. Il s'agit d'une portion de route départementale à deux voies avec un fort trafic (22000 véhicules par jour), située à proximité de l'aéroport Charles de Gaulle ainsi que d'une zone industrielle. Sur ce site trois ouvrages ont été étudiés : deux bandes enherbées (VFS1_C et VFS2_C) et une noue de biofiltration (BFS_C). La deuxième bande enherbée (VFS2_C) et la noue de biofiltration sont constituées d'un substrat filtrant. Le substrat filtrant utilisé est

un mélange de 40% de terre végétale, et 60% de sable calcaire (issu d'une carrière du Boulonnais). Ce substrat filtrant a une épaisseur de 15 cm dans le cas de VFS2_C et de 50 cm pour BFS_C, et comprend à sa base un système de drainage permettant d'évacuer les percolats. Les bandes enherbées ont une longueur de 50m chacune et une largeur de l'ordre de 2 m. Elles sont alimentées par ruissellement superficiel diffus depuis la route. Leur pente transversale de 5% permet l'écoulement de ces eaux de l'amont (côté route) vers l'aval (côté fossé, à 2 m de la route). Il a cependant été noté (Flanagan 2018) que pour les pluies courantes la majorité du ruissellement s'infiltrait dans les premiers 50 cm de largeur. La noue de biofiltration a une longueur de 30 m et une largeur de 50 cm, avec une pente longitudinale de 2% identique à la pente longitudinale de la route, et est divisée en trois biefs de stockage de 10 m de longueur chacun par des petits murets. Elle est alimentée de façon diffuse sur toute sa longueur par le ruissellement superficiel de la route. La végétation des bandes est spontanée tandis que la végétation de la noue est uniforme avec *Carex gracilis*. La texture du sol est limoneuse-sableuse pour VFS2_C et BFS_C (substrat filtrat) tandis qu'elle correspond à un limon argileux pour VFS1_C. Ces ouvrages ont été construits à différentes périodes : les bandes enherbées ont été construites en 2012 et la noue de biofiltration a été construite en 2016. Les ouvrages étaient donc en service depuis 9 et 5 ans respectivement lors de notre première campagne d'échantillonnage. Cependant, les bandes enherbées ont fait l'objet d'un entretien lourd en juin 2020 (**Figure 29**) : dérasement consistant à enlever la couche superficielle de sol (5 à 10 cm), et la végétation associée, de façon à rétablir un bon écoulement des eaux de route. Ce type d'opération de dérasement est réalisé à intervalle de temps régulier (5 à 10 ans) sur les accotements routiers. Il impacte fortement le sol du site, en supprimant la couche la plus contaminée mais aussi la plus active biologiquement et remet le sol à nu. Nous pouvons donc considérer que le sol échantillonné sur les bandes enherbées en juin 2020 est en service que depuis une période de 1 an, ce qui correspondrait à un sol d'ouvrage fraîchement construit.



Figure 29 : photos du dérasement des bandes enherbées de Compans

Stratégie d'échantillonnage du sol (figure 30) :

Pour chacune des deux bandes enherbées, deux échantillons de sol composites ont été constitués : un échantillon représentatif de la zone « amont », c'est-à-dire la zone de sol proche de l'arrivée d'eau depuis la route qui est la plus sollicitée par le ruissellement et un échantillon représentatif de la zone « aval », c'est-à-dire la zone la plus éloignée de la route. Ces échantillons composites ont été constitués par mélanges et quartage d'échantillons de sol de 10 cm de profondeur, prélevés tous les 4 m sur les 50 m de

linéaire de chaque bande. Pour la noue de biofiltration, un échantillon moyen composite, représentatif de l'ensemble du linéaire, a été constitué par échantillonnage tous les mètres et demi sur trente mètres, et sur une profondeur de 10 cm (plan d'échantillonnage (**Annexe 1**)). Les campagnes d'échantillonnage de ce site ont été réalisées l'été 2021, l'hiver 2021 et l'été 2022. Des données d'une campagne de juin 2019 sont également disponibles (Roux. J, 2019).

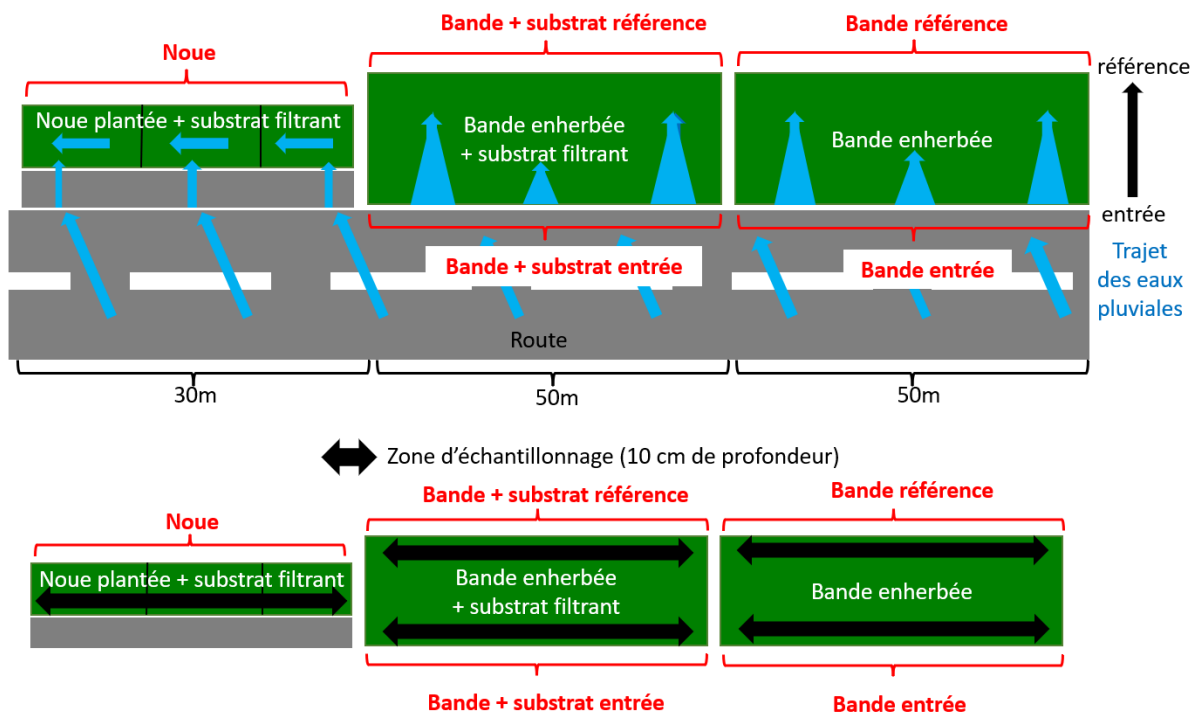


Figure 30 : schéma de la zone de prélèvement des sols composites du site de Compans

2. Le site de Vitry



Figure 31 : A. localisation du site de Vitry, encadré rouge entourant la zone sélectionnée d'échantillonnage ; B. présentation photographique de l'ouvrage

Le site de Vitry (**Figure 31**) se situe au 47 rue Charles Heller 94400 Vitry-sur-Seine, dont les coordonnées GPS sont 48.793213 2.410063. Il s'agit d'une intersection en T de deux rues dans une zone industrielle, avec un trafic important de poids lourds. Les eaux de ruissellement de cette voirie sont gérées par une noue de biofiltration de 3 m de largeur, implantée entre la chaussée et le trottoir, et superposée à une tranchée drainante. L'eau arrive dans la noue par ruissellement direct depuis la route (volume important) d'un côté, par le biais des ouvertures latérales des pierres de bordure, et par ruissellement direct depuis le trottoir (volume faible) de l'autre côté. Elle s'écoule latéralement vers le fond de la noue (pente transversale 10%), où elle est stockée et peut s'écouler longitudinalement vers le point bas de la noue pour les fortes pluies. Le couvert végétal de la noue n'est pas uniforme. Certains tronçons présentent uniquement une végétation basse, constituée de graminées et de vivaces, auxquelles s'est ajoutée de la végétation herbacée spontanée, tandis que d'autres tronçons sont plantés d'arbres. La texture du sol est limoneuse et la noue est en fonctionnement depuis 15 ans. La pollution des eaux de ruissellement de ce site est moins forte que pour Compans et la texture du sol est différente. L'âge de ce site est intermédiaire entre Compans et Dourdan.

Stratégie d'échantillonnage du sol (**figure 32**) :

Deux tronçons de noue successifs de 10 m de longueur chacun, avec des natures de couvert végétal différentes, ont été définis et étudiés : un tronçon avec les arbres comme couvert végétal (BFS1_V) et un autre avec une végétation spontanée basse uniquement (BFS2_V). Pour chaque tronçon de noue, deux échantillons composites ont été réalisés. Un premier échantillon composite, dénommé « amont », est constitué en mélangeant 6 échantillons élémentaires, prélevés sur 5 cm de profondeur, tous les mètres, le long de la zone d'arrivée d'eau côté route. Le second échantillon composite est constitué de la même manière mais côté trottoir, et sera dénommé « témoin ». Les campagnes d'échantillonnage réalisées pour ce site sont celles d'été 2021 et d'hiver 2021.

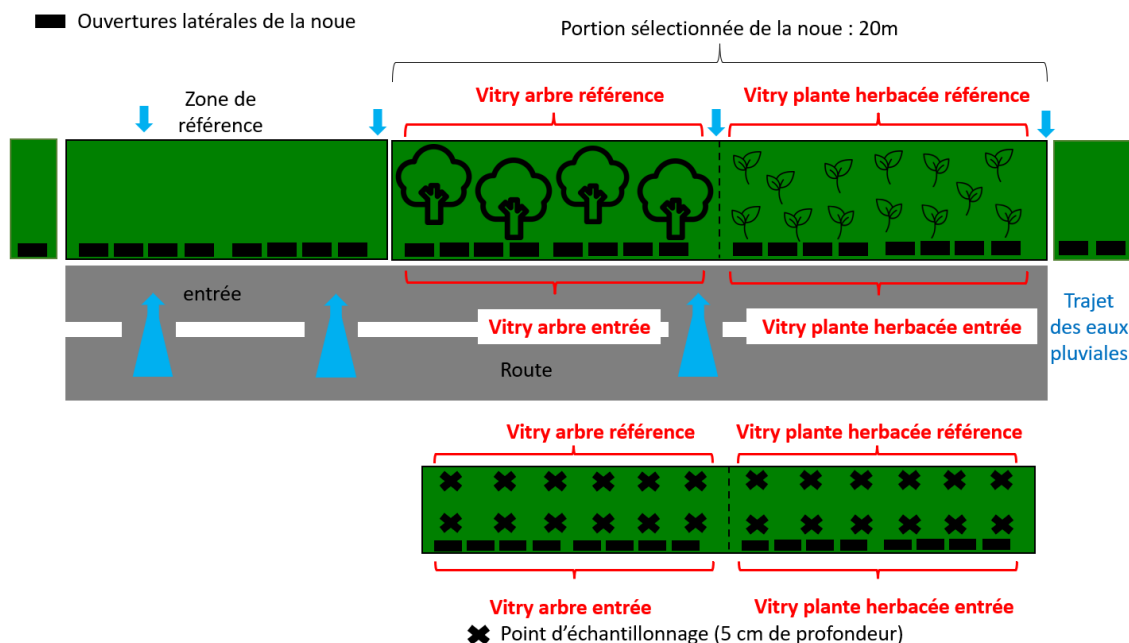


Figure 32 : schéma des points de prélèvement des sols composites du site de Vitry

3. Le site de Dourdan



Figure 33 : A. localisation du site de Dourdan, encadré rouge entourant la zone sélectionnée d'échantillonnage ; B. présentation photographique de l'ouvrage

Le site de Dourdan (**Figure 33**) se situe au 14 avenue du 14 juillet 1789, 91410 Dourdan, avec comme coordonnées GPS 48.521202 2.022671. Il s'agit d'une portion de route départementale à 2 voies avec un flux de 4900 véhicules par jour, et du parking d'une déchetterie, dont les eaux de ruissellement sont gérées dans un bassin de rétention – infiltration. L'eau arrive dans l'ouvrage via un tuyau d'un diamètre de 600mm, le fond du bassin est plat. La végétation du site est spontanée, sa texture de sol est limoneuse-sableuse et l'ouvrage est en fonctionnement depuis 25 ans. La composition et la pollution forte du sol de ce site ressemblent au site de Compans. Les deux sites diffèrent cependant de par leur fonctionnement hydrologique et de par leur âge, avec 25 ans d'utilisation pour l'ouvrage de Dourdan qui est donc le plus ancien de ceux étudiés ici.

Stratégie d'échantillonnage (figure 34) :

Deux échantillons de sol composites ont été prélevés sur cet ouvrage (IB_D), l'un (échantillon « amont ») dans la zone la plus sollicitée hydrologiquement, près de l'arrivée d'eau, et le second (échantillon « référence ») dans la zone la moins sollicitée par les eaux pluviales. Chaque sol composite est constitué de quatre échantillons de sol prélevés aux quatre coins d'un carré de 1 m de côté, et d'une profondeur de 10cm (plan d'échantillonnage en annexe). Les campagnes d'échantillonnage réalisées sur ce site sont celles d'été 2021 et d'hiver 2021.

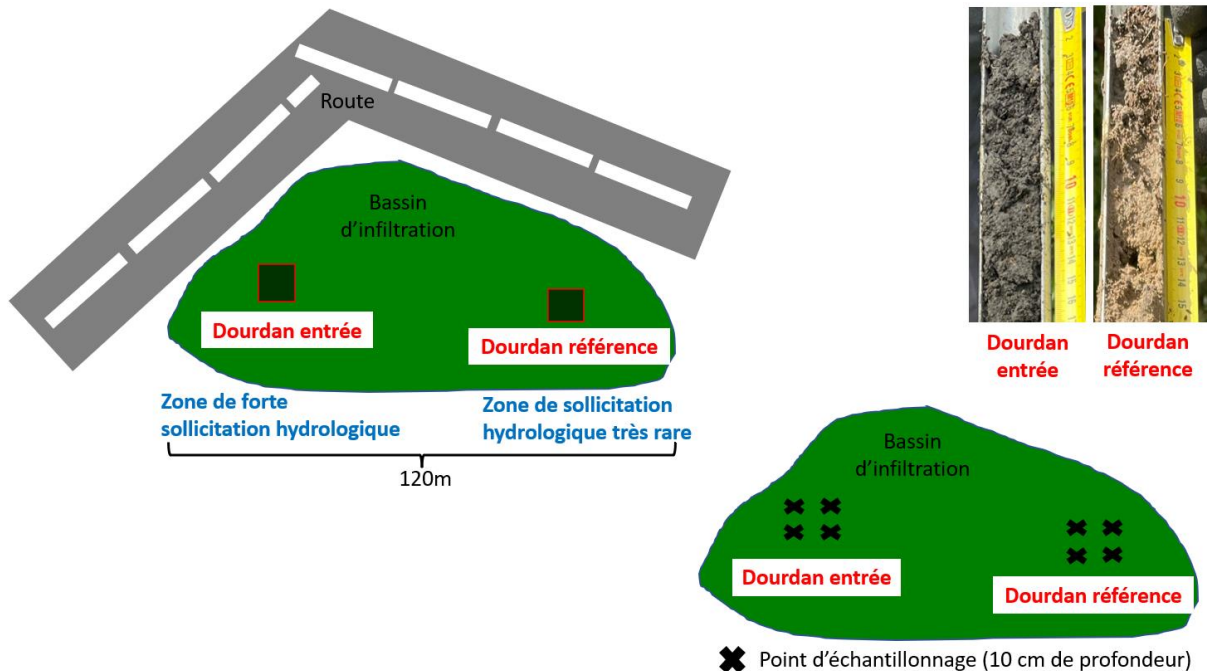


Figure 34 : schéma des points de prélèvement des sols composites – Dourdan

4. Préparation et stockage de l'échantillon

Deux actions sont réalisées directement à la suite du prélèvement des sols : la première c'est de récupérer une dizaine de gramme de sol à conserver au congélateur (-20°C) et la deuxième c'est de mettre le reste du sol à sécher dans des étuves à 25°C.

Le sol sec, est broyé à l'aide d'un mortier et d'un pilon en agate puis tamisé avec un tamis en inox de 2mm. Ce sol sec tamisé à 2mm est conservé dans des piluliers de 75ml à l'abri de l'humidité et de la lumière.

Les échantillons composites sont réalisés en laboratoire à partir des différents échantillons de sol mélangés en parts égales (**Figure 35**).



Figure 35 : présentation du regroupement des sols échantillonnés en un sol composite au laboratoire

VI. Caractérisation des paramètres physico-chimiques et biologiques du sol

A noter que pour chacune des manipulations décrites ci-dessous, les tests se feront en triplicat et avec du sol préalablement conditionné par séchage, broyage et tamisage à 2mm.

A. Introduction

Un sol n'aura pas la même composition, la même structure d'un endroit à l'autre et cela va induire des différences au niveau de la densité et de la fonctionnalité des organismes vivants dont les microorganismes. En fonction de l'endroit échantillonné, un sol pourra être plus argileux ou sableux, il n'aura pas le même pH, ni la même quantité et qualité de matière organique. L'ensemble de ces critères va impacter la structure des communautés microbienne, par exemple un sol acide va favoriser des microorganismes acidophiles. Ce même paramètre va également impacter la biodisponibilité des éléments du sol dont les micropolluants métalliques. De la même façon, on n'aura pas les mêmes communautés microbiennes d'un sol à l'autre, des différences dans leur diversité, leur abondance ou encore dans leur activité fonctionnelle. Ces différences microbiennes sont aussi très importantes à prendre en compte pour étudier le devenir des micropolluants organiques car la biodégradation de ces micropolluants variera avec la densité, l'activité et la diversité microbienne (Cébron et al., 2015; Kopecky et al., 2011).

B. Mesure des paramètres physico-chimiques du sol

1. Fractionnement granulométrique par sédimentation

L'analyse de la granulométrie permet d'obtenir la texture des particules d'un sol. Elle a été réalisée dans cette étude par sédimentation grâce à une pipette de Robinson selon la loi de Stokes, cf **Annexe 1**. Cette analyse a été réalisée se fait selon la norme NF X 31-107 (juillet 1993).

Avant de faire la sédimentation, une étape de préparation des sols est nécessaire. A l'aide de l'eau oxygénée (H_2O_2), la matière organique des sols a été détruite. Ensuite ce sont les carbonates qui ont été éliminés grâce à de l'acide chlorhydrique (HCl), pour cela une étape préalable (utilisation du Calcimètre de Bernard) a été faite pour savoir quelle quantité de carbonate était présent dans les sols et donc quelle quantité d'acide était nécessaire pour chaque sol. A noter que pour les sols à forte teneur en calcaire, un biais peut être présent suite à cette décarbonatation. Ensuite 3 à 4 lavages ont été réalisés selon les sols avec de l'eau distillée pour enlever les impuretés dont les gypses. La dernière étape de la préparation est de disperser les particules du sol. Deux traitements sont réalisés pour cet objectif, le premier consiste à ajouter 10ml d'un dispersant : hexamétaphosphate de sodium (150g/l) et 5ml d'une solution ammoniacale (ammoniaque à 20%). Après cet ajout une agitation pendant 2h est faite suivie d'un passage de 5min aux ultra-sons.

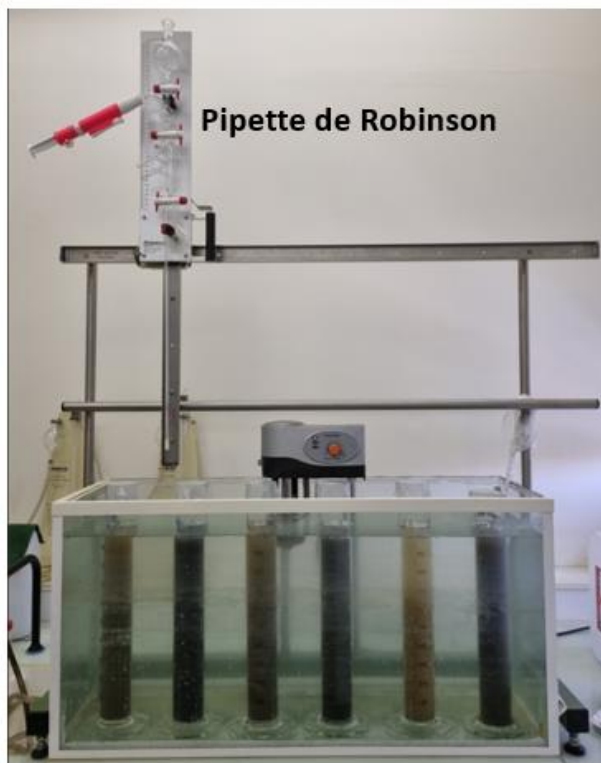


Figure 36 : photo de l'installation de la pipette de Robinson

Une fois les sols prêts, ils sont ensuite transvasés dans des colonnes de 1L complétées avec de l'eau distillée. Ces colonnes sont installées dans un aquarium rempli d'eau chauffée à température constante (18.5°C) afin de pouvoir contrôler les temps de prélèvements du sol. Ces prélèvements se font à l'aide de la pipette de Robinson à 20cm (**Figure 36**). Les 3 prélèvements vont permettre de récupérer les limons grossier/fin et les argiles. Les temps de sédimentation pour chacune de ces particules sont :

- Limon grossier (20 à 50 μ m) : 1min 36s
- Limon fin (2 à 20 μ m) : 2min
- Argile (< 2 μ m) : 16h 36min

Les suspensions des colonnes sont récupérées et versées dans des tamis pour avoir les sables grossiers (200 à 2000 μ m) / fin (50 à 200 μ m). Cela donne 5 suspensions de particules qui sont mis à sécher à 105°C, puis les masses sont pesées et des calculs sont faits pour déterminer les proportions de chacune de ces particules par sol.

La texture des sols est ensuite déterminée grâce au triangle des textures (**Annexe 2**).

2. Mesure du pH

Le pH est une mesure de l'acidité du sol, il peut varier de 0 à 14 (acide-neutre-basique). Le pH eau (acidité active) est le pH le plus souvent utilisé en laboratoire selon la norme ISO 10390, mais il est également possible de mesurer le pH KCl qui représente l'acidité échangeable. Les 2 valeurs seront mesurées pour chacun des sols de chaque campagne.

Il faut 5 fois le volume réactionnel par masse de sol, c'est-à-dire que pour 5g de sol, il faut rajouter 25ml d'eau distillée (pour pH eau) ou 25ml de KCl à 1mol/l (pour pH KCl). Ensuite les tubes seront mis sous agitation à 40 rpm (rotation par minute) pendant 1h. Après cela, les tubes seront laissés au repos 1h à température ambiante. La mesure du pH se fait ensuite dans le surnageant avec un pH-mètre HANNA pH 211 Instruments et d'une sonde HI 1053.

3. Dosage de la matière organique et mesure du poids sec

La détermination de la quantité de la matière organique (MO) d'un sol va permettre d'avoir une idée sur la richesse du sol, un sol avec beaucoup de MO sera riche en sources de carbone pour les microorganismes. Pour obtenir cette quantité de MO, la méthode de perte au feu (PAF) a été utilisée.

Cette méthode se base sur la calcination de la MO, pour cela 5g de sol sec sera soumis à de forte température (550°C) pendant 3h dans un four Nabertherm GmbH LE140K1BN (**Figure 37**) et lors de ce chauffage la MO sera oxydée en produits volatils (CO₂...). La teneur en MO se calcule grâce à la formule empirique suivante (Minasny et al., 2020) :

- 1) *Perte en C organique (g) = masse initiale (g) – masse finale (g)*
- 2) *Teneur en MO (g MO/g sol sec) = 1.72*Teneur en C organique (g C org/g sol sec)*

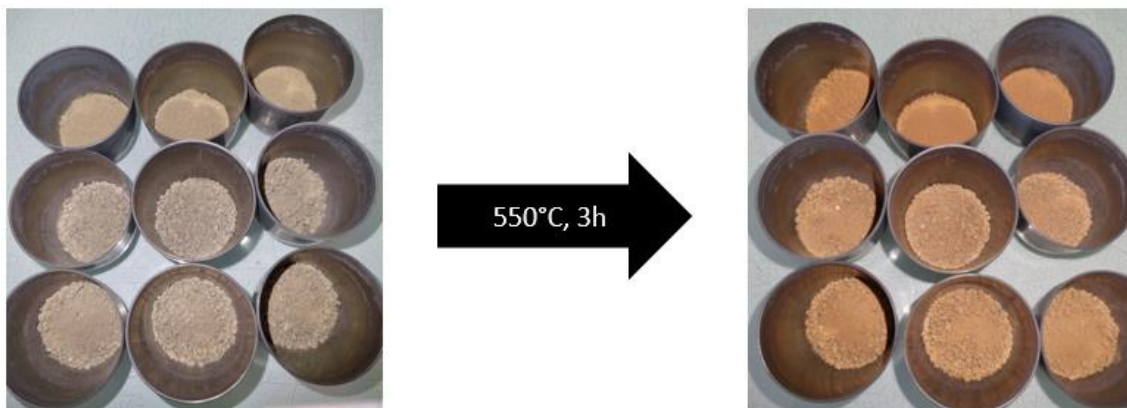


Figure 37 : photo de l'état des sols avant et après passage au four à 550°C

Afin d'obtenir le sol sec nécessaire à la détermination de la MO, une étape préalable est réalisée qui permet d'avoir le poids sec du sol. Cette étape consiste à chauffer les 5g de sol (préalablement sèche à 25°C lors du conditionnement) à 105°C à 2 reprises (2h puis 1h), ce qui permet pour la première fois d'évaporer l'eau résiduelle du sol et la deuxième fois de vérifier que toute l'eau est bien évaporée

4. Mesure de la capacité au champ

La capacité au champ correspond à la quantité maximale d'eau qu'un sol donné peut retenir par capillarité. Pour cela, un sol sera saturé en eau pendant 24h puis un ressuyage de 48h aura lieu. La masse de départ sera prise correspond à 5g de sol sec (à 25°C) puis une mesure du poids sera faite après le ressuyage qui correspondra à la masse humide. La soustraction de ces valeurs donne l'eau retenue par le sol que l'on pourra ramener à la quantité de sol de départ, ce qui donne comme formule :

$$CC \text{ (mL / g sol sec)} = (\text{masse humide (g)} - \text{masse sèche (g)}) / \text{masse sèche (g)}$$

$$CC \text{ (mL / g sol sec)} = \text{eau retenue (mL)} / \text{masse sèche (g)}$$

5. Mesure de la capacité d'échange cationique (CEC)

La CEC est liée au complexe argilo-humique. La capacité d'échange cationique d'un sol (CEC) traduit la faculté de celui-ci à fixer certains éléments minéraux à la surface du complexe argilo-humique (def. Sandre sur EauFrance). Ces minéraux pourront être restitués ensuite aux plantes par des phénomènes d'échange (décalcification) (**Figure 38**).

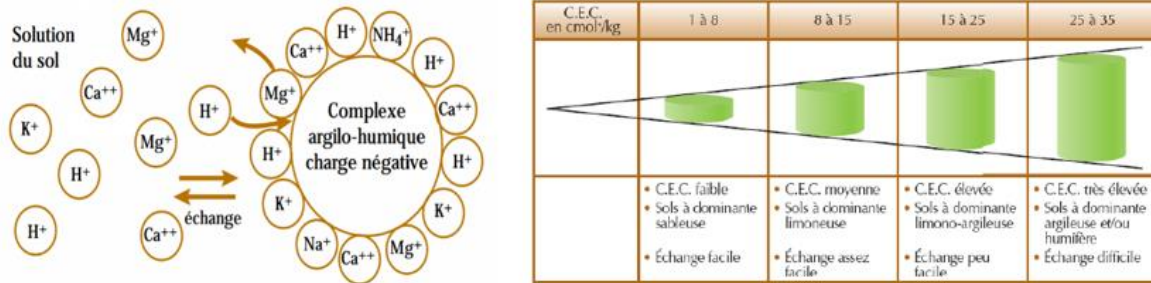


Figure 38 : représentation du fonctionnement du complexe argilo-humique et des palliés de la CEC

La CEC représente la capacité maximale d'un sol à absorber les cations à un pH donné, grâce à cette expérience on aura une information sur la fertilité et le bon état du sol étudié. Une CEC trop forte n'est pas forcément un bon résultat car il sera difficile aux plantes d'avoir accès aux éléments d'intérêt (Requasud).

Un dernier paramètre à prendre en compte est le taux de saturation du sol, c'est-à-dire le taux de remplissage du réservoir que présente le sol. Ce taux de saturation donne le pourcentage de sites occupés par des cations échangeables : Mg^{2+} , Na^+ , Ca^{2+} , K^+ . Les sites non occupés par ces cations, le seront par des H^+ qui sont non nutritifs pour la plante.

La mesure de la CEC se fait par la méthode de la cobaltihexamine (norme NF X31-130, mai 1993) et s'exprime en cmol./kg. Le principe de l'expérience consiste à mesurer au spectrophotomètre la concentration des ions cobalts restés en solution aux longueurs d'ondes de 475 et 380 nm. Il faut pour cela commencer à mettre le sol en contact avec de la cobaltihexamine et mélanger le tout pendant 1h. Ensuite, il faut filtrer (filtre de 0,45µm, filtre PTFE : polytetrafluoroéthylène) la solution pour enlever les particules de sol qui fausseraient la lecture au spectrophotomètre Genesys 10 UV scanning (Thermo scientific). Les ions cobalts de la solution vont prendre la place des cations adsorbés au complexe argilo-humique, de ce fait la concentration des ions cobalt présents dans la solution va diminuer. C'est la différence de concentration entre la solution initiale de cobalt (concentration maximum) et la concentration en cobalt des échantillons de sol qui va nous donner la quantité de cobalt qui s'est adsorbée sur le complexe et cela nous donne la CEC.

Suite à la CEC, il est possible de continuer l'analyse des cations plus loin et de mesurer la concentration des cations d'intérêt présents. Pour faire cette analyse, les solutions de la CEC sont analysées au spectromètre à émission atomique l'ICP-OES (Inductively coupled plasma optical emission spectrometry) SpectroBlue FMS 16 (spectro analytical instruments). Les cations d'intérêt retenus sont le Mg^{2+} , le Na^+ , le

Ca²⁺ et le K⁺, l'analyse de leur concentration (en cmol+/Kg) est faite ainsi que le calcul du taux de saturation en %.

$$T (\%) = (S \text{ (cmol+/Kg)} / \text{CEC (cmol+/Kg)}) * 100$$

(Avec T pour le taux de saturation, S pour la somme des cations)

C. Mesure des paramètres microbiologiques du sol

1. Mesure de la biomasse microbienne par la méthode du nombre le plus probable

La méthode utilisée pour déterminer la biomasse microbienne de nos échantillons de sol est la méthode du nombre le plus probable (NPP). Les microorganismes (bactéries et champignons) hétérotrophes cultivables pourront être dénombrés dans un milieu liquide sur des microplaques de 96 puits. Cette méthode se base sur la croissance microbienne dans la multiplaque de 96 puits avec différents taux de dilutions d'une suspension de sol. Le. Le nombre le plus probable sera alors calculé en utilisant une macro Excel téléchargeable avec ce lien : https://www.wiwiw.fu-berlin.de/fachbereich/vwl/iso/ehemalige/professoren/wilrich/MPN_ver6.xls. C'est une méthode qui donne une estimation statistique de la biomasse microbienne présente dans l'échantillon analysé.

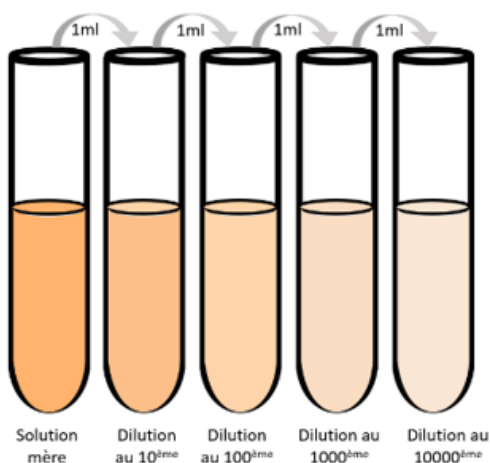


Figure 39 : dilution en cascade

Pour ce faire, une extraction des microorganismes du sol est réalisée, avec 1g de sol dans 9ml d'eau physiologique (NaCl) mis à agitation pendant 1h puis centrifugation 5min à 3000rpm. Pour avoir des concentrations décroissantes de cette solution mère, une dilution en cascade est réalisée (**Figure 39**).

Le principe d'une dilution en cascade c'est de diluer la suspension mère dans de l'eau physiologique plusieurs fois d'affilée (1ml de la solution mère mis dans 9ml d'eau physiologique puis 1ml de cette nouvelle solution sera dilué à nouveau dans 9ml, etc).

En parallèle deux milieux de culture sont préparés : un spécifique pour les bactéries (milieu LB) et un spécifique pour les champignons (extrait de malt) qui sont complétés soit avec de l'antifongique (fongizone) pour sélectionner les bactéries seulement soit de l'antibiotique (ampicilline) pour sélectionner

les champignons seulement. Rajout de l'antibiotique et de l'antifongique de façon à avoir une concentration de 100mg/L dans le milieu de culture. Les multiplaques sont ensuite remplies avec le milieu de culture (180µl) suivant un plan précis : pour chaque dilution, il y aura 8 puitsensemencés et il y a 5 niveaux de dilution fait par sol. Des témoins avec juste le milieu de culture (200µl) sont aussi disposés de part et d'autre de la plaque. La plaque est à la fin ensemencée avec les différentes dilutions microbiennes (20µl) à l'aide d'une pipette multicanaux (**Figure 40**).

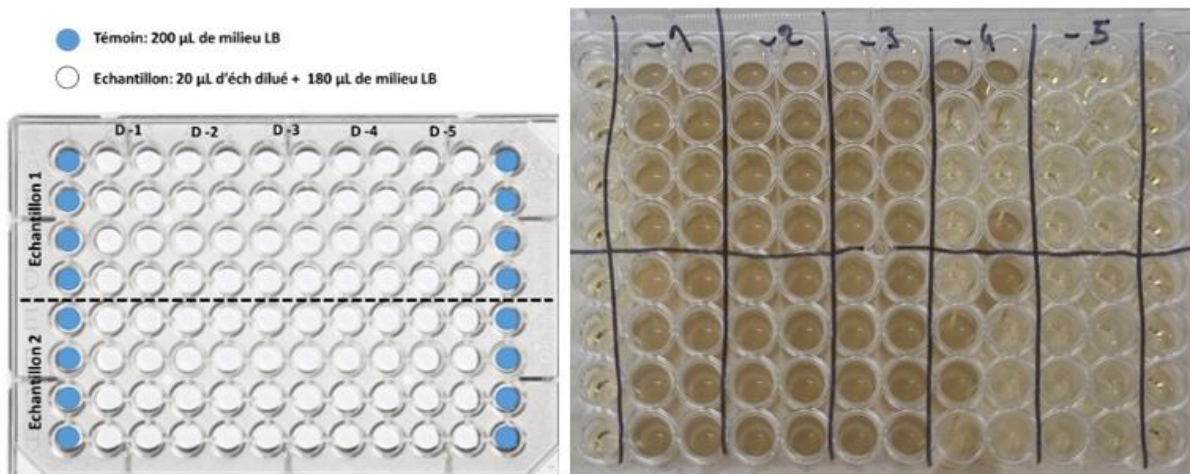


Figure 40 : schéma et photo d'un exemple de culture en multiplaque (NPP)

L'incubation des boîtes se fait à 25°C pendant 3 jours pour les bactéries et 7 jours pour les champignons. La lecture des plaques se fait au spectrophotomètre Multiskan FC (Thermo Scientific) 620nm au temps initial et final, une densité optique (DO) supérieure à 0,05 après soustraction de la DO au temps initial donne un puit positif. Une lecture visuelle des plaques est aussi réalisée pour valider les puits positifs (des colonies pouvant se former sur les parois qui ne seraient pas visibles pour le lecteur qui pourrait de ce fait sous-estimer le résultat). Le nombre de puits positifs avec la dilution associée va permettre de donner la biomasse du sol grâce à la macro.

2. Les analyses Biolog et la diversité fonctionnelle microbienne

A1 Water	A2 β -Methyl-D-Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ -Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D-Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L-Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α -Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D-Glucosamine	E3 γ -Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D-Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L-Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1-Phosphate	G3 α -Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl-amine
H1 α -D-Lactose	H2 D,L- α -Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

Figure 41 : schéma des substrats d'une plaque Biolog Ecoplate™

Les plaques de Biolog servent à étudier la diversité fonctionnelle des communautés microbiennes d'un échantillon. Des plaques spécifiques pour étudier les communautés microbiennes de l'environnement sont utilisées, ce sont les plaques BIOLOG EcoPlate™ (Preston-Mafham et al., 2002), (Biolog Inc., CA, USA, **Figure 41**).

Ces plaques sont constituées de 96 puits, contenant 31 substrats carbonés ainsi qu'un blanc, répétés en triplicat. Ces 31 substrats sont regroupés en 5 familles : les amines, les acides aminés, les polymères, les acides carboxyliques et les carbohydrates. Afin de suivre la biodégradation de ces substrats, un colorant est présent dans chacun de ces puits, c'est le chlorure de tétrazolium. Quand ce colorant est réduit lors de la métabolisation des substrats, il va donner du formazan qui est de couleur violette, c'est cette couleur qui va être mesurée avec une absorbance à 570nm. L'apparition du violet lors de la biodégradation des substrats va donner des profils différents en fonction des sols testés.

Différentes informations peuvent être obtenues de l'utilisation de ces plaques :

- La détermination du nombre des puits positifs en fonction des familles de substrats permet de déterminer la richesse fonctionnelle ainsi que les substrats favoris. Un puit positif est considéré comme tel avec une absorbance supérieure à 0,25 après soustraction des valeurs du temps initial.
- La moyenne des absorbances mesurées pour les 31 substrats permet de donner l'activité microbienne aussi appelée AWCD (Average Well Colour Development) (Garland and Mills, 1991) :

$$AWCD = (\Sigma(C_f - C_i)) / n$$

C_f = Absorbance finale mesurée d'un des triplicats : 31 puits,

C_i = Absorbance initiale mesurée d'un des triplicats : 31 puits,

n = nombre de puits = 31

- L'AWCD est calculée trois fois pour une plaque, une fois par triplicat. La moyenne de ces trois AWCD va donner l'activité microbienne moyenne de l'échantillon.

Une extraction des microorganismes du sol est faite : 1g de sol extrait dans 9ml d'eau physiologique par agitation à 40rpm pendant 1h puis une centrifugation pendant 5min à 3000 rpm pour récupérer le surnageant. Une dilution du surnageant est réalisée pour atteindre une dilution au 100^{ème}. Les puits sont ensuiteensemencés par 150µl du surnageant, une plaque par sol. Les plaques sont mises à incuber à 25°C, à l'obscurité pendant une semaine. La lecture des plaques se fait au temps initial à 0h, à 72h et à 168h (jour 0, 3 et 7) à l'aide du spectrophotomètre de plaque Multiskan FC (Thermo Scientific) à 570nm.

3. Mesure des activités enzymatiques des sols

Les enzymes interviennent dans les cycles biogéochimiques, elles interviennent aux différentes étapes de ces cycles et sans elles, les cycles peuvent être interrompu et de ce fait être moins fonctionnels, impactant la qualité et la fertilité des sols. Une multitude d'enzymes existent plus ou moins spécifiques aux cycles et plusieurs sont utilisées comme indicateur de l'état des sols. Trois enzymes ont été sélectionnées, les enzymes qui vont hydrolyser la FDA ce qui permet d'étudier l'activité enzymatique totale d'un sol (premier niveau d'analyse large), la déshydrogénase et l'uréase qui sont des enzymes plus ciblées qui vont intervenir respectivement dans le cycle du carbone et de l'azote (deuxième niveau d'analyse plus spécifique).

i. FDA

La FDA (fluorescéine diacétate) permet de déterminer l'activité enzymatique totale d'un sol. Cette molécule va être clivée par hydrolyse par un ensemble d'enzymes du sol en fluorescéine (**Figure 42**). La fluorescéine est une molécule de couleur jaune fluorescente qui peut être mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde particulière à 490nm (Green et al., 2006). De ce fait, plus l'activité enzymatique du sol est importante, plus il y aura de clivage de la FDA et donc de libération de la fluorescéine et la couleur jaune fluorescence sera de plus en plus importante.



L'absorbance mesurée sera reliée à la concentration en fluorescéine grâce à une gamme étalon (**Figure 43**).


$$\text{H}_2\text{N}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NH}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Uréease}} 2 \text{NH}_4^+ + \text{CO}_3^{2-}$$

Urée

83

Le principe est le suivant : Les échantillons de sols (0,5g) après la préparation à 70% de la capacité au champ, sont mis à incuber (4h) avec un tampon borate (0,1mol/l à pH 10) et de l'urée. Puis on va extraire l'ammonium (NH_4^+) produit par la solution de KCl (2mol/l) et HCl (1mol/l), par agitation pendant 30min et centrifugation 5min à 2000rpm. La lecture de l'ammonium va pouvoir se faire grâce à la réaction du bleu-indophénol \Rightarrow Na-salicylate + HN_3 + présence de Na-dichlorisocyanurate + pH alcalin = formation d'un complexe coloré vert détectable à 665 nm au spectrophotomètre. Pour avoir une meilleure lecture au spectrophotomètre, un catalyseur, le Na-nitroprusside est ajouté (Keeney and Nelson, 1982).

Une gamme étalon est réalisée afin d'avoir la concentration en ammonium des échantillons (vert très concentré et jaune peu concentré, **Figure 45**).

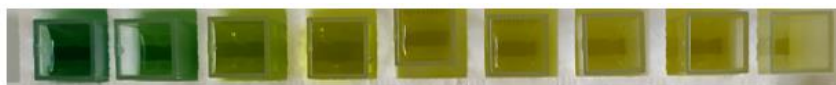


Figure 45 : gamme étalon de la mesure de l'absorbance de l'uréase

iii. Déshydrogénase

Pour finir, la déshydrogénase qui regroupe, elle aussi, un ensemble d'enzymes appartenant à la famille des oxydoréductases. Cette enzyme va catalyser les réactions d'oxydation des molécules organiques. La mesure de son activité va permettre de donner une indication du fonctionnement des systèmes RedOx microbiens et des activités d'oxydations microbiennes, ce qui nous informe sur la biomasse microbienne et la qualité biologique dans les sols. L'autre paramètre important pour étudier cette enzyme c'est qu'elle est exclusivement intracellulaire (dégradation une fois à l'extérieur), de ce fait on est sûr d'étudier l'activité biologique directement et pas un reste.

Les méthodes mises au point peuvent être vues avec Kumar et al. (2013).

Le principe et la manip est simple, il faut de rajouter du TTC 3% (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) dans la solution de sol préparée (ajout de l'eau à 70% de la capacité au champ et incubation 24h à 27°C), incubation pendant 72h. Les déshydrogénases présentes dans la solution vont réduire le TTC en TPF (1,3,5-triphenyltetrazolium formazan, **Figure 46**). Le TPF est un coloré rouge qui va être visible à une absorbance de 485nm au spectrophotomètre. Pour ce faire, du méthanol est rajouté (afin d'extraire le TPF et le mettre en solution) après les 72h, agitation 5min puis on laisse au repos à température ambiante pendant 5h les échantillons. Une centrifugation de 5min à 2000rpm avant la lecture au spectrophotomètre est réalisée. Du glucose 1% est rajoutée en même temps que le TTC pour faciliter la réaction.

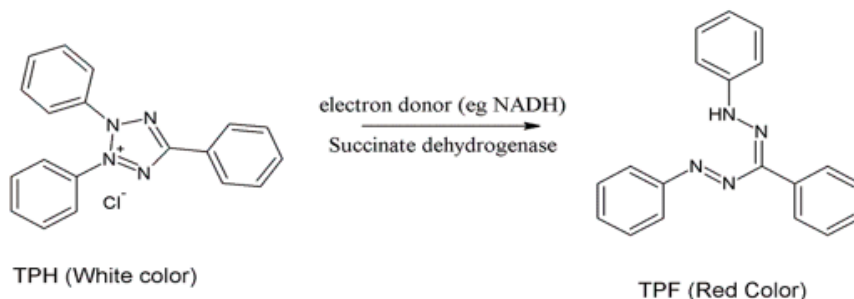


Figure 46 : réaction de transformation du TPH en TPF

Une gamme est également faite avec le TPF afin de faire correspondre l'absorbance obtenue à la concentration en formazan. Plus il y aura de déshydrogénase, plus le TTC sera réduit en TPF, plus la couleur rouge sera intense (**Figure 47**).



Figure 47 : gamme étalon de la mesure de l'absorbance de la déshydrogénase

4. Métabarcoding total

Le métabarcoding est l'identification taxonomique à grande échelle d'échantillons environnementaux complexes par l'analyse de séquences d'ADN. Le métabarcoding repose sur les technologies de séquençage de l'ADN à haut débit.

Pour faire le métabarcoding total, la première étape consiste à extraire l'ADN du sol. Un même kit est utilisé pour toutes les extractions afin d'éviter des biais liés au protocole. Le kit FastDNA™ Spin kit for Soil MPBio est utilisé. Les étapes expérimentales sont les mêmes que celle décrites dans le protocole commercial. Les appareils utilisés sont un FastPrep[®]- 24 et une centrifugeuse minispin eppendorf.

Une fois l'extraction de l'ADN faite, une vérification de la quantité et la qualité des extraits est réalisée. En premier, la concentration en ADN est mesurée par un NanoVue Plus™ (Biochrom, USA). Enfin, une électrophorèse sur gel d'agarose est faite pour valider la présence d'ADN et observer la qualité des extraits. Le gel d'agarose est fait à 1% et l'agent intercalant utilisé pour la révélation des ADN est le gel red. La migration sur gel dure 30min à 100V avec un système d'électrophorèse mini Gel II (VWR) puis le gel est mis sous UV pour observer les bandes fluorescentes (**Figure 48**). Les extraits d'ADN sont ensuite conservés à -20°C jusqu'à leur envoi pour être séquencés.



Figure 48 : photo d'un gel d'agarose avec ADN prêt à migrer dans une électrophorèse

Les extraits ADN sont envoyés à Eurofins Genomics Europe (Konstanz, Germany) pour faire du séquençage Illumina MiSeq des ADN bactériens et fongiques. Les amorces bactériennes vont cibler la région hypervariable V3-V4 de l'ARN 16S (357F-TACGGGAGGCAGCAG, (Turner et al., 1999) et 800R-CCAGGTATCTAATCC, (Kisand et al., 2002)) et les amorces fongiques vont cibler la région ITS2 (ITS3-GCATCGATGAAGAACGCAG et ITS4-TCCTCCGCTTATTGATATGC (White et al., 1990)).

La classification phylogénétique des bactéries et des champignons dans les différents échantillons a été caractérisée à l'aide du script de résumé des taxons de QIIME, jusqu'au niveau du genre (L6). Après un

contrôle de qualité (élimination des séquences de faible qualité et des chimères), seules les séquences effectives ont été gardées et utilisées pour l'analyse moléculaire. Les courbes de saturation ont également été vérifiées afin de s'assurer qu'un nombre raisonnable d'échantillons individuels a été collecté pour les analyses.

VII. Mises en place des cinétiques de biodégradation des micropolluants organiques en batch et en colonnes

A. Objectifs

Pour étudier l'efficacité de biodégradation des micropolluants par les microorganismes des sols des ouvrages de gestion des eaux pluviales, des cinétiques en batch liquide et en colonne sont réalisées.

Les cinétiques en batch liquide permettent d'étudier un plus large panel de sols en condition contrôlées de façon à obtenir de premières informations sur le potentiel de biodégradation microbienne. Les cinétiques en colonnes, plus lourdes à mettre en œuvre, ont été réalisées pour étudier la biodégradation microbienne des micropolluants dans des ouvrages représentatifs et dans des conditions plus réalistes.

Pour les cinétiques en batch liquide, 11 sols différents ont été étudiés. Pour chaque sol, les microorganismes sont extraits et sont ensemencés dans du milieu de culture liquide supplémenté par un cocktail de trois micropolluants choisis et représentatifs de la pollution organique des eaux de ruissellement.

Pour les colonnes, les deux sols les plus intéressants (basé sur leur capacité de biodégradation) ont été sélectionnés suite à la cinétique en batch liquide.

B. Dispositif expérimental de la cinétique de biodégradation en système batch liquide

1. Préparation du matériel en amont :

L'objectif étant de mesurer au cours du temps la concentration en micropolluants organiques dans les batchs liquides, il est nécessaire de s'assurer que le matériel utilisé est dépourvu de toute trace de ces micropolluants. Pour cela des étapes de chauffage/grillage à haute température du matériel en verre utilisé ont été réalisées : les bouteilles de 2L, 1L, les flacons utilisés pour faire les mésocosmes, les fioles utilisées pour les analyses sont mises à chauffer à 500°C pendant 2H (Multiwave 3000). Chaque bouteille et fiole étant recouverte d'aluminium, la stérilisation du matériel se fait en même temps que le grillage à 500°C. Le reste du matériel (tube falcon, cône, etc) étant à usage unique, cela ne nécessite pas de nettoyage.

2. Préparation des constituants des mésocosmes : milieu de culture, mélange de micropolluants et extrait de microorganismes :

- Milieu de culture liquide : le milieu utilisé est un milieu minimum, c'est-à-dire un milieu est constitué de composants strictement nécessaires à la croissance d'un organisme dans lequel on va rajouter une source de carbone unique. Ce choix permet de s'assurer que la croissance microbienne s'opère suite à la métabolisation de la source de carbone d'intérêt (ici les micropolluants). Ce milieu minimum est le milieu BSM (=Basal Salt medium), sa composition est

disponible en annexe (**Annexe 3**) et son pH est stabilisé à $7,3 \pm 0,1$. Ce milieu est stérilisé par autoclavage : 20min à 121°C, 1 bar avec l'autoclave Tuttnauer 5075 MLV (Mediatech scientifique).

- Micropolluants (MPs) : les micropolluants étudiés ont été choisis parmi ceux que l'on retrouve couramment dans les eaux de ruissellement routier (BPA : bisphénol A, 4-NP : nonylphénol et OP : octylphénol). Des solutions mères sont préparées pour ces 3 MPs à 2g/L, pour cela 20mg de micropolluants sont pesés et mis dans 10ml de méthanol. Ces solutions sont conservées en chambre froide à l'obscurité. Les micropolluants utilisés sont le Bisphénol A provenant de Sigma-Aldrich avec plus de 99% de pureté, le Nonylphénol (4-NP) provenant également de Sigma-Aldrich avec plus de 90% de pureté et l'Octylphénol (OP) provenant de Dr. Ehrenstorfer GmbH avec plus de 98% de pureté. Le descriptif de ces micropolluants peuvent être retrouvé dans le tableau 2 chapitre 1.
- Microorganismes : les extraits microbiens sont obtenus en mettant 500g du sol de l'ouvrage à étudier dans 300ml d'eau physiologique (9g/L), sous agitation pendant 1h à 120rpm. Les suspensions de sol sont centrifugées 10min à 2000rpm puis le surnageant contenant les extraits microbiens est récupéré.

3. Mise en place des mésocosmes :

Trois types de mésocosmes sont préparés :

- les tests avec milieu BSM, MPs et microorganismes,
- les témoins biotiques (témoins B) avec le milieu BSM et microorganismes,
- les témoins abiotiques (témoins A) avec le milieu BSM et les MPs.

Le volume de BSM (dopé en MPs ou non) ajouté dans chaque fiole de culture est de 26.5ml. Le milieu BSM est amendé en MPs pour les tests et les témoins A avant d'être réparti dans toutes les fioles de culture. L'amendement en micropolluants se fait de façon à obtenir des concentrations finales égales à 250µg/L pour le BPA ; 175µg/L pour le nonylphénol et 75µg/L pour l'octylphénol (le choix des concentrations a été établi avec une précédente étude au laboratoire et le ratio entre le NP et OP a été déterminé à partir des travaux de Flanagan, 2018). Ensuite, les extraits microbiens sont ajoutés à biomasse constante avec un volume de 4,5ml pour atteindre un volume final pour toutes les fioles de 31ml. Pour les témoins A : 4,5ml d'eau physiologique stérile est ajoutée à la place des extraits microbiens.

Avant d'ajouter les extraits microbiens : une étape d'homogénéisation de la densité optique (DO) à 600nm (Genesys 10 UV scanning (Thermo scientifique)) est faite en se basant sur la DO la plus basse, c'est-à-dire que le sol le moins riche donnant la DO la plus faible sera la base à ne pas dépasser pour les autres sols afin d'être à biomasse constante entre les sols. Un volume microbien plus faible sera donc ensemencé pour les sols plus riches et de l'eau physio stérile servira pour compléter les 4.5ml. Les sols seront ensuite mis à incuber à 25°C pendant 17 jours sous agitation à l'obscurité (**Figure 49**).



Figure 49 : photo des batches lors du lancement de la 3^{ème} cinétique de biodégradation liquide

4. Analyses des solutions prélevées dans les mésocosmes :

Les analyses se font sur 14 jours (sols faiblement actifs) et 17 jours (sols actifs) avec comme pas de temps : le temps initial T0, au 2^{ème} jour T2, au 3^{ème} jour T3, au 7^{ème} jour T7 et au temps final T14/T17. Des mésocosmes sacrificiels en triplicatas sont préparés pour les 11 sols tests ainsi que les témoins A et B.

Ces témoins permettent de vérifier l'activité de fond de chacun des paramètres étudiés, les micropolluants seuls permettent de vérifier qu'il n'y a pas de dégradation qui serait indépendante des microorganismes et les microorganismes seuls permettent de vérifier leur niveau basal d'activité sans source de C. Les témoins ne seront analysés qu'aux temps initiaux et finaux.

	T0	T2	T3	T7	T14/17	Total fioles
Tests	3*11	3*11	3*11	3*11	3*11	297
Témoins B	3*11				3*11	
Témoins A	3*11				3*11	

Tableau 11 : nombre des échantillons nécessaires par points de prélèvements.

Un total de 297 fioles étant nécessaire pour étudier les 11 sols, cette cinétique a été réalisée en 3 fois :

- La première cinétique avec 4 sols de Compans
- La deuxième cinétique avec 1 sol de Compans et 2 sols de Vitry
- La troisième cinétique avec 2 sols de Vitry et 2 sols de Dourdan

Des légères variations peuvent de ce fait être observées entre les sols des 3 cinétiques associées aux biais de manipulations. Des analyses physico-chimiques et biologiques sont faites au cours de la cinétique.

5. Sacrifice des mésocosmes, répartition et stockage des solutions

Avant de faire chaque prélèvements les fioles à sacrifier sont agitées pour homogénéiser les solutions. Différentes opérations et prélèvements sont ensuite réalisées :

- 2ml sont prélevés pour mesurer le pH le jour même (aux points initiaux et finaux)
- 6ml sont prélevés pour les analyses de NPP et de Biolog (T0, T3, T7, Tf). Les échantillons sont conservés au réfrigérateur à 4°C. Les analyses sont faites 24h après prélèvement.

- 2ml sont prélevés pour le dosage des micropolluants (T0, T3, T7 et Tf). Les échantillons sont conservés au congélateur à -20°C.
- 10ml sont prélevés pour les analyses de biologie moléculaire (Tf). Les échantillons sont conservés au congélateur à -20°C.
- La mesure du CO₂ se fait dans les mésocosmes finaux (Tf) tous les 2 jours.

6. Protocoles des analyses

i. Le pH

Le pH du milieu de culture de la cinétique a été mesuré au temps initial et final. L'intérêt de l'étudier est de voir si l'activité microbienne de biodégradation des micropolluants va impacter ou non le pH du milieu. Dans des tubes Falcon de 15ml, 2ml du milieu de culture seront prélevés pour mesurer directement le pH.

ii. Le dosage des micropolluants

Les micropolluants (BPA, NP et OP) ont été dosés au cours de la cinétique par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), (Acquity UPLC-TQD, Waters). La spectrométrie de masse est une puissante technique d'analyse qui repose sur une séparation chromatographique puis l'identification et la quantification des molécules ionisées par la mesure de leur masse. Plusieurs molécules peuvent être détectées au cours d'une même analyse. Cette technique est également très sensible ; elle permet de quantifier les faibles concentrations des substances chimiques généralement retrouvées dans les échantillons environnementaux.

Les analyses ont été réalisées par le personnel technique du Leesu.

Au préalable, une solution d'étalon d'injection contenant les substances de référence pour permettre la quantification des molécules a été préparée comme suit :

- 250 µL de nNP1EC (100 mg/L)
- 50 µL de nNP (0,5 mg/L)
- 20 µL de BPA₁₆ (0,5 mg/L)
- 10 µL de nNP1EO (1g/L)
- 9,67 mL de MeOH

La solution d'étalon d'injection est ajoutée aux échantillons juste avant l'analyse de manière à corriger les effets de matrice pour permettre une meilleure quantification.

Des solutions ont été faites en parallèle pour conditionner et équilibrer l'appareil avant analyse (préparation de la phase mobile et des solutions de rinçage des voies) :

- A1 : 500 mL d'eau ultrapure (EUP) + 250 µL de NH₄⁺OH⁻ à 0.05%
- B1 : 500 mL de méthanol (MeOH) + 250 µL de NH₄⁺OH⁻ à 0.05%
- A2 : 25 mL de A1 + 25 mL de B1
- B2 : 50 mL de B1

Les échantillons ont ensuite été préparés dans des vials de 2ml comme suit :

- Pour les jours 0 et 3 de la cinétique : 500 µL des échantillons + 450 µL de solution B2 + 50 µL d'étalon d'injection. Ces échantillons ont été dilués par deux de manière générale puisque la concentration en micropolluants était encore trop importante pour se situer à l'intérieur de la gamme.
- Pour les jours 7 et 14/17 : 950 µL des échantillons + 50 µL d'étalon d'injection ont été ajoutés.

Enfin, une gamme a été préparée, les échantillons ont ensuite été placés dans le LC-MS/MS et la séquence analytique a pu être lancée à l'aide de l'interface du logiciel MassLynx.

Les concentrations des micropolluants ont pu être déterminées à l'aide d'une macro VBA (excel) développée par la cellule technique du Leesu.

Celle-ci utilise les équations suivantes :

Sachant que : $q_{AP}/q_{Ei} = aAire_{AP}/Aire_{Ei} + b$,

$q_{AP} = q_{Ei}(aAire_{AP}/Aire_{Ei} + b)$

A partir de cette quantité, on peut remonter à la concentration dans l'échantillon :

$(q_{AP} \cdot Vol / 10 \cdot 1000) / (Volume_{Extrait}) = \text{Concentration AP en ng/L échantillon extrait}$

Où :

- AP : substance 'x'
- Aire : aire du pic obtenu pour la substance 'x'
- Ei : étalon d'injection
- q : quantité
- Vol : volume de la substance de référence correspondante 'x'
- Volume Extrait : volume d'échantillon = 1 mL

Les résultats seront ensuite exprimés en pourcentage de biodégradation des micropolluants réalisée par les microorganismes au cours de la cinétique.

iii. La biomasse microbienne avec la méthode de NPP

Le protocole suit le même principe que celui décrit en partie II.C.1. Quelques différences notables existent cependant :

- Les dilutions se font directement à partir d'une solution liquide,
- Le facteur de dilution est adapté en fonction des pas de temps,
- La biomasse totale est étudiée, on utilise de ce fait un milieu LB sans antifongique.

iv. L'activité microbienne avec les plaques Ecolog

Le protocole suit le même principe que celui décrit en partie II.C.2. Les seules différences notables sont l'absence de dilution des extraits microbiens et la lecture des plaques se fait au bout de 96H.

v. Suivi de la minéralisation du carbone avec la production du CO₂

Le suivi de la minéralisation du carbone se fait par mesure du dégagement de CO₂ au cours de la cinétique. Ce dégagement va être relié à la croissance microbienne, avec une augmentation de la production du CO₂ lorsque la biomasse augmente grâce à l'utilisation des micropolluants comme source de nutriments.

La quantité de CO₂ produite exprimée en ppm a été mesurée par chromatographie en phase gazeuse (Agilent Technologies 490 Micro GC). Les mésocosmes sont des flacons avec col à sertir avec des bouchons à sertir en aluminium composé d'un orifice central constitué de butyle/PTFE (VWR). Ces bouchons permettent de garder l'imperméabilité des flacons tout en permettant l'insertion d'une aiguille afin d'aspirer l'air des flacons et de mesurer le CO₂ présent (**Figure 50**).



Figure 50 : photo de l'installation du micro-GC

vi. Métabarcoding total

Le protocole suit le même principe que celui décrit en partie II.C.4. La première partie diffère : les 10ml des triplicatas sont regroupés et ensuite les 30ml sont centrifugés pour récupérer le culot qui sera resuspendu dans 500µl d'eau stérile pour ensuite passer au protocole d'extraction d'ADN du kit commerciale. L'autre différence du protocole en II.C.4 est que le séquençage sera exclusivement bactérien.

C. Dispositif expérimental de la cinétique en colonne

1. Préparation des colonnes



Figure 51 : photo des colonnes utilisées lors de la cinétique

Des colonnes en inox de 12 de hauteur avec un diamètre de 7,2cm sont utilisées. Ces colonnes sont fermées en bas avec une toile en inox ayant un maillage de 75µm (**Figure 51**). La toile est fixée sur la colonne grâce à des colliers de serrage en inox. Les colonnes en inox ont été fabriquées au sein du laboratoire au cours d'une précédente étude (J. Roux, 2024).

Chaque colonne est ensuite recouverte d'aluminium pour être mise à griller au four à 500°C (Multiwave 3000) afin de s'assurer d'éliminer toutes les traces de composés organiques et de s'assurer de la stérilité des colonnes.

2. Préparation du reste du matériel

Le matériel en verre (bécher 1L et bouteilles de 5 et 2L) sera aussi grillé à 500°C. Le matériel en plastique ainsi que les éprouvettes en verre seront nettoyés grâce à des bains successifs de 24h : 1^{er} bain = acide nitrique 5%, 2^{ème} bain = eau distillée, 3^{ème} bain = eau milliQ.

Les sols récupérés des ouvrages étudiés dans cette phase (environ 10kg par site) pour faire les colonnes ont été mis à sécher à 25°C pendant 1 semaine puis ont été tamisés à 2mm à l'aide d'un tamis en inox. Une partie du sol a été stérilisée, pour cela 3 cycles d'autoclave de 30min à 121°C et 1 bar ont été réalisés, chaque cycle étant espacé de 24h. La stérilisation des sols se fait le plus tard possible pour garder les sols le longtemps possible stériles.

De l'eau de Volvic est achetée (3 bouteilles de 8L) afin de saturer les sols en eau dopée en micropolluants, des arrosages réguliers auront également lieu au cours de la cinétique afin de maintenir au mieux l'humidité de départ. L'eau de Volvic a été choisi car elle possède une composition similaire aux eaux de pluies et cela permet d'avoir une eau avec une composition connue et identique.

Les micropolluants testés sont les mêmes que ceux de la cinétique en batch liquide (cf. partie III.2.b) et les solutions mères sont aussi préparées à 2g/L mais pour un volume plus important de 20ml. Les concentrations de dopage voulues sont 50µg/L pour le BPA, 100µg/L pour l'OP et 2200µg/L pour le 4-NP. Les bouteilles de 5 et 2L de Volvic sont donc dopées avec les 3 micropolluants pour atteindre ces concentrations.

Le choix des concentrations des MPs a été estimé en fonction des conditions de dopage et des valeurs environnementales du site de Compans. Une concentration dissoute initiale C_{dini} à mettre dans la solution de dopage des colonnes a été choisi pour atteindre à l'équilibre une concentration C_{deq} correspondant au ruissellement dissous. Pour cela, des valeurs du sol de Compans de 2017 et des valeurs pour le sédiment d'un site proche de Compans sont disponibles.

$$V \cdot C_{dini} = V \cdot C_{deq} + M_s \cdot C_p \cdot 1000$$

$$C_p = K_d \cdot C_{eq} / 1000$$

$$\Rightarrow C_{dini} \text{ (ng/L)} = M_s \times C_p / V \times 1000 + C_{deq}$$

Avec :

- V (L) = volume eau dopage colonne = 0,25
- M_s (g) = masse sol dans les colonnes = 0,2
- C_p (ng/g) = concentration maximum adsorbable depuis le ruissellement dissous pour chaque micropolluant

- C_{deq} (ng/L) = concentration dissoute maximum des micropolluants dans les eaux de ruissellements

Ces calculs sont faits afin de mimer les concentrations environnementales utilisées mais pour des impératifs de limite de détection de laboratoire, un facteur de sécurité de 10 est ajouté à C_{dini} .

C_{dini} a été calculé pour le sol et les sédiments, il faut considérer dans le site de Compans une répartition 75% sol et 25% sédiment ce qui amène à une concentration de dopage égale à $C_{diniSol} * 0,75 + C_{diniSédiment} * 0,25$.

Le détail des calculs se trouve en **annexe 4**.

3. Mise en place des colonnes



Figure 52 : photo de la saturation des colonnes pour la mise en route de la cinétique

200g de sol sont introduits dans chaque colonne, puis les colonnes sont mises dans des béchers de 1L posées sur un support en aluminium stérile. Une fois les colonnes installées dans les béchers, 250ml d'eau Volvic dopée aux micropolluants ou non (témoins sans micropolluants : témoins B) sont versés sur le sol (**Figure 52**). Il faut ensuite attendre 15min pour que l'eau passe au travers de la colonne, là cette eau est récupérée et remise sur le sol du dessus, après 15min cette étape est refaite une dernière fois. Une fois que les colonnes sont bien saturées, l'eau est enlevée et les colonnes sont laissées 1h dans les béchers pour ressuyage. Une fois le dopage terminé, chaque colonne est pesée pour avoir l'humidité de départ puis elles sont mises à incuber dans une étuve (Memmert edelstahl) à 25°C (~26°C), à l'obscurité pendant 3 semaines (**Figure 53**). Les colonnes réalisées avec le sol stérile ont été mise en place sous hotte et recouvertes d'une boîte de Petri en verre stérile pour fermer le système. Des bacs d'eau distillée sont installés dans l'étuve pour garder une humidité constante. Le poids des colonnes a été vérifié régulièrement et un ajustement a été réalisé pour revenir au poids initial.



Figure 53 : photo des colonnes mises à incuber

Comme pour la cinétique liquide, en plus des colonnes tests avec le sol des sites et les micropolluants, des témoins sont aussi mis en place : témoins biotiques = sols des sites dopés avec de l'eau de Volvic sans micropolluants (voir comportement du sol sans les micropolluants), témoins abiotiques = sols des sites stérilisés dopés avec de l'eau de Volvic avec micropolluants (niveau basal d'activité des microorganismes). Le nombre de colonnes par condition et les pas de temps d'analyse sont regroupés dans le **tableau 12**.

	T0	T1	T3	T7	T14	T21	Total colonnes
Tests 2 sols	3*2	3*2	3*2	3*2	3*2	3*2	72
Témoins B	3*2			3*2		3*2	
Témoins A	3*2			3*2		3*2	

Tableau 12 : nombre de colonnes par conditions et les pas de temps d'analyse exprimés en jour.

b. Les analyses des sols :

2.	T0	T1	T3	T7	T14	T21
Extraction ADN	X					X
pH _{eau}	X			X		X
pH _{KCl}	X			X		X
Poids sec	X	X	X	X	X	X
NPP	X	X	X	X	X	X

Biolog	X	X	X	X	X	X
FDA	X	X	X	X	X	X
MP	X	X	X	X	X	X

Tableau 13 : les différentes analyses faites en fonction des pas de temps exprimé en jour.

Pour faire les analyses, une étape de destruction et homogénéisation des sols des colonnes est réalisée au préalable. Une fois le sol bien homogénéisé, il est pesé et réparti dans différents récipients en fonction des analyses souhaitées. Dans des tubes falcons, 5g de sol sont utilisés pour le pH, les NPP, les Biolog, la biologie moléculaire et 0,5g de sol pour la FDA. Puis 10g de sol sont utilisés pour l'analyse des micropolluants sont stockés dans des fioles en verre ambrées et 30g de sol pour le poids sec dans des récipients en aluminium.

Les analyses des NPP, des Biolog, des poids secs sont faites le jour même tandis que le pH eau, KCl et la FDA sont décalés de 24h (conservation en salle froide 4°C). Les échantillons pour la biologie moléculaire et les micropolluants sont gardés au congélateur (-20°C), toutes les analyses ne se feront pas à chaque pas de temps (**Tableau 13**).

4. Protocoles des analyses

i. Le pH

Voir le protocole cf.II.B.2.

ii. Le dosage des micropolluants

Les micropolluants (BPA, NP et OP) des colonnes ont été dosés au cours de la cinétique par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS), (Acquity UPLC-TQD, Waters). Avant le passage au LC-MS/MS, une extraction des MPs est nécessaire.

Les extractions et les analyses des MPs ont été réalisées par le personnel technique du Leesu. L'extraction des MPs est réalisée par micro-ondes, à l'aide d'un Multiwave 3000 (Anton Paar).

Une première étape consiste à préparer les échantillons via un passage au congélateur. Puis une lyophilisation (Vacuumbrand 2.5 Mediatech scientifique) des échantillons est réalisée pour terminer par un broyage des échantillons au broyeur planétaire (PM 100 - Retsch). La lyophilisation permet de sécher les échantillons solides (élimination de l'eau) sans perdre les composés organiques.

Une fois les échantillons préparés, l'extraction des MPs est possible. Pour cela, il faut 500mg de sol à mettre dans des tubes en téflon dans lequel rajouter 20ml de mélange MeOH/DCM (60/40) ainsi qu'un étalon d'extraction (25 µl). Ces tubes en téflon sont ensuite placés dans des bombes (**figure 54**). Ces bombes sont ensuite insérées dans le Multiwave et le programme approprié est sélectionné.

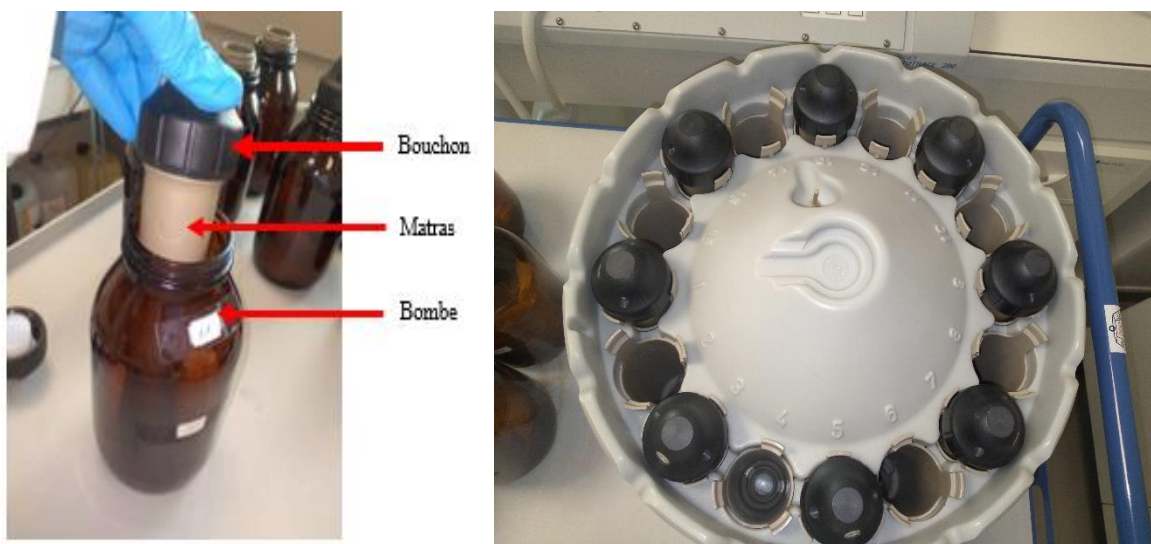


Figure 54 : Schéma de l'installation des matras et des bombes dans le Multiwave.

Une filtration de l'extrait obtenu dans les tubes en téflon est réalisée à la fin du programme du Multiwave sur des filtres plissés. Un second cycle d'extraction est lancé de la même manière (sur le même échantillon resté dans le matras) et l'extrait est ajouté dans le filtre plissé. Le volume ainsi récupéré est ensuite concentré à l'aide d'un Rotavap (Buchi). Une fois les extraits filtrés et évaporés jusqu'à environ 5 ml, il faut les purifier. La purification se fait sur colonne OASIS HLB (200 mg, 6cc). Les échantillons sont évaporés à sec puis repris dans 500 μ L d'un mélange 50% Eau/ 50% MeOH. Après un conditionnement des cartouches (3mL MeOH puis 3 d'un mélange 80% H₂O/ 20% MeOH), l'échantillon est déposé en haut de la colonne, séché 30 minutes sous vide puis élué dans un flacon brun à l'aide d'un mélange de 9 mL de MeOH/DCM/ EthylAcétate (40/40/20 v/v/v).

Une dernière étape est nécessaire pour préparer les échantillons à l'analyse au LC-MS/MS qui consiste en une évaporation sous flux d'azote. Les échantillons extraits et purifiés sont installés de nouveau dans un Visiprep destiné à l'évaporation sous flux d'azote avec l'ajout de 50 μ L de l'étalon d'injection AP/BPA. Les échantillons sont évaporés à sec puis repris dans 1ml de phase mobile A1/B1(50/50 v/v). Ils sont alors prêts à passer au LC-MS/MS (cf. analyse des micropolluants avec la cinétique en batch liquide).

iii. La biomasse microbienne avec la méthode de NPP

Le protocole suit le même principe que celui décrit en partie II.C.1. La seule différence est que la biomasse totale est étudiée dans du milieu LB sans antifongique. Le facteur de dilution est adapté en fonction des pas de temps et des sols.

iv. L'activité microbienne avec les plaques Ecolog

Le protocole suit le même principe que celui décrit en partie II.C.2. Les seules différences sont la lecture des plaques au bout de 72H et la dilution au 10^{ème} des échantillons.

i. L'activité enzymatique de la FDA

Adaptation du protocole cf.II.C.3.i pour un volume final de 15ml au lieu de 50ml.

ii. Métabarcoding total

Le protocole suit le même principe que celui décrit en partie II.C.4.

Chapitre 3 : Comparaisons de trois ouvrages de gestion des eaux pluviales au cours des saisons

Introduction

Afin de pouvoir améliorer la gestion des eaux pluviales, des structures spécifiques ont été mises en place. Ces ouvrages de gestion des eaux pluviales vont mimer le cours naturel du cycle de l'eau et permettre de limiter le transfert des micropolluants. Les micropolluants sont des composés organiques ou métalliques qui vont être néfastes pour la santé à des doses très faibles.

Plusieurs types d'ouvrages ont vu le jour avec les jardins de pluie, les Noues, les bandes enherbées, les bassins d'infiltration-rétention, etc. Maintenant l'objectif général est de comprendre le fonctionnement par lequel ces ouvrages vont empêcher la migration des micropolluants dans l'environnement et les nappes phréatiques. Plusieurs études se sont portées sur les capacités physico-chimiques de ces structures avec la rétention à la surface des sols par exemple et le transfert en profondeur. Il y a cependant peu d'article qui porte sur les micropolluants organiques au sein de ces ouvrages. Les micropolluants organiques ont la possibilité d'être biodégradés par les organismes du sol comme les plantes, les macro-organismes tels que les vers de terre et les microorganismes tels que les bactéries, les champignons, etc. Cette capacité de biodégradation des micropolluants organiques au sein des ouvrages est très importante car cela va permettre la dépollution régulière de ces sols. Cet aspect est manquant dans la littérature et cela manque pour bien comprendre le fonctionnement de ces systèmes ainsi que pour pouvoir optimiser leur fonctionnement.

Afin de compléter les données disponibles sur ces ouvrages, ce chapitre va porter sur l'étude de 3 sites comportant des ouvrages. Ces ouvrages ont été sélectionnés et étudiés en fonction de critères particuliers : l'âge de mise en service, le type de structure, la texture du sol, la végétation et la localisation par rapport à l'afflux hydrique des eaux pluviales. L'étude se fera également en fonction des saisons pour observer les sols les plus résistants. L'objectif étant de comparer les critères physico-chimiques et biologiques de ces ouvrages afin de mettre en évidence des ressemblances ou des différences entre le fonctionnement de ces structures.

Article 1 : Physico-chemical and microbiological study of soils from various source stormwater management facilities and seasonal impact

Résumé

L'objectif est ici d'étudier l'activité microbienne dans les sols des ouvrages de gestion des eaux pluviales et de mettre en évidence les points importants pour l'amélioration de la gestion de ces ouvrages. Pour ce faire, trois sites ont été sélectionnés, sur base des critères suivants : composition du sol, localisation par rapport au ruissellement, âge de l'ouvrage et couverture végétale.

Une caractérisation physico-chimique et biologique de ces sols a été réalisée en été et en hiver. Les résultats de la caractérisation ont mis en évidence 3 sites bien distincts. Dourdan, le site le plus ancien, est le plus riche et le plus actif biologiquement, Vitry est un site intermédiaire et Compans le plus jeune et le moins actif. Ceci se reflète dans les résultats physico-chimiques, avec plus de matière organique à Dourdan et Vitry, et un pH moins basique. De même, la biomasse microbienne et les activités enzymatiques (FDA, déshydrogénase et uréase) sont plus élevées à Dourdan et Vitry. Ensuite, la localisation au sein des sites entre également en ligne de compte, avec une activité biologique plus élevée dans la zone de sol recevant les apports de ruissellement. Le type de végétation joue également un rôle à Vitry, modulant la réponse microbienne. D'un point de vue génétique, le site de Dourdan sera davantage caractérisé par une dominance de protéobactéries, suivies d'actinobactéries, tandis que l'inverse sera observé pour Vitry et Compans. Ces résultats montrent le rôle joué par les micro-organismes du sol dans la biodégradation des micropolluants. La partie la plus active des structures est la zone d'arrivée des eaux de ruissellement, et plus le site est ancien, plus elle sera active.

Ces structures doivent également être conçues de manière à optimiser leurs performances en fonction des objectifs visés, par exemple en sélectionnant une végétation spécifique.

Physico-chemical and microbiological study of soils from various source stormwater management facilities and seasonal impact

Andréa Oudot, Vanessa Alphonse, Alexandre Livet, Mohamed Barakat², Wafa Achouak², Marie-Christine Gromaire¹ and Nouredine Bousserhine

LEESU, Univ Paris Est Creteil, Ecole des Ponts, Creteil, France

¹LEESU, Ecole des Ponts, Univ Paris Est Creteil, Marne-la-Vallée, France

²CNRS équipe LEMIRE, CEA Cadarache, France

Corresponding author : Andréa Oudot, andrea.oudotcroset@gmail.com

Abstract:

The aim here is to study microbial activity in stormwater management structure soils, and to highlight important points for improving the management of these structures.

To achieve this, three sites were selected based on their soil composition, location in relation to runoff, structure age and vegetation cover. A physico-chemical and biological characterization of these soils was carried out in summer and winter. The results of the characterization revealed 3 very distinct sites. Dourdan, the oldest site, is the richest and most biologically active, Vitry is an intermediate site and Compans the youngest and least active. This is reflected in the physico-chemical results, with more organic matter at Dourdan and Vitry, and a less basic pH. Similarly, microbial biomass and enzymatic activities (FDA, dehydrogenase and urease) are higher at Dourdan and Vitry. After that, localization within the sites will also come into play, with higher biological activity in the soil area receiving runoff inflow. Vegetation type does also play a role in Vitry, modulating the microbial response. From a genetic point of view, the Dourdan site will be more characterized by a dominance of *Proteobacteria*, followed by *Actinobacteria*, while the opposite will be observed for Vitry and Compans. These results show the role played by soil microorganisms in the biodegradation of micropollutants. The most active part of the structures is the runoff inflow area, and the more ancient the site, the more active it will be.

These structures should also be designed to maximize their performance according to specific objectives, such as by selecting appropriate vegetation.

Keywords: management structure at source, soil microorganisms, soil enzymes, genetic diversity

1. Introduction

Urbanization leads to increased impermeable surface area with major impacts on the environment. Rainwater that falls in cities will no longer be able to infiltrate the soil and will run off onto impermeable surfaces over long distances. This will lead on the one hand to a water depletion of soils and groundwater and on the other hand, and gives large flows to be managed by the drainage infrastructures, which in turn leads risks of urban floodings as well as combined sewer overflows. The other major impact is the contamination of this stormwater as it runs off impermeable surfaces with organic and metallic contaminants (Müller et al., 2020). To limit these 3 aspects, new nature based structures (NBSsw) that aim to manage runoff as close as possible to its source and restore the natural water cycle by enhancing infiltration and evapotranspiration have emerged (Briand et al., 2018; Fletcher et al., 2015; Rentachintala et al., 2022).

Several types of NBSsw exist, including vegetated swales, infiltration basins, rain gardens, etc. They are built, for example, on the sides of roads to collect runoff from the road as quickly as possible before it is released into the ecosystem. Roadside runoff is contaminated by micropollutants emanating from roads and cars, so it is necessary to limit their diffusion in the ecosystem (Branchu et al., 2013). These micropollutants are either metallic micropollutants such as copper, lead, cadmium, etc. (Huber et al., 2016) or emerging organic micropollutants such as bisphenol A (BPA) (Im and Löffler, 2016), alkylphenols (Mao et al., 2012), phthalates, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), biocides... (Björklund et al., 2009b; Sharma et al., 2023). Runoff will be infiltrated into the soil of the management structures and a major part the micropollutants will either be retained by either physical filtration, for the particulates phased or adsorption for the dissolved phase. These organic micropollutants trapped in the soil may later on undergo biodegradation. It is important to study the functioning of these structures to i) verify the efficiency of stormwater treatment and mechanisms involved ii) optimize the systems put in place iii) see the long-term impacts on the soil.

While numerous studies have focused on the physical and chemical processes in the soils of NBSsw, i.e. the part that will retain the micropollutants (Flanagan, 2019; LeFevre et al., 2015; Tedoldi et al., 2017), there is very scarce background on the biodegradation potential of the micropollutants (Leroy et al., 2015). Here, we are talking about the degradation of micropollutants by living organisms in the soil: fauna and flora, which can include plants, earthworms, microorganisms such as bacteria or fungi (Chaudhry et al., 2005; Sharma et al., 2023). Microorganisms are ubiquitous on the soils and are known to live even in the most extreme ones. Microbial populations living in runoff management structures will be subjected to regular influxes of contaminated water and increasing concentrations of micropollutants accumulating in the soil. It is necessary to understand how these populations will react to these stresses, which will give us a better understanding of the functioning of these structures (Reiß et al., 2021; Ren et al., 2018).

The literature contains works on microorganisms biodegrading micropollutants, but remains incomplete and very few of them concern the structure soils. We find works with bacterial or fungal species alone, sometimes the species are mixed but it is rare to see the soil consortium being used in these tests. This is a very important point because soil organisms will interact with each other, there are multiple possible interactions between microorganisms, whether positive (mutualism, symbiosis, commensalism) or negative (competition, antagonism, parasitism, predation) (Moënné-Loccoz et al., 2015). The interaction

between the microbial species of a soil will modulate their structure and thus their metabolic activity (including the biodegradation activity of micropollutants). Also, some populations will only be able to develop in the presence of other species, which is why to determine whether a soil is capable of purifying contaminated rainwater, it is necessary to take into account its overall consortium. The microbial populations of a facility's soil will differ depending on many parameters: the plants present, the soil composition, the environmental parameters, and the length of time the facility has been in place (Berg and Smalla, 2009) but also the nature, quantity and quality of inflow runoff.

In this paper, we will focus on the physicochemical and biological characterization of 11 soils collected from 5 NBSsw located at 3 different sites in Paris conurbation. The objective is to better understand the microbial functioning of these soils. The first part of the study performed in summer 2021 involved analyzing the soils' physicochemical properties, such as pH, organic matter content, cation exchange capacity, and more. Subsequently, a biological analysis of the microorganisms was conducted, including assessments of microbial biomass, enzymatic activity, potential activity (Ecolog plate), and a molecular biology analysis to identify the present species. Finally, a second round of analysis was performed in winter 2021 to observe the impact of seasonal changes on the functioning of the microbial populations in these structures.

2. Materials and methods

2.1. Sites description and soil sampling

Sites description

11 soils, sampled in five different NBSsw, collecting road runoff from three different road sites in Paris conurbation (France), have been studied. These sites were selected based on previous studies by (Flanagan, 2018; Tedoldi et al., 2017). The watershed characteristics, including anthropic activities, the annual average daily traffic in the vicinity of the study sites are indicated in Table A. The average annual rainfall in the Paris region over the period 1981–2010 is ~640 mm (source: Météo France). Inflow of water into the infiltration systems consists in either an inlet pipe (Dourdan) or surface runoff directly flowing from the pavement (Vitry, Compans). At Compans, the vegetative filter strips were constructed in September 2012 but a clearance took place in June 2020 which removed the topsoil layer and put the age of this work back to its initial point. The biofiltration swale (constructed in March 2016) was not impacted by the clearance.

Table A. Description of study sites (¹ : based on Tedoldi 2017 and Flanagan et al. 2017; ²: after soil stripping, In soil concentration is expected to be similar to the ref value)

Site name	Dourdan	Compans			Vitry	
SCM type	Detention/infiltration	Vegetated filter strips		Biofiltration swales		
SCM code	IB_D	VFS1_C	VFS2_C	BFS_C	BFS1_V	BFS2_V
Catchment type	Departmental road (4900 veh/day)	Departmental road (22000 veh/day), high truck traffic			Industrial area service road, high truck traffic	
Inflow of water	Localised piped inflow	Diffuse inflow by surface runoff				

Soil texture	Sandy loam	Clay loam	Sandy loam (filter substrate)	Loam	
Operating time	25 years	1 year (top soil stripping in June 2020)		5 years	15 years
Vegetation	Spontaneous vegetation			<i>Carex gracilis</i>	Trees Grasses + spontaneous vegetation
Cu soil content (mg/kg) ¹	In ≈ 160 ; Ref ≈ 20	In ² ≈ 250 before soil stripping; Ref ≈ 40		NA	In ≈ 110; Ref ≈ 50

Soils sampling

Soil samples used in this study were collected during the summer 2021 (June September) and the winter (February) 2022.

For the Compans biofiltration swale, which is relatively narrow, one composite soil sample (0-10 cm depth) covering the whole surface of the filter was constituted. For the other SCMs (Dourdan and Vitry), two composite samples (0-5 cm depth for Vitry and 0-10 cm for Dourdan) were collected: one representative of the area next to the runoff inflow (Inlet: In) and one representative of the area that is the furthest from the inflow (reference: ref). The sampling depth was chosen on the basis of a previous study (Tedoldi 2017). The sampling zone corresponds to the PM accumulation zone. For the Vitry biofiltration swale, two swale portions were studied, one planted with trees and the second with low and spontaneous vegetation.

Soils preparation

The soil sample were dried at 25°C for 1 week then they were crushed and sieved at 2mm. On-site samples are taken all along the structure to then be grouped into a single representative sample of the entire area of the targeted structure. These 11 composite soils are then stored at room temperature while samples were stored at -20°C for molecular biology.

2.2. Soil samples characterization

In order to characterize the main physico-chemical and biological properties, granulometry, pH, organic matter content (OM), field capacity (FC), cation exchange capacity (CEC), total major element (Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺) and microbial biomass (determined by MPN: most probable number), microbial enzymatic activities (fluorescein diacetate: FDA, dehydrogenase: DH, urease: UR), microbial functional diversity (by Biolog Ecoplate), microbial genetic diversity were determined. These analyses will allow us to determine the main differences between the soils and the sites studied.

2.2.1. Physical and chemical soils analysis

Soil granulometry determination

Granulometric fractionation was achieved by sedimentation on the fraction less than 2mm. This analysis was done according to the NF X 31-107 standard (July 1993) and separates the soil into 5 classes of particles: clay (<2 μ m), fine silts (2-20 μ m), coarse silts (20-50 μ m), fine sands (50-200 μ m), coarse sands (200-2000 μ m). Before the sedimentation, a soils preparation was carried out with in first step, the destruction of the organic matter by hydrogen peroxide (H₂O₂), in second the destruction of carbonates

by hydrochloric acid (HCl), then a succession of washing and a last step to maintain the soils particles dispersed with an addition of dispersant ((NaPO₃)₆) associated with an ultrasonic passage. The results have been regrouped into 3 class: clay, silt and sand. The soil in the Compans swale and VFS2: a mixture of topsoil and granulometric sand composed of crushed limestone (around 60% of construction volume). This sand is largely destroyed by the decarbonation phase, which biases texture measurements.

Soil pH measurements

Soils pH was measured in soil suspensions by shaking 5g of soil in 25ml water (ratio 1:5) for 1 hour and 1 hour of rest then by using a pH-metre (HANNA pH 211 Instruments) with a sensor (HI 1053) according to ISO 10390 standard.

Soil organic matter content measurements

To organic matter quantity, the loss on ignition (LOF) method for dry matter is performed. This is based on the calcination of OM, for which 5g of dry soil will be subjected to high temperature (550°C) for 3 hours in a Nabertherm GmbH LE140K1BN oven, during which the OM will be oxidized to volatile products (CO₂...). By subtracting the initial mass, the OM content can be obtained using the following empirical formula (Minasny et al., 2020; Van Bemmelen et al., 1890):

Organic C loss (g) = initial mass (g) - final mass (g)

OM content (g OM /g dry soil) = 1.72* C organic content (g C org/g dry soil)

Soil fiel capacity determination

Field capacity is the highest quantity of water a given soil can hold. To do this, a soil is saturated with water for 24 hours, then dried for 48 hours. The starting mass is taken and the weight after re-drying is measured. Subtracting these values gives the water retained by the soil, which can be reduced to the initial soil quantity, giving the following formula:

FC (mL / g dry soil) = (wet mass (g)-dry mass (g))/ dry mass (g)

FC (mL / g dry soil) = retained water (mL)/ dry mass (g)

Soil CEC determination

CEC (in cmol_e/kg) was measured in soils by the cobaltihexamine method (standard NF X31-130, May 1993). After addition of cobaltihexamine to the soil suspensions and stirring, the Genesys 10 UV scanning spectrophotometer (Thermo scientific) is used for reading of cobalt ions (Abs 475/380 nm). It is the difference in concentration between the initial cobalt solution (maximum concentration) and the cobalt concentration of the soil samples that will give us the amount of cobalt that has adsorbed onto the complex and this gives us the CEC. Then the exchangeable cation (Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺) concentrations were determined using Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, SpectroBlue FMS 16 spectro analytical instruments).

2.2.2. Biological soils analysis

Soil microbial biomass

The Most Probable Number (MPN) procedure was used to determine the total soil microbial biomass. This method counts the total number of heterotrophic bacteria and fungi. One gram of soil was mixed with 9ml NaCl (9g/l). Agitated 1 hour, centrifuged 10 min at 3000rpm, ten serial dilutions were made, ranging from 10⁻¹ to 10⁻⁵. For the enumeration of total bacteria, the plate wells were filled with LB plus fungizone,

and for the enumeration of fungi, malt extract plus ampicillin was used, 200µl in the negative control well and 180µl in the other wells. The plates were inoculated in eight wells per dilution (20µl). Plates were incubated for 3 and 7 days (for bacteria and fungi respectively) at 25°C in the dark. After incubation, the growth of microbial populations was determined spectrophotometrically by measuring absorbance at 620nm (Multiskan FC plate spectrophotometer, Thermo Scientific). A computer program (using standard Mac Grady tables) was used to calculate the MPN for each sample, expressed as numbers of cell microorganisms per gram of dry soil weight.

Soil microbial enzymatic activities determination

FDA measurement

The FDA (fluorescein diacetate) allows to determine the total enzymatic activity of a soil. This molecule will be cleaved by hydrolysis by a set of soil enzymes into fluorescein. Fluorescein is a yellow fluorescent molecule that can be measured spectrophotometrically at a specific wavelength at 490nm (Green et al., 2006). Soil samples were pre-incubated for 24 hours at 27°C. The soil solution was mixed with phosphate buffer (pH 7,2) and FDA reagent (C₂₄H₁₆O₇, Sigma Aldrich). The mix was incubated 2h on an orbital shaker and then centrifuged at 2000 rpm for 20min. The color intensity of the solution was measured with the Genesys 10 UV scanning spectrophotometer (Thermo scientific) at the chosen wavelength (490nm).

Dehydrogenase measurement

Dehydrogenase (DH) activity was determined according to (Klein et al., 1971; Kumar et al., 2013). Soil samples were pre-incubated for 24 hours at 27°C. The soil solution was mixed with TTC 3% (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) as substrate. The color intensity of the solution after 72 hours of incubation at 27°C was determined by colorimetry at 485nm.

Urease measurement

Methods have been developed to study this urease (UR) in soils by (Kandeler and Gerber, 1988; Nannipieri et al., 1978a). After a pre-incubation of 24 hour at 27°C, the soil solution was mixed with urea as substrate in a borate buffer. The reading of ammonium will be possible thanks to the reaction of blue-indophenol giving a green colored complex detectable at 665 nm with the Genesys 10 UV scanning spectrophotometer (Thermo scientific).

Soil microbial functional diversity

Biolog plates are used to study the functional diversity of microbial communities in a sample (community-level physiological profiles). Specific plates to study environmental microbial communities are used, these are the BIOLOG EcoPlate™ (Biolog Inc., CA, USA) (Preston-Mafham et al., 2002).

Each 96-well plate was composed of 31 substrates and a water control replicated three times. Microbial cell suspensions were prepared by agitating 1g of soil in 9ml of NaCl (9g/l) for 1 hour on a rotating agitator and then centrifuging the suspensions 10 min at 3000rpm to eliminate soil particles. A dilution of the supernatant is performed to reach a 100-fold dilution for each soil. Plates were inoculated with 150µl of solution per well and incubated 168 hours at 25°C. The plates are then measured with the Multiskan FC plate spectrophotometer (Thermo Scientific) at 595nm. Tetrazolium chloride present in each well will be reduced to formazan during the metabolism of the substrates by the microorganisms which is purple in color (595nm). The more the carbon sources are degraded by the microorganisms, the more the coloration will be important. Average well color development (AWCD) was calculated:

$$AWCD = (\Sigma(C_f - C_i)) / n$$

C_f = Final measured absorbance for one triplicate: 31 wells,

C_i = Initial measured absorbance for one triplicate: 31 wells,

n = wells number = 31

Soil microbial genetic diversity

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from 0.5g of soil using FastDNA™ spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Europe, LLC) and resuspended in 100-μl DES following the manufacturer's instruction. DNA concentration was estimated with a NanoVue Plus™ (Biochrom, USA) and by migration on agarose gel (Mini Gel II (VWR) Electrophoresis System). DNA was stored at -20 °C until further analyses.

Sequencing

DNA extracts are sent to Eurofins Genomics Europe (Konstanz, Germany) for illumina MiSeq sequencing of bacterial and fungal DNA. Bacterial primers will target the V3-V4 region of 16S RNA (357F-TACGGGAGGCAGCAG, (Turner et al., 1999) and 800R-CCAGGGTATCTAATCC, (Kisand et al., 2002)) and fungal primers will target the ITS2 region (ITS3-GCATCGATGAAGAACGCAGC et ITS4-TCCTCCGCTTATTGATATGC (White et al., 1990)).

Sequence quality

The phylogenetic position of bacteria and fungi in the different samples was characterized using taxa summary QIIME script until genus level (L6). After quality control trimming (removal of low-quality sequences and chimeras), a total of 1.906.648 bacteria effective sequences and 1.733.519 fungi effective sequences were generated from 22 samples and utilized for analysis. Effective sequences recovered after cleaning vary from 44 to 73% for bacterial sequences and from 59 to 89% for fungal sequences. The average length of the bacteria sequences after processing was 417 bp for all samples and the fungi sequences was 328 bp. All rarefaction curves tended to approach the saturation plateau indicating that a reasonable number of individual samples had been collected.

2.3. Statistical analysis

The results for chemical and biological soils analysis are presented as the mean ± SD of 3 samples. Statistical analyses were performed with R-4.2.2 (31-10-2022) software. The data were not normally distributed so the Kruskal–Wallis test was used (all effects were considered significant when P<0.05). Then the conover-iman multiple comparison test was performed (significant differences being represented by different letters). The principal component analysis (PCA) circle correlation was performed using 8 variables (OM%, pH, FC, CEC, microbial biomass, FDA, DH, UR, AWCD) to provide an overview of relationships between all variables in a single figure.

3. Results and discussion

3.1 Physical and chemical properties of the soils

3.1.1 Soils physical and chemical properties, comparison between sites

Soil characteristics are summarized in **table 1** and **2** for the summer samples and in **table 3** for the winter samples. Starting with granulometry (**table 1**), the 11 soils are mainly made up of silt (28-69%),

clays are also present but to a lesser extent (14-35%). On the other hand, the soils are much less homogeneous in the sand quantity present (7-58%). For Dourdan site, the In soil is loamy while the ref soil is loamy-sandy. There are few carbonates for Dourdan and Vitry sites. For Compans site, we can see 2 trends: VFS1_C low (4-6%) in carbonate and VFS2_C as well as BFS_C rich (19-41%) in carbonate due to the use of an engineered substrate consisting in a mixture of calcareous sand (approx. 60% in volume at the construction time) and top soil. The texture calculated in our case for VFS1_C and BFS_C differs from that previously for the same sites by (Flanagan, 2018; Tedoldi et al., 2017) and which was sandy loam. This difference can be explained by differences in the applied protocol. In the case of Flanagan, 2018 and Tedoldi et al., 2017 grain size distribution was measured without previous decarbonation, while in this study the granulometry protocol contains a carbonate destruction step.

Summer soil pH measurements (**table 1**) indicated that the Vitry and Compans site are more basic than the Dourdan site. According to the report on the state of soils in France (2011), the Dourdan soils are neutral (pH between 6.5-7.5), the Vitry soils basic (7.5-8.5) and the Compans soils are basic to very basic (>8.5). However, Compans soils become more acidic in winter (**table 3**), moving into the basic soil category (7.5-8.5). There are significant differences for the soils (summer and winter) of Dourdan and Vitry between Inlet and reference, the In soils being more basic than the ref soils. For the Vitry site, differences due to vegetation are also observed, the soils with trees are more basic than the soils with herbaceous plants. There is no significant difference observed between Compans strip soils in summer but significant differences appear in winter. Soil removal from the Compans strips may explain the same pH level in all filter strip soils in summer (12 months after removal). The pH acidification after 19 months may indicate the beginning of the return to normal in the Compans soils and could give an indication on the time needed for these soils to return to a functional state. The soil constitution (amount of carbonate, nature of organic matter, etc.) can impact the pH and explain the differences between soils (Pietri and Brookes, 2008).

The In soil of Dourdan is very rich in organic matter (>20%), the Vitry soils have an intermediate richness between 10 and 20% organic matter (OM). While the Compans soils (5 to 10%) and Dourdan reference (8%) are poorer in OM (Henin et al., 1969). Inlet/reference significant differences are present for the 3 sites (**tables 1 and 3**).

It should be noted that the soils of Vitry and Dourdan Inlet have a much greater quantity of organic matter than usual for natural soils, while Compans shows OM values in the range of natural soils. It is considered that natural soils have a OM content in the range 1 to 10 % in France ("L'état des sols de France," 2011) with focus in Brittany. Similar values can be found in other countries such as Iran with a OM quantity of 7-8% for planted and forest soils (Kooch et al., 2020) or England with agricultural soils having OM values ranging from 2 to 8% (Johnston, 1986). With regard to the soils of SCMs, the values found in the literature vary from 3 to 18% according to (Deeb et al., 2018) and from 10 to 14% for (Badin, 2011). We find values similar to natural soils but with a greater interval for very rich soils (Vitry and Dourdan Inlet are close to their high values). It should be noted that the low OM values of Compans come from i) the derasing of VFS1/2 (2020) which greatly reduces the reserves of OM, ii) the youth of the swale who didn't have enough time to build a soil rich in OM.

In summer (**table 1**), the most important field capacity (FC) is at Dourdan Inlet (almost 79%). Dourdan reference, Vitry soils and Compans BFS_C have similar (50-55%) FC with significative differences between In and ref. VFS1/2 have lower FC (36/43%) with no difference In/ref. In winter (table 3), 2 FC trends are observed: the soil Inlet of Dourdan and the soils of Vitry have the same trend with values around 63% to 70%. There are significant differences Inlet/reference for all soils except for Vitry soil with trees. FC related to soil components such as OM and texture. Soils with high water and nutrient content are soils that will encourage soil populations to develop and, conversely, soils poor in water and nutrients will not be able to have a rich biological dynamic (Kooch et al., 2020). The water content can also influence the mobility of microorganisms and impact the bioavailability of micropollutants by resuspending them (Shchegolikhina and Marschner, 2013).

Table 1: Mean physical and chemical characteristics of summer soils used for experiments (n=3, mean \pm SD). OM: organic matter, FC: field capacity. For each parameter, values followed by different letters differ significantly ($P < 0.05$) with Conover-Iman test of multiple comparisons after Kruskal-Wallis non-parametric test.

Site	SCM code	Location	pH	OM %	FC %	Granulometry (n=1), %			
						Clay	Silt	Sand	CaCO ₃
Dourdan (summer)	IB_D	In	7.56a ± 0.10	22.3a ± 0.47	78.8a ± 1.3	26	37	37	2
		ref	6,95b ± 0.06	7.8b ± 0.27	52.4b ± 1.2	14	28	58	1
Vitry (summer)	BFS1_V	In	8.36c ± 0.02	17.9c ± 0.29	55.2c ± 1.8	30	39	32	8
		ref	8.22d ± 0.02	14.6d ± 0.44	51.2b d ± 3.2	28	53	19	6
	BFS2_V	In	8.20d ± 0.01	17.4e ± 0.07	55.9c ± 1.5	26	35	39	9
		ref	8.03e ± 0.03	13.7f ± 0.02	49.8d ± 1.0	35	48	17	5
Compans (summer)	VFS1_C	In	8.60f ± 0.06	6.8g ± 0.14	43.5e ± 0.6	23	62	15	6
		ref	8.55f ± 0.02	6.0h ± 0.22	43.5e ± 1.1	24	69	7	4
	VFS2_C	In	8.51f ± 0.03	6.2h ± 0.23	36.5f ± 2.0	34	39	27	33
		Ref	8.54f ± 0.04	5.2i ± 0.05	37.2f ± 3.1	25	58	17	41
	BFS_C	/	8.43g ± 0.02	10.0j ± 0.25	50.4b d	27	32	41	19

					± 3.5				
--	--	--	--	--	-------	--	--	--	--

The summer and winter values of soil effective cation exchange capacity varies from 7,5 cmol₍₊₎/kg to 23,3 cmol₍₊₎/kg. For Vitry and Dourdan Inlet, we have values of more than 20 which show a high potential for cation reserves, for VFS1_C (In and ref) we have high values around 15. On the other hand, the soils of Compans and Dourdan reference have values around 10 or even less, which means that these soils have a low potential to store cations. The soils heterogeneity shows significative differences in the results: i) for Dourdan, CEC higher Inlet ii) for Vitry and Compans, CEC higher reference and for Vitry, a significative impact of vegetation can be observed.

For Compans, the differences observed between VFS1/2 are due to the presence of the filtering substrate (60% carbonated sand) in VFS2, which limits the formation of clay-humic complexes and therefore gives a lower CEC.

It's possible to find a broad spectrum of CEC ranging from 1 to 30 cmol₍₊₎/kg (Domene et al., 2009; Klečka et al., 2001; Tao et al., 2021). With the work of (Domene et al., 2009), we see that the lowest CEC is found in the sandiest soils (80% sand = CEC of 7 / 45% sand = CEC of 9 / 36% sand = CEC of 14). According to (Adam et al., 2021), clay contributes significantly to CEC (Khaledian et al., 2017) but when the amount of silt is very high then there is a significant relationship between silt and CEC (also obtained with (Liu et al., 2020)). Based on the report ("L'état des sols de France," 2011), the natural values of loamy soils are around 15-30 cmol₍₊₎/kg while for sandy soils, the values are below 15 cmol₍₊₎/kg.

If we look at exchangeable cations, a relationship between OM and CEC is shown by the work of (Solly et al., 2020) as well as the impact of pH on the exchangeable cations contribution. With pH around 7.5-8, calcium concerns 80% of the distribution of exchangeable cations, decreasing in pH around 6.5-7, calcium is at 60% and this decrease continues as that we arrive in acidic soils.

Basic soils therefore have a tendency to be highly saturated with calcium as found for the soils of the present study. This high saturation in Ca²⁺ can have beneficial effects (improvement of structure stability, increase in pH which induces positive impacts on biological activity) but also harmful effects (presence of CaCO₃ can disturb the balance of biodiversity with the blocking of secondary mineralization, competition in the absorption of other cations) (Baize and Girard, 2008).

Table 2: Mean physical and chemical characteristics of summer soils used for experiments (n=3, mean \pm SD). CEC: Cation exchange capacity. For each parameter, values followed by different letters differ significantly ($P < 0.05$) with Conover-Iman test of multiple comparisons after Kruskal-Wallis non-parametric test.

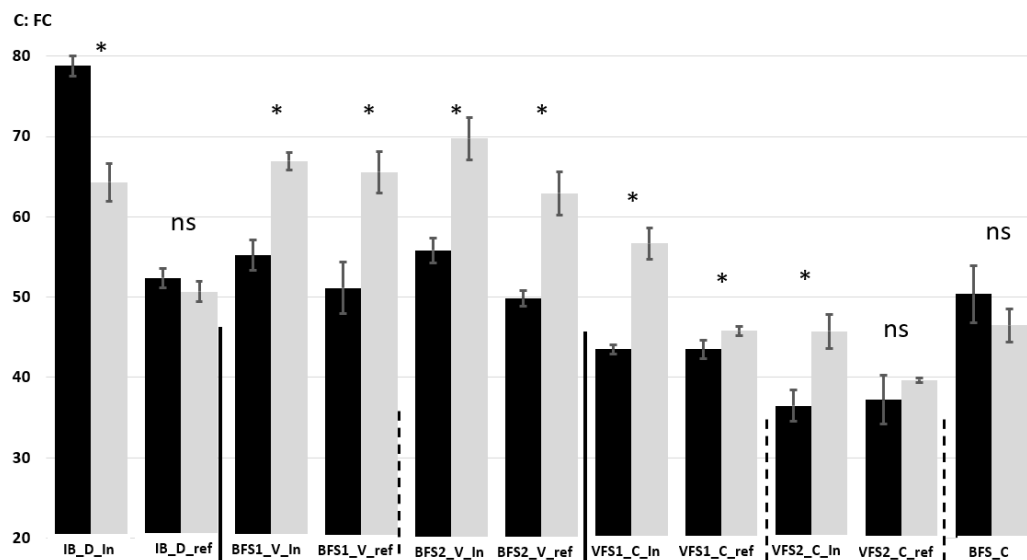
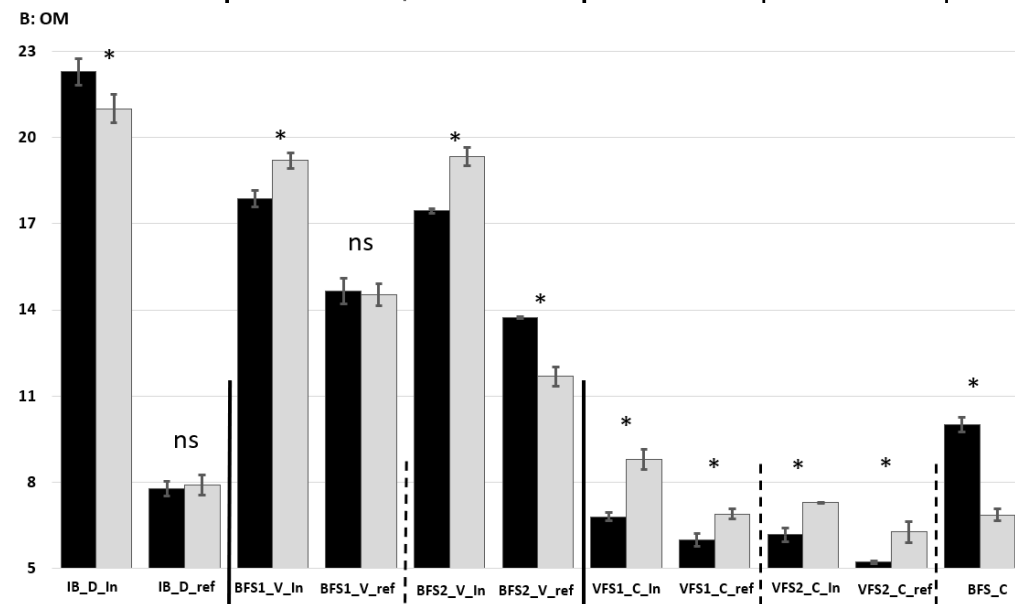
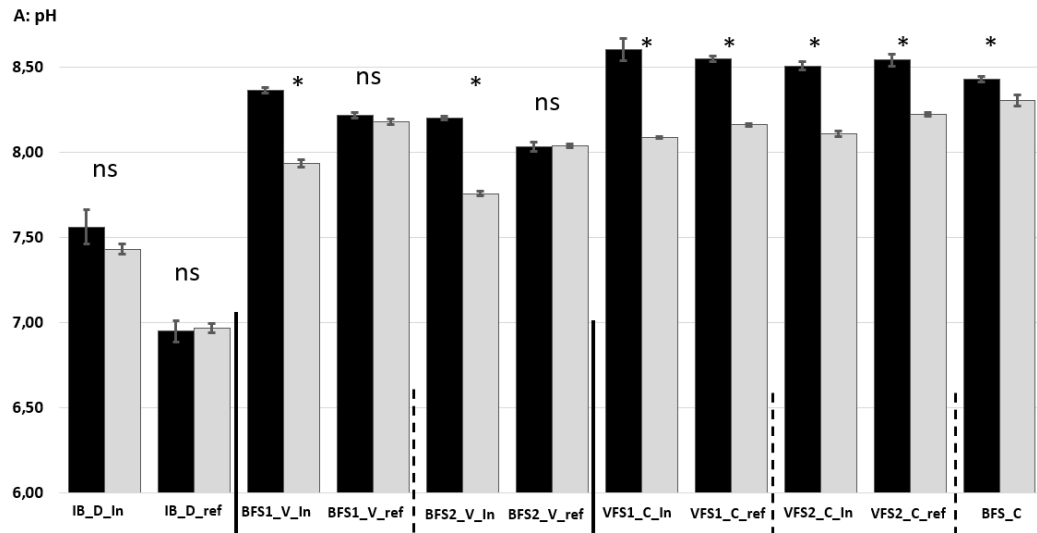
Site	SCM code	Location	CEC cmol+/kg	Exchangeable cations, cmol+/kg			
				Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺
Dourdan (summer)	IB_D	☐	23.3a ± 0.6	22.9a ± 0.2	0.62a ± 0.02	0.07a ± 0.00	0.00a ± 0.00
		Ref	10.3b ± 0.1	9.0b ± 0.2	0.64b ± 0.01	0.06a ± 0.01	0.27b ± 0.01
Vitry (summer)	BFS1_V	In	21.3c ± 0.1	18.2c ± 0.4	1.70c ± 0.04	0.31b ± 0.01	1.91c ± 0.03
		Ref	22.0d ± 0.3	19.2d ± 0.2	1.81d ± 0.02	0.25c ± 0.00	2.49d ± 0.03
	BFS2_V	In	19.9e ± 0.4	17.9c ± 0.4	1.44e ± 0.02	0.19d ± 0.00	1.01e ± 0.02
		Ref	21.2c ± 0.4	19.3d ± 0.2	1.35f ± 0.01	0.27e ± 0.00	1.49f ± 0.01
Compans (summer)	VFS1_C	In	15.1f ± 0.1	14.8e ± 0.2	0.53g ± 0.00	0.83f ± 0.01	0.00a ± 0.00
		Ref	16.2g ± 0.1	15.6f ± 0.1	0.67h ± 0.01	0.30b ± 0.01	0.00a ± 0.00
	VFS2_C	In	7.5h ± 0.4	7.5g ± 0.3	0.24i ± 0.01	0.19d ± 0.01	0.13g ± 0.01
		Ref	8.0i ± 0.2	7.9h ± 0.2	0.33j ± 0.01	0.09g ± 0.00	0.12g ± 0.00
	BFS_C	/	12.7j ± 0.6	12.7i ± 0.6	0.58k ± 0.03	0.19d ± 0.01	0.19h ± 0.01

Table 3: Mean physical and chemical characteristics of winter soils used for experiments (n=3, mean \pm SD). OM: organic matter, FC: field capacity, CEC: Cation exchange capacity. For each parameter, values followed by different letters differ significantly (P < 0.05) with Conover-Iman test of multiple comparisons after Kruskal-Wallis non-parametric test.

Site	SCM code	Location	pH	OM %	FC %	CEC cmol+/kg	Exchangeable cations, cmol+/kg			
							Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺
Dourdan (winter)	IB_D	In	7.43a \pm 0.03	21.0a \pm 0.50	64.3a b \pm 2.3	22.3a \pm 0.2	23.9a \pm 0.5	0.95a \pm 0.02	0.12a \pm 0.04	0.44a \pm 0.00
		Ref	6.97b \pm 0.03	7.9b \pm 0.36	50.7c \pm 1.3	11.5b \pm 0.3	10.7b \pm 0.2	0.83b \pm 0.02	0.00b \pm 0.00	0.50b \pm 0.01
Vitry (winter)	BFS1_V	In	7.93c \pm 0.02	19.2c \pm 0.27	67.0d e \pm 1.1	21.5c \pm 0.3	21.9c \pm 0.2	1.69c \pm 0.03	0.20c \pm 0.00	1.10c \pm 0.01
		Ref	8.18d \pm 0.02	14.5d \pm 0.38	65.6a d \pm 2.6	22.0d \pm 0.2	19.2d \pm 0.3	2.01d \pm 0.04	0.22d \pm 0.01	3.10d \pm 0.06
	BFS2_V	In	7.76e \pm 0.01	19.3c \pm 0.31	69.7e \pm 2.7	19.6e \pm 0.1	20.0e \pm 0.2	1.33e \pm 0.02	0.24d \pm 0.01	0.89e \pm 0.02
		Ref	8.04f \pm 0.01	11.7e \pm 0.34	62.9b \pm 2.7	21.2f \pm 0.4	21.1c \pm 0.6	1.59c \pm 0.06	0.16a \pm 0.00	1.57f \pm 0.05
Compans (winter)	VFS1_C	In	8.09g \pm 0.01	8.8f \pm 0.35	56.7c \pm 2.0	16.2g \pm 0.3	18.5df \pm 1.2	0.68f \pm 0.04	0.92e \pm 0.05	0.25g \pm 0.01
		Ref	8.16h \pm 0.01	6.9g \pm 0.19	45.8f \pm 0.6	17.1h \pm 0.1	18.1f \pm 0.6	0.66fg \pm 0.24	0.28f \pm 0.01	0.30h \pm 0.01
	VFS2_C	In	8.11i \pm 0.02	7.3h \pm 0.01	45.7f \pm 2.1	9.0i \pm 0.3	9.6g \pm 0.2	0.32e \pm 0.00	0.78g \pm 0.02	0.23i \pm 0.01
		Ref	8.22j \pm 0.01	6.3i \pm 0.36	39.7g \pm 0.3	8.5j \pm 0.1	8.9h \pm 0.1	0.44h \pm 0.01	0.16a \pm 0.00	0.37j \pm 0.00
	BFS_C	/	8.32k \pm 0.01	6.9g \pm 0.20	46.5f \pm 2.1	10.8k \pm 0.3	12.0i \pm 0.5	0.51g \pm 0.02	0.50h \pm 0.03	0.24i \pm 0.00

3.1.2 Soils physical and chemical properties: comparison of the summer/winter campaigns

Now the objective is to determine the seasonal influence on these physico-chemical soil results. The summer/winter results for a same soil will be compared to find out if there are significant differences or if there are no significant differences in the results between seasons.



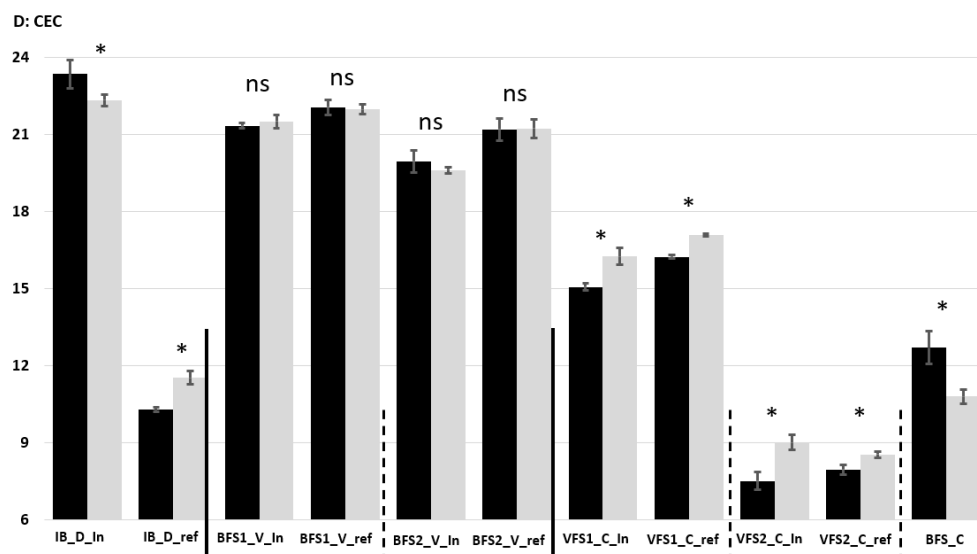


Figure 1: Mean physical and chemical characteristics of summer (dark histogram) and winter (light histogram) soils used for experiments (n=3, mean \pm SD). A = pH; B = OM: organic matter; C = FC: field capacity; D = CEC: Cation exchange capacity. For each graph, the summer/winter results are examined with Conover-Iman test of multiple comparisons after Kruskal-Wallis non-parametric test. Significant summer/winter differences of the same soil are represented by (*) and (ns) when there is no significant difference.

The results show that there is no significant difference in pH between both seasons at Dourdan. The seasons also do not impact the reference soils of Vitry. However, there is a visible impact of the sampling period on the Inlet soils of Vitry as well as the Compans soils. For these soils, an acidification is observed in winter. For the Vitry site, the difference between both sampling periods is mainly noticeable for the Inlet soils which receive important runoff and micropollutants loads while for Compans, the acidification is observed for the 5 soils but especially for the strip soils. For Compans, the soil disturbance surely intervenes in this pH shift, the soils return to less basic pH levels. For the swale, there is a significant difference in pH between summer and winter, but it remains a negligible difference compared to the other soils.

It is possible to find studies on the physico-chemical characteristics of soils and the impact of seasons such as the work of (Kopecky et al., 2011). In this work (upper horizon of the forest soil: 0-10cm), there was no significant difference in pH between summer and winter soils, which corresponds to the soils of Dourdan and Vitry aval. For the soil OM (Kopecky et al., 2011) observed a significant increase of OM in winter compared to summer. (Muscolo et al., 2014), didn't observe any significant change in OM between the 4 seasons studied (summer, fall, winter, spring) for forest soils (0-5cm). With our results, only 2 soils didn't show a significant difference in OM between summer and winter which are the soils reference of Dourdan (IB_D_ref) and reference of Vitry with tree (BFS1_V_ref). Two trends can be established: either there is a significant increase of OM in winter (feb. 2022) with the soils Inlet of Vitry and the soils of the Compans strips while there is a significant decrease of OM in winter with the soils Inlet of Dourdan and Vitry with the herbaceous plants and the swale. For the Compans strips, the impact of the derasement is still visible here with an increase in OM of the 4 impacted soils. There is also an increase in OM for the soils Inlet of Vitry which can be linked to the decrease in pH seen previously. The significant difference seen at Dourdan

Inlet is still negligible (summer = 22.3 ± 0.47 ; winter = 21.0 ± 0.50). Most of the soils with no significant difference in pH also have no significant difference in OM due to the impact of the seasons.

The pattern changes for FC, there is a significant increase in FC in winter for the Vitry soils and the Inlet Compans soils. There is no significant difference in FC for the reference soils of Compans and Dourdan as well as for the swale. Finally, there is a significant decrease in FC for the Inlet soil of Dourdan. For CEC, there is no significant difference in winter in Vitry, but there is a significant increase in CEC for the Compans soil and for the reference Dourdan soil, and finally a significant decrease in CEC for the Inlet Dourdan soil and the swale.

First, we can see the significant impact of the sampling period on the results of these different parameters. However, these differences must be related to the other criteria studied, which are spatial heterogeneity (Inlet/reference), age, and the structure maintenance actions. Indeed, it is often found that the Inlet soils are the most impacted in winter compared to the reference soils of the same site. The Dourdan site also seems to be the least impacted by seasonal effects and is the oldest site. Finally, the maintenance of the structures biases the seasonal impact study for the Compans strips because these soils are at an initial level in summer (12 months after removal), they will continue to evolve rapidly to return to a more natural state. What is observed in winter (19 months after disking) is not the impact of seasonal change, but rather the additional 7 months that the soils were given to evolve.

Following the analysis of the physico-chemical results, several points stand out: i) the 3 sites have very different soils, ii) the soils within the same site are also different, iii) an influence of the plants, the structure's age, the spatial heterogeneity, the sites' maintenance, the seasons is observed. Now we want to know how this will be reflected from biological point of view. This is why we move on to the analysis of soil microbial communities with the determination of biomass, activity and microbial diversity.

3.2 Biological properties of the soils

3.2.1 Microbial biomass and enzymatic activity of summer and winter campaign soils

The microbial biomass of soils was estimated by the Most Probable Number (MPN) which is a statistical estimate, this estimate only concerns cultivable heterotrophic microorganisms. This method only gives us an idea about the soil richness, variations can occur.

To start with the summer soils (**table 4**), the IB_D_In soil seems to be the richest in microorganisms with $3.71\text{E}+05$ NPP/gSS. The Vitry soils come after with values ranging from $5.59\text{E}+04$ to $1.32\text{E}+05$ NPP/gSS. The Compans and IB_D_ref soils are the poorest in microbial biomass with values of $5.54\text{E}+03$ to $4.79\text{E}+04$ NPP/gSS. Significant differences are present between Inlet and reference of the same site except for BFS2_V. In winter (**table 5**), the microbial biomass decreases for all sites except for IB_D_ref which sees its biomass increase to $1.82\text{E}+05$ NPP/gSS. The significant differences that we are going to find for Vitry are reversed, that is to say that there is no more significant difference with BFS1_V but that differences appear with BFS2_V. These changes can either be due to the impact of the seasons and a different development within the microbial populations in summer/winter or this variability could be due to the MPN method which lacks precision.

If we look at these results with what we find in natural soils, we have biomasses that are globally low. (Bidaud, 1998; Burns et al., 2013; Chaussod, 1996) estimate the quantity of bacteria in the soil ranging

from 10^7 to 10^9 . By looking at soils subjected to pollution as in the work of (Andreoni et al., 2004), the microbial biomass reaches $3.9E+5$ CFU/g which corresponds to our richest soils. However, other soils subjected to pollution can show a higher biomass as can be seen in the work of (Wu et al., 2017). Their soil subjected to oil pollution has a biomass of $2.3E+7$ cells/g. There are several methods to determine microbial biomass (MPN, direct counting, substrate-induced respiration: SIR, fumigation extraction method: (Badin, 2011), etc), literature comparisons to estimate the richness of one soil compared to others are only an indication.

In summer (**table 4**), the highest FDA activity with a fluorescein value of $89\mu\text{g/gSS/h}$ is found in the In BFS2_V soil. The In IB_D and BFS1_V soils have significantly lower activity but still very high with values of 76 and $80\mu\text{g/gSS/h}$. The Ref soils follow a similar trend, the highest activity is found with the BFS2_V soil $51\mu\text{g/gSS/h}$ while for IB_D and BFS1_V 14 and $36\mu\text{g/gSS/h}$. At this level, 2 characteristics stand out: i) the BFS2_V structure is the most active in FDA ii) the In soils are much more active than the ref soils. Then for the Compans site: a slight significant difference In/ref is visible for VFS1_C (4 and $3\mu\text{g/gSS/h}$), no significant difference for VFS2_C ($6\mu\text{g/gSS/h}$) and BFS_C is the most active soil in Compans ($20\mu\text{g/gSS/h}$). In Vitry, the higher FDA activity with BFS2_V soils shows an impact of plants that can promote enzymatic activity. For Compans, the impact of the soil disturbance of the VFS 1/2 is again illustrated by these low FDA activities.

The FDA activity values for the VFS are low, but for BFS_C and the ref soils ($14-51\mu\text{g/gSS/h}$), the values are not so low when compared with other work. Indeed, with the work of (Chaer et al., 2009), we find values ranging from 29 to $35\mu\text{g/gSS/h}$ for agricultural and forest soils and with work on alternative structures (Unger et al., 2013), we find values of $40\mu\text{g/gSS/h}$ (vegetative filter strips). It is rather the results found Inlet that show a very high activity.

Other results show that the activity of the FDA can be impacted by xenobiotic stresses with a strong inhibition of its activity (Andreoni et al., 2004; Tao et al., 2021). With the results of (Andreoni et al., 2004), three soils were studied: a soil polluted with PAHs for 50 years with no detectable FDA activity, a soil with no significant pollution with an activity of $186\mu\text{g/gSS/h}$ and a last soil that had suffered a pollution accident three years ago with an activity of $8.5\mu\text{g/gSS/h}$. This last soil after a bioremediation treatment shows an activity in FDA of $162\mu\text{g/gSS/h}$.

Microbial selections can occur in sites subjected to constant pollution at limited levels of contamination, so that populations more capable of biodegrading micropollutants can be found Inlet of sites with high FDA activities, as they will be populations adapted to this environment. Reference soils that are less subject to selection pressure may have a less adapted community and therefore have lower activities.

In winter (**table 5**), the same trends are found with high values Inlet and lower values reference. Dourdan and Vitry sites are still the most active compared to Compans. On the other hand, we note a strong increase in FDA activity in winter for all sites (16.5 to $216.9\mu\text{g/gSS/h}$).

For the dehydrogenase activity (DH) in summer (**table 4**), 2 trends are present, an activity higher than $11\mu\text{gTPF/gSS/h}$ and an activity lower than $10\mu\text{gTPF/gSS/h}$. However, there is little difference between the 3 sites (no impact of the disturbance at Compans) and the significant differences that can be had with the heterogeneity of the soils is in both directions. For Dourdan and the BFS1_V soil, the In soils are more active while for the other soils, the activity of the DH is the strongest reference. The BFS_C is the least active in dehydrogenase: the monoculture of *Carex gracilis* may be involved in this lack of activity,

less active or less diverse microbial populations. With Vitry, the impact of the vegetation also intervenes but only Inlet. There is no significant difference with the Ref soils Vitry but the In BFS1_V is significantly higher than In BFS2_V, and In BFS1_V is the soil with the highest dehydrogenase activity (14 $\mu\text{gTPF/gSS/h}$). For Compans, the Ref soils are not significantly different while VFS2_C has a significantly lower activity than VFS1_C. It is possible that the greater hydrological impacts in Inlet of the alternative structures with inputs (nutrients, micropollutants) will mostly influence the Inlet microbial populations (positively or negatively). Work by unger2013 and andreoni2004 provides activities that differ greatly from our values 35-70 $\mu\text{gTPF/gSS/h}$ (Unger et al., 2013) and 0.748-18.9 $\mu\text{gTPF/gSS/h}$ (Andreoni et al., 2004). In winter (**table 5**), overall, we have a DH activity that is more important reference, Inlet the values are from 5.2 to 22.5 while reference it goes from 14.0 to 32.4 $\mu\text{gTPF/gSS/h}$. Contrary to the FDA activity, this time we observe an increase in DH activity reference and at Compans as well as a decrease in this activity Inlet. The Inlet/reference differences are significant for all sites.

For urease (UR) activity in summer (**table 4**), the soils with the highest activity are IB_D_In and BFS1_V_In (1559 and 1604 $\mu\text{gNH}_4^+/\text{gSS/h}$). A significant difference is observed with their reference soil (486 and 1012 $\mu\text{gNH}_4^+/\text{gSS/h}$). For the VFS2_C soils, there is no significant difference between In and ref (1375 and 1345 $\mu\text{gNH}_4^+/\text{gSS/h}$). On the other hand, for Compans, a lower urease activity is observed, ranging from 179 to 326 $\mu\text{gNH}_4^+/\text{gSS/h}$, which may be the result of the disruption of the VFS and the BFS youth. The differences between the Vitry soils show an impact of plants on urease activity.

The values of urease activity obtained differ greatly from what can be found in the literature, differences in the protocols establishment may intervene in this phenomenon (Nannipieri et al., 2012). For example, for the work of Błonska et al. (2016) the NH_4^+ concentration was measured at 410 nm instead of 665nm for us or Gopinath et al. (2008) which is based on the work of Tabatabai and Bremner (1972) for the implementation of its protocol, Kandeler and Gerber (1988) for us.

The values found in the literature range from 18.4 to 71.3 $\mu\text{g/g/h}$ (Andreoni et al., 2004; Bueis et al., 2018). In the work of Jat et al. (2021), values at 319.6 $\mu\text{g urea/g soil/h}$ are found. With the results of Badji. (2011), it can be seen that urease activity increases with organic matter inputs up to 477.1 $\mu\text{gNH}_4^+/\text{gSS/hr}$. The work of E.-H. Chang et al. (2007) also shows the increase in urease activity with organic matter inputs (although the magnitude is lower), from 47 $\mu\text{gNH}_4^+/\text{gSS/h}$ to 84 $\mu\text{gNH}_4^+/\text{gSS/h}$.

The high urease activities observed can possibly be related to the high amount of organic matter present in our soils. But overall, our soils show very high urease enzyme activity.

And finally, for urease activity in winter soils, the highest activity is found in the BFS2_V_ref soil with 1901 $\mu\text{gNH}_4^+/\text{gSS/h}$. This gives a significant difference with BFS2_V_In which wasn't present in summer. At Vitry, the soils have a higher activity significantly reference while this activity is higher Inlet at Dourdan and VFS1_C.

Table 4: Mean biological characteristics of summer soils used for experiments (n=3, mean \pm SD). MPN: Most Probable Number, FDA: fluorescein diacetate, DH: dehydrogenase, UR: urease, AWCD: average well color development. For each parameter, values followed by different letters differ significantly ($P < 0.05$) with Conover-Iman test of multiple comparisons after Kruskal-Wallis non-parametric test.

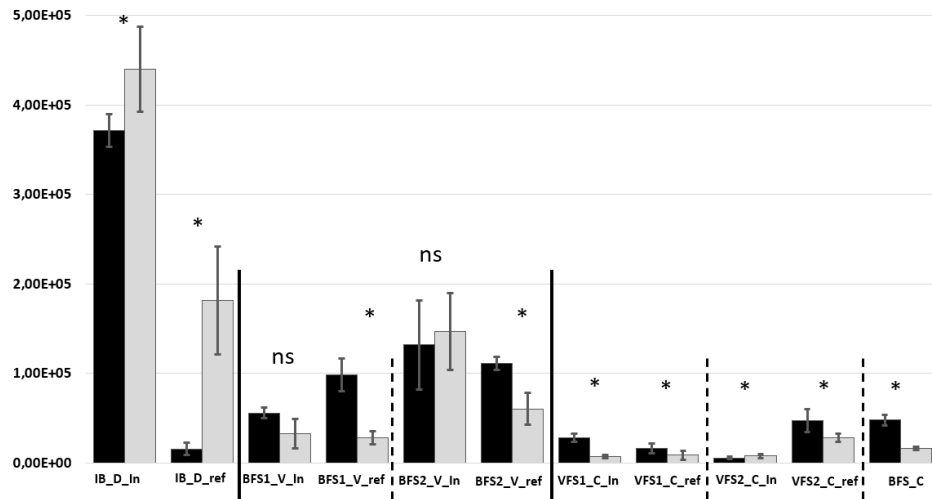
Site	SCM code	Location	MPN/gSS	Enzymes ($\mu\text{g/gSS/h}$)			AWCD
				FDA	DH	UR	
Dourdan (summer)	IB_D	In	3.71E+05a $\pm 1.79\text{E}+04$	75.8a ± 5.8	11.5ab ± 0.7	1559a ± 59	0.99a ± 0.06
		ref	1.58E+04b $\pm 7.12\text{E}+03$	13.7b ± 0.7	7.5cd ± 0.3	486b ± 36	0.31b ± 0.03
Vitry (summer)	BFS1_V	In	5.59E+04c $\pm 6.00\text{E}+03$	80.5a ± 3.4	14.1e ± 0.4	1604a ± 81	0.37c ± 0.03
		ref	9.86E+04d $\pm 1.79\text{E}+04$	36.4c ± 2.1	11.6ab ± 0.7	1012c ± 118	0.51a ± 0.04
	BFS2_V	In	1.32E+05d $\pm 4.98\text{E}+04$	89.3d ± 1.4	9.8cf ± 0.9	1375d ± 59	0.42c ± 0.04
		ref	1.11E+05d $\pm 6.91\text{E}+03$	51.2e ± 3.2	11.3a ± 1.3	1345d ± 25	0.38c ± 0.06
Compans (summer)	VFS1_C	In	2.80E+04e $\pm 4.65\text{E}+03$	4.4f ± 1.0	11.0af ± 1.3	200e ± 24	0.08d ± 0.09
		ref	1.64E+04b $\pm 5.27\text{E}+03$	3.0g ± 0.8	12.9be ± 1.6	179e ± 22	0.05de ± 0.04
	VFS2_C	In	5.54E+03f $\pm 1.31\text{E}+03$	6.1h ± 0.9	9.1c ± 1.1	261f ± 23	0.01e ± 0.01
		ref	4.73E+04g $\pm 1.30\text{E}+04$	6.1h ± 1.0	12.9be ± 1.4	326g ± 14	0.26b ± 0.07
	BFS_C	/	4.79E+04g $\pm 6.28\text{E}+03$	20.8e ± 2.2	5.2d ± 0.6	271f ± 25	0.07d ± 0.04

Table 5: Mean biological characteristics of winter soils used for experiments (n=3, mean \pm SD). MPN: Most Probable Number, FDA: fluorescein diacetate, DH: dehydrogenase, UR: urease, AWCD: average well color development. For each parameter, values followed by different letters differ significantly ($P < 0.05$) with Conover-Iman test of multiple comparisons after Kruskal-Wallis non-parametric test.

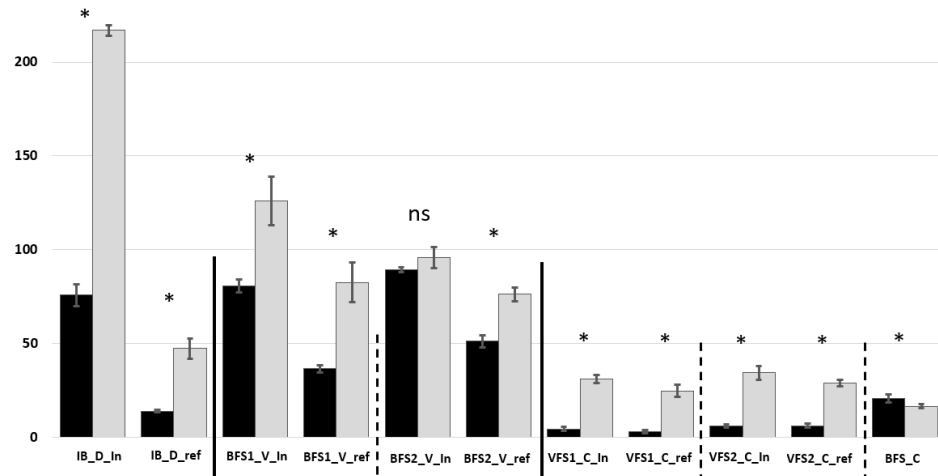
Site	SCM code	Location	MPN/gSS	Enzymes ($\mu\text{g/gSS/h}$)			AWCD
				FDA	DH	UR	
Dourdan (winter)	IB_D	In	4.40E+05a $\pm 4.72\text{E}+04$	216.9a ± 2.6	7.4ab ± 0.4	1009a ± 76	0.55a ± 0.09
		ref	1.82E+05ab $\pm 6.04\text{E}+04$	47.2b ± 5.3	20.8cd ± 1.0	359b ± 31	0.23bc ± 0.03
Vitry (winter)	BFS1_V	In	3.29E+04c $\pm 1.64\text{E}+04$	126.0c ± 12.8	5.2a ± 0.9	703c ± 62	0.29de ± 0.02
		ref	2.80E+04c $\pm 7.13\text{E}+03$	82.4d ± 10.5	14.0be ± 1.0	1296d ± 66	0.17bf ± 0.03
	BFS2_V	In	1.47E+05b $\pm 4.30\text{E}+04$	95.9e ± 5.6	17.2f ± 0.4	1180e ± 52	0.14f ± 0.04
		ref	6.05E+04d $\pm 1.77\text{E}+04$	76.2d ± 3.7	26.7g ± 1.9	1901f ± 93	0.33d ± 0.06
Compans (winter)	VFS1_C	In	7.25E+03e $\pm 1.75\text{E}+03$	30.9f ± 2.1	21.5c ± 2.0	737g ± 43	0.30de ± 0.07
		ref	8.73E+03e $\pm 5.19\text{E}+03$	24.6g ± 3.3	19.0df ± 2.1	630h ± 31	0.32d ± 0.01
	VFS2_C	In	7.87E+03e $\pm 2.07\text{E}+03$	34.2f ± 3.6	22.5c ± 2.0	756gi ± 60	0.42da ± 0.15
		ref	2.80E+04c $\pm 4.55\text{E}+03$	28.9g ± 1.7	32.4g ± 1.3	806i ± 50	0.25ec ± 0.03
	BFS_C	/	1.63E+04f $\pm 2.18\text{E}+03$	16.5h ± 1.2	15.8e ± 0.7	527j ± 51	0.06f ± 0.05

3.2.2 Comparison of summer and winter soil microbial biomass and enzymatic activity

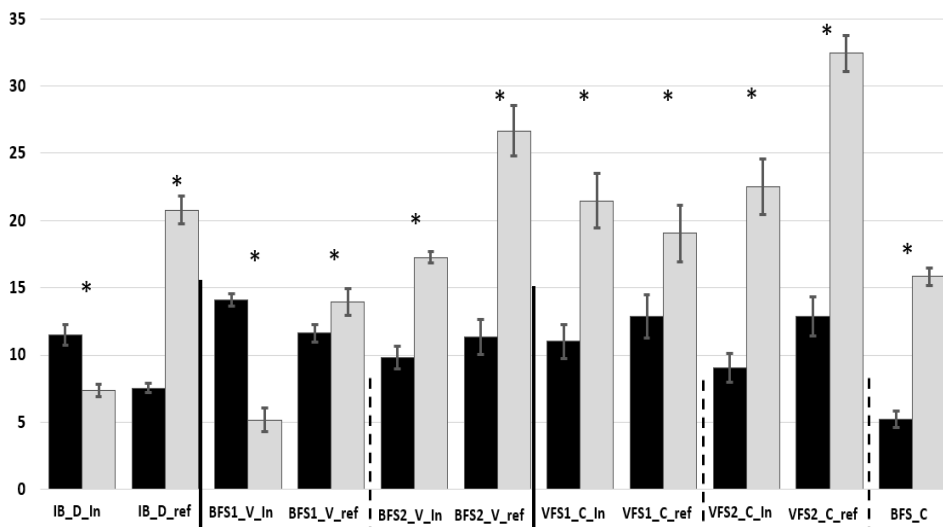
A: MPN



B: FDA



C: DH



D: UR

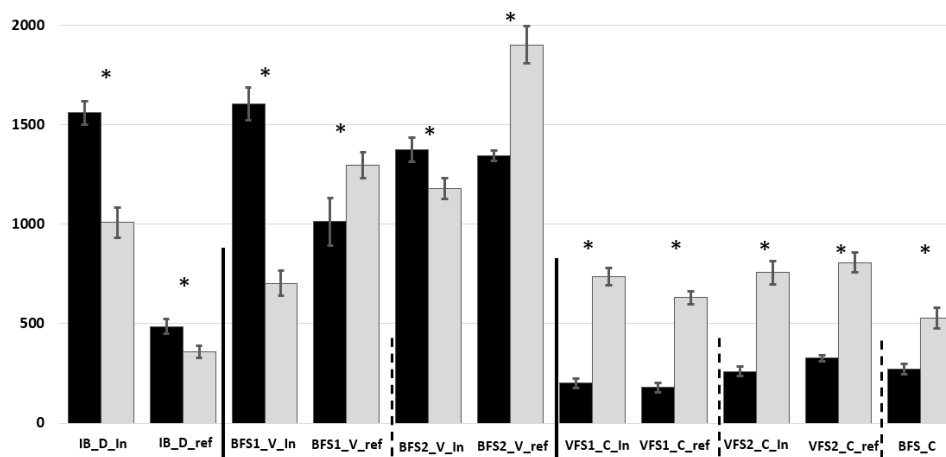


Figure 2: Mean biological characteristics of summer (dark histogram) and winter (light histogram) soils used for experiments (n=3, mean \pm SD). A = MPN (MPN/gSS); B = FDA (μ g/gSS/h); C = DH (μ g/gSS/h); D = UR (μ g/gSS/h). For each graph, the summer/winter results are examined with Conover-Iman test of multiple comparisons after Kruskal-Wallis non-parametric test. Significant summer/winter differences of the same soil are represented by (*) and (ns) when there is no significant difference.

Looking at the microbial biomass, it is possible to see 3 trends: i) the biomass of Dourdan increases in winter, ii) biomass of reference Vitry soils decreases in winter but there is no significant change Inlet iii) microbial biomass at Compans decreases in winter. For the enzyme activity of FDA, dehydrogenase and urease, significant changes are observed between summer and winter. For FDA, apart from BFS2_V_In, there is a significant increase in activity in winter. For dehydrogenase, there is a significant decrease in activity in winter for IB_D_In and BFS1_V_In, for all others, there is a significant increase in activity. For urease, there are also 2 trends: i) the soils of Dourdan and the soils Inlet of Vitry see their activity decrease in winter, ii) the soils reference of Vitry and the soils of Compans have their activity increase in winter.

Per site, we note that the 5 Compans soils act in the same way with the microbial biomass decreasing in winter and the activity of the 3 enzymes increasing. In Vitry, we can see the difference Inlet/reference with the microbial biomass (no change Inlet and a decrease reference) and the urease activity (decrease of the activity Inlet and increase reference). For dehydrogenase and FDA activity, we see 1 soil reacting differently from the others (BFS1_V_In and BFS2_V_In), the plants Inlet of the sites will be able to influence differently the reaction of the microorganisms in winter: either by decreasing the impact of the seasons (BFS2_V_In) or by modulating the microbial enzymatic activity (BFS1_V_In).

Research by Kooch et al. (2020) shows a decrease in microbial biomass in multiple soils (forest, grassland, agriculture...) in winter compared to summer. We see a decrease in total biomass (bacteria and fungi) in winter which is consistent with most of our results except Dourdan.

In the Muscolo et al. (2014) work, they see the impact of seasons on microbial biomass with a decrease in winter and they also see the impact of plants on biomass.

They also worked on FDA activity and unlike our results, they have a decrease in FDA activity in winter. The work of Elifantz et al. (2011) shows the evolution of the FDA activity during the seasons for 4

years, strong peaks of activity are shown in July/August as well as a low activity in winters showing the effect of the seasons on the FDA. However if we look at the work of Emmert et al. (2021), we can see a nuance in these results. They find that FDA activity is high in spring, low in late summer with an increase in activity from late fall/early winter. The soils in our studies were collected in late June for Compans (late spring/early summer) and late September for Dourdan and Vitry (late summer) and then in February for the winter soils. By looking at the months of sampling of our soils compared to the results of (Emmert et al., 2021), the activity of FDA is high in June but in September (end of August and October for their work), we can see that this represents the time with the lowest activity of FDA. The winter values (February) show more FDA activity than the late summer. They also cite the work Piotrowska and Długosz. (2012) which also shows higher FDA activity in spring than in late summer. The increase in FDA activity in winter may in fact be due to the low activity obtained with summer (late summer) soils. Analyses of Dourdan and Vitry soils recovered in early summer may allow for a better analysis of the impact of the seasons on these soils for FDA.

Also with the work of Elifantz et al. (2011), Emmert et al. (2021), variations in dehydrogenase activity over the year were observed but their results did not show a correlation between changes in dehydrogenase activity and seasons. Emmert et al. (2021), Piotrowska and Długosz. (2012) find that FDA better represents microbial activity than dehydrogenase because it is more sensitive and better correlated to other soil physicochemical parameters. Soil analyses over several years or with more sampling points could therefore show whether or not the seasons impact the dehydrogenase activity of our soils.

The studies of Huang et al. (2012) show a decrease in urease activity in winter, which corresponds to several of the results from our soils. These observations from the bibliography are especially valid for the sites of Dourdan and Vitry. The Compans site being in constant evolution following its disturbance, the increase of the activity of the 3 enzymes in winter compared to summer is understandable.

Muscolo et al. (2014) concludes that in order to analyze changes in soil quality, several parameters must be selected including microbial biomass which is going to be plant dependent and FDA which is going to be seasonally dependent. It is useful to link external factors that can alter the soil ecosystem functioning to soil quality indicators in order to improve soil management strategies, especially for soils of alternative structures from which our analyses are taken.

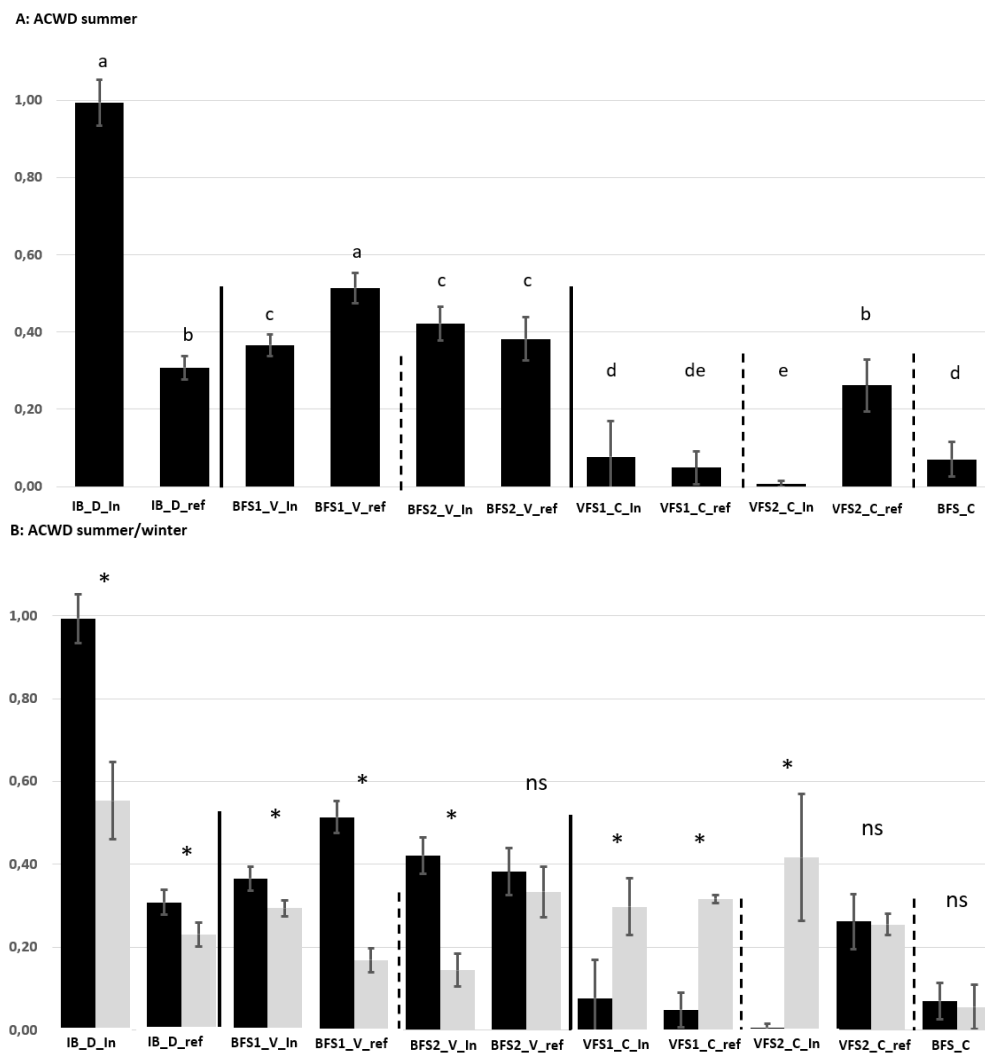
After the analysis of the microbial biomass and enzymatic activity, the results on functional and genetic diversity remain to be used to decide on the biological observations of the structures' soils and the impact of the criteria studied.

3.2.3 Functional microbial diversity of summer and winter campaign soils

Biolog Ecoplate

AWCD (average well color development) is a parameter that can be used as an indicator of microbial activity in soils (Gomez et al., 2006). In summer (**figure3A**), the highest AWCD is found with IB_D_In, with a value close to 1. The soils with the lowest activity (>0.20) are VFS1_C, VFS2_C_In and BFS_C, which correspond to most of the Compans soils. Inlet/reference differences can be noted: for Dourdan, the highest activity is Inlet, while for the 2nd Compans grass strip, the highest activity is reference. For Vitry, vegetation is also a factor: for the tree zone, activity is highest reference, while for the herbaceous zone, there is no significant difference between Inlet and reference. Looking at the winter

data (**figure3B**), we see a significant drop in AWCD in winter for the Dourdan soils and three of the four Vitry soils. No change is observed for soils BFS2_V_ref, VFS2_C_ref and BFS_C. For the other Compans soils, a significant increase in AWCD is noted. Looking at AWCD data in the literature on contaminated soils, (Mkhinini et al., 2020) shows high values of 1.17 and low values of 0.98, while (Koner et al., 2022) shows high values of around 1 and low values of around 0.4. Values similar to our own are found for the majority of soils, leaving Compans to the side. The clearing of the site and the young age of the swale are important factors in explaining the low values obtained. The increase in AWCD in winter at Compans may reflect the evolution of the microbial populations in the strips to return to a biologically functional state, which has already been observed previously with enzymatic activities.



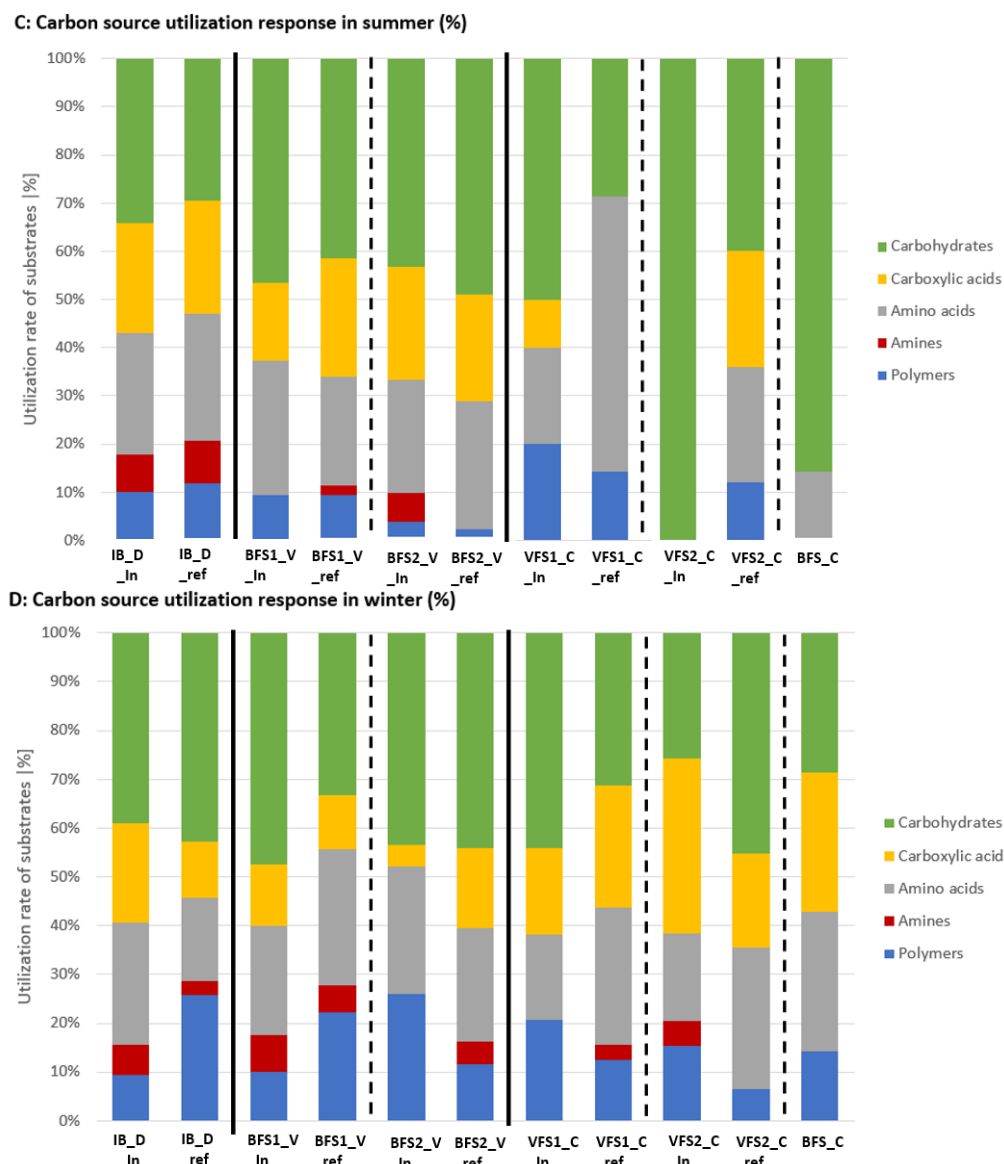


Figure 3: Representation of Ecoplate biolog results (A) Mean summer soils AWCD (n=3, mean \pm SD), the summer results are examined with Conover-Iman test of multiple comparisons after Kruskal-Wallis non-parametric test, significant differences between soils are represented by different letters (P < 0.05). (B) Mean summer (dark histogram) and winter (light histogram) soils AWCD (n=3, mean \pm SD). The summer/winter results are examined with Conover-Iman test of multiple comparisons after Kruskal-Wallis non-parametric test. Significant summer/winter differences of the same soil are represented by (*) and (ns) when there is no significant difference. (C) representation in % of the use of the 5 carbon sources of Biolog Ecoplate in summer according to 11 soils analyzed, (D) representation in % of the use of the 5 carbon sources of Biolog Ecoplate in winter according to 11 soils analyzed.

Now let's take a look at **figure 3C** with the distribution of metabolism of the 5 major substrate classes between soils in summer. Overall, the amine class is the least used with (2-9%), while the carbohydrate (29-100%) and amino acid (14-57%) classes are the most used. Metabolic differences can also be seen at each site: i) Dourdan uses all 5 substrate classes in a fairly balanced way, ii) Vitry uses all 5 substrate classes, but with wide variations (carbohydrates : 42 to 49% and amines/polymers are used very

little), iii) Compans will have a much narrower spectrum of substrate use: VFS1_C_In and VFS2_C_ref are the soils with the greatest variety of substrate use, but do not use amines at all, while the other soils will use 3,2 or even only 1 substrate class. With the work of Wolińska et al. (2018) on soil contamination with petroleum-based substances, or Németh et al. (2021) on the study of the effects of metal oxide nanoparticles on freshwater communities, we can see a diversity of substrate use, the trends are not the same but each substrate is used. This corresponds to the results from Dourdan and Vitry, but once again the Compans soils have very specific results showing restricted metabolic activity. The winter results (**figure 3D**) will show changes in substrate utilization trends. Overall, polymer utilization will rise from 2-20% to 6-26%, and amino acids from 14-57% to 17-29%. These changes in substrate utilization occur for all soils except IB_D_In, VFS1_C_In and VFS2_C_ref. Chazarenc et al. (2010) studies microbial community changes in wet built-up areas as a function of season, and Biolog analyses are carried out in June and November. Changes in substrate utilization can be observed between seasons, with a decrease in the metabolization of amines and complex carbon sources. What is more notable is the increase in the variety of substrate use for the other 3 Compans soils (4 to 5 substrates used), surely demonstrating a change in the microbial communities of these soils.

3.3 Relation between summer and winter campaign soils results

Looking at the PCA (**fig. 4A**), we look at the physico-chemical and biological parameters of the soils according to the sites. The 2 components retained for the PCA will explain 84% of the results, with the first axis (Dim1) and the second axis (Dim2) explaining 67.3% and 16.6% respectively. Dim1 is positively correlated with most variables such as CEC, OM, FC, UR, FDA, AWCD, MPN while Dim2 is positively correlated with DH and pH. A strong positive correlation is visible between MPN, AWCD and FC, another strong positive correlation is visible between UR, FDA and OM. Dim1, however, will be negatively correlated with pH, a negative correlation of pH with AWCD and FC is visible. However, by looking at a correlogram (Spearman correlation) of these data (**fig. 4B**), it can be seen that while the positive correlations are significant ($p < 0.05$), the negative correlations with pH are non-significant ($p > 0.05$). pH and DH therefore have no relationship with the other parameters.

Now, if we look at the individuals on the PCA (**fig. 4A**), we can see 3 distinct groups: i) in red, Compans soils which are negatively correlated to axis 1 and positively/negatively correlated to axis 2 depending on the soil, ii) in blue, Vitry soils which are positively correlated to axis 1 and axis 2, iii) in green, Dourdan soils which are positively/negatively correlated to axis 1 depending on the soil and negatively correlated to axis 2. The site effect is more important than the location effect (Inlet/reference). On the other hand, if we look within the same site, Inlet/reference separations are clearly present for each one, and if we look at the Vitry site, a separation according to vegetation is also visible. It is also interesting to note that the VFS2_C_In and IB_D_In soils are located at opposite ends of axis 1, corresponding to the weakest and richest soils.

Facing the PCA data for summer and winter soil physico-chemical and biological characteristics, **figure 4C** shows that the parameters correlated with axis 1 remain the same. pH and DH are slightly shifted in comparison with the summer PCA, but remain negatively correlated with axis 1 and positively correlated with axis 2. On the other hand, if we look at soils by season (**fig. 4D**), there are some notable differences. To begin with, the distinction between summer and winter soils in Compans is clear, with 2

distinct groups shown on the PCA (summer group negatively correlated with axis 2 and winter group positively correlated with axis 2). Then for Dourdan soils, there's a inversion of trends: in summer, Inlet is positively correlated to the two axes and reference is negatively correlated to the two axes, then in winter, Inlet becomes negatively correlated to axis 2 and reference becomes positively correlated to axis 2. For Vitry, the distinction between summer and winter soils is weaker, BFS1_V_In being the only one to migrate strongly from positively to negatively correlated to axis 2 in winter.

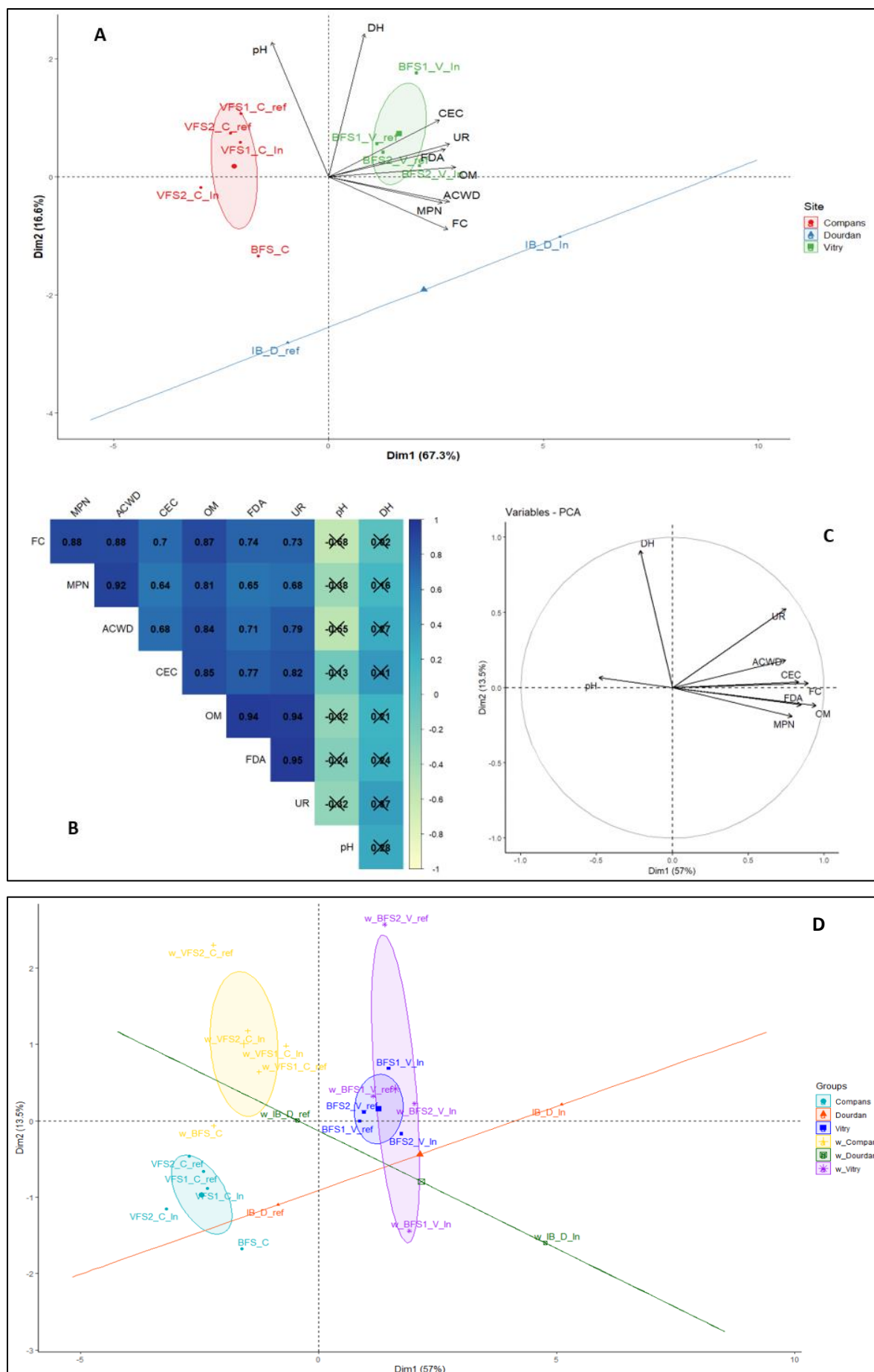


Figure 4: PCA and Correlogram (Spearman correlation) of soil properties, (A) PCA biplot showing the influence of site, localization and vegetation on summer bio-physicochemical variables: organic matter (OM), pH, field capacity (FC), cation exchange capacity (CEC), Most Probable Number (MPN), fluorescein diacetate (FDA), dehydrogenase (DH), urease (UR), average well color development (AWCD). The first and second axes explained 67% and 16% of the total variance. (B) Correlogram (Spearman correlation) of summer soil properties, dark blue colors show a positive correlation while light colors show a negative correlation level at $p < 0.05$ (non-significant correlations ($p > 0.05$) are crossed out). (C) PCA of summer and winter variables, the first and second axes explained 57% and 13% of the total variance. (D) PCA of summer and winter individus showing the influence of season on site, the first and second axes explained 57% and 13% of the total variance.

Among physico-chemical properties, the quantity of organic matter seems to be the most correlated parameter with biological properties. An analysis of organic matter can quickly give an idea about the state of stormwater management soils. In terms of biological properties, we remain on the principle that a high microbial biomass gives a high microbial enzymatic activity and, above all, a more diverse activity, as can be seen with biologs. However, one last parameter remains to be studied for the full biological characterization of soils using molecular biology.

3.4 Genetic microbial diversity of summer and winter campaign soils

Microbial communities were studied using soil from stormwater management structures at various sites (Dourdan, Vitry, Compans). The microbial study was carried out in relation to various parameters such as site age, hydrological location, vegetation and season (summer, winter), in order to gain a better understanding of how these structures function.

3.4.1 Biodiversity indices

The Shannon entropy, which focuses on the "richness" component of diversity, shows a fairly homogeneous trend among the samples. The bacteria richness component of diversity summer soils was between 9.27 to 10.57 and the winter soils diversity was between 9.14 to 10.33. The bacteria diversity within all these soils is very high with little difference between sites and seasons. The "fungal richness" component of diversity is weaker than bacterial richness. The "fungal richness" component of diversity in summer soils ranged from 6.08 to 8.15 and in winter soils from 4.59 to 8.06.

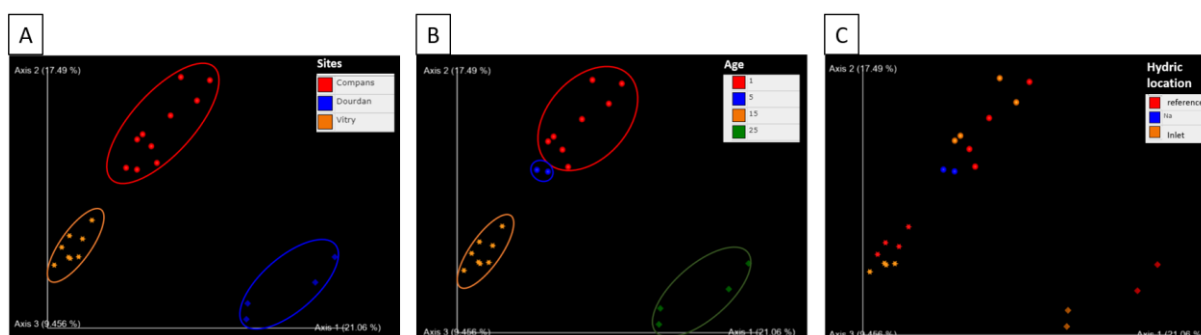


Figure 5: Beta diversity (bacteria) of the 22 soils study according to: A: the soil; B: site age; C: soil location in relation to rainwater runoff. The first two dimensions of a principal component analysis are plotted based on Bray-Curtis distances. Samples are color coded according to the conditions: A: red = Compans, blue = Dourdan, orange = Vitry; B: red = 1 year, blue = 5 years, orange = 15 years, green = 25 years; C: red = Reference, orange = Inlet, blue = NA (without distinction).

Samples were significantly separated according to site, to age (PERMANOVA, $p < 0.05$). Looking at the Bray-curtis distances in **Figure 5A and 5B**, it is possible to see 3 and 4 distinct groups separated according to site and age. On the other hand, when we look at soils according to hydric location (**fig. 5C**), the distinctions are less obvious. With Vitry and Dourdan, we see 2 groups in each case: Inlet and reference. For Compans, Inlet and reference soils are mixed.

3.4.2 Microbial community structure in stormwater management soils

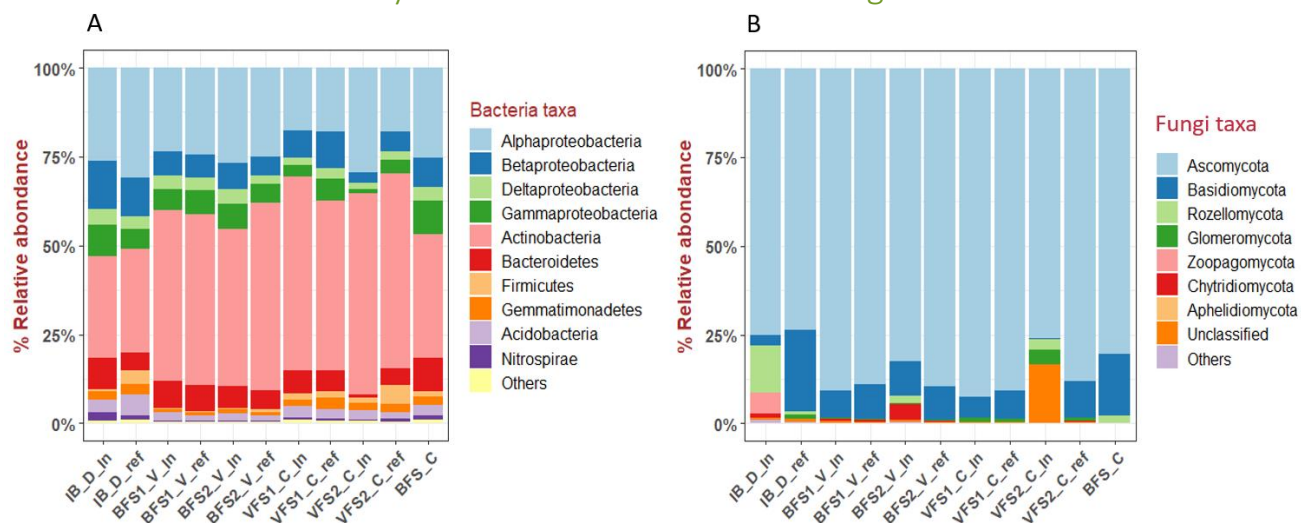


Figure 6: The average relative abundances of all the major phylum in summer soils, Proteobacteria are divided in classes (with relative abundance higher than 1%). A: Bacteria taxa, B: Fungi taxa. The phylum with relative abundance lower than 1% were grouped as “others”.

For bacteria (**fig. 6A**), the 2 most abundant phyla in summer are Proteobacteria (30 and 53%) and Actinobacteria (29 and 57%). Soils in Vitry and the Compans grass strips have a majority of Actinobacteria, while soils in Dourdan and the Compans swale have a majority of Proteobacteria. Among the Proteobacteria of the 11 soils, the Alphaproteobacteria class is the most abundant. Bacteroidetes are 5 to 10% abundant in all soils except VFS2_C_In, which has only 1% of this phylum. Looking at the winter data (**fig. S1**), a slight decrease in Actinobacteria abundance is observed in favor of Proteobacteria and Bacteroidetes, with the overall trend remaining similar.

For fungi (**fig. 6B**), the Ascomycota phylum (74 to 91%) is the most abundant for the 11 soils studied in summer. Basidiomycota (6 to 23%) was then the 2nd dominant phylum in most soils, except for IB_D_In (3%) and VFS2_C_In (<1%). These 2 soils and BFS2_V_In will have a specific composition. IB_D_In will contain 13% Rozellomycota and 6% Zoopagomycota. BFS2_V_In will contain 4% Chytridiomycota (compared with less than 1% for other soils). VFS2_C_In will have 16% of its abundance unclassified. It is interesting to note that soils with fungal specificity are all located Inlet.

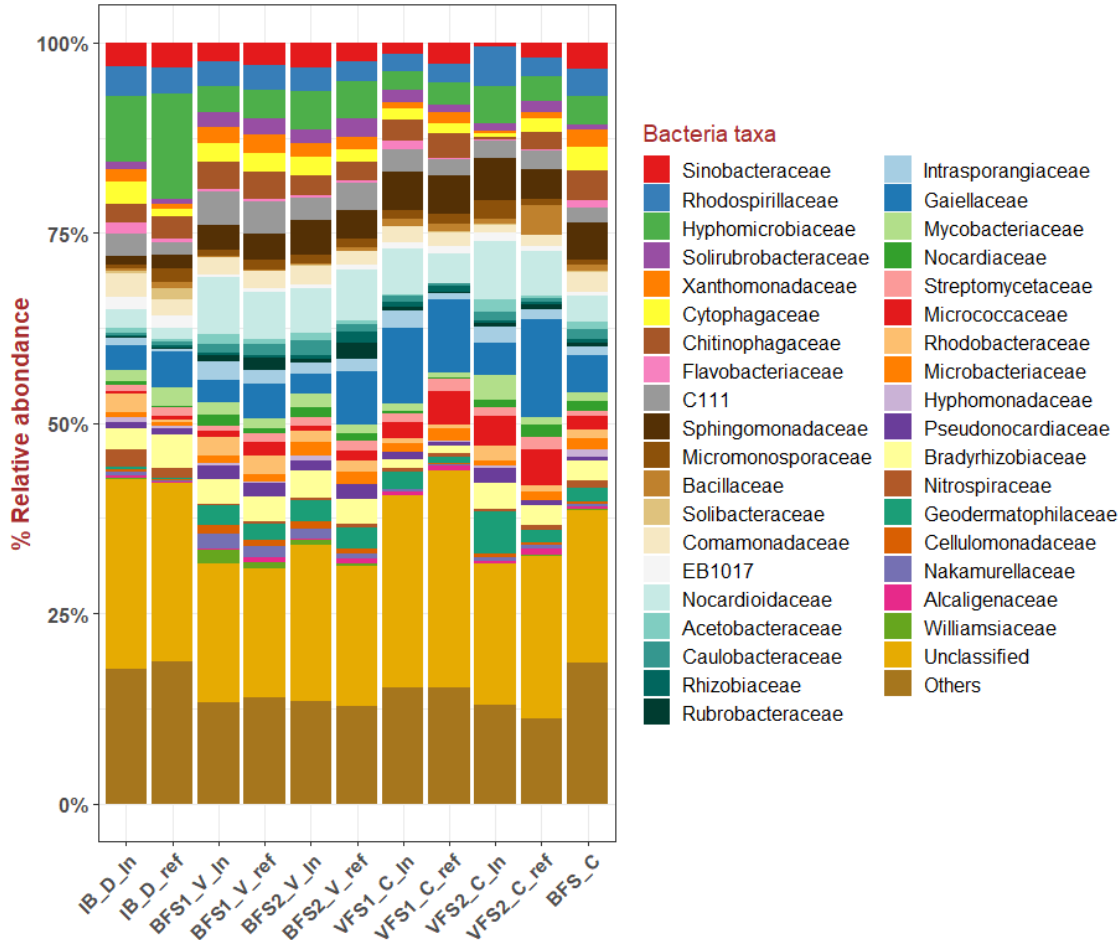


Figure 7: The average relative abundances of all the major family (with relative abundance higher than 1%) in summer soils. The family with relative abundance lower than 1% were grouped as “others”.

Further phylogenetic analysis of these soils revealed approximately forty bacterial families (**fig. 7**). The families present in summer soils are diverse, with Dourdan soils having a lower known diversity than other soils. The Rhodospirillaceae family is regularly present in all soils, with an approximate abundance of 3%, as are the Comamonadaceae (2%). There are, however, differences in the relative abundance of the families in these 11 soils. For example, Hyphomicrobiaceae are present at between 2% and 5% in the soils of Vitry and Compans, whereas they have a relative abundance of 10% in Dourdan. The EB1017 family is also present in Dourdan (2%) compared with the other soils (<1%). But if the general trend is that there is less abundance per family in Dourdan soils compared to others. Sphingomonadaceae, Intrasporangiaceae, Nocardiodaceae, Geodermatophilaceae, Micrococcaceae, etc. are more present in Vitry and Compans than in Dourdan. There are also specificities between Vitry and Compans. Sphingomonadaceae, Gaiellaceae, Micrococcaceae are more abundant in Compans soils than in Vitry. There are also differences according to other parameters such as hydric localization and vegetation. For example, C111 is more important in the Vitry tree zone (4% Inlet and reference) than in the Vitry herbaceous zone (3% Inlet and reference). Rubrobacteraceae is a more abundant family Inlet of the Dourdan and Vitry sites. The bacterial populations in these 3 soils are very similar, although differences can be observed according to the parameters studied.

Continuing with genetic analysis, with a focus on plant involvement in the distribution of the bacterial community within the soils of structures.

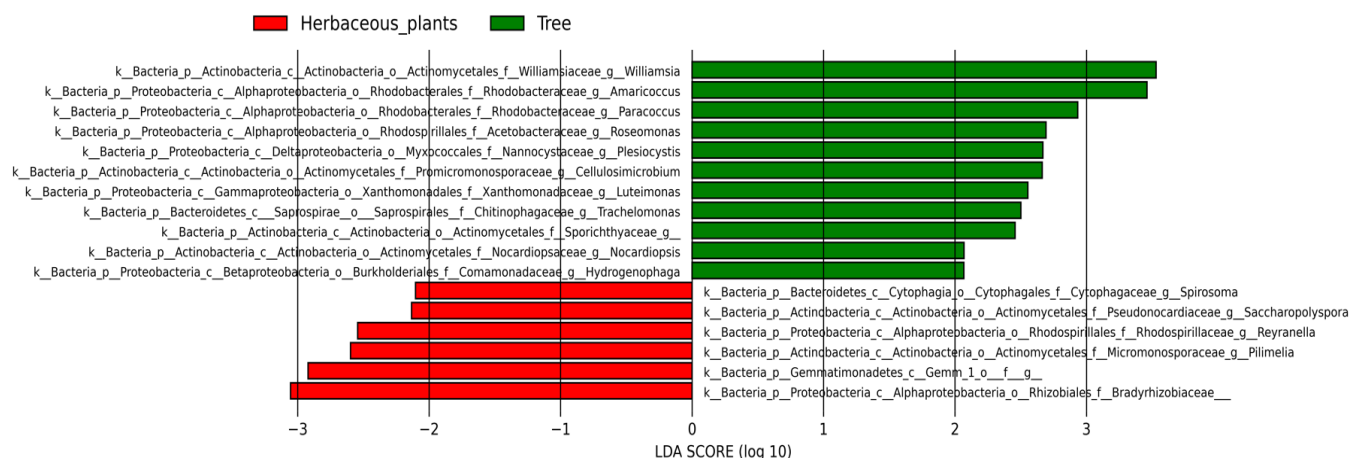


Figure 8: LefSe analysis of the soil's samples according to vegetation at Vitry. Histograms of LDA scores of 16 S gene sequences

A LefSe (Linear discriminant analysis Effect Size) analysis was performed to show which taxa significantly characterize Vitry soils vegetation, using Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$) with LDA score > 2.0 . LefSe confirms the high abundance of Actinobacteria and Alphaproteobacteria phyla in Vitry soils (**fig. 8**). A specific selection of bacterial communities occurs as a function of vegetation (trees and herbaceous plants). The families that preferentially colonize soils in the presence of trees are Rhodobacteraceae (genus *Amaricoccus* and *Paracoccus*), Williamsiaceae (*Williamsia*), Xanthomonadaceae (*Luteimonas*), Chitinophagaceae (*Trachelomonas*), etc., while families that prefer to colonize soils with herbaceous plants include Cytophagaceae (*Spirosoma*), Pseudonocardiaceae (*Saccharopolyspora*), Rhodospirillaceae (*Reyranella*).

Amaricoccus and *Paracoccus* of the Rhodobacteraceae family are known to be involved in the biodegradation of pharmaceutical compounds (Jiang et al., 2021) and, more broadly, the Rhodobacteraceae family is known for its biodegradation capacities in natural environments such as plastics (Zhou et al., 2023). The *Williamsia* genus has been shown to be involved in the biodegradation of phenanthrene in oil-contaminated soils (Liang et al., 2021). *Luteimonas* has been shown to play a role in BPA biodegradation (Cyzdik-Kwiatkowska and Zielińska, 2018). Families and genera colonizing soils under the influence of trees (in structures) appear to have a high capacity for biodegrading micropollutants. Soil populations of herbaceous plants such as Cytophagaceae (*Spirosoma*), Pseudonocardiaceae (*Saccharopolyspora*), Rhodospirillaceae (*Reyranella*) appear to be present in natural soils (Dukunde et al., 2019; Ten et al., 2018) and have not been shown to be involved in micropollutant biodegradation.

The bacterial communities selected under the influence of plants will therefore be different and more or less adapted to the environment contaminated with micropollutants. However, when we look at the microbial composition within the sites (fig. S2), we see that the Xanthomonadaceae, Pseudonocardiaceae, Rhodospirillaceae and the *Williamsia* and *Amaricoccus* genera are found at Dourdan. So, there's a whole range of populations more or less capable of biodegrading micropollutants. At Vitry, without the

vegetation criterion, the family that stands out is the Hyphomicrobiaceae, with the genus *Hyphomicrobium* shown to be involved in bisphenol biodegradation (Wang et al., 2019). At Compans, the Rhodobacteraceae family is also present, but this time with the genus *Rhodobacter*.

The more detailed the microbial community analysis, the more we see differences in the populations present at the 3 sites studied, but there are similarities with families known to biodegrade micropollutants, which are also present in these soils. As the micropollutants in the structures are present at environmental concentrations, selection pressure allows a wide microbial diversity. The differences in activity observed in the soils may be partly due to the specific communities present, Dourdan and Vitry seem to have a larger selection of populations better adapted to contaminated soils. But the importance of soil quality will also come into play, with organic matter levels, for example, boosting microbial activity.

4. Conclusion

The aim of this work was to study different stormwater management structures according to defined parameters and to see what emerged. The age of the structure was found to be an important criterion. Dourdan, the oldest site, is the one most likely to operate efficiently and robustly. Compans, on the other hand, with its more recent structures, has a very limited level of activity. The results from Vitry show the impact of plants on soil biological activity. However, at this level, the results do not allow us to assess their importance, but rather to demonstrate the interaction of plants with microorganisms, thus modulating the soil microbial activities of these structures. Soil texture being a selected parameter for grass strips, the results are not sufficient due to the low activity of these soils. Location in relation to stormwater inflow is another major parameter to emerge from the results, with marked differences between Inlet and reference. Soils located Inlet and subject to strong inflows of water rich in micropollutants and nutrients are the richest and most biologically active. The importance of microorganisms at the point of arrival of stormwater and in stormwater treatment in limiting the spread of organic micropollutants is even more obvious. It would therefore be interesting to study the microbial biodegradation capacities of these soils and, depending on the parameters selected, to estimate the microbial involvement in the loss of micropollutants from stormwater management facilities.

5. Acknowledgements

This research was carried out under the OPUR research program (<https://leesu.univ-paris-est.fr/opur/>). The authors gratefully acknowledge OPUR partners for their financial support, as well as the French territorial collectivities which collaborated in the present study, by allowing the authors to carry out soil samplings and measurements in their infiltration facilities.

Thanks to the team at CEA Cadarache for their collaboration in analyzing the sequencing data

Chapitre 4 : Etude de la capacité de biodégradation des micropolluants par les microorganismes du sol des ouvrages de gestion des eaux pluviales

Introduction

Suite à l'étude des caractéristiques physico-chimiques et biologiques des 11 sols des ouvrages provenant des sites de Dourdan, Vitry et Compans pour se faire une idée sur l'activité de ces sols, maintenant, on a voulu étudier les capacités de biodégradation de ces sols.

Ce qui nous intéresse avec ces sols, c'est leur capacité à biodégrader les micropolluants qui vont être amenés via les eaux pluviales. Maintenant que l'on connaît le niveau d'activité des 11 sols sélectionnés, on veut étudier dans ce chapitre les efficacités de biodégradation de ces 11 sols face à un cocktails de micropolluants. Les micropolluants étudiés sont connus pour être présents dans les eaux de voirie : le BPA, le NP et l'OP. Ce quatrième chapitre sera séparé en 2 parties : la première partie sera constituée de l'étude des capacités de biodégradation des 11 sols lors d'une cinétique en batch liquide qui fait l'objet d'un article qui va être soumis et d'une deuxième partie sur une cinétique en colonnes avec cette fois la sélection des 2 sols les plus intéressants trouvés lors de la cinétique liquide.

La cinétique en batch liquide permet d'étudier un plus large choix de sols en contrôlant les paramètres environnementaux plus facilement et la biodisponibilité des micropolluants est maximale. La cinétique en colonnes nécessite un choix plus restreint de sols mais permet d'avoir une étude avec des conditions plus proches de la réalité.

4.1 Cinétique de biodégradation en batch liquide

Article 2 : Biodegradation of organic micropollutants (BPA, 4-NP and OP) by indigenous microbial communities in the soils of stormwater management facilities

Résumé

Ce projet étudie le devenir des micropolluants organiques (MP) dans les sols des installations de gestion des eaux pluviales et explore l'interaction entre les populations microbiennes autochtones et la biodégradation des MP. Trois sites ont été choisis en fonction de la composition du sol, de la proximité des eaux de ruissellement, de l'âge de la structure et de la couverture végétale.

La cinétique contrôlée en milieu liquide a permis de comparer les capacités de biodégradation du bisphénol A, du nonylphénol et de l'octylphénol à l'aide de microorganismes autochtones extraits des sols étudiés.

Les résultats ont révélé des efficacités de biodégradation variables entre les sols d'un même site pour un MP donné. Pour les sols du site de Vitry, la biodégradation du BPA a varié de 20 % à 100 % et pour les sols du site de Compans, la biodégradation du NP et de l'OP a varié de 0 % à 100 %. Les pourcentages de biodégradation diffèrent également d'un site à l'autre, le site du bras de mer de Dourdan présentant une biodégradation du BPA de 99 %, tandis que la rigole du site de Compans n'atteint que 54 %. Sur le plan microbiologique, la cinétique a montré une diminution de la diversité de la communauté bactérienne dans les sols enrichis en MP par rapport aux témoins. Les familles de bactéries méthylophiles ont dominé en présence de MP. La biodégradation effective des MP est corrélée à la dominance des Alphaproteobacteria et Betaproteobacteria (par exemple Methylophilaceae, Methylocystaceae...), tandis que les sols à faible biodégradation sont dominés par les Gammaproteobacteria et Actinobacteria (par exemple la famille Methylobacteriaceae). Les MPs ajoutés au milieu permettent une croissance microbienne qui diffère des contrôles après 4/7 jours, selon le sol. En ce qui concerne la diversité fonctionnelle, des différences d'activité sont également visibles entre les sols testés et les sols témoins. Les microorganismes des sols tests de Dourdan sont les plus actifs, avec un AWCD de 2. Deux tendances peuvent être observées pour les sols de Vitry : BFS1 avec un AWCD moyen de 1 et BFS2 avec un AWCD de 2. Pour les sols de Compans, l'AWCD est d'environ 1,2. Pour la plupart des sols, l'activité du sol témoin est inférieure à celle des microorganismes des sols testés. Vitry BFS1 est le seul sol pour lequel l'activité du sol témoin est supérieure à celle du sol testé.

Ces résultats soulignent l'influence de l'âge de la structure, de la proximité de l'afflux d'eaux pluviales et de la végétation sur l'efficacité de la biodégradation des particules dans les sols de gestion des eaux pluviales.

Biodegradation of organic micropollutants (BPA, 4-NP and OP) by indigenous microbial communities in the soils of stormwater management facilities

Andréa Oudot, Elodie Bettembos, Vanessa Alphonse, Lila Boudahmane, Emilie Caupos, Mohamed Barakat², Wafa Achouak², Marie-Christine Gromaire¹ and Nouredine Bousserhine

LEESU, Univ Paris Est Creteil, Ecole des Ponts, Creteil, France

¹LEESU, Ecole des Ponts, Univ Paris Est Creteil, Marne-la-Vallée, France

²CNRS équipe LEMIRE, CEA Cadarache, France

Corresponding author : Andréa Oudot, andrea.oudotcroset@gmail.com

Abstract:

This project investigates the fate of organic micropollutants (MPs) in stormwater management facility soils, and explores the interaction between autochthonous microbial populations and MP biodegradation. Three sites were chosen based on soil composition, runoff proximity, structure age and vegetation cover.

Controlled liquid-batch kinetics compared Bisphenol A, Nonylphenol and Octylphenol biodegradation capacities using autochthonous microorganisms extracted from the studied soils.

Results revealed varying biodegradation efficiencies between soils from the same site for a given MP. For Vitry site soils, BPA biodegradation ranged from 20% to 100% and for Compans site soils, NP and OP biodegradation ranged from 0% to 100%. Biodegradation percentages also differed between sites with Dourdan Inlet site exhibiting 99% BPA biodegradation, and Compans site's swale achieving only 54%. Microbiologically, kinetics showed decreased bacterial community diversity in soils spiked with MPs compared to controls. Methylophilic bacterial families dominated in the presence of MPs. Effectively biodegraded MPs correlated with dominance of Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria (e.g. Methylophilaceae, Methylocystaceae...), while soils with poor biodegradation were dominated by Gammaproteobacteria and Actinobacteria (e.g. Methylobacteriaceae family). MPs added to the medium enable microbial growth that will differ from controls after 4/7 days, depending on the soil. As for functional diversity, differences in activity are also visible between test and control soils. Test soils microorganisms from Dourdan are the most active, with an AWCD of 2. Two trends can be observed for Vitry soils: BFS1 with an average AWCD of 1 and BFS2 with an AWCD of 2. For Compans soils, the AWCD is around 1.2. For most soils, control soil activity is lower than test soils microorganisms. Vitry BFS1 is the only soil for which the control soil activity is higher than that of the test soil.

These findings underscore the influence of structural age, stormwater inflow proximity, and vegetation on the biodegradation efficiency of MPs in stormwater management soils.

Keywords: biodegradation, organic micropollutants, soil microorganisms, microbial diversity, source management structure

1. Introduction

Micropollutants, both metallic or organic compounds of anthropogenic origin, prevail in the environment at very low concentrations (ranging from ng to g/L) posing potential harm to living organisms (Sharma et al., 2023). Metallic micropollutants such as zinc, copper, cadmium, and lead (Eriksson et al., 2007; Wikström, 2015), coexist with a broader spectrum of organic micropollutants (MPs). The latter encompass diverse families, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), biocides, phthalates, pharmaceuticals, alkylphenols, and BPA, each exhibiting toxicity with endocrine-disrupting and carcinogenic effects (Caserta et al., 2022). Despite their low concentrations, MPs inflict harmful effects on the environment (Bhatt et al., 2022), necessitating the establishment of dose limits known as environmental quality standard (EQS). In addition, micropollutants can contaminate the environment via urban stormwater runoff. In other words, rainwater runoff spreads over long surfaces and becomes contaminated with micropollutants along the way. This contaminates both soil and aquatic environments. Addressing this, it becomes crucial to curtail their usage and explore degradation mechanisms (Rios-Miguel et al., 2023). PAHs sourced from roadways and combustion, and phthalates or alkylphenols, prevalent in the chemical industry as additives in plastics (PVCs) and other polymeric construction materials, exemplify the ubiquitous nature of these micropollutants in urban runoff. Biocides, employed to protect surfaces like building facades from microbial deterioration, underscore their diverse applications and the (Müller et al., 2020). In order to manage stormwater runoff flows, innovative nature based structures have emerged (Lei et al., 2023). These alternative structures, strategically implemented in cities, not only regulate water volumes during rainfall but also limit pollution transfer through stormwater (Gasperi et al., 2014). Redefining the water cycle, these structures facilitate natural water infiltration into the soil from the earliest point of rainfall, departing from the conventional practice of swiftly channeling water away from impermeable urban surfaces (Briand et al., 2018; Fletcher et al., 2015; Rentachintala et al., 2022).

The nature-based structures used for runoff source control exhibit a high diversity and include swales, grassed strips, infiltration basins, vegetated roofs, rain trees, etc. They aim at encouraging water infiltration into the soil and thereby restrict the transfer of micropollutants (MP) to surface waters. Several physico-chemical mechanisms allow MP retention in the superficial soil layers during runoff infiltration: particulate micropollutant retention by filtration, dissolved micropollutant retention by sorption, precipitation, etc. Biological mechanisms can promote the biodegradation of these organic micropollutants (MPs) trapped in the soil. While existing literature extensively covers the physico-chemical processes within these structures (Flanagan, 2019; LeFevre et al., 2015; Tedoldi et al., 2017), there is a gap in research focusing on the biodegradation of OMPs in the soil and substrates of these structures (Leroy et al., 2015). With the results of DiBlasi et al. (2009), the structures studied show an average retention of 90% of PAHs. For David et al. (2015), an 82% reduction in PCBs and a 97% reduction in PAHs are observed in stormwater after passage through a bioretention structure. However, biodegradation is not included in the observed reductions. Yet, the biodegradation of MPs can lead to complete mineralization of these pollutants, resulting in soil depollution rather than accumulation. Investing these biodegradation processes within alternative structures holds significant promise for understanding the underlying mechanisms and improving the management of these structures to maximize soil bioremediation (Abatenh et al., 2017; Wu et al., 2017). Such insights are crucial for ensuring

the long-term effectiveness of these structures without posing risks to the environment (Chunyan et al., 2023).

The chosen cocktail of OMPs -Bisphenol A (BPA), Nonylphenol (4-NP) and Octylphenol (OP)-representing emerging pollutants frequently detected in roadway stormwater. BPA, which is extensively used in plastics, epoxy resins and flame retardants, poses environmental risk through combustion-related atmospheric release and water contamination from inadequate plastic waste management. Despite its brief environmental persistence, its continuous high production levels sustain its prevalence, contributing to endocrine disruption, carcinogenicity and immunotoxicity (Caserta et al., 2022; Ďurovcová et al., 2022; Gao et al., 2022; Jia et al., 2020; Klečka et al., 2001; Xing et al., 2022). Alkylphenols (4-NP and OP) serving as surfactants, emulsifiers and dispersants, are ubiquitous in various environmental compartments due to sources like road traffic, industrial processes, and waste incineration. Recognized as endocrine disruptors and CMRs, they are present in the atmosphere, water, and soil (Acir and Guenther, 2018; Dornelles et al., 2020; Gałazka and Jankiewicz, 2022; Lamprea et al., 2018). These 2 families of OMPs are found in road runoff because they are also linked to automotive sources. BPA and alkylphenols are ubiquitous in automotive fluids, pneumatics and envelope materials (Gromaire et al., 2020).

Furthermore, all microorganisms within the soil structures, constituting a consortium, will be employed in mesocosms (Bidja Abena et al., 2019). In ecosystems, intricate interactions occur among microorganisms, and between microorganisms, plants, insects and soil molecules (Manriquez et al., 2021). For instance, interactions such as mutualism, cooperation, competition and amensalism can take place within a microbial community (Moëgne-Loccoz et al., 2015). Between microorganisms and plants, there will also be negative and positive interactions: plant pathogenic microorganisms, phytopathogens and PGPR (plant-growth-promoting-rhizobacteria) such as *Azospirillum* or *Azotobacter* which will interact positively with plants (Singh et al., 2020). These interactions are crucial for understanding ecosystem functioning, as they can lead to antagonistic or synergistic effects. Studying soil biodegradation with a limited number of bacteria could yield distorted results, as these few bacteria might be in a minority or exhibit a lower biodegradation activity due to competition with other microorganisms (Bidaud, 1998). Biodegradation of micropollutants is generally slower with single strains and faster when using a consortium; for instance, Peng et al., (2015) found that pure strains took 8 days to biodegrade 100% of BPA, a strain mixture took 6 days, while the entire consortium from river sediment will achieved this in 28 hours (starting from a concentration of 10mg/L BPA in the microcosm). Wang et al., (2019) reported a 99% biodegradation of BPS (bisphenol S [(4-hydroxyphenyl sulfone)] as the main substitute of BPA) at 50mg/L in 10 days at 30°C with the river sediment consortium, emphasizing the lower efficiency of strains cultures. Chang et al., (2011) investigated BPA biodegradation with a concentration of 250µg/g, achieving between 78 and 96% aerobic biodegradation after 5 days. Regarding NP, Bai et al., (2017) demonstrated a consortium from activated sludge accomplishing 90% biodegradation of NP at 1000mg/L in 8 days, while Yuan et al., (2004) reported complete biodegradation of NP (2µg/g) in 70 days by microorganisms from river sediment. Kang and Kondo. (2002) show the ability of 11 strains to biodegrade BPA under aerobic and anaerobic conditions. BPA biodegradation ranged from 18% to 91% in 3 days under aerobic conditions, while under anaerobic conditions it took up to 10 days.

This underscores the importance of using a cocktail of MPs (Shao et al., 2019), mirroring the diversity of the environmental exposure microorganisms face.

There are different mechanisms for the biodegradation of MPs by microorganisms. There are primary and secondary biodegradation pathways, and biodegradation pathways which are influenced by the environment (aerobic or anaerobic). Microorganisms will biodegrade MPs until complete mineralization or until an intermediate, also known as a metabolite, is reached (De Weert et al., 2010; Giger et al., 2009; Peng et al., 2015; Spivack et al., 1994). The fate of PMs is diverse, but so is the nature of the microbial communities involved in biodegradation.

For example, Matsumura et al. (2009) constructed a phylogenetic tree based on BPA-biodegrading bacteria. This tree shows a diversity of proteobacteria as well as some firmicutes (**figure 1**). Depending on the type of micropollutant, a selection of microorganisms is also visible. Zaborowska et al. (2020) studies the response of the soil microbiome to three MPs: BPA (Bisphenol A), BPF (Bisphenol F) and BPS (Bisphenol S). In the presence of BPA, a preferential selection of *Lysobacter*, *Steroidobacter*, *Variovorax*, *Mycoplana* is visible. In the presence of BPF, *Caldilinea*, *Arthrobacter*, *Cellulosimicrobium*, *Promicromonospora* are found. And finally, with BPS, selection reveals *Dactylosporangium* *Geodermatophilus*, *Sphingopyxis*.

biological analyses (biomass, activity and microbial diversity assessments) will be carried out in order to identify soils that are favourable to effective MPs biodegradation.

2. Materials and methods

2.1. Site description and soil sampling

Sites description

Investigations were carried out on 11 soils, collected in the summer 2021 from five distinct stormwater control measures (SCMs), which collect road runoff from three different road sites in Paris conurbation (France) (Flanagan, 2018; Tedoldi et al., 2017). Table 1 provides details on watershed characteristics, including anthropic activities and the annual average daily traffic near the study sites. Water inflow into the infiltration systems occurs through either an inlet pipe (Dourdan) or surface runoff directly flowing from the pavement (Vitry, Compans). At Compans, vegetative filter strips were constructed in September 2012 but a clearing took place in June 2020 which put the age of this work back to its initial point. The biofiltration swale constructed in March 2016, remained unaffected by the clearing. Dourdan site is exposed to road pollution (heavy road traffic with 4,900 vehicles per day). The site's texture is sandy loam with spontaneous herbaceous vegetation. Vitry site is exposed to road pollution in an industrial zone. The site's texture is loamy, with trees on one side and spontaneous herbaceous vegetation on the other. Compans site is exposed to road pollution in an area with very heavy road traffic (22,000 vehicles per day). Texture of VFS1_C is clay loam and texture of VFS2_C and BFS_C is sandy loam (these 2 areas contain a filtering substrate). VFS1_C and VFS2_C consist of spontaneous herbaceous vegetation, while BFS_C is composed of *Carex aracilis* monoculture.

Table 1: Description of study sites

(¹ : based on Tedoldi 2017 and Flanagan et al. 2017; ²: after soil stripping, up soil concentration is expected to be similar to the ref value)

Site name	Dourdan	Compans			Vitry	
SCM type	Infiltration basin	Vegetated filter strips		Biofiltration swales		
SCM code	IB_D	VFS1_C	VFS2_C	BFS_C	BFS1_V	BFS2_V
Catchment type	Departmental road (4900 veh/day)	Departmental road (22000 veh/day), high truck traffic			Industrial area service road, high truck traffic	
Inflow of water	Localized piped inflow	Diffuse inflow by surface runoff				
Soil texture	Sandy loam	Clay loam	Sandy loam (filter substrate)		Loam	
Operating time	25 years	1 year (top soil stripping in June 2020)		5 years	15 years	
Vegetation	Spontaneous herbaceous vegetation			Carex gracilis	Trees	Spontaneous herbaceous vegetation
Cu soil content (mg/kg) ¹	Up ≈ 160; Ref ≈ 20	Up ² ≈ 250 before soil stripping; Ref ≈ 40		NA	Up ≈ 110; Ref ≈ 50	

Soils sampling

Soil samples were taken from a depth of 0 to 10 cm for Compans and Dourdan. For Vitry, samples were taken at a depth between 0 and 5cm. In the case of the relatively narrow Compans biofiltration swale (\approx 50 cm width), a single composite sample covering the whole filter area was constituted. For the other SCMs -Vitry biofiltration swale, Compans filter strips and Dourdan infiltration basin, two composite samples were collected: one reflecting the region proximal to the runoff inflow (in) which receives important quantities of water and associated pollutants at each rainfall and one representing the area that is the less subject to runoff and almost only receives direct rainfall, which can be considered as a reference value (ref). For the Vitry biofiltration swale, two portions were studied, one planted with tree and the second with spontaneous herbaceous vegetation.

Soils preparation

The soils were dried at 25°C for 1 week then they were sieved through a 2mm mesh. On-site samples were collected all along the structure, and these individual samples were later combined to form a representative composite sample for each of the 11 studied soils. Subsequently, these 11 composite soil samples were stored at room temperature until they were used for kinetic experiments.

2.2. Chemicals

Basal salt media (BSM) were prepared using the following composition (g/L): K_2HPO_4 (2.1), KH_2PO_4 (0.4), NH_4NO_3 (0.5), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2), $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0.023) and $FeCl_3 \cdot 2H_2O$ (0.002) (Peng et al., 2015). The pH of the BSM was adjusted to 7.3 ± 0.1 with NaOH. The three stock solutions of BPA, 4-NP and OP were prepared in methanol at a concentration of 2g/L and stored at 4°C for further use. The micropollutants were added to the BSM to obtain a final concentration of 250, 175 and 75 μ g/L (BPA, 4-NP and OP respectively). Concentrations of these MPs were chosen based on several parameters: i) concentrations as close as possible to environmental conditions, taking laboratory requirements into account, ii) the ratio between NP and OP is taken from (Flanagan, 2018)'s work, iii) a previous experiment carried out at LEESU (Roux, 2019). The BPA (99%+ purity) and the 4-NP (90%+ purity) were purchased from Sigma-Aldrich. The OP (98%+ purity) were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH. The chemical structure and physico-chemical properties of these compounds are shown in table 2.

Table 2: physico-chemical characteristics of micropollutants studied in biodegradation kinetics (a =(Deshayes, 2016) ; b = (Ahel and Giger, 1993a) ; c = (Bergé et al., 2012a) ; d = (Ahel and Giger, 1993b))

Family	Molecule name	N° CAS	Formulas	Molar weight (g/mol)	Solubility at 20°C (mg/l)	Hydrophobicity (Log kow)
Bisphenol	Bisphenol A	80-05-7	$C_{15}H_{16}O_2$	228.3	300 (a)	3.4 (a)
Alkylphenol	4-Nonylphenol	84852-15-3	$C_{15}H_{24}O$	220.3	5.43 (b,c) – 5.44 (a)	4.48 (d,a) – 4.80 (c)
	4-tert-Octylphenol	140-66-9	$C_{14}H_{22}O$	206.3	12.6 (b,a)	4.1 (d,a)

1.1. Inoculum preparation for kinetics micropollutants degradation

The microbial inoculum used were obtained from the 11 composite soils described above by combining 500g of each soil with 300ml of physiological water (9g/L). The mixture was subjected to shaking for 1h at 120rpm, followed by centrifugation for 10min at 2000rpm. The resulting supernatant, representing the microbial extracts was carefully collected. The optical density (OD) at 600 nm of each inoculum was measured using a Genesys 10 UV scanning Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). OD is homogenized on the basis of the lowest OD, i.e. the least rich inoculum giving the lowest OD will be the limit for the other inoculum in order to maintain a constant biomass between inoculum. All inoculums were used immediately for the subsequent experiments.

2.3. Kinetics experimental design

In each flask, a mixture of 26.5ml of BSM culture media (spiked with MPs) and 4.5ml of a single inoculum was prepared, a step repeated for all 11 inoculums. Additionally, an abiotic control consisting of only BSM media with MPs and a biotic control with media without MPs and inoculum were prepared. These flasks were then placed in an incubator at 25°C with agitation (120rpm) in the dark for 14 days (for soils with low biological activity) and 17 days (for soils with strong biological activity). Each treatment was carried out in triplicate and with sufficient replicates for analysis at each analysis point. Throughout the 17-days experiment (0-, 1-, 3-, 7-, 14-/17-days), physico-chemical and biological analyses were carried out.

2.4. Analysis

2.4.1. Physico-chemical analysis

pH measurements

The pH of 2 ml liquid samples was measured using a pH-meter (HANNA pH 211 Instruments) equipped with a sensor (HI 1053) according to ISO 10390 standard. pH measurements were conducted at the beginning and at the end of experiments.

BPA, 4-NP and OP measurements

BPA, 4-NP and OP were quantified at each experiment point to determine their concentration. Analysis of BPA, 4-NP and OP was performed using Ultra Performance Liquid Chromatography (ACQUITY UPLC, Waters) coupled with a tandem mass spectrometry (MS-MS) (ACQUITY TQD, Waters).

Micropollutant concentrations were determined using a VBA macro containing the following equations:

$$q_{AP}/q_{Ei} = a \text{Area}_{AP}/\text{Area}_{Ei} + b,$$

$$q_{AP} = q_{Ei}(a \text{Area}_{AP}/\text{Area}_{Ei} + b)$$

$$\Rightarrow (q_{AP} \cdot \text{Vol}/10 \cdot 1000)/(\text{Extract volume}) = \text{Concentration AP in ng/L extracted sample}$$

Where:

- AP: substance 'x'
- Area: peak area for the substance 'x'
- Ei: injection standard
- q: quantity
- Vol: corresponding reference substance volume 'x'
- Extract volume: sample volume = 1 mL

The results will then be expressed as the percentage of micropollutant biodegradation achieved by the microorganisms

2.4.2. Biological analysis

Microbial biomass

To quantify the total microbial biomass, the most probable number (MPN) procedure was used. Cascade dilutions were performed from the kinetic solutions, with dilution factors ranging from 10^{-1} to 10^{-5} up to 10^{-7} across different time steps. For total enumeration, LB was added to the wells of plate, with 200µl in the negative controls well and 180µl in the other wells. Eight wells per dilution were inoculated with 20µl each. The plates were incubated for 3 days at 25°C in the dark. After incubation, the growth of microbial populations was determined spectrophotometrically (Multiskan FC plate spectrophotometer, Thermo Scientific) by measuring the absorbance at 620nm. A computer program utilizing standard Mac Grady's tables, was used to calculate the MPN for each sample, expressed as the number per gram of soil dry weight.

Monitoring carbon mineralization with CO₂ production

The produced CO₂ was quantified in ppm using gas chromatography (Agilent Technologies 490 Micro GC) every 2 days. Mesocosms consisting of flasks with crimp necks and aluminum crimp caps featuring a central butyl/PTFE (VWR) orifice, remained sealed during measurements, without aeration. The caps permitted needle insertion to draw air from the flasks for CO₂ measurements via the micro-GC.

Microbial functional diversity

Biolog plates, specifically the BIOLOG EcoPlate™ (Biolog Inc., CA, USA), are used to assess the functional diversity of microbial communities providing insights into community-level physiological profiles (Preston-Mafham et al., 2002). Each 96-well plate was composed of 31 substrates, with a water control replicated three times. The plates were inoculated with 150µl of inoculum suspension per well and incubated 96 hours at 25°C. Subsequently, the plates are then measured with the Multiskan FC plate spectrophotometer (Thermo Scientific) at 595nm. Tetrazolium chloride in each well is reduced to formazan during microbial substrates metabolism, resulting in a purple in color (595nm). The intensity of coloration reflects the extent of carbon sources degradation by microorganisms. The Average well color development (AWCD) was calculated using the following equation:

$$AWCD = (\Sigma(C_f - C_i)) / n$$

C_f = Final measured absorbance for one triplicate: 31 wells,

C_i = Initial measured absorbance for one triplicate: 31 wells,

n = wells number = 31

Potential functional richness was estimated by calculating the average number of positive wells (DO > 0.25) depending on substrate families.

Microbial genetic diversity

DNA extraction

Genomic DNA was extracted involved pooling triplicate 500 µl samples into a single sample (analysis performed only at the final time). The FastDNA™ spin Kit for Soil (MP Biomedicals, Europe, LLC) was employed following the manufacturer's instruction. DNA concentration was estimated with a NanoVue

Plus™ (Biochrom, USA) and through agarose gel electrophoresis (Mini Gel II (VWR) System). DNA samples were stored at –20 °C until sent for sequencing.

Sequencing

The DNA extracts are sent to Eurofins Genomics Europe ((Konstanz, Germany) for illumina MiSeq sequencing of bacterial 16S rRNA gene, with bacterial primers targeting the V3-V4 region of 16S RNA (357F-TACGGGAGGCAGCAG, (Turner et al., 1999) and 800R-CCAGGGTATCTAATCC, (Kisand et al., 2002)).

Sequence quality

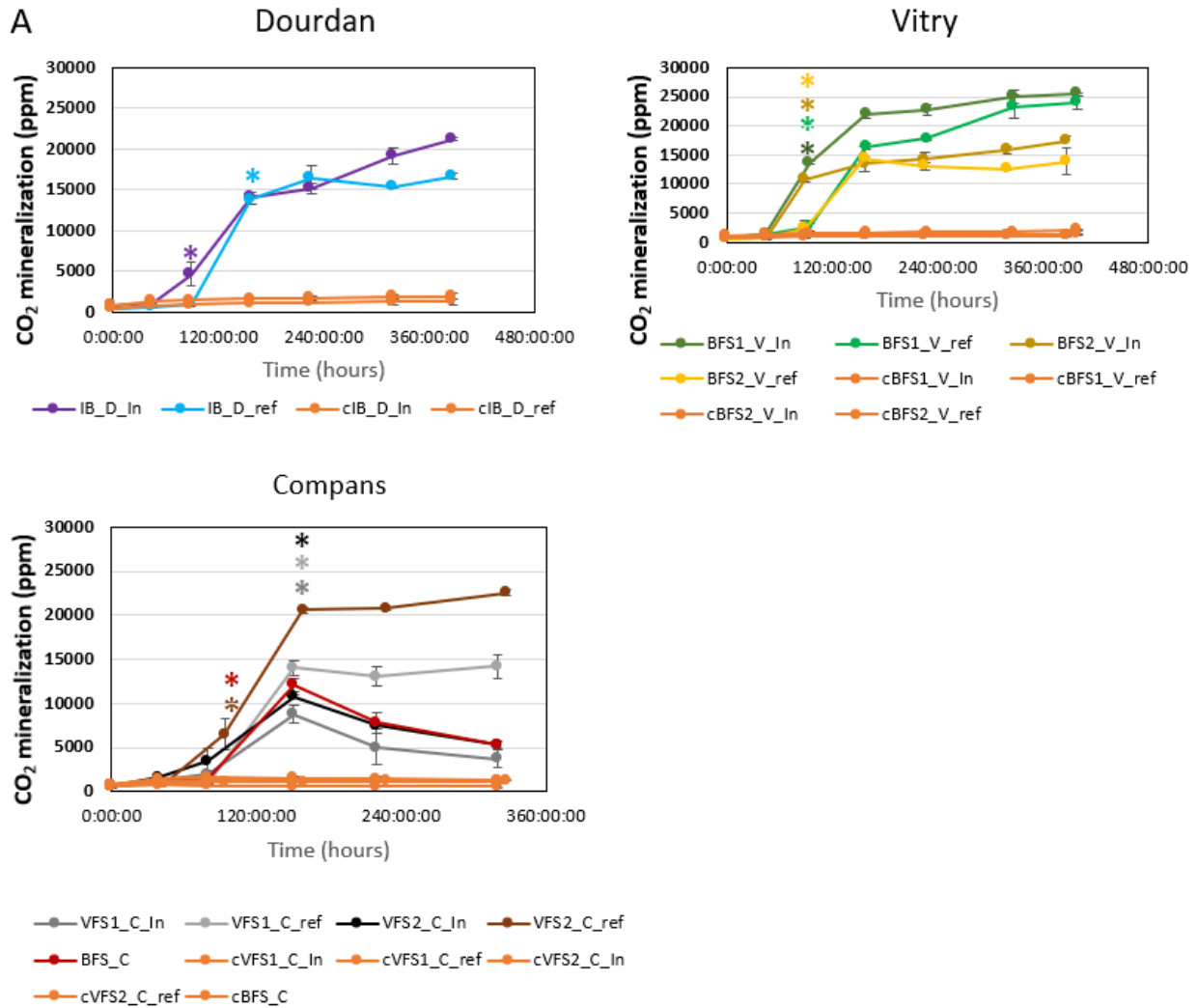
The phylogenetic classification of bacteria in the different samples was characterized using the QIIME taxa summary script, reaching up to the genus level (L6). Following quality control trimming (removal of low-quality sequences and chimeras), a total of 3.445.583 effective sequences were generated from 22 samples and utilized for analysis (table 4). The average length of the processed sequences was 417 bp for all samples. The rarefaction curves consistently approached saturation plateau, indicating that a reasonable number of individual samples had been collected for analysis.

2.5. Statistical analysis

These results are expressed as the mean \pm SD of three samples, except for microbial genetic diversity. Statistical analyses were performed with R-4.2.2 (31-10-2022) software. Given the non-normal distribution of the data, the Kruskal–Wallis test was applied (with all effects considered significant when $P < 0.05$). Subsequently, the Conover-Iman multiple comparison test was performed, with significant differences being represented by distinct letters.

3. Results & discussion

3.1. Biological results during kinetics



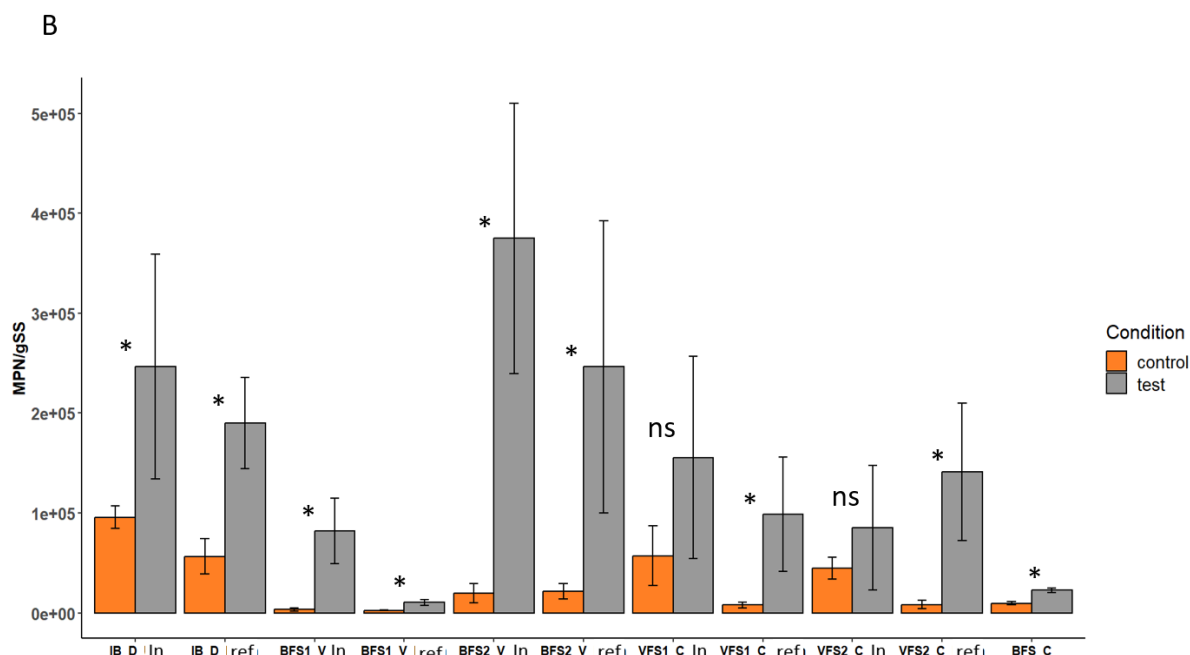
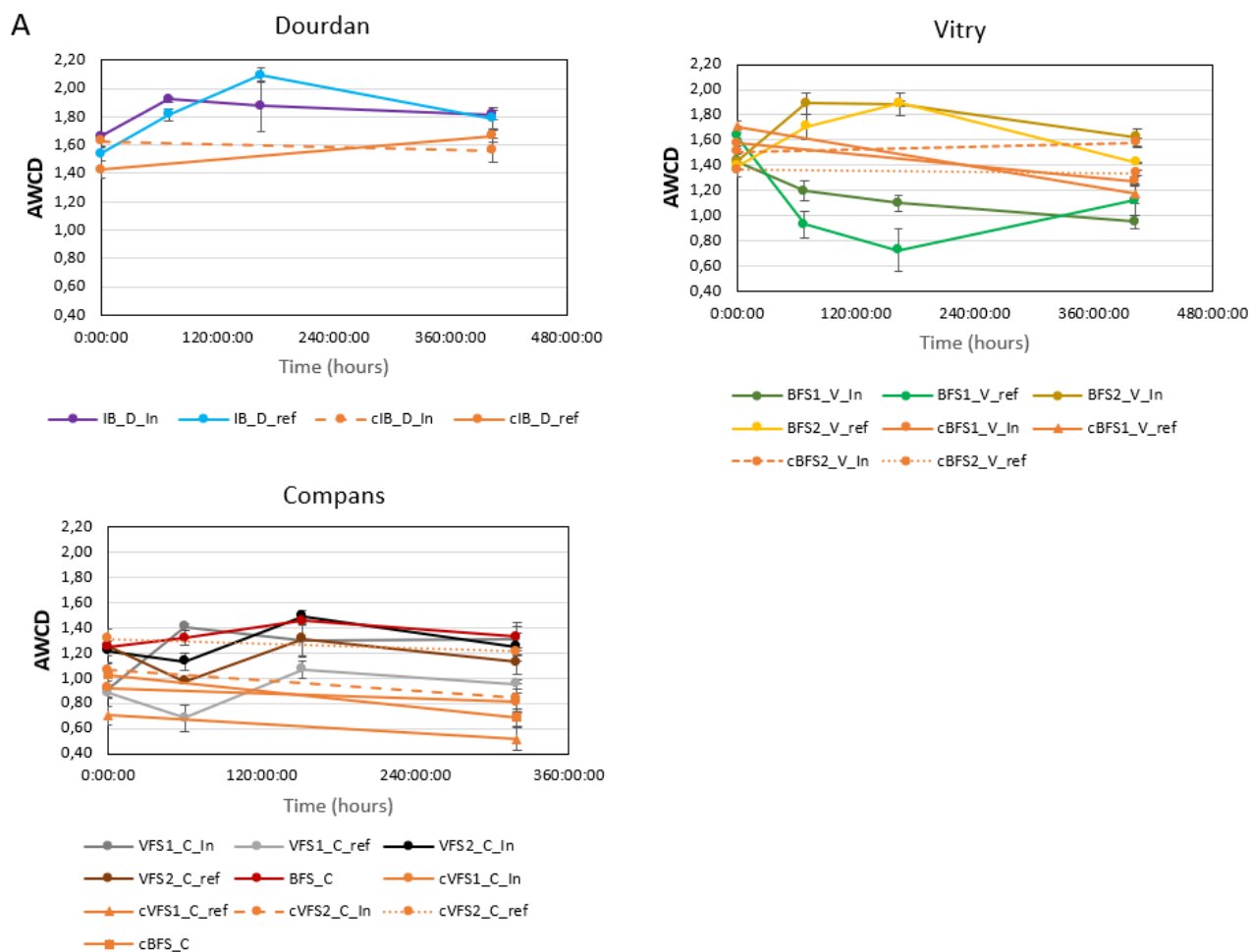


Figure 2: Mean biological characteristics including microbial biomass during kinetics ($n = 3$, mean \pm SD). A) Monitoring of CO_2 production during kinetics in ppm, with results discussed using the Conover-Iman test for multiple comparisons (with Bonferroni correction) following the Kruskal-Wallis non-parametric test. Significant differences between test soils microorganisms and controls are represented by (*). B = MPN expressed in MPN/gSS at the end of kinetics for all soils, with results examined with Conover-Iman test for multiple comparisons after the Kruskal-Wallis non-parametric test. Significant differences between test soils microorganisms (gray) and controls (orange) are denoted by (*) and (ns) when there is no significant difference.

Microbial growth was concurrently monitored by assessing the mineralization of C sources into CO_2 every 2/3 days and determining the most probable number (MPN) at various kinetic time steps, with test and biotic controls included in the study. In **Fig.2A**, a significant difference in CO_2 production is between the tests and biotic controls (orange) were observed. At the Dourdan site, a significant difference is observed from the 4th day of kinetics Inlet and after the 7th day reference. In Vitry, a significant difference between the test and control is observed after 4 days for all soils at this site. At Compans, significant differences are observed on day 4 for the swale and VFS2_C_ref, and after 7 days for the other soils. The controls maintain levels around 1000ppm, while the tests reach 20000 to 25000ppm. A drop-in biomass (or stagnation) is noticeable in the Compans soils. MPN results (**Fig.2B**) at the end of the kinetics exhibit more variability. Significant differences are observed between the biotic controls and the tests for almost all the soils, with the two soils showing no significant differences being VFS1/2_C_In. On the other hand, BFS1_V_ref and BFS_C soils, despite a significant difference between test and control, should be discussed, as the quantity of NPP/gSS measured for the tests is very low ($1.1\text{E}+04$ and $2.1\text{E}+04$ MPN/gSS). Conversely, three very active soils achieved a biomass greater than $2.4\text{E}+05$ MPN/gSS, i.e. IB_D_In and BFS2_V_In/ref, resembling findings from experiments conducted by Cébron et al., (2015), which reported values between $4\text{E}+05$ and $2\text{E}+05$ MPN/gSS of PAH-degrading bacteria between the beginning and end of the batch experiment. Huang et al. (2017)'s work also shows that the presence of BPA as the sole carbon

source can stimulate microbial growth compared with controls. Microorganisms are therefore selected for their ability to biodegrade PMs.

By gathering the outcomes derived from MPN and CO₂ production, we can affirm the significant differences in growth between the tests and biotic controls (significantly higher growth in tests than in controls), showing the impact of MPs. Microorganisms exhibit growth through the utilization of the C sources added to the medium in the test vials (Klečka et al., 2001). However, for two soils (BFS1_V_ref and BFS_C), a noticeable difference in biomass between the two measurement techniques was observed. CO₂ measurements indicated robust microbial growth in these soils, whereas MPN results showed little distinction between test and control soils. This incongruity, may suggest microbial communities not well-adapted to the LB medium used in the microplates.



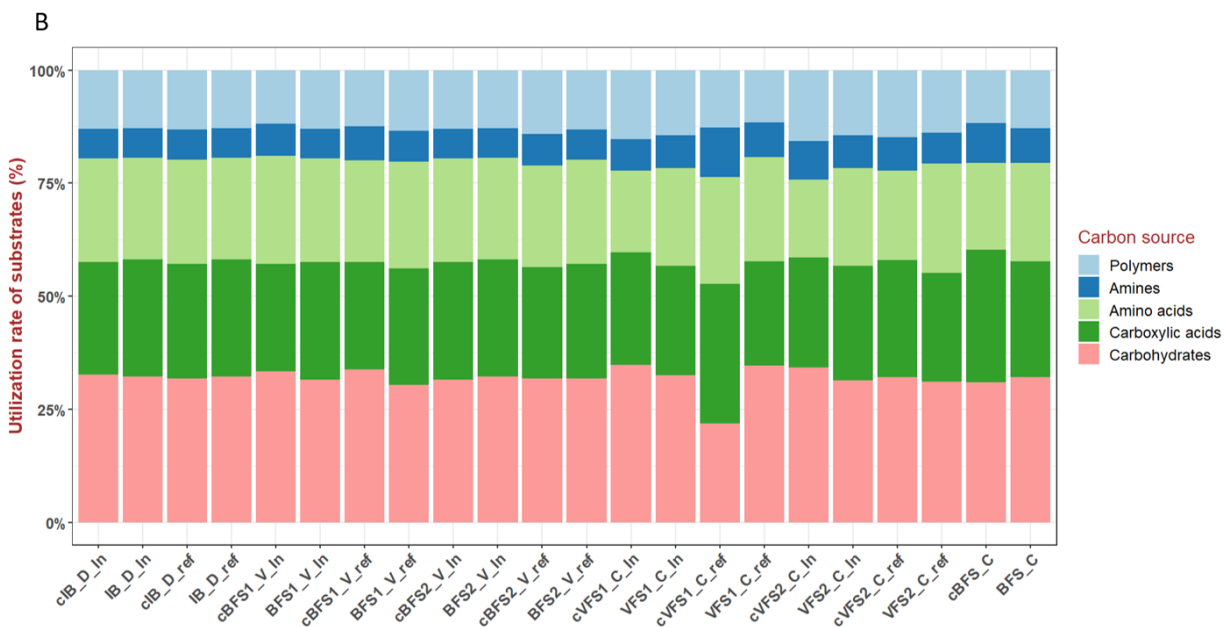


Figure 3: Representation of Ecoplate biolog results reflecting the functional diversity of microbial communities. (A) Mean AWCD Average Well Color Development) of soils during kinetics ($n=3$, mean \pm SD). Results are examined using Conover-Iman test of multiple comparisons after Kruskal-Wallis non-parametric test, where significant differences between test soils microorganisms (colors) and controls (orange) are represented by different letters ($P < 0.05$), table S1. (B) Percentage representation of the utilization of the five type carbon sources (polymers, amines, amino acids, carboxylic acids, carbohydrates) in Biolog Ecoplate by test soils microorganisms and controls.

The results of potential of microbial activity assessed with Ecoplates are shown in **Fig. 3** (A and B). In **Fig. 3A**, the AWCD curves during kinetics are depicted for each site, with details on significant differences available in supplementary Table S1. For three soils (BFS1_V_ref, BFS2_V_In and VFS2_C_ref), the AWCD of both tests and controls converge at the end of kinetics. Conversely, behavior varies considerably between sites. At Dourdan, tests exhibit higher activity than the controls, peaking on day 3 (In - 1.9) and day 7 (ref - 2.1). At Vitry, different behaviors are observed depending on vegetation: microorganisms coming from soils with trees had a lower activity than controls before recovering a basal level (~ 1), while microorganism coming from soils with herbaceous plants display high activity initially, decreasing to a basal level (~ 1.5). In Compans, extracted microorganisms show an apparent decrease in activity on day 3, followed by an increase, except for VFS1_C_In, whose activity increases on day 3 (1.4) and then stagnates until the end of kinetics. Histograms in **Fig. 3B** show the percentage utilization of the five type plate substrates between control and test soils microorganisms at the end of kinetics. A predominance of carbohydrate utilization (over 30%) is evident, along with a weak preference for amine. These results demonstrate that carbohydrates are more easily biodegraded by the microorganisms present, while amines are less adapted to the microorganisms present, making them more difficult to biodegrade (Mohamed and Abdelmajid, 2016). While Vitry and Dourdan sites, exhibit little difference in substrate utilization trends, some variations are observed for the Compans site. The first band at Compans especially reference, is most affected, showing a sharp drop in carbohydrate use from 35% to 22%. A difference within the microbial community could explain this change in trend.

The AWCD results reveal diverse behaviors influenced by soil type and site conditions. MPs added to microbial extracts can induce stress, leading to lower activity compared to control, and an extended time to return to a basal state. Conversely, in Dourdan microbial extracts', MPs may not stress microorganisms, but rather boost their growth. In terms of C utilization, Dourdan and Vitry soils seem to have metabolisms well-adapted to Ecoplate substrates. Their microbial communities exhibit redundant metabolisms, where the impact of MPs is not noticeable in substrate utilization preferences, but only in overall activity. In the work by Mkhinini et al. (2020), soils irrigated for 20 years with treated wastewater displayed higher microbial activity than newly irrigated soils. This suggests microbial selection over time following adaptation to the environment, in line with our observations suggesting higher microbial activity in older soils. It is possible that the incubation time for microbial growth in each soil was overestimated (standard incubation time for the 11 soils), leading to saturation in Ecoplates in the most active soils. Higher dilution of inoculated microbial extracts could potentially reveal more distinct differences between control and test soils microorganisms in Ecoplates, as demonstrated in the work by Wolińska et al. (2018), where clear differences were observed between control soils and those polluted with petrol.

3.2. Physico-chemical results during kinetics

Table 3: Average pH value (n=3, mean \pm SD) for test soils microorganisms, biotic control and average pH (n = 6, mean \pm SD) for abiotic control at the beginning (ti) and end (tf) of the kinetics. Results for each row were examined with Conover-Iman test for multiple comparisons after the Kruskal-Wallis non-parametric test, and values followed by different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

Site	SCM code	Location	pH			
			Abiotic control (ti-tf) = 7.27-7.28 \pm 0.01-0.00			
			Control ti	Control tf	Test ti	Test tf
Dourdan	IB_D	In	6.83a \pm 0.01	6.80b \pm 0.01	6.87c \pm 0.01	6.68d \pm 0.01
		ref	6.97a \pm 0.01	6.92b \pm 0.03	7.06c \pm 0.02	6.80d \pm 0.01
Vitry	BFS1_V	In	7.00a \pm 0.01	6.89b \pm 0.00	7.00a \pm 0.01	6.80c \pm 0.01
		ref	6.94a \pm 0.01	6.57b \pm 0.06	6.95a \pm 0.01	6.77c \pm 0.00
	BFS2_V	In	6.96a \pm 0.02	7.00b \pm 0.03	7.05c \pm 0.03	6.83d \pm 0.01
		ref	7.00a \pm 0.01	6.89b \pm 0.01	7.02c \pm 0.01	6.77d \pm 0.01
Compans	VFS1_C	In	7.17a \pm 0.01	6.75b \pm 0.01	7.06c \pm 0.01	6.77b \pm 0.05
		ref	7.19a \pm 0.01	6.81b \pm 0.01	7.12c \pm 0.00	6.80b \pm 0.01

	VFS2_C	In	7.21a ± 0.00	6.89b ± 0.02	7.24a ± 0.05	6.86c ± 0.01
		ref	6.97a ± 0.04	6.89b ± 0.01	6.97a ± 0.01	6.79c ± 0.01
	BFS_C	/	7.19a ± 0.00	6.74b ± 0.01	6.94c ± 0.01	6.71d ± 0.01

The pH was measured at the start and end of the kinetics to determine the impact of microbial MPs biodegradation activity on the environment (**Table 3**), with the starting pH stabilized around 7.3 ± 0.1 . Both biotic and abiotic tests and controls were analyzed. Abiotic controls show no change in pH between initial and final measurements. Conversely, the biotic controls and tests displayed significant differences in pH for each mesocosms, indicating medium acidification at the end of the kinetics. Notably, certain soils microbial extracts (BFS1_V_In, VFS2_C_In/ref), exhibited more pronounced acidification in the tests than in the biotic controls. Subsequently, comparing the tests and biotic controls became challenging, given that the addition of soil microbial extracts modified the initial pH from 7.3 ± 0.1 to a range of 6.83 to 7.21.

The observed acidification at the beginning led to the hypothesis that when the addition of microbial extracts to the kinetic flasks, introduced not only microorganisms but also soil ions in substantial quantities. The interaction of these ions with the medium may have contributed to acidification, as evidenced by the appearance of white precipitates exclusively in the biotic controls and tests, but not in the abiotic controls.

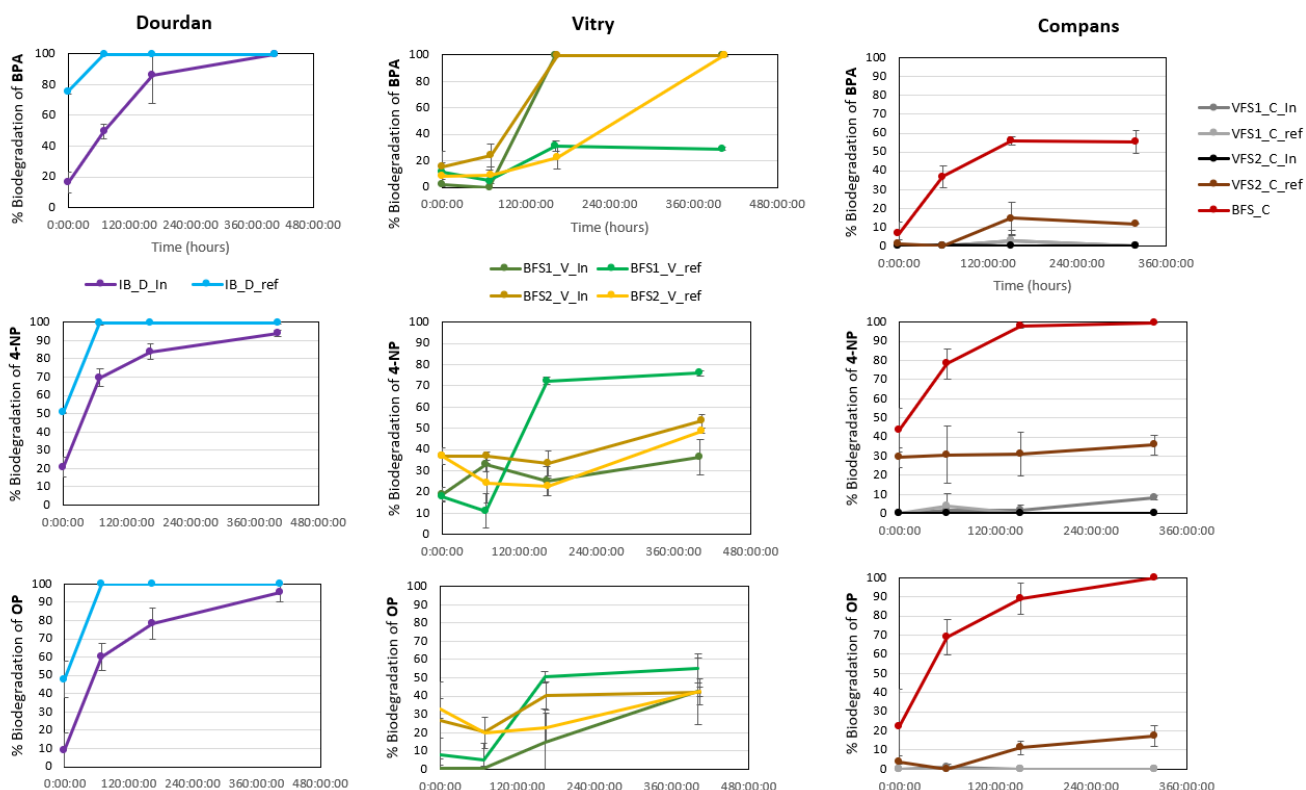


Figure 4: Representation of site-dependent percentage biodegradation for the three micropollutants during kinetics (n = 3, mean \pm SD). First row: BPA biodegradation results, second row: 4-NP biodegradation results and last row: OP biodegradation results. The results were analyzed with Conover-Iman test for multiple comparisons after the Kruskal-Wallis non-parametric test. significant differences are indicated by different letters (P < 0.05) in table S2,3 and 4.

In **Figure 4**, the percentage biodegradation of the three MPs is plotted per site over the kinetics. For Dourdan, the soil exhibits consistent behavior across all three MPs, achieving strong biodegradation reaching 100% at the end. The notable variation lies in the biodegradation rate, with the reference soil reaching 100% biodegradation after 3 days, while the Inlet soil achieved 100% at the end of the kinetics. It noteworthy, that IB_D_ref starts with high values high % of degradation for each pollutant (T0 BPA = 80%, T0 4-NP/OP = 50%). In Vitry, diverse behaviors are observed. For BPA biodegradation, all soils except BFS1_V_ref reach 100% biodegradation. BFS2_V_ref requires more time than Inlet soils, but will still achieves complete biodegradation. BFS1_V_ref, however, biodegrades BPA at less than 40%. Nevertheless, it stands out as the most active in biodegrading 4-NP and OP., achieving almost 80% biodegradation and almost 60% biodegradation respectively. The other soils extracts achieve no more than 50% biodegradation of 4-NP and 40% for OP. In Compans, the swale achieves nearly 60% biodegradation of BPA and 100 for 4-NP and OP. VFS2_C_Ref achieves 20% biodegradation of BPA and OP. Notably, no significant difference (Table S3.) is observed between the beginning and end of the kinetics for 4-NP, suggesting minimal biodegradation by this extract. The other three Compans soils exhibit negligible biodegradation of MPs. Contrary to some literature findings, BPA in our study does not undergo 100% degradation after 3 days (Eio et al., 2014; Sarma et al., 2019) except for IB_D_ref, requiring at least 7 days. The degradation of alkylphenols takes between 7 and 17 days at least (except for IB_D_ref), aligning with the work of (Wang et al., 2014) (4-NP reduced to 93% after 9 days). These different

biodegradation times found in the literature could be explained by different microbial communities or different biodegradation activities. However, work on the microbial biodegradation of these micropollutants in stormwater management facilities is scarce, limiting available data in the literature.

Alkylphenols, being more hydrophobic, tend to absorb onto surfaces such as walls or equipment during analysis. Consequently, initial values for 4-NP and OP (especially 4-NP) are relatively high. Accounting for these bias reveals that BFS2_V_In/ref soils exhibit minimal or no biodegradation of 4-NP and OP, even though final values reach 40-50%. Focusing on Vitry, distinct soil behaviors and preferences in the utilization of the C sources by microorganisms are evident within the same site. Microbial communities in BFS2_V_In/ref soils predominantly utilize BPA at different rates and exhibit limited consumption of alkylphenols. BFS1_V_In will mainly utilize BPA, but also demonstrates 40% biodegradation of OP from an initial 0%. The last Vitry soil, BFS1_V_ref, mainly utilizes alkylphenols (60-80%), with a lesser extent utilization of BPA (30%). These results underline the impact of vegetation and Inlet/reference position on microbial community selection in soils. In Compans, the swale also shows substrate preference, favoring alkylphenols. The other Compans soils are less suitable for the biodegradation of the three MPs, deviating from expectations set by previous biological results. Klečka et al. (2001) discuss the lack of correlation between biodegradation capacity during kinetics and microbial population size (heterotrophic population), with a BPA biodegradation kinetics study with river and sediment microorganisms, aligning with our results. We observe either high biomass with Compans bands and no biodegradation capacity, or low biomass (heterotrophic microorganisms obtained by MPN) and medium to high micropollutant biodegradation capacity. It is crucial to note that the 2 Compans grass strips were cleared a year before sampling the soils used for these kinetics. This suggests that microbial selection in a polluted environment is not yet complete, and that the present populations are not suited for biodegrading MPs. In contrast, the unaltered swale in Compans, shows great potential for soil bioremediation. Meanwhile, the Dourdan site shows a high capacity for MPs biodegradation, consistent with expectations, as the oldest site with microbial populations adapted well to the prevailing pollution. Interestingly, the reference site is more efficient in biodegradation than the Inlet site. Alongside the high initial values of biodegradation for alkylphenols, a similar trend is observed for BPA. This raises question about whether biodegradation occurred between vial set up and analysis or if there were issues with the sample soil. Further analysis over a very short period could validate these observations. Peng et al. (2015) show in their work on BPA biodegradation in microcosms, that half of the BPA present in the test vials had already degraded within the first 6 hours, depleting completely after 28 hours.

It would be interesting to evaluate the micropollutant biodegradation capacity of these soils: i) in the presence of the original soil, to integrate the role of organic matter and other soil constituents, ii) in the presence of organic amendments, to enhance microbial capacities (Agbor et al., 2018; Cébron et al., 2015). For example, with an organic amendment, soils at the Compans site, which have been cleared, could potentially recover a biodegradation level closer to that expected for a stormwater management structure. Additionally, for soils capable of biodegrading micropollutants efficiently, a complementary analysis could have completed the liquid kinetics by analyzing the metabolites produced. During the biodegradation of MPs, complete mineralization of compounds, our ultimate goal, is possible. However, it is also plausible that biodegradation pathways stop at metabolite production. The problem with metabolites lies in their potential to be more toxic than the parent product, posing adverse toxicological

and ecotoxicological effects (Acir and Guenther, 2018; Yousefi-Ahmadipour et al., 2016). While untargeted analyses to identify random metabolites are time-consuming, target established BPA metabolites is feasible. In BPA biodegradation, two pathways exist: a predominant pathway producing the metabolites 4-HBAL (p-hydroxybenzaldehyde), 4-HAP (p-hydroxyacetophenone) and 4-HBA (p-hydroxybenzoic acid), and a minor pathway producing 2,2bis(4-hydroxyphenyl)propanoic acid, 2,3bis(4-hydroxyphenyl)propan-1,2-diol, which then yields HBA or 4-hydroxyphenacyl alcohol (Choi and Lee, 2017; Eio et al., 2014; Ike et al., 2018; Jia et al., 2020; Spivack et al., 1994).

3.3. Microbial community structure

Characterizing, the microbial structure of microorganisms' extract provides a better understanding of micropollutant biodegradation. Bacterial communities were examined in different soils extract following acclimatization to a cocktail of micropollutants comprising BPA, NP and OP (designated as test soils microorganisms). Additionally, a comparative analysis of bacterial communities was conducted in the same soils without micropollutant amendment (controls).

3.3.1. Biodiversity indices

Table 4: Sequences and diversity indices in this study.

Soils Tests	Effective sequences	Percentage of effective sequences	Shannon entropy	Soils Controls	Effective sequences	Percentage of effective sequences	Shannon entropy
BFS_C	98693	85.28	4.692	cBFS_C	46549	62.3	5.611
BFS1_V_ref	169199	84.03	6.985	cBFS1_V_ref	170318	77.97	7.529
BFS1_V_In	166171	83.58	6.990	cBFS1_V_In	171849	76.53	9.049
BFS2_V_ref	136854	82.31	5.722	cBFS2_V_ref	164399	78.07	7.779
BFS2_V_In	134228	84.12	4.588	cBFS2_V_In	156066	77.23	7.678
IB_D_ref	153607	82.48	5.617	cIB_D_ref	147270	80.24	7.521
IB_D_In	141976	85.33	2.990	cIB_D_In	164304	78.95	7.846
VFS1_C_ref	226891	86.07	1.630	cVFS1_C_ref	46121	57.08	4.984
VFS1_C_In	225202	86.45	3.097	cVFS1_C_In	161256	84.8	6.086
VFS2_C_ref	240816	86.37	3.135	cVFS2_C_ref	173606	81.54	7.796
VFS2_C_In	208078	85.29	3.133	cVFS2_C_In	148374	85.94	6.424

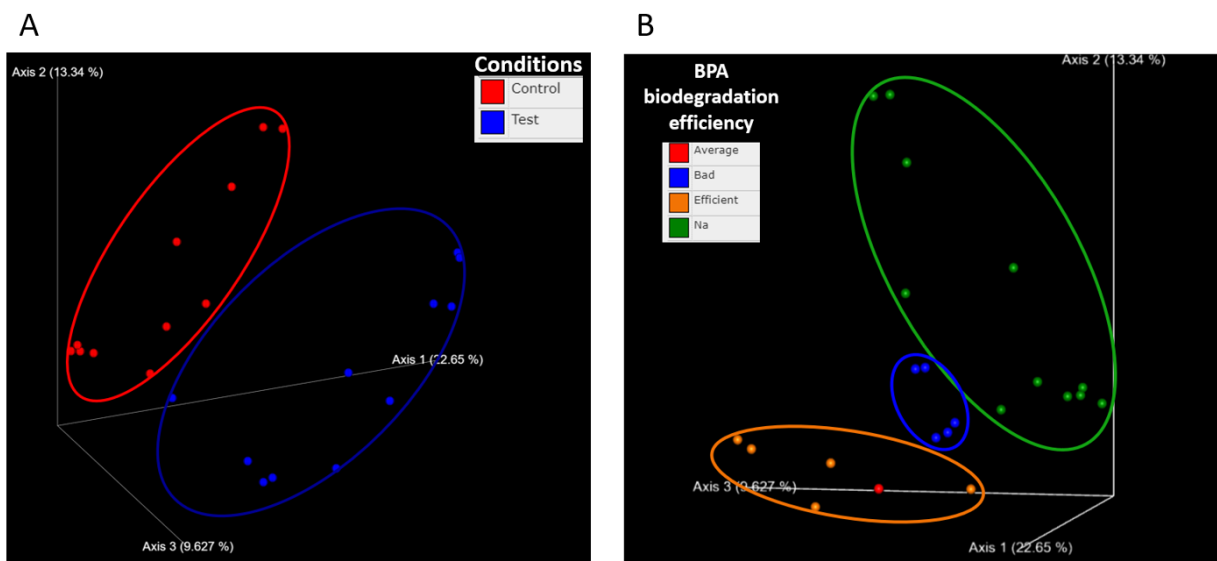


Figure 5: Beta diversity of the 11 soils extract in response to micropollutant spiking at kinetic endpoint, visualizes through the first two dimensions of a principal component analysis using Bray-Curtis distances. A) Samples are color-coded with red representing soils without micropollutant, and blue representing soils extract with micropollutants; B) Samples are color-coded based on BPA biodegradation efficiency, where in red indicates average biodegradation capacity, blue indicates poor efficiency, orange indicates high efficiency and green represents controls without micropollutants.

The Shannon entropy, emphasizing the "richness" aspect of diversity, is detailed in **table 4**. Control soils exhibited higher richness values (4.98-9.04) compared to test soils microorganisms (1.63-6.98), indicating greater diversity in control soils extracts. Notably, cBFS1_V_In (Vitry site) displayed the highest diversity, while VFS1_C_ref (Compans site) exhibited the lowest. Statistical analyses (PERMANOVA, $p < 0.05$) confirmed separation between samples under different conditions (with and without micropollutant amendment). Bray-Curtis distances in **Figure 5A** illustrates two distinct groups separated based on conditions (soils without micropollutant and soils extract with micropollutants), while **Figure 5B** focusing on BPA biodegradation capacities, reveals three distinct groups: a green control group without micropollutants, a blue group with inefficient BPA biodegradation, and an orange (and red) group comprising soils with moderate to efficient BPA biodegradation. These graphs therefore indicate a significant difference between the control group and the group biodegrading PMs. In the case of BPA biodegradation, a clear distinction is visible in microorganisms' biodegradation capacities.

3.3.2. Characterization of microbial population potentially involved in the micropollutant biodegradation

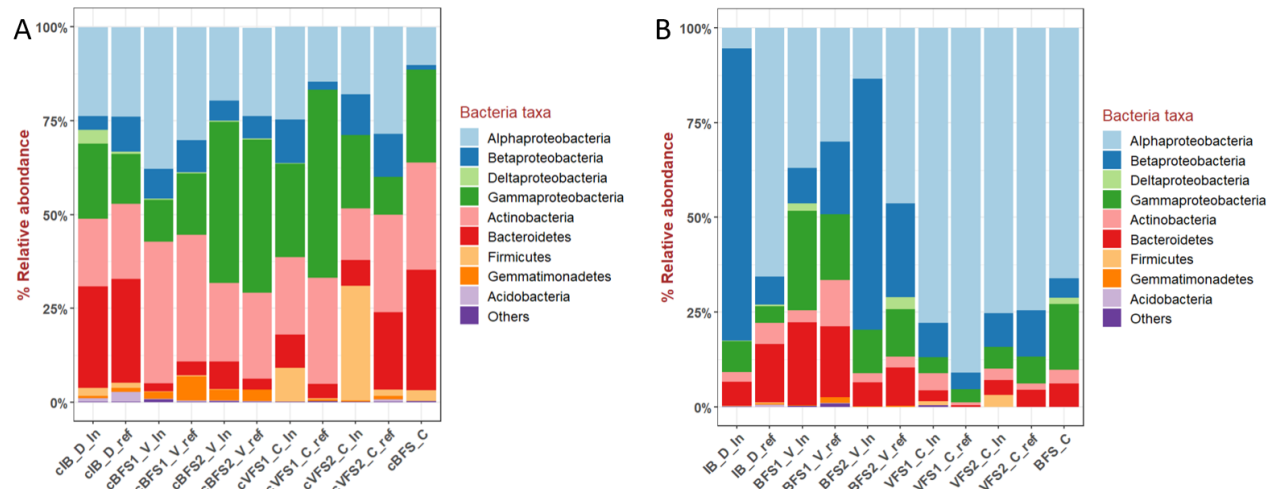


Figure 6: The average relative abundances of major phyla, with a focus on Proteobacteria divided into classes (with relative abundance higher than 1%) at kinetic endpoint. A: in mesocosms without micropollutant, B: in mesocosms spiked by micropollutants. Phyla with relative abundance lower than 1% were grouped as “others”.

Proteobacteria is the dominant phylum in all studied soils, representing between 36% and 99% of prokaryotic communities. Analysis at class level reveals that the main classes in the test soils microorganisms (**figure 6B**) were Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria (IB_D_In and BFS2_V_In). In control soils, the principal classes of Proteobacteria were Alpha- and Gammaproteobacteria (**figure 6A**). Additional major phyla include Actinobacteria and Bacteroidetes, with Actinobacteria displaying higher abundance in control soils than in test soils microorganisms. Comparative analysis at the phylum level (and class for proteobacteria) indicate a shift in the microbial community composition following micropollutant introduction to the medium at the end of the kinetics. Whereas control soils exhibit greater phylum diversity, this diversity decreases in test soils microorganisms, showing a selection towards proteobacteria.

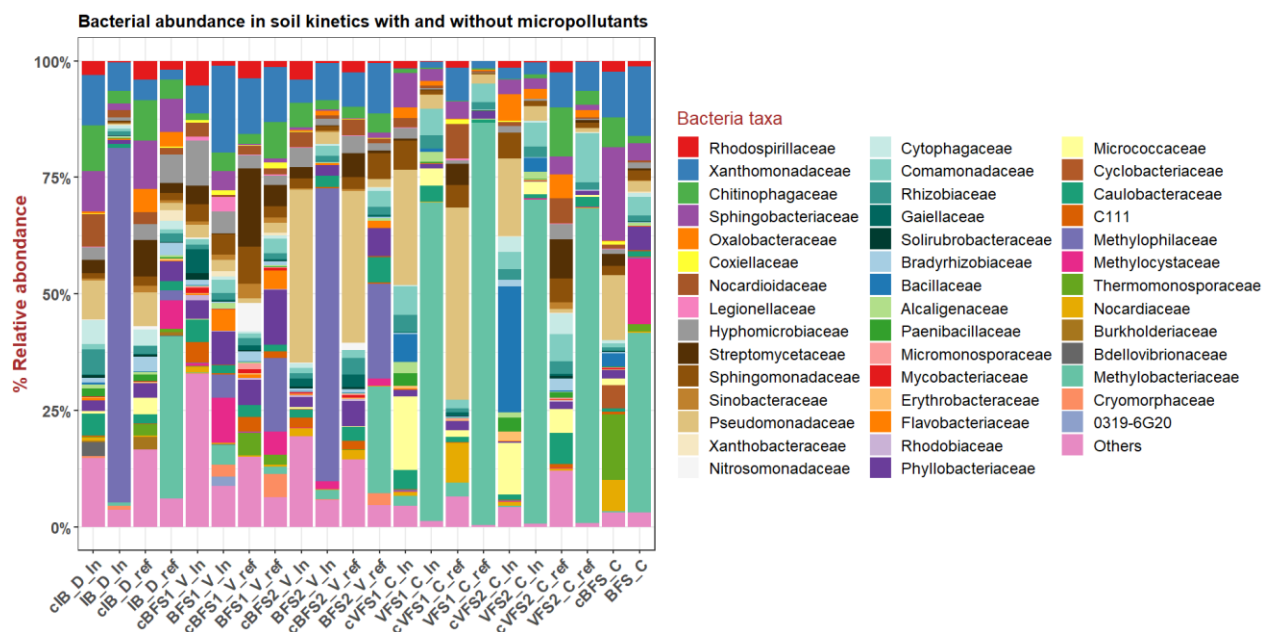


Figure 7: The average relative abundances of all major family (with relative abundance higher than 1%) in samples without micropollutants and in samples spiked with micropollutants at kinetic endpoint. Family with relative abundance lower than 1% were grouped as “others”.

Further phylogenetic analysis of these soils’ extracts revealed the presence of approximately forty bacterial families. While the families in the control soils exhibit diversity (**figure 7**), a strong selection is observed in the test soils microorganisms. The Xanthomonadaceae family is consistently present in nearly all soils, with a relative abundance of around 10%. In contrast, certain families, like Pseudomonadaceae (ranging from 1% to 41%) are exclusively present in control soils. This indicates that Pseudomonadaceae is subject to selection pressure generated by the addition of MPs, and does not appear to contribute to the capacity for metabolizing the targeted MPs. The selective pressure created by the MPs will reduce the Pseudomonadaceae abundance in our samples, which differs from the literature. Several works show the presence and involvement of Pseudomonadaceae in the biodegradation of BPA (Tong et al., 2021; Zhang et al., 2013) and Alkylphenols such as 4-t-octylphenol (Tuan et al., 2011) and nonylphenol (Bai et al., 2017; Soares et al., 2003). However, additional nuances in the selection of Pseudomonadaceae can be observed. In Vitry, the area with trees displays a relative abundance around 2% for this family (both Inlet and reference), while the zone with herbaceous plants shows a higher relative abundance of 35% (both Inlet/reference). In Compans, still within control soils, there is reference selection of Bacillaceae (3 and 27%) and Micrococcaceae (15 and 11%). In the test soils microorganisms, certain families exhibit a predominant presence, such as Methylophilaceae constituting 76% in IB_D_In and 62% in BFS2_V_In. The other soils in Dourdan and Vitry show abundance ranging from 2 to 20% while the Compans soils consist of less than 1% of this family. The Methylocystaceae family, though less dominant, also appears in Dourdan and Vitry soils. In contrast, the Methylobacteriaceae family is present in soils with little or no Methylophilaceae, such as Compans, where it constitutes 38 to 86%, and IB_D_Ref with 35%.

A LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) analysis was performed to identify taxa that significantly characterize test soils microorganisms compared to the controls, using the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$) with an LDA score > 2.0 . Test soils microorganisms (**figure 8**) exhibit distinct bacterial composition, notably

enriched with taxa from Alphaproteobacteria (including Methylobacteriaceae, *Methylopila*, Xanthobacteraceae, *Ancylobacter*) and Betaproteobacteria (*Methylothera*, Methylophilaceae and *Hydrogenophaga*). Two other classes, though less prevalent, include Gammaproteobacteria (Legionellaceae) and SJA_4 (phylum TM6).

In the existing literature, certain families found in our study were also identified by (Wang et al., 2019) during studies on the biodegradation of a BPA substitute (BPS) in river sediments. After 14 days, their microbial composition exhibited a relative abundance of *Hydrogenophaga* 26%, *Pseudomonas* 11%, *Methylothera* 10%, Flavobacterium 9%. After 21 days, *Methylothera* dominated with 64%, 4% Hyphomicrobium, 3% Eoetvoesia, and 3% Flavobacterium. Finally, at 28 days, the relative abundance showed 53% *Hyphomicrobium*, 9% *Pandorea* and 7% *Cupriavidus*. Our analyses conducted at 14 days for the Compans soils and at 17 days for the Dourdan and Vitry soils, revealed a diverse range of relative abundances of taxa potentially acclimated to BPS, including Methylophilaceae, ranging from 2 to 76%, is a family with few *Methylothera* and mainly unclassified. However, employing LEfSe analysis, the prominent bacteria characterizing soils amended with micropollutants were identified as *Hydrogenophaga* and *Methylothera*. Supplementary data (figure S1), from a LEfSe analysis targeting bacteria characterizing efficient BPA biodegradation, also highlighted the *Hyphomicrobium* genus. Species from these genera *Hydrogenophaga*, *Methylothera* and *Hyphomicrobium* have been described to biodegrade organic micropollutants (Beck et al., 2011; Lambo and Patel, 2006). Wang et al. (2019) study exclusively focuses on bisphenol, and the identified bacteria here are certainly involved in the biodegradation process of BPA within our amendment cocktail. Zhang et al. (2022) suggests that during the biodegradation of bisphenol, the production of methanol or other methylated compounds occurs. These products can serve as a growth substrate for Methylophilaceae (*Methylobacillus*), which are methylotrophic (Rosenberg et al., 2014), thereby potentially leading to an increase of their abundance. Cydzik-Kwiatkowska et al. (2017) also highlights the production of BPA metabolites such as hydroquinone, 4-hydroxyacetophenone and 3-hydroxybisphenol A. These metabolites contribute to the formation of molecules utilized by methylotrophs. As the methylotroph family uses BPA metabolites, their presence at the end of biodegradation kinetics is expected. *Methylothera* is not, exclusive to bisphenol biodegradation ; Guo et al. (2020) work demonstrate the capacity of this bacterial genus to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Additionally, Brunhoferova et al. (2022) identify the genera *Methylothera* and *Hydrogenophaga* in the biodegradation of 22 micropollutants (pharmaceuticals and their metabolites, pesticides, herbicides, corrosion inhibitors, flame retardants). *Hydrogenophaga* is also identified in NP biodegradation studies (Wang et al., 2015; Yuan et al., 2023). The study of Montenegro et al. (2021) investigates the effect of two different groups of phenolic compounds (NP and OP, and the chlorophenol pentachlorophenol (PCP)) on constructed wetlands performance. When the systems were subjected to a mixture of OP and NP, the microbial analyses showed a selection of *Methylothera* and *Methylophilus* (Methylophilaceae family) and *Hyphomicrobium* (Hyphomicrobiaceae family). The Methylophilaceae family is prevalent in soils IB_D_In and BFS2_V_In, while it is moderately to poorly represented in soils IB_D_ref, BFS1_V_In, BFS1_V_ref and BFS2_V_ref. However, if we look at the biodegradation results for micropollutants, these 6 soils and BFS_C are capable of biodegrading these micropollutants well. Another family seems to appear in soils extracts capable of biodegradation but not dominated by Methylophilaceae is Methylocystaceae. The LEfSe analysis in **Figure 8** also highlights the

Methylopila genus of the Methylocystaceae family as a characteristic of soils amended with micropollutants. In contrast, another methylotrophic family, Methylobacteriaceae (with no classified genus) appears on the histograms and LEfSe. This family predominates in the VFS1_C_In, VFS1_C_ref, VFS2_C_In and VFS2_C_ref soils. Intriguingly, these soils did not show significant biodegradation capacity for micropollutants after 14 days. Consequently, two microbial community profiles emerge capable of biodegrading micropollutants: i) a predominance of Methylophilaceae, and ii) a predominance of methylotrophs belonging to a wide range of families. A single pattern appears for microbial communities that do not biodegrade efficiently: the presence of Methylobacteriaceae.

The community analysis was carried out at the end of the kinetics, and as we have seen with the work of Wang et al. (2019), community acclimatization during liquid kinetics can change rapidly. In our 14/17-day kinetics, the analysis focuses on populations biodegrading both the added MPs and the metabolites generated by BPA biodegradation. Conducting a microbial analysis on day 7 could have identified the populations involved in the initial stages of MP biodegradation, as well as a metabolite assay to monitor their evolution over time (production and metabolization).

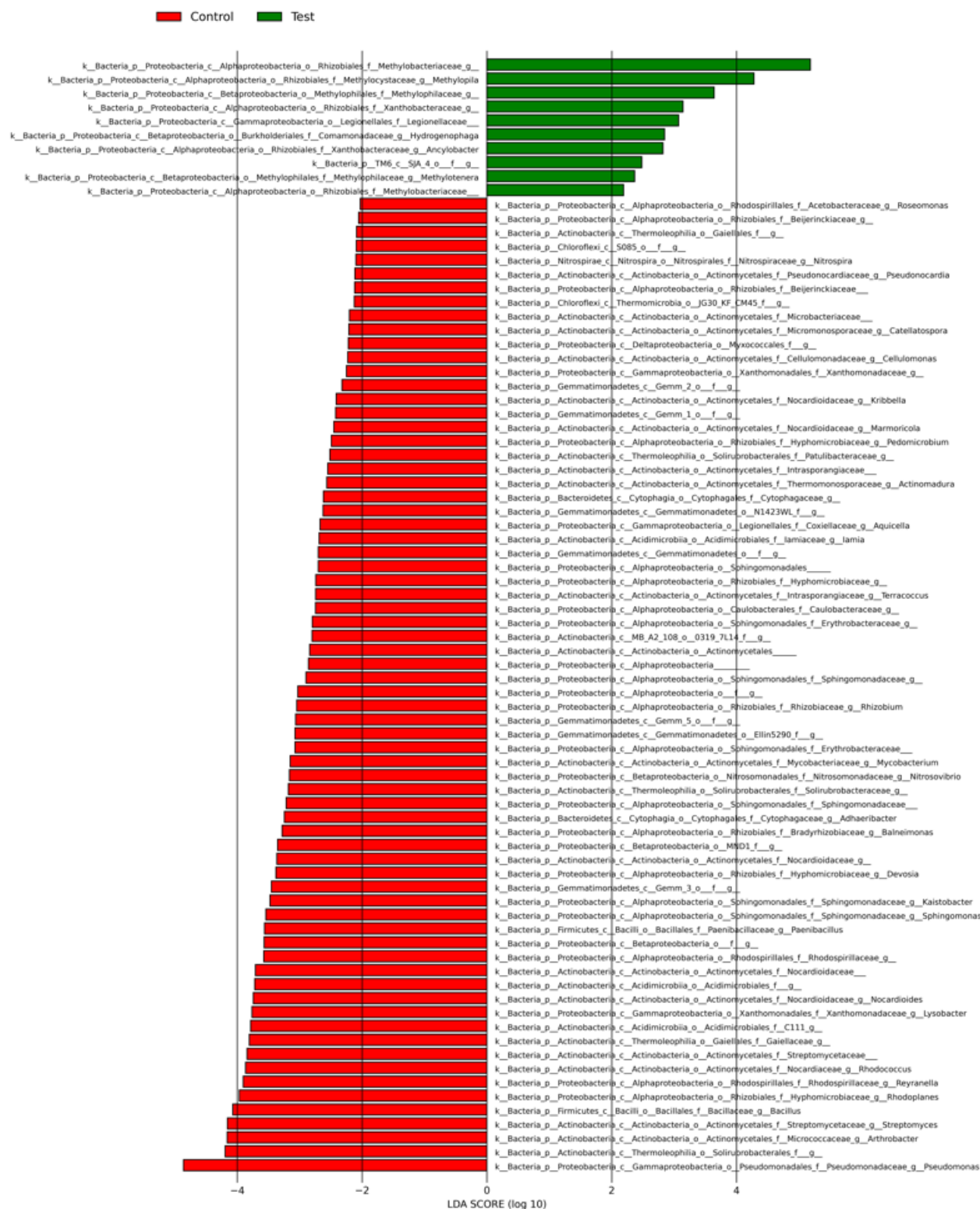


Figure 8: LefSe analysis of the 11 soils samples according to sample conditions at kinetic endpoint. Histograms of LDA scores of 16 S gene sequences

4. Conclusion

The findings of the presented research can be summarized through the following conclusion:

- ♦ Significant differences in micropollutant biodegradation efficiencies were observed. This underlines the positive influence of hydrological load, duration of system functioning and the presence of vegetation cover on microbial selection in extracted soils.
- ♦ A correlation exists between micropollutant biodegradation and the physico-chemical composition, as well as the microbial activity of the soils.
- ♦ Microbial selection processes were identified, distinguishing between exhibiting efficient and limited biodegradation potential.

In further investigations, our emphasis will be on delving deeper into the biodegradation capacities of studied soils under more real-life conditions, employing column kinetics especially on the soils of the Dourdan Inlet site and the Swale of Compans. This research marks a significant advance in associating microbial diversity and functionality, and the biodegradation potential of micropollutants in structural soils. The insight garnered will contribute to a better understanding and effective managing of stormwater treatment facilities.

5. Acknowledgements

This research was carried out under the OPUR research program (<https://leesu.univ-paris-est.fr/opur/>). The authors gratefully acknowledge OPUR partners for their financial support, as well as the French territorial collectivities which collaborated in the present study, by allowing the authors to carry out soil samplings and measurements in their infiltration facilities.

Thanks to the team at CEA Cadarache for their collaboration in analyzing the sequencing data

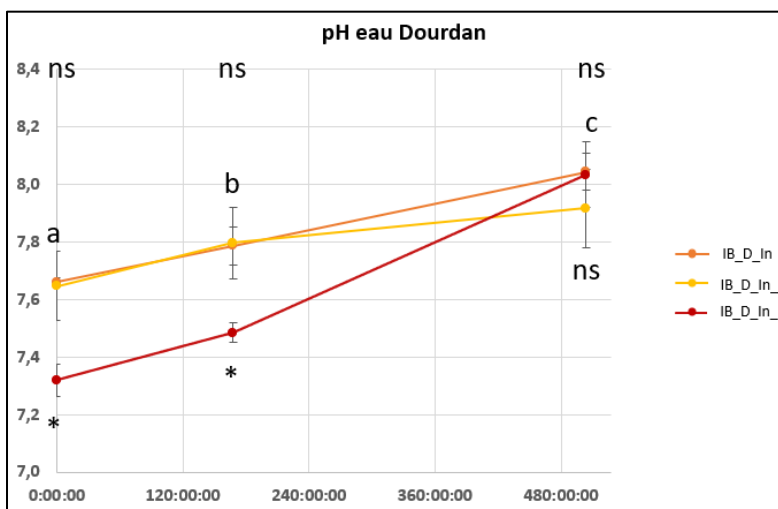
4.2. Cinétique de biodégradation en colonnes des sols de Dourdan et de la Noue

Après une étude en Batch faisant appel aux microorganismes extraits en présence d'un milieu de culture optimisé, l'efficacité de biodégradation des micropolluants par les microorganismes du sol de deux ouvrages sélectionnés a été étudiée en colonnes et les cinétiques de biodégradation établies. Cette étude en colonnes avec des sols provenant directement des ouvrages étudiés permet d'avoir une approche plus réaliste de ce qui se passe au sein de ces ouvrages où les microorganismes sont dans leurs environnements naturels. Les résultats de la cinétique en batch liquide ont montré que deux sols parmi les onze étudiés démarquaient par l'intensité et la diversité de leur activité de biodégradation : le sol de la Noue de Compans et le sol en amont de Dourdan. Ces 2 sols seront étudiés au cours de la cinétique en colonnes en présence d'un cocktail de micropolluants : BPA, NP et OP.

Le détail de la mise en place de la cinétique en colonnes et des analyses réalisées sont présentés dans le chapitre 2 de ce rapport. La cinétique en colonnes a été suivie pendant 21 jours avec 5 points de prélèvements dans le temps. Les échantillons de sols utilisés ont été prélevés lors d'une campagne de terrain spécifique en mars 2023. Une solution constituée d'eau Volvic additionnée d'un cocktail de BPA, NP et OP a été ajoutée aux colonnes tests et aux témoins abiotiques. De l'eau Volvic simple seule a été ajoutée pour les colonnes témoins biotiques. Les analyses réalisées dans le temps sont le pH_{eau} , le pH_{KCl} , le dosage des micropolluants, mesure de la biomasse microbienne (NPP), de l'activité, de la fonctionnalité microbienne (FDA et Biolog) et enfin l'analyse de la diversité génétique.

4.2.1 Analyses physico-chimiques et biologiques au cours de la cinétique en colonnes

Evolution du pH



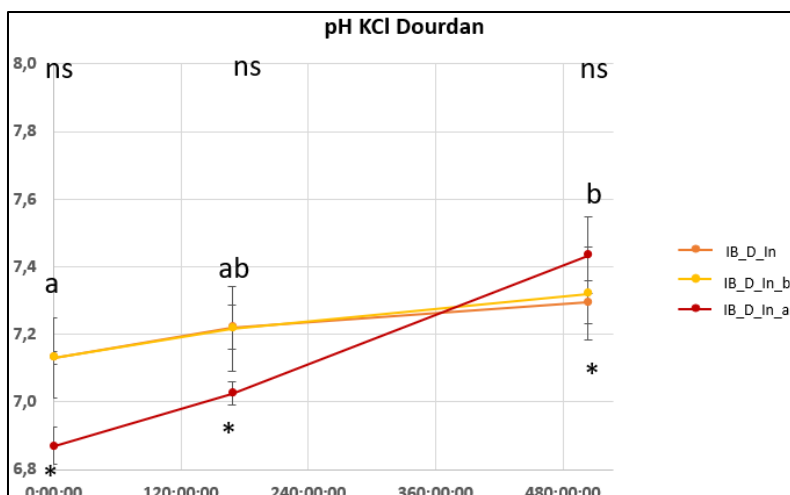


Figure 1 : Evolution du pH_{eau} et du pH_{KCl} du sol de Dourdan (3 points de prélèvements) : moyenne des pH des répétitions durant la cinétique ($n=3$, moyenne \pm ET). Les résultats sont analysés avec le test de comparaison multiple Conover-Iman après le test non paramétrique Kruskal-Wallis. Les différences significatives entre les points d'analyses du sol test (orange) sont représentés par des lettres différentes ($P < 0.05$). Comparaison des sols tests (orange) et des témoins biotiques (jaune) notée sur la ligne supérieure du graphique (ns = différence non significative, * = différence significative). Comparaison des sols tests (orange) et des témoins abiotiques (rouge) notés sous les courbes (ns = différence non significative, * = différence significative).

Afin de suivre l'évolution temporelle des conditions physico-chimiques du sol, le pH a été mesuré à différents pas de temps au cours de la cinétique (T0, T7 et T21). Le pH des colonnes contrôle biotiques et abiotiques a également été mesuré. Lorsque l'on regarde le pH_{eau} de Dourdan (fig. 1), on voit qu'il commence à 7.7 pour les sols tests (IB_D_In en orange) avec une augmentation régulière pour atteindre un pH de 8.0 à la fin de la cinétique, ce qui diffère significativement du pH initial. Le pH des témoins biotiques (IB_D_In_b en jaune) va augmenter de la même façon que IB_D_In, il n'y a pas de différence significative. Par contre, en regardant les sols abiotiques (IB_D_In_a en rouge), on voit que le pH initial est significativement différent par rapport aux sols tests puis il va augmenter pour atteindre le même pH que les autres. A compans l'augmentation de pH est beaucoup moins marquée qu'à Dourdan et la différence de l'abiotique par apport aux biotiques est aussi moins nette (fig. 2). Augmentation du pH des sols tests (BFS_C en vert) entre le début et la fin de la cinétique (8.4 à 8.5). Les sols biotiques (BFS_C_b en bleu) vont suivre la même tendance et les sols abiotiques (BFS_C_a en gris) vont également avoir un pH plus bas (8.3) au début de la cinétique pour revenir à un pH identique à celui des sols tests. Il y a cependant une particularité avec les sols de Compans par rapport aux sols de Dourdan qui est une diminution du pH au jour 7 pour les témoins biotiques et abiotiques. Les sols abiotiques ont subi une procédure d'autoclavage pour stériliser les sols ce qui a pu entraîner une modification du pH initial, l'augmentation du pH de ces sols pourraient s'expliquer par le développement d'une communauté microbienne ayant résisté à l'autoclavage. Les courbes des sols tests et des témoins biotiques montrent que l'évolution du pH au cours de la cinétique n'est pas liée à la biodégradation des micropolluants additionnés. L'activité microbienne naturelle présente dans les sols pourraient expliquer les variations de pH.

La mesure du pH_{KCl} (fig. 1 et 2) a également été faite afin de pouvoir estimer l'acidité potentielle de ces sols ($pH_{eau} - pH_{KCl}$). En comparant les pH, on estime que l'acidité potentielle de ces sols augmentent à la fin de la cinétique.

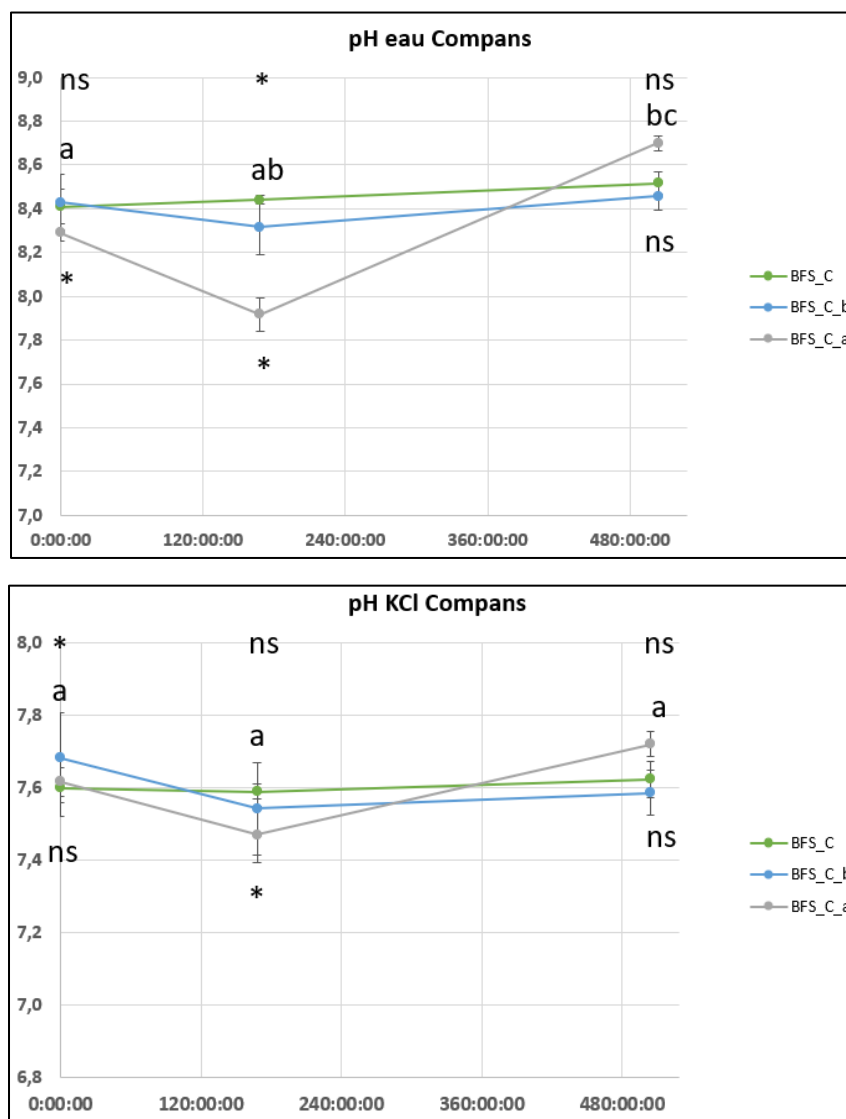


Figure 2 : Evolution du pH_{eau} et du pH_{KCl} du sol de Compans : moyenne des sols du pH durant la cinétique ($n=3$, moy \pm ET), les résultats sont analysés avec le test de comparaison multiple Conover-Iman après le test non paramétrique Kruskal-Wallis. Les différences significatives entre les points d'analyses du sol test (vert) sont représentés par des lettres différentes ($P < 0.05$). Comparaison des sols tests (vert) et des témoins biotiques (bleu) notés sur la ligne supérieure du graphique (ns = différence non significative, * = différence significative). Comparaison des sols tests (vert) et des témoins abiotiques (gris) notés sous les courbes (ns = différence non significative, * = différence significative).

Dosage des micropolluants

Le dosage d'une sélection de micropolluants organiques dont ceux étudiés a été réalisé avant toute manipulation de ces sols afin de s'assurer des concentrations initiales de ces polluants (tableau 1). Ces 2 sols sont situés à proximité d'une route et vont recevoir le ruissellement routier riche en micropolluants

organiques. Cependant les flux de micropolluants reçus par ces sols tout comme leur capacité à les piéger (par filtration et adsorption) ne vont pas être les mêmes, il faut donc faire une analyse préliminaire de ces sols pour ensuite pouvoir les comparer.

Les sols Campans et Dourdan sont différents et ont donc des capacités d'adsorption différentes. Ceci explique pourquoi on n'aura pas les mêmes concentrations au démarrage des cinétiques.

Tableau 1 : Concentration (en $\mu\text{g/g}$ extrait) des micropolluants organiques (BPA, NP1EC, OP, OP1EO, OP2EO, 4NP, NP1EO, NP2EO) dans les sols initiaux utilisés pour faire les cinétiques en colonnes, ($n = 3$, moyenne \pm ET).

Concentration ($\mu\text{g/g}$ extrait)	BPA	NP1EC	OP	OP1EO	OP2EO	4NP	NP1EO	NP2EO
IB_D_In	0,0323 $\pm 0,0019$	0,0014 $\pm 0,0005$	0,0082 $\pm 0,0100$	0,0676 $\pm 0,0329$	0,0206 $\pm 0,0152$	0,0526 $\pm 0,0000$	0,0092 $\pm 0,0001$	0,0032 $\pm 0,0006$
BFS_C	0,0336 $\pm 0,0066$	0,0003 $\pm 0,0000$	0,0103 $\pm 0,0027$	0,0273 $\pm 0,0017$	0,0028 $\pm 0,0003$	0,0321 $\pm 0,0065$	0,0029 $\pm 0,0002$	0,0014 $\pm 0,0013$

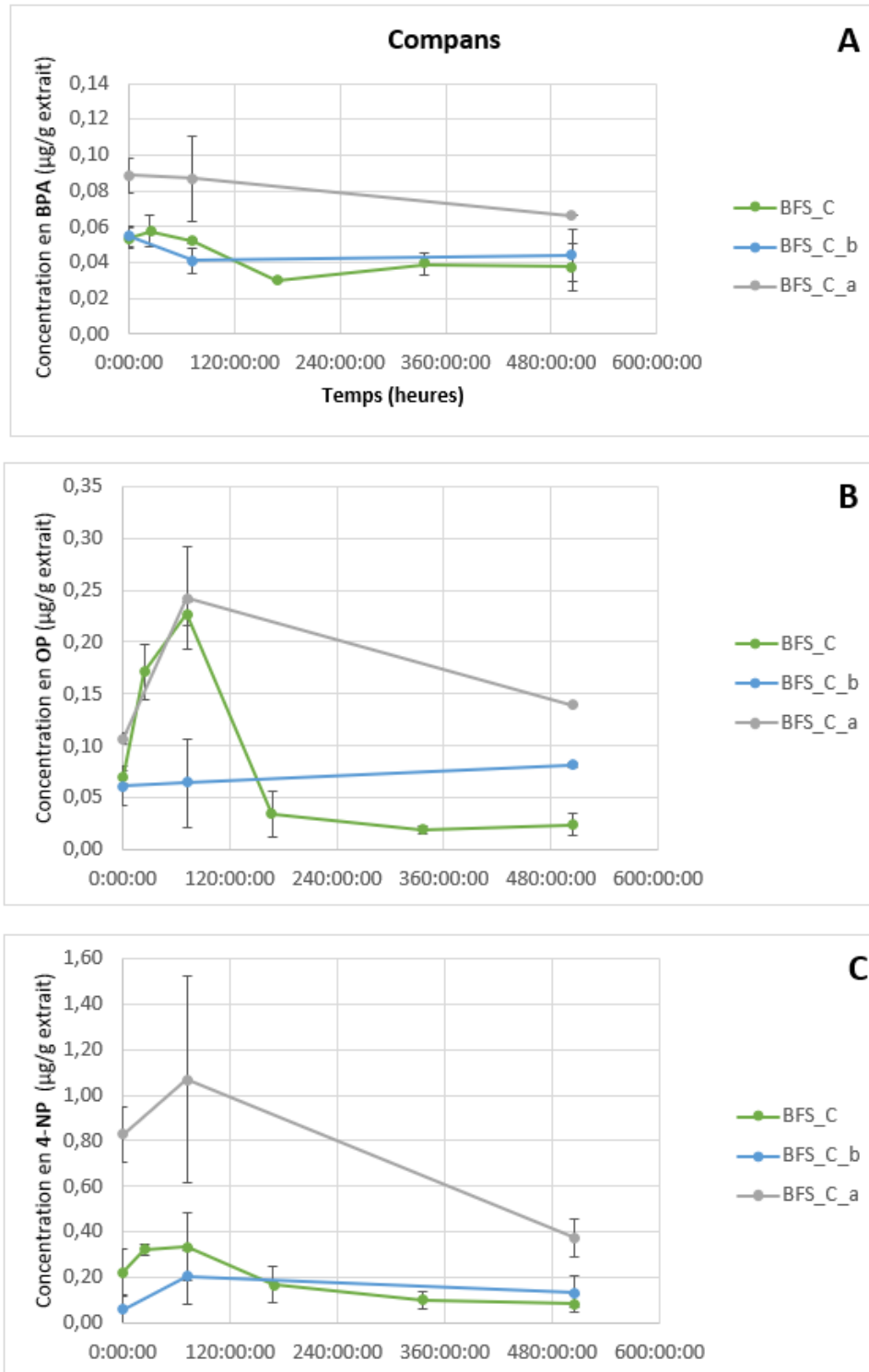


Figure 3 : Evolution de la concentration ($\mu\text{g/g}$ extrait) des 3 micropolluants durant la cinétique ($n = 3$, moyenne \pm ET) dans les sols de Compans. A : concentration en BPA, B : concentration en OP et C : concentration en 4-NP. Les résultats ont été analysés avec le test de Conover-Iman pour la comparaison multiple après le test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes ($P < 0.05$) dans le tableau 2. En vert : les sols tests, en bleu : les sols biotiques et en gris : les sols abiotiques.

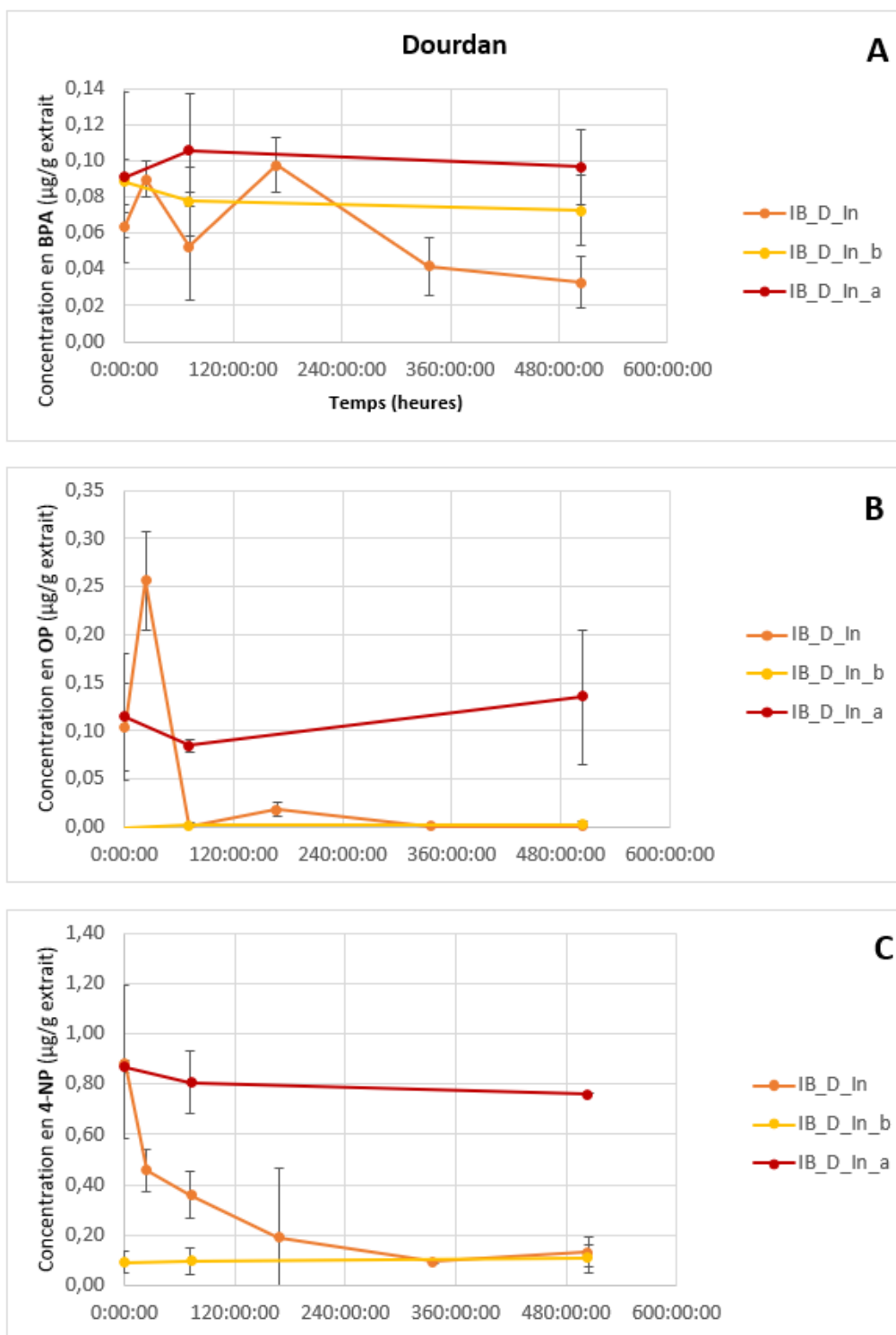


Figure 4 : Evolution de la concentration en ($\mu\text{g/g}$ extrait) de 3 micropolluants durant la cinétique ($n = 3$, moyenne \pm ET) dans les sols de Dourdan. A : concentration en BPA, B : concentration en OP et C : concentration en 4-NP. Les résultats ont été analysés avec le test de Conover-Iman pour la comparaison multiple après le test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Les différences significatives sont indiquées par des lettres différentes ($P < 0.05$) dans le tableau 2. En orange : les sols tests, en jaune : les sols biotiques et en rouge : les sols abiotiques.

Tableau 2 : Représentation des différences significatives (lettres différentes) dans les concentrations des 3 MPs au cours de la cinétique pour Compans et Dourdan (tests ainsi que les témoins biotiques et abiotiques).

		0:00:00	24:00:00	72:00:00	168:00:00	336:00:00	504:00:00
BPA	IB_D_In	ab	ac	b	c	b	d
	IB_D_In_b	a			a		a
	IB_D_In_a	a			a		a
	BFS_C	a	ab	a	c	c	c
	BFS_C_b	a			b		ab
	BFS_C_a	a			a		a
OP	IB_D_In	a	b	c	d	e	ce
	IB_D_In_b	a			a		a
	IB_D_In_a	a			a		a
	BFS_C	a	b	b	c	c	c
	BFS_C_b	a			a		a
	BFS_C_a	a			b		ab
NP	IB_D_In	a	a	ab	c	c	c
	IB_D_In_b	a			a		a
	IB_D_In_a	a			a		a
	BFS_C	ab	a	a	bc	c	c
	BFS_C_b	a			b		ab
	BFS_C_a	a			a		a

Tableau 3 : Représentation des différences significatives (lettres différentes) dans les concentrations des 3 MPs au point initial de la cinétique pour Compans et Dourdan entre les 3 conditions testées (test, témoins biotiques et abiotiques).

BPA	0:00:00	OP	0:00:00	NP	0:00:00
IB_D_In	a	IB_D_In	a	IB_D_In	a
IB_D_In_b	b	IB_D_In_b	b	IB_D_In_b	b
IB_D_In_a	b	IB_D_In_a	a	IB_D_In_a	a
BPA	0:00:00	OP	0:00:00	NP	0:00:00
BFS_C	a	BFS_C	a	BFS_C	a
BFS_C_b	a	BFS_C_b	a	BFS_C_b	b
BFS_C_a	b	BFS_C_a	b	BFS_C_a	c

Dans la **figure 3** (Compans), la concentration des 3 micropolluants au cours de la cinétique est représentée pour les sols de Compans avec les tests et les témoins. Pour le BPA (**fig. 3A**), le graph ne montre pas de grande différence entre le BFS_C (sol test) et BFS_C_b (sol biotique), les concentrations partant pour chacune à 0.06µg/g. Une différence significative apparaît pour BFS_C au bout de 3 jours avec une baisse de la concentration en BPA. Le témoin abiotique est différent significativement de BFS_C et BFS_C_b avec une concentration au-dessus de 0.08 µg/g, il est possible de voir dans le **tableau 2** qu'il n'y a pas de variation significative au cours de la cinétique pour ce témoin. Si on regarde, les concentrations en BPA pour Dourdan, **figure 4A** ainsi que les tableaux avec les différences significatives 2 et 3 alors on peut voir que les témoins commencent à la même concentration à 0.09µg/g et les tests sont à 0.06µg/g. Il n'y a pas de réelle variation significative au cours de la cinétique pour les 3 conditions.

Les concentrations initiales en micropolluants en BPA dans les sols (**tableau 1**) montrent une valeur de 0.03 pour Dourdan et Compans. Les concentrations sont bien moins importantes que pour les sols tests et les témoins abiotiques cependant les concentrations dans les sols biotiques qui n'ont pas été dopés sont quand même plus importantes que les concentrations initiales et ressemblent à celles des 2 autres conditions. Il est donc objectif de penser que le dopage des sols par le BPA n'a pas été réussi ou n'a pas été fait de manière homogène.

Pour l'OP (**figure 3B**), dans les sols de Compans, le point initial n'est pas conclusif (concentration plus basse qu'attendue pour BFS_C et plus forte pour BFS_C_b) car BFS_C et BFS_C_b sont égales à 0.06µg/g. Par contre, les valeurs aux jours suivants sont bien plus révélatrices. Au jour 1, la concentration de BFS_C est de plus de 0.15µg/g et une baisse significative est observée au 7^{ème} jour de la cinétique à moins de 0.05µg/g. La concentration de BFS_C_b reste stable tout le long de la cinétique. Pour BFS_C_a, le jour 1 est aussi bas mais les 2 autres points montrent des valeurs allant de 0.1 à 0.2µg/g. Pour les sols de Dourdan, **figure 4B**, les valeurs ne montrent pas de problèmes particuliers. IB_D_In et IB_D_In_a démarrent tous les 2 à 0.1µg/g et IB_D_In_b à 0.00µg/g. Les témoins sont tous les 2 stables tout le long de la cinétique. IB_D_In va cependant varier, une augmentation significative est visible au jour 1 mais le biais d'échantillonnage lors de la récupération des sols (hétérogénéité des sols) pour analyse peut expliquer cette augmentation soudaine. Il faut cependant noter, une baisse significative au jour 3 qui se maintient le reste de la cinétique montrant une biodégradation efficace du OP par les microorganismes du sol. L'augmentation au 3^{ème} jour de l'OP vu avec les 2 sites pourraient s'expliquer par la transformation d'un autre composé normalement des OPnEO en OP.

Pour vérifier les valeurs obtenues, les concentrations initiales en OP dans les sols (**tableau 1**) étaient de 0.008µg/g pour Dourdan et 0.01µg/g pour Compans. Le dopage des sols en OP, contrairement au BPA, semble avoir mieux fonctionné.

Enfin, le dernier MP, le 4-NP pour les sols de Compans (**figure 3C**). Les concentrations pour les 3 conditions sont différentes significativement au temps initial (**tableau 3**) allant de 0.06 pour BFS_C_b à 0.2 pour BFS_C et à 0.8µg/g pour BFS_C_a. Une forte variation est notée pour BFS_C_a au cours de la cinétique mais qui intervient au sein des triplicats analysés donnant de fort écart-types. Le témoin BFS_C_b reste assez constant le long de la cinétique tandis que BFS_C voit sa concentration diminuer significativement au bout du 7^{ème} jour. Pour Dourdan (**Fig 4C**), les concentrations initiales de IB_D_In et IB_D_In_a commencent au même niveau à 0.8µg/g et IB_D_In_b commencent à 0.09µg/g. Les concentrations dans les 2 témoins restent constantes tandis que la concentration de IB_D_In diminue significativement dès le 3^{ème} jour pour rejoindre les valeurs du témoin IB_D_In_b.

Une dernière comparaison avec les concentrations initiales montrent une concentration en 4-NP de 0.05µg/g pour Dourdan et de 0.03µg/g pour Compans. Là aussi, le dopage des colonnes en 4-NP est bien réussi.

Les résultats du BPA pour les 2 sols ne permettent pas de s'attarder dessus car le dopage n'a pas été suffisant. La poursuite de l'analyse va donc se concentrer sur les résultats du OP et du 4-NP. Déjà il faut commencer par noter des différences entre les 2 sites d'un point de vue expérimental. Des courbes plus complexes sont visibles avec les valeurs de Compans montrant quelques points difficiles à interpréter comme le point initial de la **Fig. 3B**. Il faut bien prendre en compte que les cinétiques en colonnes sont plus complexes et peuvent entraîner des biais expérimentaux plus important que pour les cinétiques en batch liquide sans pour autant impacter la globalité des résultats.

En s'intéressant à la capacité de biodégradation au sein des sites et entre les sites nous constatons que pour Compans, une biodégradation significative des 2 MPs se fait au bout de 7 jours tandis que pour Dourdan, la biodégradation est plus rapide et prend place au bout de 3 jours. A Compans, la stimulation de la biodégradation des MPs par le dopage des colonnes va conduire à une biodégradation plus efficace que Dourdan, les concentrations tests descendant en-dessous des concentrations des témoins biotiques.

Un fonctionnement différent des communautés microbiennes présentes pourrait expliquer cette différence dans l'efficacité de biodégradation de ces 2 sites. Les sols de Dourdan ont une biomasse microbienne (**fig.5**) plus importante au départ que pour les sols de Compans ce qui peut expliquer la biodégradation plus rapide observée entre les 2 sols mais les sols de Compans vont faire une biodégradation plus efficace à terme. Klečka et al. (2001) discutent du manque de corrélation entre la capacité de biodégradation pendant la cinétique et la taille de la population microbienne (population hétérotrophe), avec une étude cinétique de biodégradation du BPA avec des micro-organismes de rivière et de sédiments.

Il existe peu de travaux sur les capacités de biodégradation des MPs par les consortiums des sols des ouvrages de gestion des eaux pluviales, mais il est possible de trouver des valeurs dans des travaux plus larges. Dans les travaux de Wang et al. (2014), sur la biodégradation du NP dans les sédiments de rivières, ils obtiennent un niveau significatif de biodégradation du NP en 6-9 jours. Les travaux de B. V. Chang et al. (2007) étudient la biodégradation du NP dans les sols en fonction de différents paramètres (température, pH, concentration en NP) et montrent des temps de demi-vie allant de 6.4 à 12.8 jours. Différents moyens sont étudiés pour augmenter l'efficacité de biodégradation des MPs par les microorganismes comme le montre l'article de (Wang et al., 2024) mais les efficacités de biodégradation de nos sols sont cependant assez significatives avec les sols de Compans faisant une biodégradation dans la semaine et Dourdan en moins de 3 jours.

Il serait intéressant de refaire une expérience avec des concentrations de BPA plus importantes pour mieux visualiser les différences de biodégradation des communautés microbiennes pour ce MP. Dans le même temps, faire une analyse plus poussée de la biodégradation de ce MP avec l'analyse des métabolites produits ainsi que l'activité microbienne via des gènes cibles serait complémentaire de ces résultats. La biodégradation du BPA pourrait aboutir à la minéralisation totale du composé mais aussi à la production des métabolites. En fonction des communautés microbiennes présentes, différentes voies de biodégradation peuvent être utilisées aboutissant à la production de métabolites différents. Dans la biodégradation du BPA, il existe deux voies : une voie prédominante produisant les métabolites 4-HBAL (p-hydroxybenzaldéhyde), 4-HAP (p-hydroxyacétophénone) et 4-HBA (acide p-hydroxybenzoïque), et une voie mineure produisant l'acide 2,2bis(4-hydroxyphényl)propanoïque, 2,3bis(4-hydroxyphényl)propan-1,2-diol, qui donne ensuite du HBA ou de l'alcool 4-hydroxyphénacyl (Choi et Lee, 2017 ; Eio et al., 2014 ; Ike et al., 2018 ; Jia et al., 2020 ; Spivack et al., 1994). L'analyse des gènes intervenant dans la biodégradation des micropolluants organiques au cours de la cinétique serait aussi intéressante car pourrait expliquer plus en détails les processus métaboliques microbiens mis en place. L'analyse de gène pouvant intervenir dans la biodégradation des MPs comme *bisdA*, *bisdB* (Peng et al., 2015; Sasaki et al., 2008), *pheA* (Harzallah et al., 2017) ou encore *amoA* (Marshall et al., 2018) étant un gène intervenant dans un cycle régulier, le cycle de l'azote mais agissant aussi lors de processus de cométabolisme (Cydzik-Kwiatkowska et al., 2020). L'analyse de ces gènes pourrait se faire via une qPCR (Moghadam et al., 2023).

Biomasse microbienne

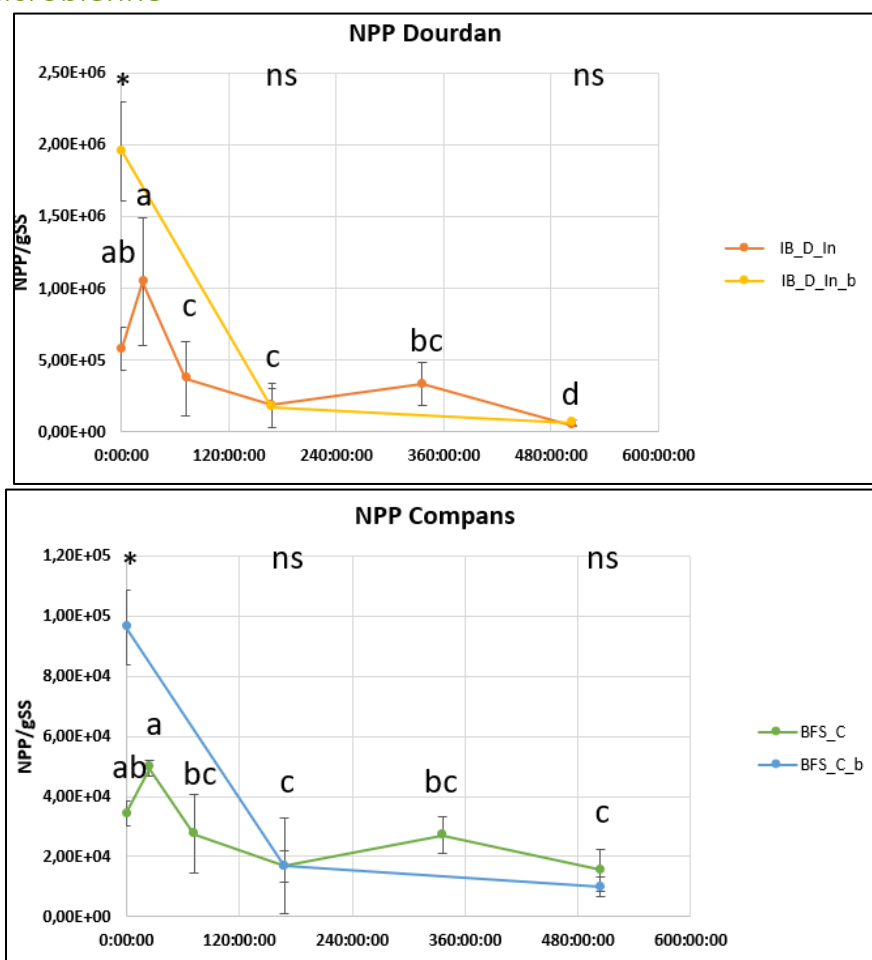


Figure 5 : Evolution de la biomasse microbienne des sols de Dourdan et de Compans : moyenne de la biomasse microbienne dans les sols des colonnes durant la cinétique (n=3, moyenne \pm ET), les résultats sont analysés avec le test de comparaison multiple Conover-Iman après le test non paramétrique Kruskal-Wallis. Les différences significatives entre les points d'analyses du sol test (orange et vert) sont représentés par des lettres différentes ($P < 0.05$). Comparaison des sols tests (orange et vert) et des témoins biotiques (jaune et bleu) notés sur la ligne supérieure du graphique (ns = différence non significative, * = différence significative).

La biomasse microbienne a été estimée avec la méthode du Nombre le plus probable (NPP) à trois pas de temps pour les témoins biotiques, abiotiques et tout au long de la cinétique pour les sols tests (**fig. 5**). Les témoins abiotiques faussant la lecture des autres courbes ne sont pas représentés sur la figure. Pour Dourdan, dans les témoins abiotiques, passage d'une biomasse de $1.14E+05$ à $1.84E+07$ NPP/gSS et pour Compans de $7.76E+02$ à $2.16E+06$ NPP/gSS. Une explosion de croissance a pris place dans les témoins abiotiques au cours de la cinétique (dès le jour 7), il reste cependant à mettre en lien cette forte biomasse à leur activité enzymatique. Il y a une biomasse microbienne moins importante dans les sols de Compans (pour les 3 conditions) mais cela est attendu suite aux précédentes analyses faites sur Compans et Dourdan. Outre cette différence de biomasse entre les 2 sites, on va avoir le même schéma de développement des courbes tests (orange et vert) et des témoins biotiques (jaune et bleu). Pour les témoins biotiques, on part d'une biomasse microbienne abondante ($1.96E+06$ et $6.47E+04$ NPP/gSS) qui

diffère significativement des sols tests pour diminuer et retourner à la même quantité de biomasse que les sols tests dès 7 jours. Pour les sols tests, on part à $5.96E+05$ et $3.99E+04$ NPP/gSS. Au jour 1, une augmentation est visible pour Dourdan et Compans (bien que non significative) puis il y a une diminution de la biomasse pour les 2 sites avec une légère augmentation au jour 14 pour diminuer encore légèrement au jour 21 ($4.60E+04$ et $1.54E+04$ NPP/gSS). Pour comparaison, les travaux de Cébron et al. (2015) montrent des valeurs entre $4E+05$ et $2E+05$ NPP/gSS entre le début et la fin de leur expérience de biodégradation des HAP. Ces résultats montrent l'impact de l'amendement des micropolluants au départ de la cinétique, un stress sur les populations qui réduit leur développement au temps initial pour ensuite récupérer le même rythme de développement que les sols biotiques au jour 7.

Activité enzymatique

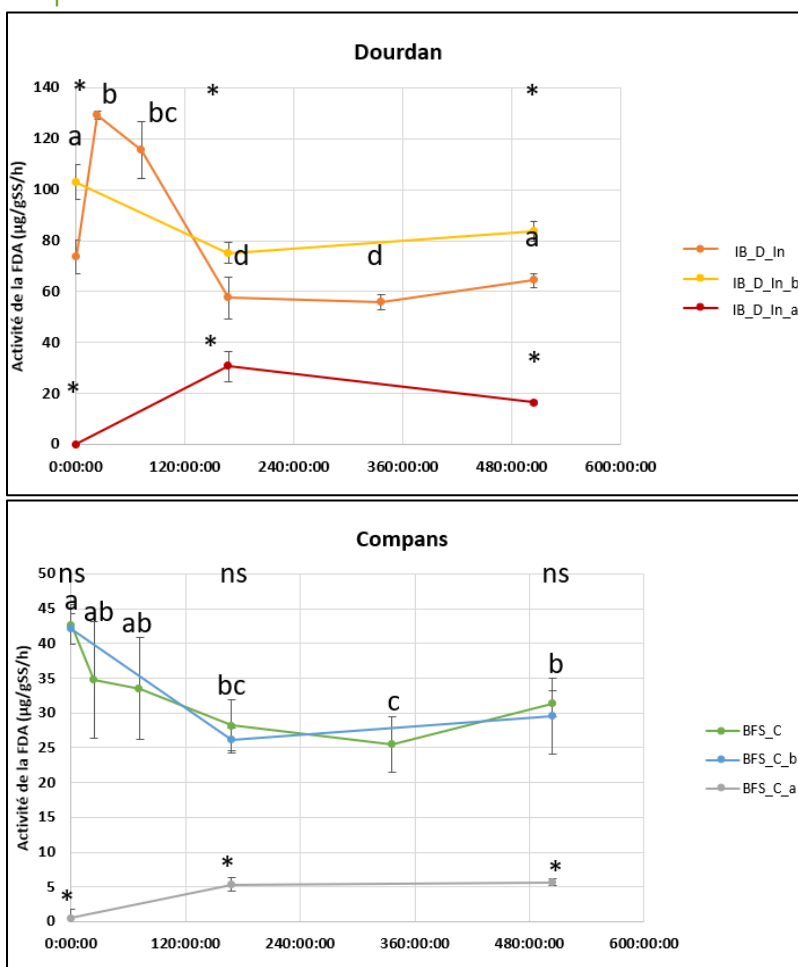
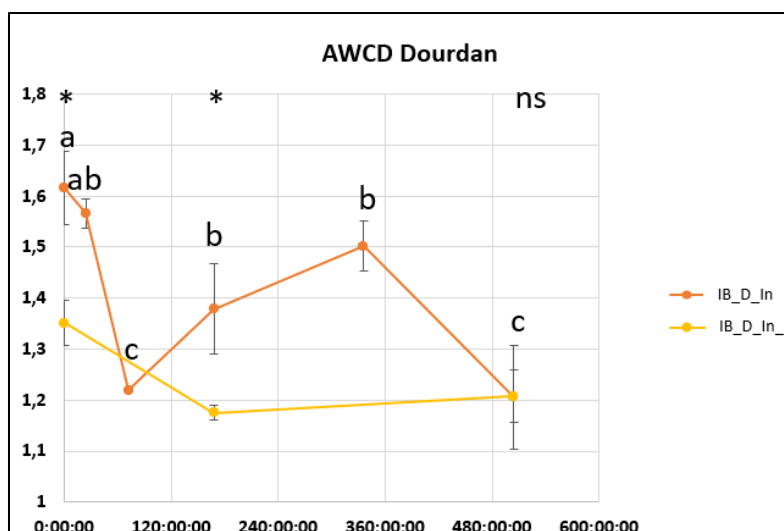


Figure 6 : Représentation de l'activité enzymatique microbienne des sols de Dourdan et de Compans : moyenne de l'activité enzymatique dans les sols durant la cinétique (n=3, moyenne \pm ET), les résultats sont analysés avec le test de comparaison multiple Conover-Iman après le test non paramétrique Kruskal-Wallis. Les différences significatives entre les points d'analyses du sol test (orange et vert) sont représentés par des lettres différentes ($P < 0.05$). Comparaison des sols tests (orange et vert) et des témoins biotiques (jaune et bleu) notés sur la ligne supérieure du graphique (ns = différence non significative, * = différence significative). Comparaison des sols tests (orange et vert) et des témoins abiotiques (rouge et gris) notés sous les courbes (ns = différence non significative, * = différence significative).

L'activité enzymatique étudiée est celle de la FDA qui montre l'activité microbienne globale des sols (**fig. 6**). L'activité de la FDA dans les sols abiotiques suit le même parcours entre les 2 sites et suit la même logique que les précédents résultats. On part d'une activité de la FDA nulle pour les 2 sites puis une augmentation de cette activité est visible dès le jour 7. L'augmentation de la biomasse microbienne ayant commencé au jour 7, il est normal de voir l'activité enzymatique suivre le même chemin. Il faut cependant noter que la quantité de biomasse microbienne dépassait largement les biomasses microbiennes des sols tests alors qu'ici, on voit que l'activité enzymatique des sols abiotiques est bien inférieure aux sols tests de façon significative. On peut considérer cette activité dans les sols abiotiques comme étant le niveau basal, le bruit de fond. Maintenant si on regarde l'activité de la FDA pour les sols de Dourdan, on voit un niveau initial des sols tests à 74 $\mu\text{g/gSS/h}$ puis une forte augmentation de l'activité aux jours 1 et 3 (129 et 116 $\mu\text{g/gSS/h}$) pour ensuite diminuer au jour 7 à 57 $\mu\text{g/gSS/h}$ qui va rester le niveau d'activité moyen jusqu'à la fin de la cinétique. En regardant les sols biotiques de Dourdan, on voit une activité allant de 100 à 84 $\mu\text{g/gSS/h}$ du début à la fin de la cinétique, se différenciant significativement des sols tests. Pour les sols de Compans, on part à une activité de 43 $\mu\text{g/gSS/h}$ qui va diminuer tout au long de la cinétique pour atteindre 25 $\mu\text{g/gSS/h}$ au jour 14 et réaugmenter légèrement à la fin de la cinétique (31 $\mu\text{g/gSS/h}$). Les sols biotiques de Compans suivent le même chemin que les sols tests. On a de ce fait d'un côté, Dourdan qui va être impacté par l'amendement des micropolluants, choc au temps initial puis une très forte activité pour répondre au stress et ensuite récupération d'un niveau stable moins actif que les sols biotiques. De l'autre côté, Compans qui ne voit pas son activité enzymatique impactée par l'apport des micropolluants. Malgré l'impact sur le sol de Dourdan, le niveau d'activité de la FDA reste élevé 57 $\mu\text{g/gSS/h}$ par rapport aux sols de Compans et à ce que l'on trouve dans la littérature. Chaer et al. (2009) trouve une activité de la FDA allant de 29 à 35 $\mu\text{g/gSS/h}$ dans des sols d'agriculture et des sols forestiers et (Unger et al., 2013) trouve des valeurs autour de 40 $\mu\text{g/gSS/h}$ dans des bandes filtrantes végétalisées.

Diversité fonctionnelle



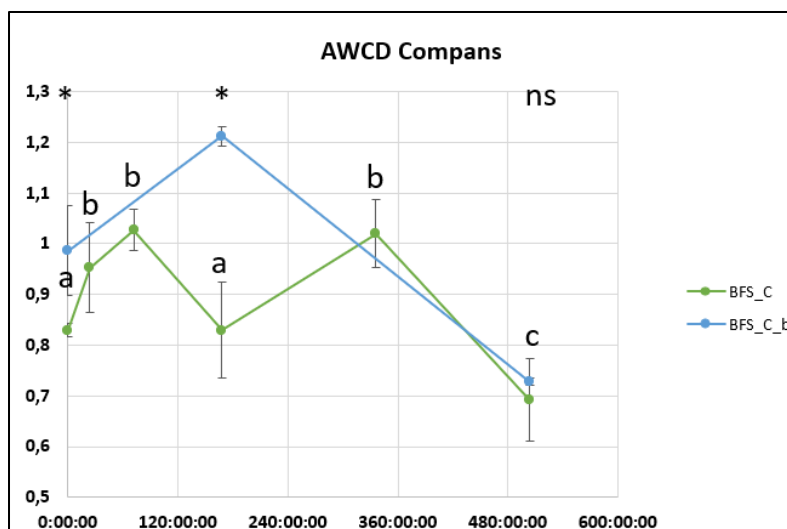


Figure 7 : Evolution de la diversité fonctionnelle des sols de Dourdan et de Compans : moyenne des sols de l'AWCD durant la cinétique (n=3, moyenne \pm ET), les résultats sont analysés avec le test de comparaison multiple Conover-Iman après le test non paramétrique Kruskal-Wallis. Les différences significatives entre les points d'analyses du sol test (orange et vert) sont représentés par des lettres différentes ($P < 0.05$). Comparaison des sols tests (orange et vert) et des témoins biotiques (jaune et bleu) notés sur la ligne supérieur du graphique (ns = différence non significative, * = différence significative).

L'étude de la diversité fonctionnelle se fait avec les plaques Ecologues (**fig. 7**). Les sols abiotiques n'ont pas été analysés dans cette expérience. Pour le site de Dourdan, on voit que l'activité des sols tests est bien supérieure aux sols biotiques pendant les 14 premiers jours et retourne au même niveau que les sols biotiques à la fin de la cinétique. Pour le site de Compans, c'est l'inverse, c'est les sols biotiques qui ont une activité plus importante que les sols tests pour aussi revenir au même niveau à la fin de la cinétique. Il manque par contre des points d'analyse pour Compans car les sols tests aux jours 3 et 14 se rapprochent des valeurs des sols biotiques, l'impact de l'amendement des micropolluants n'est de ce fait, pas aussi prononcé à Compans que Dourdan. Ces résultats suivent les précédents avec le sol de Dourdan plus impacté par l'amendement des micropolluants aboutissant par une hausse transitoire de son activité. Afin de compléter ces résultats, une analyse génétique a aussi été faite pour mettre en lien les capacités de biodégradation des micropolluants et les activités microbiennes.

Composition des communautés bactériennes par métabarcoding du gène codant l'ARNr 16S

Qualité et diversité des séquences

La position phylogénétique des bactéries dans les différents échantillons a été caractérisée à l'aide du script QIIME de résumé des taxons jusqu'au niveau du genre (L6). Après un contrôle de qualité (élimination des séquences de mauvaise qualité et des chimères), un total de 625 480 séquences effectives a été généré à partir de 16 échantillons et utilisé pour l'analyse (**tableau 1**). La longueur moyenne des séquences après traitement était de 416 pb pour tous les échantillons.

Tableau 4 : Séquences et indices de diversité dans cette étude.

Compans	Séquences effectives	Pourcentage de séquences effectives	Shannon entropy	Dourdan	Séquences effectives	Pourcentage de séquences effectives	Shannon entropy
T0_BFS	43136	62	9,39	T0_IB_In	38877	57	9,19
Tf_BFS	32017	55	9,28	Tf_IB_In	40271	56	9,43
Tf_BFS_b	40693	56	9,53	Tf_IB_In_b	40392	60	9,32

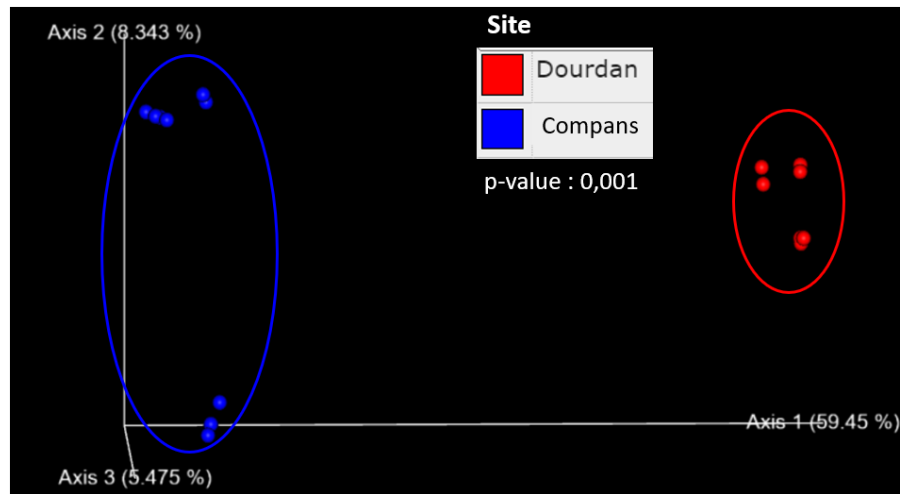


Figure 8 : Diversité bêta des sols étudiés en réponse au dopage en micropolluants. Les deux premières dimensions d'une analyse en composantes principales sont représentées sur la base des distances de Bray-Curtis. Les échantillons sont codés par couleur selon les sites : en rouge les sols de Dourdan, en bleu les sols de Compans.

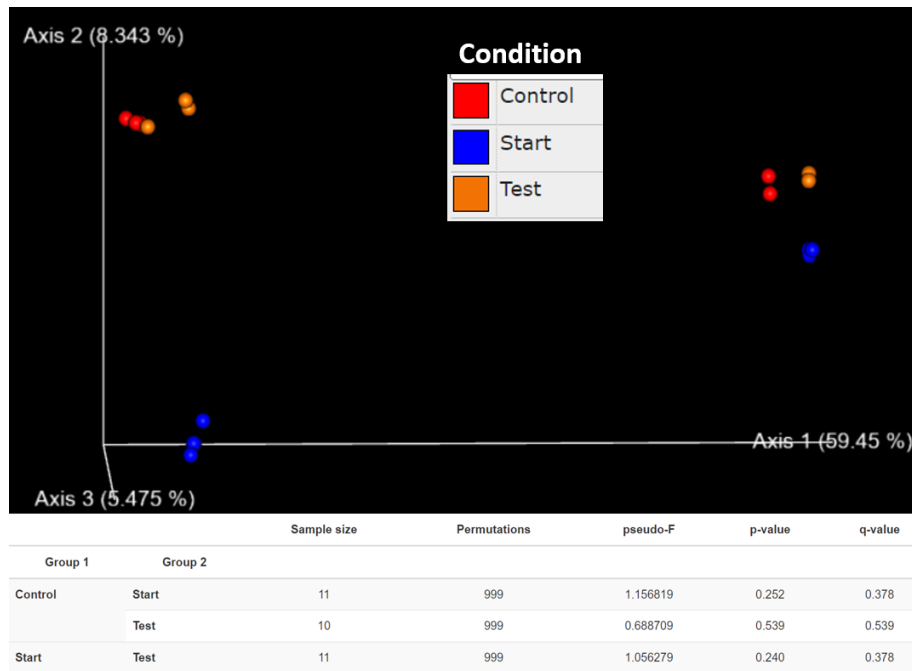


Figure 9 : Diversité bêta des sols étudiés en réponse au dopage en micropolluants. Les deux premières dimensions d'une analyse en composantes principales sont représentées sur la base des distances de Bray-Curtis. Les échantillons sont codés par couleur selon les sites : en rouge les sols contrôles (Tf avec amendement en micropolluants), en bleu les sols start (T0 : sols de départ) et en orange les sols tests (Tf sans amendement en micropolluants).

Toutes les courbes de raréfaction ont eu tendance à s'approcher du plateau de saturation, ce qui indique qu'un nombre raisonnable d'échantillons individuels a été collecté. L'entropie de Shannon, qui se concentre sur la composante "richesse" de la diversité, est présentée dans le **tableau 3**. Une forte diversité est visible dans chaque sol (~9) cependant une variation légère de la richesse est notée allant de 9,19 à 9,53 entre les sites et entre les conditions. Les échantillons ont été séparés de manière significative en fonction des sites (PERMANOVA, $p < 0,05$) mais pas en fonction des conditions (**figure 9**). En regardant les distances de Bray-curtis dans la **figure 8**, il est possible de voir 2 groupes bien distincts séparés selon les sites. Sur la **figure 9**, les groupes de condition ne montrent pas de différence significative mais il est quand même possible de voir avec Compans, une différence entre les échantillons de départ (start en bleu) et les 2 autres conditions (control et test).

Structure de la communauté microbienne impliquée dans la biodégradation des micropolluants

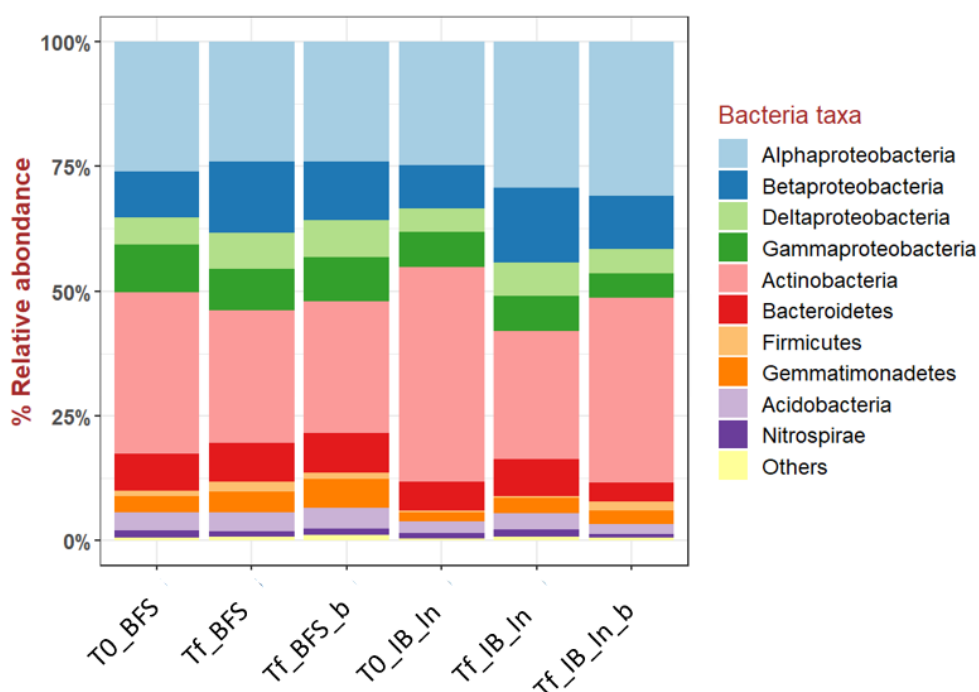


Figure 10 : Représentation des abondances relatives moyennes des phylums majeurs et des protéobactéries, qui sont divisées en classes (pour ceux avec une abondance relative supérieure à 1%) dans les sols provenant des cinétiques en colonnes. Les embranchements dont l'abondance relative est inférieure à 1 % ont été regroupés sous l'appellation "others".

Les protéobactéries sont le phylum dominant dans tous les sols étudiés avec environ 50% de l'abondance relative totale (**figure 10**). En regardant au niveau de la classe des protéobactéries, ce sont les Alphaprotéobactéries qui sont les plus représentées (~25%). Le 2^{ème} phylum le plus représenté dans ces

sols est celui des Actinobactéries (~25%). Il est également possible de voir des Bacteroidetes, des Firmicutes, des Gemmatimonadetes, des Acidobactéries et des Nitrospirae. Des tendances similaires peuvent être observées entre les sols de la Noue de Compans (BFS) et de Dourdan (IB). Des légères variations dans les abondances des différents phylums sont visibles entre le début et la fin de la cinétique pour les 2 ouvrages.

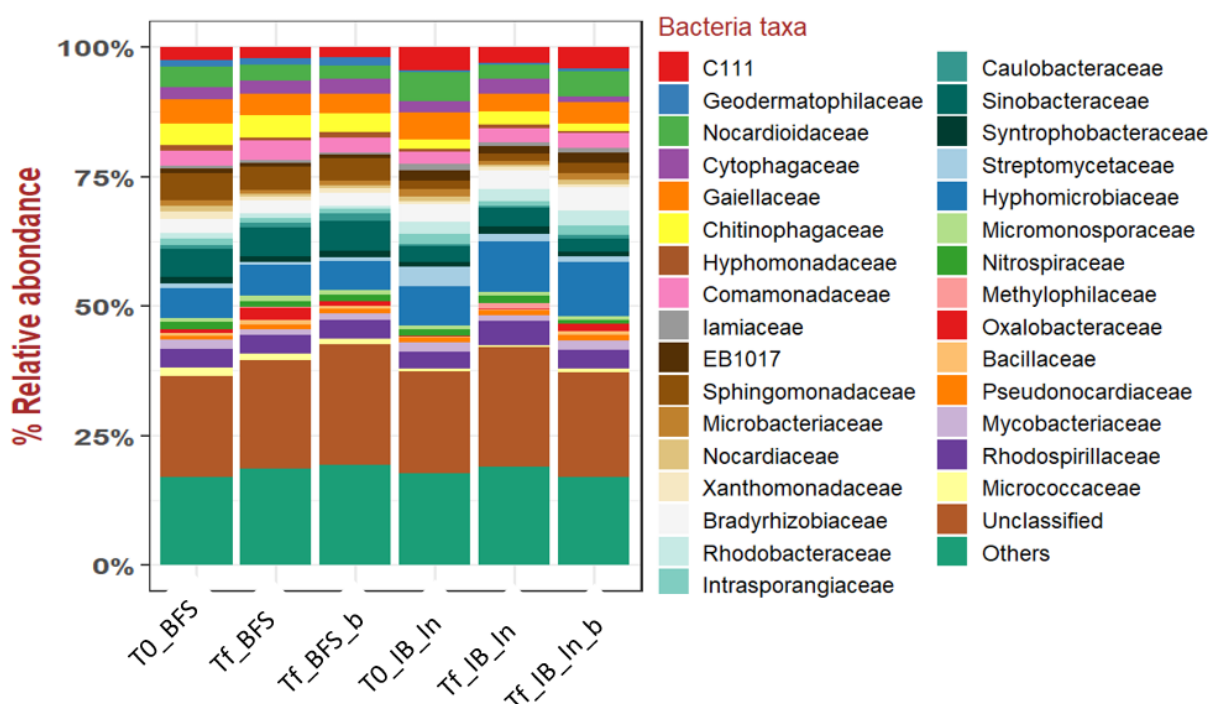


Figure 11 : Représentation des abondances relatives moyennes des familles bactériennes dans les sols provenant des cinétiques en colonnes. Les embranchements dont l'abondance relative est inférieure à 1 % ont été regroupés sous l'appellation "others".

Des analyses phylogénétiques plus poussées montrent une trentaine de familles bactériennes connues et identifiées dans nos sols (**figure 11**). Une tendance semblable ressort entre les sols des 2 ouvrages et entre le début et la fin de la cinétique ainsi qu'entre les témoins et contrôles. Les différences ne sont que de 1 ou 2% en fonction des conditions. Il est notable qu'une grosse partie (~40%) de l'abondance relative soit constituée de familles non caractérisées ou de familles présentes à moins de 1%. La famille la plus abondante dans les sols de ces ouvrages est Hyphomicrobiaceae (6% pour les 3 sols de BFS, 8% pour TO_IB et 10% pour Tf_IB/IB_b). Globalement, une grande diversité est présente dans ces sols et l'ajout des MPs ne semble pas avoir eu d'impact sur la structure des communautés microbiennes.

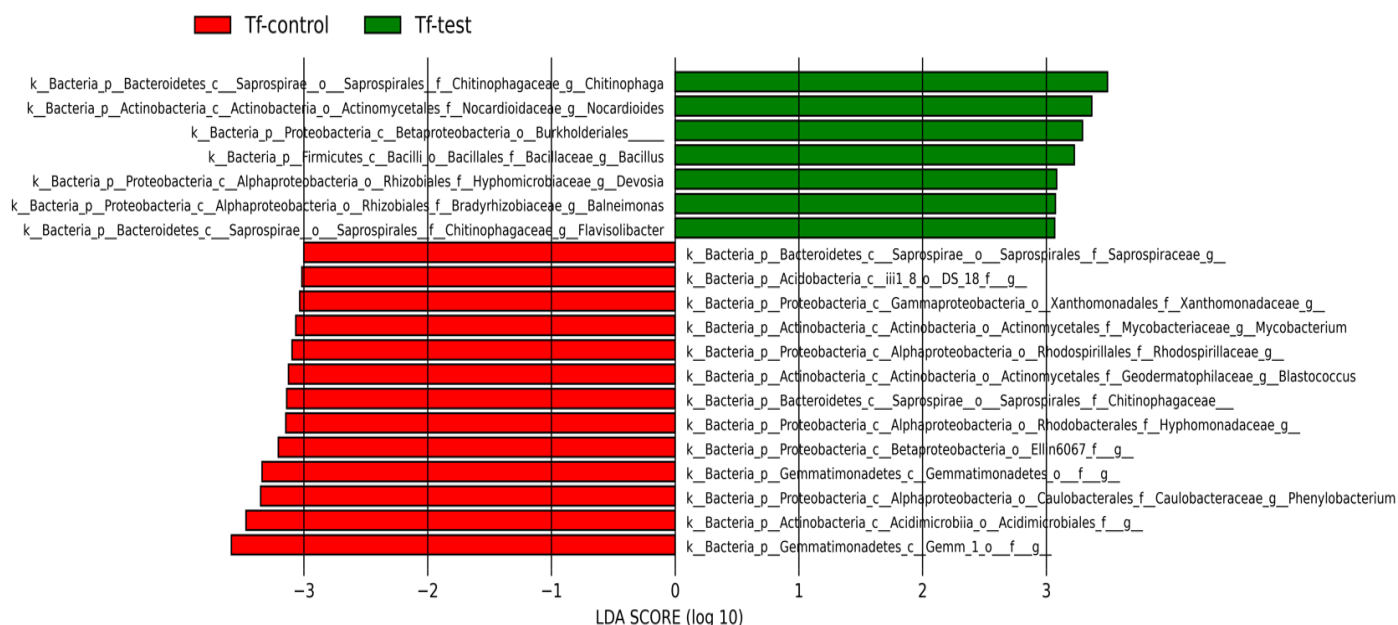


Figure 12 : Analyse LEfSe de 6 échantillons de sols de BFS : Tf_BFS (Tf-test ; 3 échantillons avec MP) et Tf_BFS_b (Tf-control ; 3 échantillons sans MP) au point final cinétique. Histogrammes des scores LDA de séquences de gènes 16S

Une analyse LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) a été réalisée pour montrer quels taxons caractérisent significativement les sols dopés par rapport aux contrôles, en utilisant le test de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) avec un score LDA $> 3,0$. Les microorganismes des sols tests (**figure 12**) présentent une composition bactérienne distincte des sols contrôles, notamment enrichie en taxons d'Alphaproteobacteria (*Hyphomicrobiaceae Devosia* et *Bradyrhizobiaceae Balneimonas*) et de Bacteroidetes (*Chitinophaga* et *Flavisolibacter*). Trois autres phylums sont aussi présents, bien que moins répandus, comprenant les Bétaprotéobactéries (ordre des Burkholderiales), les Actinobactéries (*Nocardioides*) et les Firmicutes (*Bacillus*).

Dans la littérature, les communautés bactériennes retrouvées qui font la biodégradation du BPA et des alkylphénols sont diverses. Avec Matsumura et al. (2009) et Zhang et al. (2013), les genres de *Sphingomonas*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pandoraea*, *Serratia* sont des bactéries capables de biodégrader le BPA retrouvées dans les sols. Bergé. (2013) parle aussi d'un total de 37 souches de bactéries pouvant dégrader le NP qui ont été isolées dans des conditions aérobies et anaérobies (*Acinetobacter baumannii*, *Arthrobacter nicotianae*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, *Sphingomonas sp.*, ...) (Chang et al. 2005, Chang et al. 2004, Yuan et al. 2004). Zaborowska et al. (2020) parle de 4 types de bactéries qui ont été identifiés dans les sols exposés à tous les types de bisphénols : *Nocardioides*, *Agromyces*, *Sphingomonas* et *Devosia*. Les genres que l'on retrouve dans cette littérature sont plus divers que ceux qui ressortent lors de l'analyse LEfSe (**figure 10**). La LEfSe de la figure 10 met en évidence les genres de *Bacillus*, *Nocardioides* et de *Devosia* comme caractéristique des sols Tf_BFS dopés avec des micropolluants, ce qui correspond à ce que l'on peut retrouver dans les travaux précédents. Il faut également noter que les genres retrouvés spécifiquement dans les sols Tf_BFS amendés avec des micropolluants sont des genres qui ne sont pas spécifiques à la biodégradation du BPA et des alkylphénols. Singleton et al. (2016) montre l'implication des familles Chitinophagaceae et Bradyrhizobiaceae lors de la biodégradation des HAPs. Ce qui ressort des histogrammes et de l'analyse

LEfSe c'est qu'il y a des variations légères dans les communautés microbiennes des sols au cours de la cinétique mais avec un impact peu important. Les différences au cours de la cinétique sont moins visibles dans le site de Dourdan que la noue de Compans. Il faut noter que les concentrations des MPs ajoutées dans les sols étaient limitées afin de mimer l'impact de l'environnement naturel. Le site de Dourdan est un site ancien (26 ans) qui a pu se développer avec peu d'interférence humaine (peu d'entretien du site). Tandis que la noue de Compans est un site jeune, âgé de 6 ans seulement lors de la campagne de prélèvement du sol utilisé pour les colonnes. Il est donc possible de se dire que l'impact plus important vu avec Compans pourrait provenir d'une structure microbienne moins robuste que celle de Dourdan.

En regroupant l'ensemble de ces observations, il est possible de noter des liens entre les analyses. Par exemple, le sol de Dourdan est très actif pour faire la biodégradation durant les 3 premiers jours de la cinétique. En parallèle, on peut voir un pic dans son activité de la FDA également dans les 3 premiers jours de la cinétique qui est significativement différent des sols témoins. De même pour l'activité potentielle, il y a une diminution de cette activité les 3 premiers jours pour re-augmenter après. Cela amène à penser que les populations microbiennes vont avoir une stimulation globale de leur activité par le dopage en MPs et qu'il va y avoir une métabolisation préférentielle des MPs et ensuite elles vont repasser aux autres sources de C. Pour Compans, l'effet du dopage est moins prononcé avec une activité de la FDA qui reste semblable au témoin au cours de la cinétique. Cependant, il faut noter que pour l'activité potentielle, il y a une baisse de cette activité au 7^{ème} jour qui correspond au moment où la biodégradation prend place dans les sols de Compans.

4.2.2 Conclusions et perspectives

Ces résultats nous montrent dans un premier temps :

- Les témoins abiotiques ont un niveau basal d'activité à prendre en compte lors de l'analyse du dosage des micropolluants.
- Le dopage en micropolluants des sols va impacter la biomasse microbienne pour les 2 sites testés : sol en entrée des eaux de ruissellement de Dourdan et la Noue de Compans.
- Des différences de réaction pour les activités sont visibles : Dourdan va voir son activité boostée suite au dopage en micropolluants et Compans va avoir peu de différence dans son activité.
- Un impact faible est visible sur les communautés microbiennes suite au dopage en MPs
- Une biodégradation des MPs spécifiques en fonction des sites mais pas en fonction du MP

Les relations observées entre les capacités de biodégradation des MPs et les activités microbiennes montrent des comportements différents des structures microbiennes des sols. Une analyse qPCR pour compléter le travail sur le fonctionnement microbien qui intervient pourrait être intéressante. Aussi, les analyses de biodégradation du BPA sont manquantes afin d'observer les comportements en fonction des différentes familles de MPs comme cela avait été vu avec la cinétique en batch liquide.

Sur la base de ces résultats, que peut-on dire du potentiel de biodégradation, in situ, du BPA, OP et NP piégés dans le sol des ouvrages en termes d'implications opérationnelles ?

- Les « témoins biotiques » : ce sont des sols tests, pour lesquels on évalue la cinétique de biodégradation dans les conditions de contamination réelle d'un ouvrage de gestion des EP (en termes de concentration mais aussi en termes de forme sous laquelle se trouve le micropolluant dans le sol). Et cette contamination est loin d'être négligeable : pour BPA et pour OP les

concentrations TO de ces « témoins biotiques » correspondent à la gamme haute de ce qu'on observe dans les parties les plus polluées des ouvrages.

- D'après les résultats de cinétique, il n'y a pas de biodégradation significative des polluants contenus dans les « témoins biotiques » sur la durée de l'essai. En fait pour BPA il semble y avoir une légère décroissance mais pas significative compte tenu des écarts types. Pour OP et NP, il n'y a clairement pas de décroissance (à noter pour ces deux polluants la dégradation de composés éthoxylés à longues chaînes, présents notamment dans les pneus pourrait au contraire conduire à une augmentation, mais ce n'est pas notable ici).
- Ce résultat pose question quant à la représentativité des cinétiques de biodégradation que l'on peut établir par dopage du sol à forte concentration et avec des polluants dissous → cela permet sans doute d'évaluer le devenir de la fraction des MP qui sont apportés par les ruissellements sous forme dissoute, mais pas le potentiel de remédiation des sols contaminés par un long historique d'exposition au ruissellement. Doper fortement avec des composés dissous permet sans doute de booster les souches qui sont actives dans leur biodégradation et ainsi de les identifier plus facilement, mais d'un point de vue de l'établissement de cinétique qui pourraient être utilisées dans des modèles d'évolution de la contamination du sol des ouvrages ce n'est clairement pas bon.

Chapitre 5 : Evolution au cours du temps des ouvrages de gestion des eaux pluviales situés à Compans

Introduction

Compans est un site qui est constitué de 3 ouvrages bien distincts. Ce site est très intéressant grâce à la proximité des 3 ouvrages permettant d'étudier le fonctionnement de ces sols avec le moins de biais possible dû aux localisations différentes. Lors de mon étude, un autre point intéressant avait eu lieu qui est la maintenance des 2 premiers ouvrages de Compans. Les 2 bandes enherbées ont subis un dérasement, c'est-à-dire que la terre a été enlevée sur les 10 premiers du sol, puis les ouvrages ont été laissés tel quel sans replanter ni rien. Ce dérasement ayant eu lieu en juin 2020, cela correspond exactement à 1 an avant ma première campagne d'échantillonnage (juin 2021), lors de mon étude j'étudie donc un sol à son état initial. Il a de ce fait été décidé de faire une 2^{ème} campagne en juillet 2022 pour étudier l'évolution de ces sols au cours du temps. La Noue de Compans n'a pas subi de dérasement mais c'est également un ouvrage jeune et il a été également choisis d'étudier son évolution au cours du temps.

Article 3 : Changes over time in the physical, chemical, and biological characteristics of the Compans stormwater management facility

Résumé

Le premier objectif de ce travail est d'étudier plusieurs structures sur le même site de gestion des eaux pluviales en termes de texture du sol, d'âge et de type de végétation. La localisation hydrologique est également prise en compte. L'autre objectif est de voir l'évolution dans le temps et au fil des saisons. Le site étudié est situé à Compans (près de Paris), et comprend 3 structures (2 bandes enherbées, dont une avec un substrat filtrant, et une baissière de biorétention avec un substrat filtrant). Les 2 bandes enherbées ont été nivelées en juin 2020, c'est-à-dire que les 10 cm de terre supérieurs ont été enlevés et laissés tels quels. Trois campagnes d'échantillonnage ont été réalisées pour étudier ces sols : Juin 2021, Février 2021 et Juillet 2022, soit 1 et 2 ans après le décompactage. Les bandes ont également été séparées en fonction du lieu d'entrée/référence des eaux de ruissellement de la route. Cinq échantillons de sols ont donc été étudiés (4 provenant des bandes enherbées et de la totalité de la rigole).

Un fort impact sur le sol du nivellement de 2020 est visible dans les données de 2019/2021, à la fois en termes d'aspects physico-chimiques et biologiques. Les résultats pour 2021 montrent une nette différence entre les bandes enherbées et la rigole. Le pH est supérieur à 8,5, la MO ne représente que 5% du sol et l'activité FDA est de 5µg/gSS/h pour les bandes enherbées, alors que la rigole a un pH inférieur à 8,5, une teneur en MO de 10% et une activité FDA de 20µg/gSS/h. Les 2022 résultats montrent une évolution des 5 sols étudiés, le pH de chaque sol diminuant vers des valeurs neutres, la quantité de MO augmentant et les activités enzymatiques augmentant également (20 à 60 µg/gSS/h). La rigole n'a pas été démantelée, mais il s'agit également d'une structure jeune (5 ans en 2021).

Nos recherches ont démontré que les cinq sols étudiés subiront une évolution positive, nécessitant un minimum de deux ans pour rétablir un niveau sain d'activité biologique. Cela soulève des inquiétudes quant à l'entretien des structures, car cela pourrait avoir un impact négatif sur ces structures au lieu de les préserver.

**Changes over time in the physical, chemical, and biological characteristics of the Compans
stormwater management facility**

Andréa Oudot, Vanessa Alphonse, Alexandre Livet, Mohamed Barakat², Wafa Achouak², Marie-Christine Gromaire¹ and Nouredine Bousserhine

LEESU, Univ Paris Est Creteil, Ecole des Ponts, Creteil, France

¹LEESU, Ecole des Ponts, Univ Paris Est Creteil, Marne-la-Vallée, France

²CNRS équipe LEMIRE, CEA Cadarache, France

Corresponding author : Andréa Oudot, andrea.oudotcroset@gmail.com

Abstract:

The first aim of this work is to study several structures on the same stormwater management site in terms of soil texture, age and type of vegetation. Hydrological location is also considered. The other objective is to see the evolution over time and with the seasons. The studied site is located in Compans (near Paris), and comprises 3 structures (2 grass strips, one with a filtering substrate, and a bioretention swale with a filtering substrate). The 2 grassy strips were levelled in June 2020, i.e., the top 10 cm of soil was removed and left as is. Three sampling campaigns were carried out to study these soils: June 2021, February 2021 and July 2022, i.e., 1 and 2 years after disking. The strips were also separated according to the inlet/reference location of the road runoff. Five soils samples were therefore studied (4 from the grassed strips and the entire swale).

A strong impact on soil from the 2020 levelling can be seen in the 2019/2021 data, both in terms of physico-chemical and biological aspects. The results for 2021 show a clear difference between the grassed strips and the swale. The pH is above 8.5, OM makes up only 5% of the soil and FDA activity is $5\mu\text{g/gSS/h}$ for the grass strips, whereas the swale has a pH below 8.5, an OM content of 10% and FDA activity is $20\mu\text{g/gSS/h}$. The 2022 results show an evolution of the 5 soils studied, with the pH of each soil decreasing towards neuter values, the amount of OM increasing and enzyme activities also increasing (20 to $60\mu\text{g/gSS/h}$). The swale has not been dismantled, but it is also a young structure (5 years old in 2021).

Our research has demonstrated that the five soils studied will undergo positive evolution, requiring a minimum of two years to restore a healthy level of biological activity. This raises concerns about structure maintenance, as it may negatively impact these structures instead of preserving them.

Keywords: management structure at source, soils properties, soil microorganisms' biological activities, temporal change, clearance

1. Introduction

Urban development leads to an artificialization of soils which in turn will strongly modify the natural water balance of the site, by limiting soil water recharge and increasing runoff (Gromaire-Mertz et al., 1999; Miller et al., 2014). Moreover, urban runoff conveys a range of micropollutants that are found on impermeable surfaces, and thus contributes to the degradation of aquatic ecosystems. Nowadays, environmental pollution has become a key issue both for ecosystem and human health, and the quality of stormwater is a subject to be dealt with in order to limit the dispersion of pollutants in the environment (Bressy, 2010; Chocat, 2008). The organic micropollutants (MPs) encountered are diverse: biocides are found in construction materials. On roads, bisphenol A, alkylphenols, PAHs, etc. will be found (Gooty et al., 2022; Müller et al., 2020). These MPs are all harmful not only to the environment, but also to human health, and much work is available on the toxic effects they can have, as with (Ďurovcová et al., 2022)'s work on bisphenol A. It should be noted that micropollutants are present in the environment at very low concentrations (ng/L-μg/L), but that even at these low concentrations, they will be harmful (Gooty et al., 2022). Over the last decade, source control measures (SCMs) of urban runoff within sustainable urban drainage systems (SUDS) has been widely promoted, both to restore a more nature like water budget and to reduce associated pollutant loads. Natured based solutions, involving runoff infiltration and filtration through vegetated soils has proven very efficient to improve runoff water quality. They allow for physical filtration of particle bound micropollutants but also adsorption of part of the pollutants present in the dissolved phase. The accumulation of runoff born micropollutants in the filtration layer will in turn lead over the years to an increased contamination level of the substrate (Briand et al., 2018; Chocat, 2008; Rentachintala et al., 2022; Sage, 2016). A number of studies have been carried out to understand the physico-chemical mechanisms by which trace metals and to a lesser extend organic micropollutants are retained during rain events in the top soil layers of runoff infiltration systems or in the substrate of bioretention SUDS (Tedoldi et al., 2017). However, there is one area that has received much less attention. The biological functioning of these structures remains unclear, yet organic micropollutants trapped in the substrate layer can be biodegraded over time thanks to living soil organisms such as plants (Bashir et al., 2022), microorganisms, etc. This aspect is important because the biodegradation of organic micropollutants will eliminate them definitively from the soil and thus reduce accumulation in the substrate, preserve soil ecosystems and increase substrate's lifespan. This is important, as the biodegradation of organic micropollutants will eliminate them permanently from the soil, unlike metallic micropollutants, which will accumulate. It is therefore necessary to study organic micropollutants accumulation and their biodegradation within the soils of these structures. The microbial aspect was chosen because microorganisms are highly diverse organisms with enormous metabolically potential, including the ability to metabolize PM directly or indirectly (cometabolism). Microorganisms are an important actor in the bioremediation of soils and therefore in maintaining an acceptable level of MPOs in the soils of these structures (Bhatt et al., 2022; Chunyan et al., 2023; Sharma et al., 2023).

The present article focuses on the microbiological functioning of the soils of road runoff treatments SUDS (Sustainable Urban Drainage Systems). Three different SCMs (Stormwater Control Measures), situated side by side and treating runoff from the same high traffic road are considered. They differ in terms of structure, soil texture, vegetation, but also operational period. This allows to assess the effect of different SCM parameters on soil microbial functioning for a same runoff context, thus avoiding biases

linked to high spatial and temporal variability of road runoff. My work will therefore focus on the study of these 3 structures divided into 5 soils (study of the location of the hydrological input as well: upstream/downstream). Several sampling campaigns will be carried out in summer (2021, 2022) and one in winter 2021. The objectives are firstly to see if there are any differences between soils chemical and biological properties from the same campaign, and then to monitor soil evolution over time, as well as to study seasonal impact. Data from 2019 (J.Roux, 2019) will also be used. Physico-chemical (pH, OM, CEC, etc.) and biological (biomass, microbial activity and diversity) characterizations will be carried out on each occasion.

2. Materials and methods

2.1. Site description and soils sampling

Site description

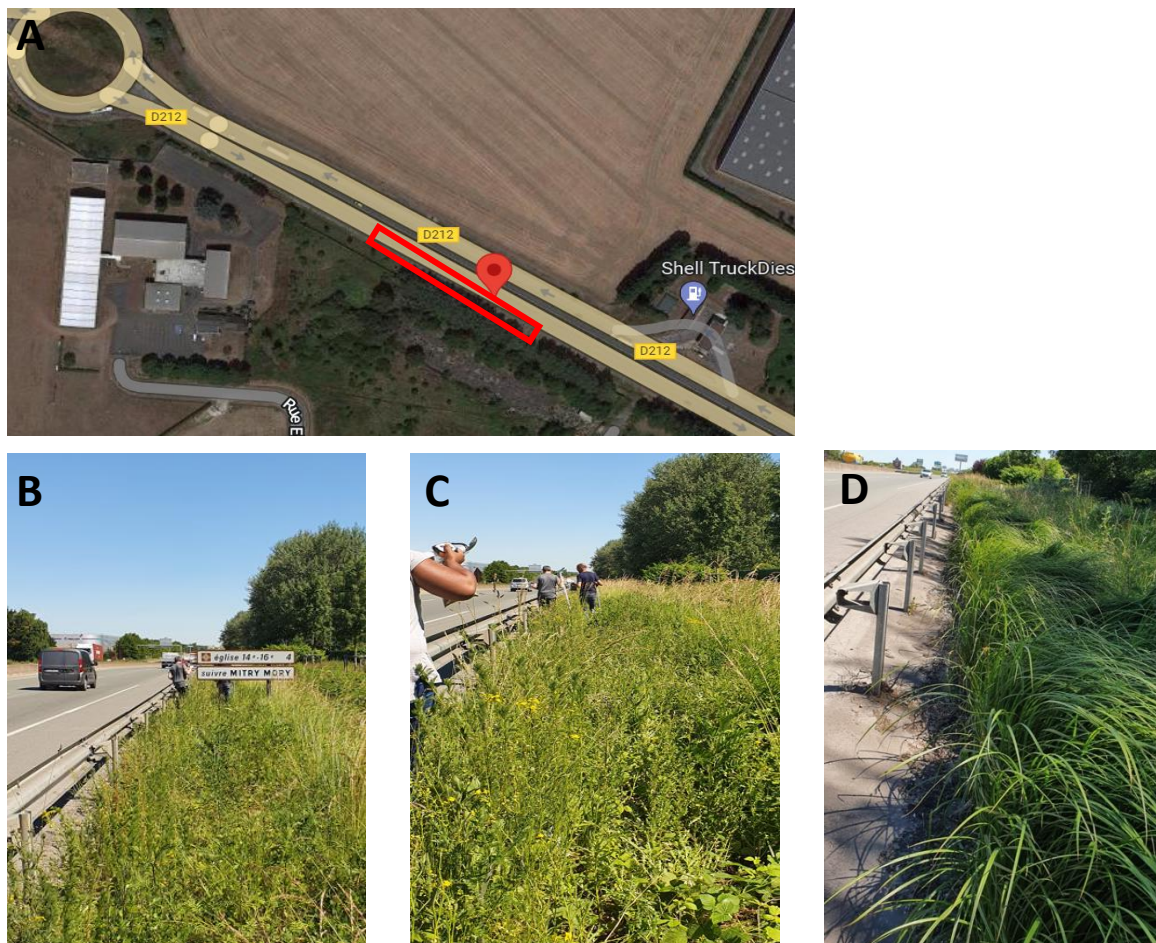


Figure 1 : A. Compans site location, red box surrounding selected sampling area ; B. Grass strip on 1st section of site ; C. Grass strip and filter substrate in the 2nd section of site ; D. Swale and filter substrate in 3rd section of site

The study site located in the Mitry-Compans industrial zone, along the D212 road in Compans (77), France (**Fig. 1**), close to Charles de Gaulle international airport. GPS coordinates are 48.9959135

2.6475648. It is a 2x2 lanes, heavy traffic (22,000 vehicles per day in each direction), departmental road, the runoff of which is managed site in different SCMs (Stormwater Control Measures). The 3 SCMs considered here are 2 filter strips (VFS1_C and VFS2_C) and one bioretention swale (BFS_C), which all collect direct runoff from the road over their whole length (**Fig 3**). The vegetated strips were built in 2012, but underwent heavy maintenance in June 2020 (soil scraping over a 5 to 10 cm depth, **Figure 2**), while the vegetated biofiltration swale was built in April 2016. Filter strip VFS1_C has a clay loam top soil layer while VFS2_C as well as bioretention swale BFS_C present a filtration soil layer made of a mixture of 40% topsoil and 60% limestone sand (sandy loam texture). This filtering substrate is 15 cm thick in the case of VFS2_C and 50 cm thick for BFS_C, and includes a drainage system at its base to evacuate percolates. The filter strips are each 50 m long and around 2 m wide. Their 5% transverse slope (**Fig. 3A**) allows runoff to flow from upstream (on the road side) to downstream (on the ditch side, 2 m from the road). However, it has been noted (Flanagan et al. 2017) that for most rain events the majority of runoff infiltrates within the first 50cm of width. The biofiltration ditch is 30 m long and 50 cm wide, with a longitudinal slope of 2% identical to the longitudinal slope of the road, and is divided into three storage sections, each 10 m long, by small check dams. The vegetation in the filter strips is spontaneous (**Fig. 1B et 1C**), while the swale is uniformly planted with *Carex gracilis* (**Fig. 1D**).



Figure 2 : photos showing the clearing of Compans grass strips in June 2020

Soils sampling

For each of the two filter strips, two composite soil samples were taken (**Figure 3**): one representative of the "upstream" zone, i.e. the zone of soil close to the road that is the most impacted by runoff: inlet, and one representative of the "downstream" zone, i.e. the zone furthest away from the road: reference. These composite samples were made up by mixing and quartering 10 cm deep soil samples, taken every 4 m along the 50 m length of each strip. For the biofiltration swale, a composite sample, representative of the entire swale length, was taken by sampling the top 10 cm of substrate every 1.5 m (sampling plan attached). The campaigns were carried out in June 2021, in February 2021 and June 2022. Data from 2019 (J.Roux, 2019) sampled using the same protocol was also utilized

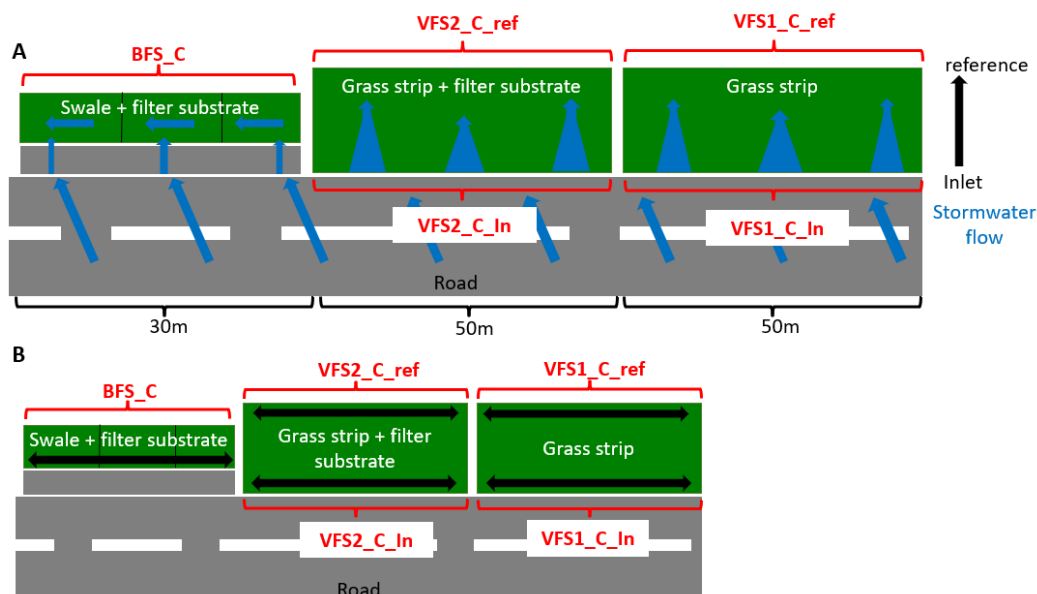


Figure 3: Representation study soils, A: Plan of stormwater structure and flow; B: Soil sampling zone for the 5 composite soils

Soils preparation

Sampled soils were dried at 25°C for 1 week then they were sieved through a 2mm mesh. On-site samples were collected all along the structure, and these individual samples were later combined to form a representative composite sample for each of the 5 studied structures. All 5 composite soils are then stored at room temperature, while the small samples are kept at -20°C for molecular analysis.

Meteorological data and micropollutant concentrations in studied soils

Table 1: Meteorological data (average maximum temperature and cumulative rainfall) for the 10 days preceding each sampling campaign in Paris.

	Maximum temperature (avg/°C)	Cumulative rainfall (mm)
20 june 2019	22,8	25,6
9 june 2021	25,4	33,3
24 january 2022	7	2,8
6 july 2022	25,1	11,9

Table 2: Organic micropollutant measurement (µg/g) in the 5 soils studied during summer 2022 campaign

Micropollutant concentrations in µg/g soil					
	VFS1_C_In	VFS1_C_ref	VFS2_C_In	VFS2_C_ref	BFS_C
BPA	0,014	0,002	0,012	0,018	0,059
NP1EC	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
OP	0,000	0,005	0,012	0,004	0,012
OP1EO	0,002	0,017	0,053	0,019	0,054
OP2EO	0,013	0,002	0,002	0,002	0,004
4NP	0,001	0,017	0,027	0,031	0,044
NP1EO	0,018	0,001	0,000	0,000	0,000
NP2EO	0,026	0,003	0,005	0,003	0,006

2.2. Campaigns soil samples characterization

Main soils physico-chemical and biological properties were characterized by particle size, pH, organic matter (OM) content, field capacity (FC), cation exchange capacity (CEC), total major elements (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+) and microbial biomass (determined by MPN: Most Probable Number), microbial enzymatic activities (fluorescein diacetate: FDA, dehydrogenase: DH, urease: UR), microbial functional diversity (by Biolog Ecoplate) and microbial genetic diversity were determined.

2.2.1. Physical and chemical soils analysis

Soil granulometry determination

Granulometric size fractionation was carried out by sedimentation on the fraction smaller than 2mm. This analysis was conducted in accordance with standard NF X 31-107 (July 1993) and separates the soil into 5 particle classes: clay ($<2\mu\text{m}$), fine silts ($2-20\mu\text{m}$), coarse silts ($20-50\mu\text{m}$), fine sands ($50-200\mu\text{m}$), coarse sands ($200-2000\mu\text{m}$). Prior to sedimentation, the soils were prepared by first destroying the organic matter with hydrogen peroxide (H_2O_2), then destroying the carbonates with hydrochloric acid (HCl), followed by a succession of washes and a final step to keep the soil particles dispersed by adding dispersant ($(\text{NaPO}_3)_6$) combined with ultrasound. The results were grouped into 3 classes: clay, silt and sand.

Soil pH measurements

Soils pH were measured in soil suspensions by shaking 5g of soil in 25ml water (ratio 1:5) for 1 hour and 1 hour of rest then by using a pH-metre (HANNA pH 211 Instruments) with a sensor (HI 1053) according to ISO 10390 standard. pH_{KCl} was also measured using 1mol/L KCl instead of water.

Soil field capacity determination

Field capacity is the highest quantity of water a given soil can hold. To do this, a soil is saturated with water for 24 hours, then dried for 48 hours. The starting mass is taken and the weight after re-drying is measured. Subtracting these values gives the water retained by the soil, which can be reduced to the initial soil quantity, giving the following formula:

$$\text{FC (mL / g dry soil)} = (\text{wet mass (g)} - \text{dry mass (g)}) / \text{dry mass (g)}$$

$$\text{FC (mL / g dry soil)} = \text{retained water (mL)} / \text{dry mass (g)}$$

Soil organic matter content measurements

To estimate this quantity, the loss on ignition (LOI) method for dry matter is performed. This is based on the calcination of OM, for which 5g of dry soil will be subjected to high temperature (550°C) for 3 hours in a Nabertherm GmbH LE140K1BN oven, during which the OM will be oxidized to volatile products (CO_2 ...). By subtracting the initial mass, the OM content can be obtained using the following empirical formula (Minasny et al., 2020; Van Bemmelen et al., 1890):

$$\text{Organic C loss (g)} = \text{initial mass (g)} - \text{final mass (g)}$$

$$\text{OM content (g OM / g dry soil)} = 1.72 * \text{C organic content (g C org/g dry soil)}$$

Soil CEC determination

CEC (in cmol_+/ kg) was calculated using the cobaltihexamine method (NF X31-130, May 1993). After adding cobaltihexamine to soil suspensions and stirring, the Genesys 10 UV scanning spectrophotometer

(Thermo scientific) reads cobalt ions (Abs 475/380 nm). It's the difference in concentration between the initial cobalt solution (maximum concentration) and the cobalt concentration of the soil samples that gives us the amount of cobalt adsorbed on the complex, and thus the CEC. Next, the concentrations of exchangeable cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} , K^{+}) were determined using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, SpectroBlue FMS 16 spectro analytical instruments).

2.2.2. Biological soils analysis

Soil microbial biomass

The Most Probable Number (MPN) procedure was used to determine the total soil microbial biomass. This method counts the total number of heterotrophic bacteria and fungi. One gram of soil was mixed with 9ml NaCl (9g/l). Agitated 1 hour, centrifuged 10 min at 3000rpm, ten serial dilutions were made, ranging from 10^{-1} to 10^{-5} . For the enumeration of total bacteria, the plate wells were filled with LB plus fungizone, and for the enumeration of fungi, malt extract plus ampicillin was used, 200 μ l in the negative control well and 180 μ l in the other wells. The plates were inoculated in eight wells per dilution (20 μ l). Plates were incubated for 3 and 7 days (for bacteria and fungi respectively) at 25°C in the dark. After incubation, the growth of microbial populations was determined spectrophotometrically (Multiskan FC plate spectrophotometer, Thermo Scientific) by measuring absorbance at 620nm. A computer program (using standard Mac Grady tables) was used to calculate the MPN for each sample, expressed as numbers of cell microorganisms per gram of dry soil weight.

Soil microbial enzymatic activities determination

FDA measurement

FDA (fluorescein diacetate) is used to determine the total enzymatic activity of a soil. This molecule will be hydrolysed by a set of soil enzymes into fluorescein. Fluorescein is a yellow fluorescent molecule that can be measured spectrophotometrically at a specific wavelength of 490 nm (Green et al., 2006). Samples were pre-incubated for 24 hours at 27°C. The soil suspension was mixed with phosphate buffer (pH 7.2) and FDA reagent ($\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{O}_7$, Sigma Aldrich). The mixture was incubated for 2 hours on an orbital shaker, then centrifuged at 2000 rpm over 20 minutes. The intensity of the solution color was determined using a Genesys 10 UV scanning spectrophotometer (Thermo scientific) at the selected wavelength (490nm).

Urease measurement

Procedures to study this urease (UR) in soils have been developed by (Kandeler and Gerber, 1988; Nannipieri et al., 1978b). After 24 h pre-incubation at 27°C, the soil suspension is mixed with urea as substrate in borate buffer. Ammonium can be read off by means of the blue-indophenol reaction, giving a green-colored complex detectable at 665 nm with the Genesys 10 UV scanning spectrophotometer (Thermo scientific).

Dehydrogenase measurement

Dehydrogenase (DH) activity was measured following (Kumar et al., 2013). The soil samples were pre-incubated for 24 hours at 27°C. Soil suspension was mixed with TTC 3% (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) as substrate. Color intensity after 72 hours incubation at 27°C was measured by colorimetry at 485nm.

Soil microbial functional diversity

Biolog plates, specifically the BIOLOG EcoPlate™ (Biolog Inc., CA, USA), are used to assess the functional diversity of microbial communities providing insights into community-level physiological profiles (Preston-Mafham et al., 2002). Each 96-well plate was composed of 31 substrates, with a water control replicated three times. The plates were inoculated with 150µl of inoculum suspension per well and incubated 96 hours at 25°C. Subsequently, the plates are then measured with the Multiskan FC plate spectrophotometer (Thermo Scientific) at 595nm. Tetrazolium chloride in each well is reduced to formazan during microbial substrates metabolism, resulting in a purple in color (595nm). The intensity of coloration reflects the extent of carbon sources degradation by microorganisms. The Average well color development (AWCD) was calculated using the following equation:

$$AWCD = (\sum(C_f - C_i)) / n$$

C_f = Final measured absorbance for one triplicate: 31 wells,

C_i = Initial measured absorbance for one triplicate: 31 wells,

n = wells number = 31

Soil microbial genetic diversity

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from 0.5 g of soil using the FastDNATM soil spin kit (MP Biomedicals, Europe, LLC) and resuspended in 100-µl of DES following the manufacturer's instructions. DNA concentration was assessed using a NanoVue Plus™ (Biochrom, USA) and by agarose gel migration (Mini Gel II (VWR) Electrophoresis System). DNA was stored at -20°C until later analysis.

Sequencing

DNA extracts are shipped to Eurofins Genomics Europe (Konstanz, Germany) in order to perform MiSeq illumina sequencing of bacterial and fungal DNA. The bacterial primers target the V3-V4 region of 16S RNA (357F-TACGGGAGGCAGCAG, (Turner et al., 1999) and 800R-CCAGGGTATCTAATCC, (Kisand et al., 2002)) and the fungal primers target the ITS2 region (ITS3-GCATCGATGAAGAACGCAGC and ITS4-TCCTCCGCTTATTGATATGC (White et al., 1990)).

Sequence quality

The phylogenetic position of bacteria and fungi in the various samples was characterized using the QIIME taxon summary script down to genus level (L6). After quality control trimming (removal of low-quality sequences and chimeras), a total of 964,745 bacteria effective sequences and 662,902 fungi effective sequences were generated from 10 samples and utilized for analysis. Effective sequences recovered after cleaning vary from 53 to 68% for bacterial sequences and from 70 to 91% for fungal sequences. The average length of bacterial sequences after treatment was 417 bp for all samples, and fungal sequences 326 bp. All rarefaction curves approached the saturation plateau, suggesting that a reasonable number of individual samples had been obtained.

3.3 Statistical analysis

Chemical and biological soil analysis results are presented as the mean ± SD of 3 samples. Statistical analyses were carried out using R-4.2.2 software (31-10-2022). As the data were not normally distributed,

the Kruskal-Wallis and Friedman test were used (all effects were considered significant when $P < 0.05$). Next, the conover-iman multiple comparison test was performed. Principal component analysis (PCA) circle correlation was conducted on 10 variables (OM, $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$, pH_{KCl} , FC, CEC, texture, MPN, FDA, DH, UR, AWCD) to give a global view of the relationships between all variables in a single **Figure 10**.

3. Results

3.1. Soils physical, chemical and biological analysis of the 4 sampling campaigns

Table 3: Mean physical, chemical characteristics of 2019, 2021, 2022 soils used for experiments (n=3, mean \pm SD). S: Summer and W: Winter, OM: organic matter, FC: field capacity, CEC: Cation exchange capacity, VFS1_C_In: filter strips 1 inlet, VFS1_C_ref: filter strips 1 reference, VFS2_C_In: filter strips 2 inlet, VFS2_C_ref: filter strips 2 reference.

Soils		VFS1_C_In				VFS1_C_ref				VFS2_C_In				VFS2_C_ref			
Seasons		S	S	W	S	S	S	W	S	S	S	W	S	S	S	W	S
Sampling campaign		2019	2021	2021	2022	2019	2021	2021	2022	2019	2021	2021	2022	2019	2021	2021	2022
pH _{H2O}		8.99 ± 0.10	8.60 ± 0.06	8.09 ± 0.0 1	8.30 ± 0.0 2	8.70 ± 0.0 1	8.55 ± 0.02	8.16 ± 0.0 1	8.16 ± 0.0 1	8.74 ± 0.0 1	8.51 ± 0.03	8.11 ± 0.0 2	8.23 ± 0.0 1	8.53 ± 0.01	8.54 \pm 0.04	8.22 ± 0.01	8.21 ± 0.04
pH _{KCl}		7.60 ± 0.04	7.39 ± 0.03	7.46 ± 0.0 1	7.55 ± 0.0 3	7.63 ± 0.0 2	7.44 ± 0.04	7.50 ± 0.0 3	7.48 ± 0.0 0	7.73 ± 0.0 2	7.47 ± 0.04	7.75 ± 0.0 2	7.75 ± 0.0 2	7.73 ± 0.02	7.57 \pm 0.08	7.83 ± 0.03	7.74 ± 0.03
OM (%)		10.3 ± 0.12	6.8 ± 0.14	8.8 ± 0.3 5	7.7 ± 0.3 6	8.2 ± 0.2 3	6.0 ± 0.22	6.9 ± 0.1 9	7.5 ± 0.1 9	13.2 ± 0.4 5	6.2 ± 0.23	7.3 ± 0.0 1	6.7 ± 0.7 0	6.9 ± 0.12	5.2 \pm 0.05	6.3 ± 0.36	6.5 ± 0.19
FC (%)		63.7 ± 3.7	43.5 ± 0.6	56.7 ± 2.0	54.8 ± 0.6	53.1 ± 5.0	43.5 ± 1.1	45.8 ± 0.6	60.7 ± 1.7	59.4 ± 2.5	36.5 ± 2.0	45.7 ± 2.1	50.4 ± 1.9	48.3 ± 5.4	37.2 ± 3.1	39.7 ± 0.3	57.0 ± 3.7
CEC (cmol+/kg)		16.9 ± 0.4	15.1 ± 0.1	16.2 ± 0.3	15.9 ± 0.0 8	16.6 ± 0.2	16.2 ± 0.1	17.1 ± 0.1	18.9 ± 0.2 5	13.8 ± 0.6	7.5 ± 0.4	9.0 ± 0.3	9.2 ± 0.0 4	11.3 ± 0.4	8.0 ± 0.2	8.5 ± 0.1	9.5 ± 0.07
Exchangeable cations (cmol+/kg)	Ca ²⁺	14.4 ± 0.3	14.8 ± 0.2	18.5 ± 1.2	17.1 ± 0.4 8	15.2 ± 0.2	15.6 ± 0.1	18.1 ± 0.6	20.5 ± 0.5 5	12.2 ± 0.5	7.5 ± 0.3	9.6 ± 0.2	9.8 ± 0.0 9	10.4 ± 0.4	7.9 ± 0.2	8.9 ± 0.1	9.9 ± 0.09
	Mg ²⁺	0.6 ± 0.02	0.53 ± 0.00	0.68 ± 0.0 4	0.59 ± 0.0 2	0.8 ± 0.0 2	0.67 ± 0.01	0.66 ± 0.2 4	1.02 ± 0.0 3	0.5 ± 0.0 1	0.24 ± 0.01	0.32 ± 0.0 0	0.39 ± 0.0 1	0.5 ± 0.02	0.33 \pm 0.01	0.44 ± 0.01	0.52 ± 0.00
	Na ⁺	1.6 ± 0.04	0.83 ± 0.01	0.92 ± 0.0 5	0.83 ± 0.0 3	0.3 ± 0.0 1	0.30 ± 0.01	0.28 ± 0.0 1	0.39 ± 0.0 1	0.7 ± 0.0 3	0.19 ± 0.01	0.78 ± 0.0 2	0.19 ± 0.0 0	0.1 ± 0.00	0.09 \pm 0.00	0.16 ± 0.00	0.11 ± 0.00

	K ⁺	0.3 ±0.01	0.00 ± 0.00	0.25 ±0.0 1	0.22 ±0.0 2	0.3 ±0.0 1	0.00 ± 0.00	0.30 ±0.0 1	0.30 ±0.0 1	0.4 ±0.0 1	0.13 ± 0.01	0.23 ±0.0 1	0.21 ±0.0 0	0.3 ±0.01	0.12 ± 0.00	0.37 ±0.00	0.29 ±0.01
Granulometry (n=1), %	Clay	17	23	/	/	18	24	/	/	9	34	/	/	11	25	/	/
	Silt	55	62	/	/	62	69	/	/	30	39	/	/	32	58	/	/
	Sand	15	15	/	/	10	7	/	/	26	27	/	/	7	17	/	/
	CaCO ₃	8	6	/	/	8	4	/	/	31	33	/	/	52	41	/	/

Table 4: Mean biological characteristics of 2019, 2021, 2022 soils used for experiments (n=3, mean \pm SD). S: Summer and W: Winter, FDA: fluorescein diacetate, DH: dehydrogenase, UR: urease, AWCD: average well colour developpement, VFS1_C_In: filter strips 1 inlet, VFS1_C_ref: filter strips 1 reference, VFS2_C_In: filter strips 2 inlet, VFS2_C_ref: filter strips 2 reference.

Soils		VFS1_C_In				VFS1_C_ref				VFS2_C_In				VFS2_C_ref			
Seasons		S	S	W	S	S	S	W	S	S	S	W	S	S	S	W	S
Sampling campaign		2019	2021	2021	2022	2019	2021	2021	2022	2019	2021	2021	2022	2019	2021	2021	2022
Enzymes ($\mu\text{g/gSS/h}$)	FDA	12.3 ± 2.1	4.4 ± 1.0	30.9 ± 2.1	18.8 ± 1.5	14.8 ± 4.2	3.0 ± 0.8	24.6 ± 3.3	20.9 ± 1.4	27.9 ± 5.7	6.1 ± 0.9	34.2 ± 3.6	20.3 ± 1.5	10.4 ± 2.1	6.1 ± 1.0	28.9 ± 1.7	28.4 ± 1.8
	DH	4.8 ± 1.1	11.0 ± 1.3	21.5 ± 2.0	16.5 ± 2.1	7.3 ± 0.8	12.9 ± 1.6	19.0 ± 2.1	24.6 ± 0.1	6.2 ± 0.9	9.1 ± 1.1	22.5 ± 2.0	20.6 ± 1.6	3.7 ± 0.6	12.9 ± 1.4	32.4 ± 1.3	26.2 ± 1.7
	UR	/	200 ± 24	737 ± 43	1162 ± 19	/	179 ± 22	630 ± 31	1019 ± 93	/	261 ± 23	756 ± 60	1405 ± 61	/	326 ± 14	806 ± 50	1766 ± 46
AWCD		/	0.08 ± 0.09	0.30 ± 0.07	0.13 ± 0.05	/	0.05 ± 0.04	0.32 ± 0.01	0.68 ± 0.05	/	0.01 ± 0.01	0.42 ± 0.15	0.50 ± 0.05	/	0.26 ± 0.07	0.25 ± 0.03	0.40 ± 0.18
Carbon source utilization (%)	Carbohydrate	/	32	44	43	/	19	31	27	/	79	26	24	/	27	45	26
	Carboxylic acid	/	12	18	43	/	12	25	33	/	21	36	32	/	26	19	23
	Amino acid	/	17	18	7	/	41	28	25	/	0	18	29	/	29	29	31
	Amine	/	0	0	0	/	0	3	6	/	0	5	2	/	0	0	8
	Polymer	/	38	21	7	/	28	13	10	/	0	15	13	/	18	6	13

Table 5: Mean biological characteristics of 2019, 2021, 2022 soils used for experiments (n=3, mean \pm SD). S: Summer and W: Winter, MPN: Most Probable Number, VFS1_C_In: filter strips 1 inlet, VFS1_C_ref: filter strips 1 reference, VFS2_C_In: filter strips 2 inlet, VFS2_C_ref: filter strips 2 reference, BFS_C: bioretention swale.

Soils	VFS1_C_In				VFS1_C_ref				BFS_C	
Seasons	S	S	W	S	S	S	W	S	S	S
Sampling campaign	2019	2021	2021	2022	2019	2021	2021	2022	2019	2021
MPN/gSS	/	2.80E+04 \pm 4.65E+03	7.25E+03 \pm 1.75E+03	2.97E+04 \pm 5.67E+03	/	1.64E+04 \pm 5.27E+03	8.73E+03 \pm 5.19E+03	2.34E+04 \pm 2.99E+03	/	4.79E+04 \pm 6.28E+03
Soils	VFS2_C_In				VFS2_C_ref				BFS_C	
Seasons	S	S	W	S	S	S	W	S	W	S
Years	2019	2021	2021	2022	2019	2021	2021	2022	2021	2022
MPN/gSS	/	5.54E+03 \pm 1.31E+03	7.87E+03 \pm 2.07E+03	3.50E+04 \pm 2.33E+04	/	4.73E+04 \pm 1.30E+04	2.80E+04 \pm 4.55E+03	2.40E+04 \pm 7.28E+03	1.63E+04 \pm 2.18E+03	2.84E+05 \pm 5.76E+04

Table 6: Mean physical, chemical and biological characteristics of 2019, 2021, 2022 soils used for experiments (n=3, mean \pm SD). S: Summer and W: Winter, OM: organic matter, FC: field capacity, CEC: Cation exchange capacity, MPN: Most Probable Number, FDA: fluorescein diacetate, DH: dehydrogenase, UR: urease, AWCD: average well colour development, BFS_C: bioretention swale

Soils		BFS_C			
Seasons		S	S	W	S
Sampling campaign		2019	2021	2021	2022
pH _{H2O}		8.49 ± 0.03	8.43 ± 0.02	8.32 ± 0.01	8.05 ± 0.02
pH _{KCl}		7.78 ± 0.01	7.46 ± 0.02	7.76 ± 0.01	7.58 ± 0.01
OM (%)		11.1 ± 0.11	10.0 ± 0.25	6.9 ± 0.20	13.6 ± 0.37
FC (%)		56.3 ± 4.2	50.4 ± 3.5	46.5 ± 2.1	67.6 ± 3.2
CEC (cmol+/kg)		12.6 ± 0.2	12.7 ± 0.6	10.8 ± 0.3	15.0 ± 0.16
Exchangeable cations (cmol+/kg)	Ca ²⁺	11.4 ± 0.2	12.7 ± 0.6	12.0 ± 0.5	16.6 ± 0.08
	Mg ²⁺	0.4 ± 0.00	0.58 ± 0.03	0.51 ± 0.02	0.66 ± 0.01
	Na ⁺	0.5 ± 0.00	0.19 ± 0.01	0.50 ± 0.03	0.39 ± 0.01
	K ⁺	0.3 ± 0.00	0.19 ± 0.01	0.24 ± 0.00	0.28 ± 0.04
Granulometry (n=1), %	Clay	10	27	/	/
	Silt	23	32	/	/
	Sand	41	41	/	/
	CaCO ₃	22	19	/	/

Soils		BFS_C			
Seasons		S	S	W	S
Sampling campaign		2019	2021	2021	2022
Enzymes (μ g/gSS/h)	FDA	24.9 ± 2.1	20.8 ± 2.2	16.5 ± 1.2	61.2 ± 4.3
	DH	6.8 ± 0.5	5.2 ± 0.6	15.8 ± 0.7	8.6 ± 0.2
	UR	/	271 ± 25	527 ± 51	764 ± 22
AWCD		/	0.07 ± 0.04	0.06 ± 0.05	0.41 ± 0.03
Carbon source utilization (%)	Carbohydrate	/	76	29	32
	Carboxylic acids	/	5	29	26
	Amino acids	/	17	29	24
	Amines	/	1	0	3
	Polymers	/	1	14	15

Table 7: Comparison of 5 Compans soils to obtain p-values with Friedman test. Average values for each physico-chemical and biological parameter obtained over 4 campaigns for each soil. OM: organic matter, FC: field capacity, CEC: Cation exchange capacity, MPN: Most Probable Number, FDA: fluorescein diacetate, DH: dehydrogenase, UR: urease, AWCD: average well colour development.

p-value	pH _{H2O}	pH _{kcl}	MO	FC	CEC	Ca ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	MPN	FDA	DH	UR	AWCD
VFS1_C_In/ VFS1_C_ref	0,417	0,680	0,194	0,537	0,682	0,682	0,095	0,377	0,414	0,820	1,000	0,267	0,500	0,500
VFS1_C_In/ VFS2_C_In	0,417	0,046	0,680	0,138	0,058	0,058	0,136	0,655	0,067	1,000	0,194	0,680	0,500	0,650
VFS1_C_In/ VFS2_C_ref	0,417	0,021	0,026	0,097	0,039	0,039	0,005	0,231	0,194	0,373	0,606	0,267	0,138	0,820
VFS1_C_In/ BFS_C	0,119	0,056	0,917	0,756	0,232	0,232	0,114	0,438	0,537	0,138	0,228	0,537	0,650	0,820
VFS1_C_ref/ VFS2_C_In	1,000	0,097	0,360	0,360	0,027	0,027	0,835	0,655	0,014	0,820	0,194	0,473	0,195	0,820
VFS1_C_ref/ VFS2_C_ref	1,000	0,046	0,267	0,267	0,018	0,018	0,136	0,737	0,046	0,272	0,606	1,000	0,046	0,650
VFS1_C_ref/ BFS_C	0,417	0,116	0,164	0,360	0,119	0,119	0,917	0,911	0,164	0,096	0,228	0,097	0,820	0,373
VFS2_C_In/ VFS2_C_ref	1,000	0,680	0,056	0,836	0,837	0,837	0,095	0,438	0,537	0,373	0,414	0,473	0,373	0,820
VFS2_C_In/ BFS_C	0,417	0,917	0,606	0,081	0,417	0,417	0,917	0,737	0,194	0,138	0,917	0,311	0,272	0,500
VFS2_C_ref/ BFS_C	0,417	0,606	0,021	0,056	0,314	0,314	0,114	0,655	0,473	0,500	0,473	0,097	0,067	0,650

The 5 soils from the 4 campaigns were compared with each other to highlight any differences or similarities. The p-values of the tests are shown in **Table 7**. With these results, we can say that there is no significant difference between VFS1_C_In and VFS1_C_ref for either physico-chemical or biological data. Nor is there any significant difference between VFS1_C_ref and BFS_C, or between VFS2_C_In and BFS_C. There are, however, several significant differences in the physico-chemical data between the other soils with pH_{kcl}, OM, FC, CEC, Ca²⁺, Na⁺ and Mg²⁺. Soil VFS2_C_ref differs the most from the other 4 soils. In terms of biological data, only one value differs significantly from the others: urease activity between VFS1_C_ref and VFS2_C_ref. The data from the 4 campaigns have been grouped together for each soil, showing that some soils have similar trends over the 3 years of sampling, combining weather conditions external to the soil, such as human activity with the disturbance of certain soils, and the seasons. Significant differences emerged between the 2 bands, which are of different constitution. On the other hand, few significant differences were seen between the inlet and reference zones for each strip. When we look at the data in **Tables 3 and 4**, differences in the data for the inlet and reference zones are visible in 2019, but are then less marked in the other campaigns. Clearing must have reset the differentiation between inlet and reference zones.

Now if we look at the data for summer 2021 to enable a comparison between soils in a single campaign. The physico-chemical and biological characteristics of the 3 Compans zones for the summer 2021 campaign are summarized in **Table 3, 4, 5 and 6**.

Physical and chemical soil properties

Looking at water pH (**Tables 3 and 6**), we can see that soil pH is basic to very basic (basic: 7.5-8.5; very basic: >8.5) according to the French soil report (“L’état des sols de France,” 2011)). There is little difference between VFS1_C and VFS2_C soils, although there is a significant difference with BFS_C. If we look at pH_{KCl} , we can see significant differences appearing between inlet and reference for each zone. A higher pH_{KCl} is observed in reference zone, but despite these significant differences, the values remain very close between the 5 soils. Based on these values the potential acidity of the soils ($pH_{water} - pH_{KCl}$) was calculated. VFS1_C_In has the highest potential acidity, which is lower in reference zone than in inlet zone of a same site and lower for the sandy loam than for the clay loam

If we look at organic matter (OM) (**Tables 3 and 6**), we find values ranging from 5.2 to 10% OM in these soils. These are low values, especially for VFS1_C and VFS2_C, which are below 10% (Henin et al., 1969), while BFS_C is at the limit between a poor and intermediate soil for OM. There are significant differences between Inlet/reference locations (more OM in inlet zone, probably due to the nutrient-rich runoff input upstream) and between SCMs, but these differences are not flagrant for VFS1_C and VFS2_C. The significant difference observed with BFS_C is more relevant, with almost twice as much OM in this soil as in the others. Compared with what can be found in the literature for stormwater management structures (Deeb et al., 2018): 3 to 18% and (Badin et al., 2011): 10 to 14%, with the exception of BFS_C, we have low OM values.

Field capacity (FC) (**Tables 3 and 6**), which is related to OM and texture, shows a high value for BFS_C with 50.4%, which has the highest OM, while the 4 other soils with less OM also have lower FC. There are no significant differences between the inlet and reference parts of the same zone, but there are significant differences between the 3 zones. For BFS_C, OM must be involved, while for the difference between VFS1_C (43%) and VFS2_C (37%), soil composition must be involved. The filtering substrate present in VFS2_C and BFS_C should not facilitate high FC, but its impact is reduced by the presence of a greater quantity of OM. VFS2_C, with the lowest FC and low OM, is unlikely to have a high water and nutrient potential, suggesting low biological activity (Kooch et al., 2020).

Cation exchange capacity (CEC) (**Tables 3 and 6**) shows significant differences between the 3 zones, with VFS2_C having the lowest CEC at 7.5 cmol+/kg and VFS1_C the highest at 16.2 cmol+/kg. At this level, soil texture is the parameter with the greatest influence on CEC. Inlet/reference location also plays a role, with significant differences with a higher CEC in reference zone, but differences linked to hydrological location are clearly less significant than those linked to soil texture. BFS_C has an intermediate CEC, and the greater OM in this soil than in VFS2_C should compensate for the presence of the filter substrate and improve soil quality. The filter substrate is composed of 60% carbonated sand, which limits the formation of clay-humus complexes, resulting in a low CEC. This is in line with what can be found in the literature, such as the work of (Domene et al., 2009), which shows that the lowest CEC is obtained with sand-rich soils (80% sand = CEC of 7 / 45% sand = CEC of 9 / 36% sand = CEC of 14). These soils are largely saturated with Ca^{2+} , which can be beneficial for the soil's biological activities, but there are also possible adverse effects, such as competition for the uptake of other, rarer elements (Baize and Girard, 2008).

For the final physico-chemical soil parameter (**Tables 3 and 6**), the granulometric composition shows the expected texture. VFS1_C is rich in silt, while VFS2_C and BFS_C are rich in sand and carbonate, reflecting the addition of the filter substrate in these 2 zones. To conclude on the results of the physico-chemical parameters for the 2021 campaign, we can see that BFS_C is the soil that shows the greatest aptitude for having a rich microbial population and biological activity: least basic pH, more OM, greater

FC and also fairly high CEC. VFS1_C and VFS2_C soils, on the other hand, are less likely to host rich communities. As a reminder, the soils in these 2 zones had been subjected to clearing 1 year prior to the sampling campaign, which is probably still having an impact on these soils (for example, the OM reserve has not yet had time to recover, which explains the low % present). Inlet/reference differences can be seen, but they are not flagrant. Once again, since the clearing took place 1 year earlier, the soils have certainly not yet had time to differ in response to the hydrological input. The big difference we see is between VFS1_C and VFS2_C, showing the impact of the addition of the filter substrate. For the time being, this filter substrate seems to have a negative impact on soil structure (OM, FC, lower CEC).

We will now look at the biological results of these 5 soils during the summer 2021 campaign, as shown in **Tables 4, 5 and 6**. We'll be looking at biomass richness, enzymatic activity and potential soil activity.

Biological soil properties

In **Table 5**, microbial biomass with most probable number (MPN) per gram of dry soil gives an estimate of heterotrophic microbial populations. 3 significantly different groups of soils can be identified based on MPN. VFS2_C_Down and BFS_C have the highest biomass ($4.7E+04$ MPN/gSS). VFS1_C_Up and VFS1_C_Down show intermediate biomass values around $2E+04$ MPN/gSS. VFS2_C_Up has the lowest biomass with $5.54E+03$ MPN/gSS. These results are surprising, since the reference soil in VFS2_C resembles BFS_C in terms of biomass quantity, whereas none of the physico-chemical parameters seen above suggest this. It should also be noted that we have low levels of microbial biomass in our soils, even in our richest soils. Indeed, natural soils show values of the order of $10E+7$ to $10E+9$ (Bidaud, 1998; Burns et al., 2013; Chaussod, 1996) and even with soils subjected to populations (Andreoni et al., 2004), the microbial biomass found is $3.9E+5$ CFU/g.

Soil enzymatic activity is an important parameter to study (**Tables 4 and 6**), as it reflects the state of the microbial communities present. There are several levels of enzymatic activity: the FDA represents overall microbial enzymatic activity, and there are enzymes present in particular cycles, which are therefore indicators of whether or not the cycle is functioning properly, such as dehydrogenase (DH), which is involved in the C cycle, and urease (UR), which is involved in the nitrogen cycle.

For FDA, there are significant differences in activity between the 3 SCMs. VFS1_C has the lowest FDA activity (no significant difference inlet/reference) with values around $4 \mu\text{g/gSS/h}$, VFS2_C has intermediate activity at $6 \mu\text{g/gSS/h}$, and BFS_C has the highest FDA activity at $21 \mu\text{g/gSS/h}$. Despite high activity for BFS_C, these values remain low compared with the literature. (Chaer et al., 2009) shows activity ranging from 29 to $35 \mu\text{g/gSS/h}$ for agricultural and forest soils, and (Unger et al., 2013) shows values of $40 \mu\text{g/gSS/h}$ for soils with alternative structures. The impact of hydrological location is not shown with these results, but soil texture comes into play with a higher activity in the presence of the filter substrate.

For DH, there is no clear significant difference between VFS1_C and VFS2_C, however there is a significant difference with BFS_C which has the lowest DH activity with $5 \mu\text{g/gSS/h}$ instead of values around $10 \mu\text{g/gSS/h}$ for the other soils. The low DH activity for BFS_C may be explained by the monoculture of *Carex gracilis*, which could limit the selection of populations involved in the C cycle or select populations less active for this cycle in particular. Various results are found in the bibliography, with values between $35-70 \mu\text{g/gSS/h}$ for (Unger et al., 2013) and values between $0.75-18.9 \mu\text{g/gSS/h}$ for (Andreoni et al., 2004).

For UR, the values are much higher than for the other enzymes, with results around 200 $\mu\text{g/gSS/h}$. There is no difference in activity between soils in VFS1_C (around 200 $\mu\text{g/gSS/h}$), a significant difference is present for VFS2_C with a high activity in reference zone 326 $\mu\text{g/gSS/h}$, BFS_C has an activity similar to the soil inlet of VFS2_C (VFS2_C_Up) which is intermediate. The presence of the filter substrate seems to have an impact on UR activity, and location also impacts activity. Soil reference of VFS2_C is less subject to pollution from hydrological input along roads, and is therefore less subject to selection pressure, which could result in greater UR activity. In the literature, we find a wide range of results with (Andreoni et al., 2004; Bueis et al., 2018) having values ranging from 18.4 to 71.3 $\mu\text{g/gSS/h}$ while (Jat et al., 2021)'s work has values of 319.6 $\mu\text{g urea/g soil/h}$. These large differences between the studies can be explained either by experimental differences, which limit the comparison between the studies, or by microorganism present in soils that are highly specialized in the nitrogen cycle.

Now, to look at microbial activity potential (**Tables 4 and 6**), we'll look at the AWCD obtained using Biolog Ecoplate (Gomez et al., 2006). The highest AWCD is found in the VFS2_C_ref soil, with a value of 0.26, while the other soils have very low activities, not exceeding 0.1. A comparison with the AWCD found in the literature shows that the activity of our soils is very low, even for VFS2_C_ref. Usually, the AWCD is found to be around 1 (Mkhinini et al., 2020) and the low values obtained are around 0.4 (Koner et al., 2022). The soil is therefore not very active. A closer look at the sources of carbons preferentially used reveals significant variations, and above all, some are hardly used at all. Amines, for example, are not used as a source of C by the microorganisms in these 5 soils. Polymers are used in VFS1_C and VFS2_C_ref. The 2 soils using the least diverse C sources are VFS2_C_In and BFS_C. We saw earlier that VFS2_C_In was not very rich in microorganisms and was less active, which is in line with what we obtained, but we would have expected more diversity in the use of C sources for BFS_C. Vegetation can intervene at this level, as the monoculture of BFS_C will limit the diversity of microbial communities in this zone, resulting in a lower number of available metabolic pathways within these communities.

To conclude with the results for summer 2021, we can see that VFS1_C without the filter substrate, although showing some variations in physico-chemical parameters between inlet and reference, will not show much variation from a biological point of view. VFS2_C and BFS_C with filter substrate, on the other hand, show more varied results. The biological results for VFS2_C_In are in line with the physico-chemical results: low biological activity due to poor soil conditions, not very conducive to microbial development. On the other hand, VFS2_C_ref, whose physico-chemical results are just as unfavorable for microbial development, has much higher microbial activity and biomass than VFS2_C_In. Does hydrological location allow reference microbial communities to develop better? This is not the case in VFS1_C. The impact of the filtering substrate associated with location could explain this difference. In the 3rd zone, the physico-chemical values are higher, more conducive to development, yet microbial activity remains average. It should be pointed out that, despite these differences between the 5 soils, the results obtained are low in comparison with the literature. BFS_C is a young structure, 5 years old at the time of the campaign, coupled with a monoculture which does not facilitate the development of a diverse microbial community. The other 2 zones are technically older structures, but the clearing that took place 1 year before the campaign restored the soil to its initial state, which is reflected in the results obtained.

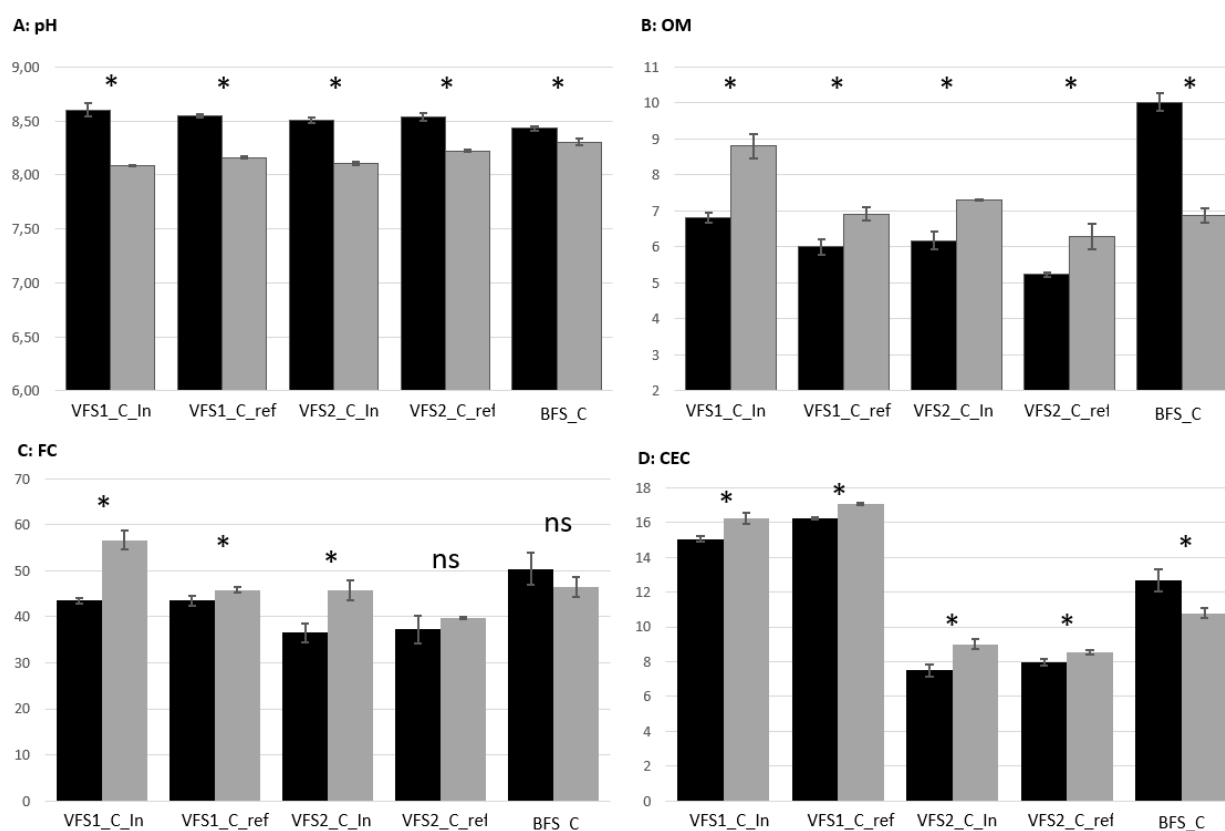
3.2. Soils physical, chemical and biological properties evolution

Comparison between 2019 and 2021 campaigns

The comparison between campaigns begins with the observable trend between the 2019 and 2021 campaigns. As a reminder, in June 2020 campaigns, the 2 strips were de-sashed while the swale was not. In **Table 3**, the physico-chemical data for the 4 shredded soils show a clear trend, with a decrease in all values in 2021. For the biological data in **Table 4**, there are 2 trends observed: for FDA, a decrease in enzymatic activity is visible in 2021 compared to 2019 values for all 4 soils, while for DH, an increase in enzymatic activity is obtained. If we now look at the physico-chemical and biological data for the swale in **Table 6**, we can see a very different trend from the strip soils. There are some slight differences from one campaign to the next, but no clear decrease in physico-chemical and FDA values. There is no increase in DH in 2021 for the swale compared with the other 4 soils. These results clearly illustrate the impact of structure maintenance. One year after the maintenance of the 2 Compans grass strips, the physico-chemical and biological data are still different from the values obtained before de-silting. The fact that the data for the swale remained unchanged between 2019 and 2021 clearly points to the impact of de-silting on the observations made with the strips. Maintenance operations can negatively impact parameters such as their effect on associated plants and microorganisms, organic matter (content and type), and consequences on chemical properties (exchange, pH, etc).

Comparison between summer and winter campaigns in 2021

Now the objective is to determine the seasonal influence on these physico-chemical soil parameters. The summer/winter results for a same soil will be compared to find out if there are significant differences or if there are no significant differences in the results between seasons.



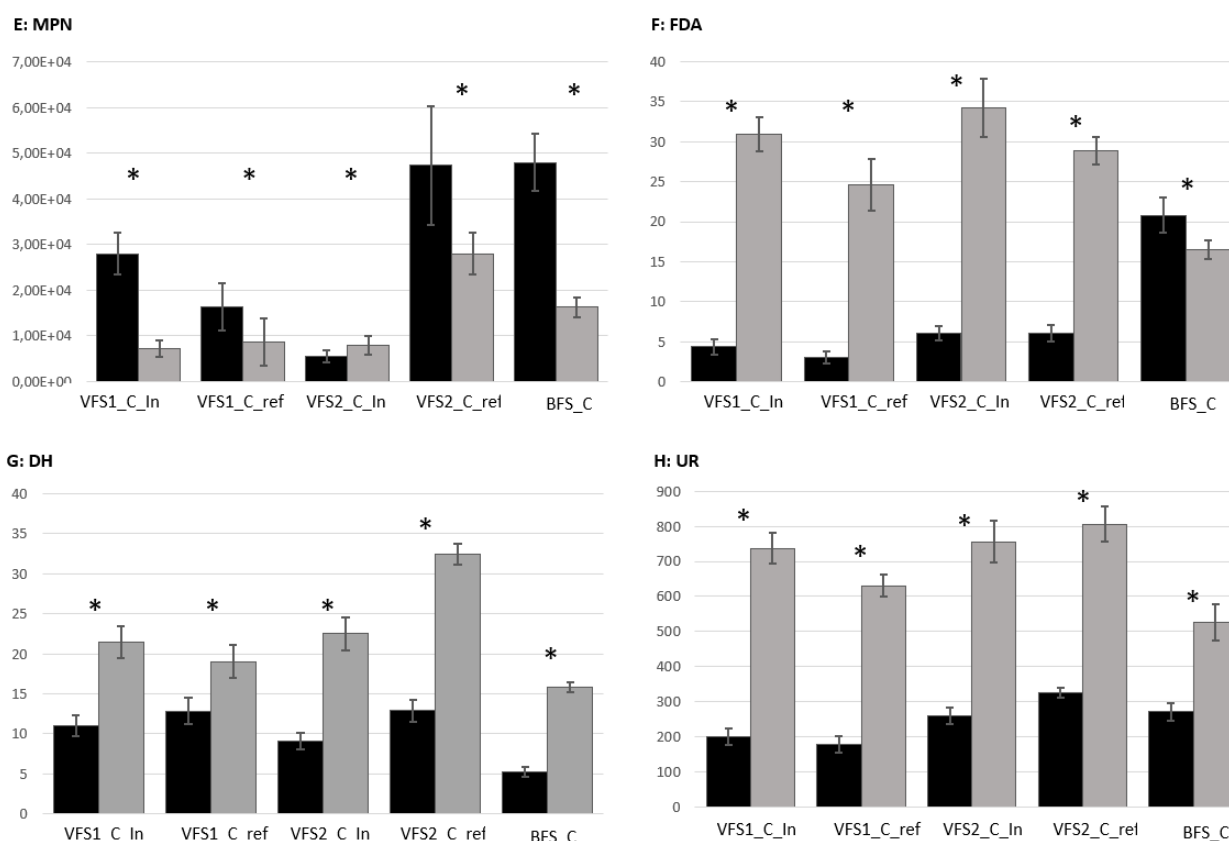


Figure 4: Mean physical and chemical characteristics of summer (dark histogram) and winter (light histogram) soils used for experiments (n=3, mean \pm SD). A = pH; B = OM: organic matter (%); C = FC: field capacity (%); D = CEC: Cation exchange capacity (cmol+/kg); E = MPN (MPN/gSS); F = FDA (μ g/gSS/h); G = DH (μ g/gSS/h); H= UR (μ g/gSS/h). For each graph, the 2021/2022 results are examined with Conover-Iman test of multiple comparisons after Kruskal-Wallis non-parametric test. Significant summer/winter differences of the same soil are represented by (*) and (ns) when there is no significant difference.

In **figure 4**, there is a visible impact of the seasons on the inlet soils of Compans soils. For these soils, an acidification is observed. For Compans site, the acidification is observed for the 5 soils but especially for the strip soils. The soil disturbance surely intervenes in this pH shift, the soils return to less basic pH levels. For the swale, there is a significant difference in pH between summer and winter, but it remains a negligible difference compared to the other soils.

It is possible to find studies on the physico-chemical characteristics of soils and the impact of seasons such as the work of (Kopecky et al., 2011). In this work (upper horizon of the forest soil: 0-10cm), there was no significant difference in pH between summer and winter soils. They also look at the OM of the soils and this time they observe a significant increase of OM in winter compared to summer soils. In the work of (Muscolo et al., 2014), with forest soils (0-5cm), there is no significant change in OM between the 4 seasons studied (summer, fall, winter, spring). With our results, there are then 2 trends: either there is a significant increase of OM in winter with the soils inlet of the Compans strips or there is a significant decrease of OM in winter with the swale. For the Compans strips, the impact of the derasement is still visible here with an increase in OM of the 4 impacted soils.

The pattern changes for FC, there is a significant increase in FC in winter for the inlet Compans soils. There is no significant difference in FC for the reference soils of Compans as well as for the swale. For

CEC, there is a significant increase in CEC for the Compans strip soil and finally a significant decrease in CEC for the swale.

First, we can see the significant impact of the seasons on the results of these different parameters. However, these differences must be related to the other criteria studied, which are spatial heterogeneity (inlet/reference), age, and the structure maintenance actions. Indeed, it is often found that the inlet soils are the most impacted in winter compared to the reference soils.

Following the analysis of the physico-chemical results, several points stand out: i) the 3 sites have very different soils, ii) the soils within the same site are also different, iii) the influence of the plants, the structure's age, the spatial heterogeneity, the sites' maintenance, the seasons is observed. Now we want to know how this will be reflected from biological point of view. This is why we move on to the analysis of soil microbial communities with the determination of biomass, activity and microbial diversity.

The microbial biomass of soils was estimated by the Most Probable Number (MPN) which is a statistical estimate, this estimate only concerns cultivable heterotrophic microorganisms. This method only gives us an idea about the soil richness, variations can occur.

To start with the summer soils, the Compans soils are poor in microbial biomass with values of $5.54\text{E}+03$ to $4.79\text{E}+04$ NPP/gSS. Significant differences are present between inlet and reference. In winter, the microbial biomass decreases for all soils. These variations may stem from seasonal influences and divergent microbial population dynamics between summer and winter. Alternatively, this variability could result from the MPN method's inherent lack of precision.

If we look at these results with what we find in natural soils, we have biomasses that are globally low. Bidaud, (1998), Burns and al. (2013) et Chaussod, (1996) estimate the quantity of bacteria in the soil ranging from 10^7 to 10^9 . By looking at soils subjected to pollution as in the work of (Andreoni et al., 2004), the microbial biomass reaches $3.9\text{E}+5$ CFU/g. However, other soils subjected to pollution can show a higher biomass as can be seen in the work of (Wu et al., 2017). Their soil subjected to oil pollution has a biomass of $2.3\text{E}+7$ cells/g. There are several methods to determine microbial biomass (MPN, direct counting, substrate-induced respiration: SIR, fumigation extraction method: (Badin, 2011), etc), literature comparisons to estimate the richness of one soil compared to others are only an indication.

In summer, a slight significant difference In/ref is visible for VFS1_C (4 and 3 $\mu\text{g/gSS/h}$), no significant difference for VFS2_C (6 $\mu\text{g/gSS/h}$) and BFS_C is the most active soil in Compans (20 $\mu\text{g/gSS/h}$).

The FDA activity values for the VFS are low, but for BFS_C, the values are not so low when compared with other work. Indeed, with the work of Chaer et al. (2009), we find values ranging from 29 to 35 $\mu\text{g/gSS/h}$ for agricultural and forest soils and with work on alternative structures (Unger et al., 2013), we find values of 40 $\mu\text{g/gSS/h}$ (vegetative filter strips). It is rather the results found in inlet zone that show a very high activity.

Other results show that the activity of the FDA can be impacted by xenobiotic stresses with a strong inhibition of its activity (Andreoni et al., 2004; Tao et al., 2021). With the results of Andreoni et al. (2004), three soils were studied: a soil polluted with PAHs for 50 years with no detectable FDA activity, a soil with no significant pollution with an activity of 186 $\mu\text{g/gSS/h}$ and a last soil that had suffered a pollution accident three years ago with an activity of 8.5 $\mu\text{g/gSS/h}$. This last soil after a bioremediation treatment shows an activity in FDA of 162 $\mu\text{g/gSS/h}$.

Microbial selections can occur in sites subjected to constant pollution at limited levels of contamination, so that populations more capable of biodegrading micropollutants can be found inlet

of sites with high FDA activities, as they will be populations adapted to this environment. Reference soils that are less subject to selection pressure may have a less adapted community and therefore have lower activities.

In winter, we note a strong increase in FDA activity in strips.

For the dehydrogenase activity (DH) in summer, an activity around 11 $\mu\text{gTPF/gSS/h}$ are present in the strip's soils. The BFS_C is the least active in dehydrogenase: the monoculture of *Carex gracilis* may be involved in this lack of activity, less active or less diverse microbial populations. For Compans, the ref soils are not significantly different while VFS2_C has a significantly lower activity than VFS1_C. It is possible that the greater hydrological impacts in inlet of the alternative structures with inputs (nutrients, micropollutants) will mostly influence the inlet microbial populations (positively or negatively). Work by Andreoni et al. (2004) and Unger et al. (2013) provides activities that differ greatly from our values 35-70 $\mu\text{gTPF/gSS/h}$ (Unger et al., 2013) and 0.748-18.9 $\mu\text{gTPF/gSS/h}$ (Andreoni et al., 2004).

In winter, overall, we have a DH activity that is more important.

For urease (UR) activity in summer, a urease activity is observed, ranging from 179 to 326 $\mu\text{gNH}_4^+/\text{gSS/h}$. And finally, for urease activity in winter soils, a higher activity significantly is visible ranging from 527 to 806 $\mu\text{gNH}_4^+/\text{gSS/h}$.

The values of urease activity obtained differ greatly from what can be found in the literature, differences in the protocols establishment may intervene in this phenomenon (Nannipieri et al., 2012). For example, for the work of Błonska et al. (2016) the NH_4^+ concentration was measured at 410 nm instead of 665nm for us or Gopinath et al. (2008) which is based on the work of Tabatabai and Bremner (1972) for the implementation of its protocol, Kandeler and Gerber (1988) for us.

The values found in the literature range from 18.4 to 71.3 $\mu\text{g/g/h}$ (Andreoni et al., 2004; Bueis et al., 2018). In the work of Jat et al. (2021), values at 319.6 $\mu\text{g urea/g soil/h}$ are found. With the results of Badji. (2011), it can be seen that urease activity increases with organic matter inputs up to 477.1 $\mu\text{gNH}_4^+/\text{gSS/hr}$. The work of E.-H. Chang et al. (2007) also shows the increase in urease activity with organic matter inputs (although the magnitude is lower), from 47 $\mu\text{gNH}_4^+/\text{gSS/h}$ to 84 $\mu\text{gNH}_4^+/\text{gSS/h}$. But overall, our soils show very high urease enzyme activity.

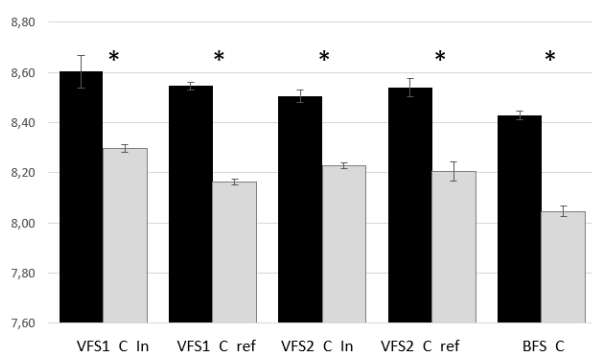
Comparison between 2021 and 2022 campaigns

The Compans soil investigation 1 year after clearing revealed a low level of biological activity in the soils, with physico-chemical parameters that were also sub-optimal for this activity. For this reason, a second campaign was carried out in July 2022 in order to observe the evolution of these soils over time. The 5 Compans soils were therefore sampled in the summer of 2022 in order to re-analyze the physico-chemical and biological parameters. The strips will then have had 2 years to evolve since they were cleared.

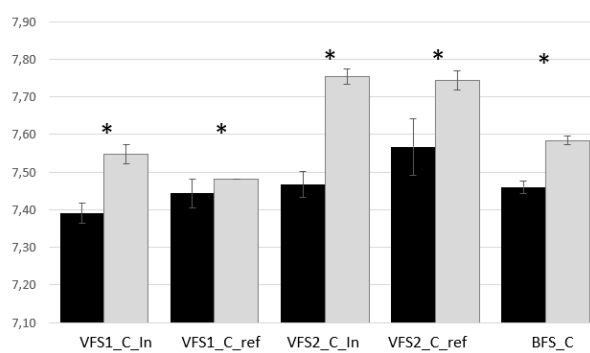
Looking first at the physico-chemical parameters represented in **Figure 5**, we can see a clear evolution (significantly different) of all Compans soils in 2022 (grey) compared to the 2021 results (black). For pH water, we move from values between 8.4-8.6 to values between 8.0-8.2, we have an acidification of these soils which will bring the pH of these soils closer to more neutral values, more optimal for biological development. And inversely, with pH_{KCl} , there is an increase in pH, with values between $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}}$ and pH_{KCl} , the potential acidity of the soils will decrease. The amount of organic matter present in these soils will also increase significantly for 4 soils (except VFS2_C_In). An increase of

almost 2% is observed for the 3 other soils in VFS1_C and VFS2_C, and for the swale, an increase of almost 4%. This increase in OM will also translate into an increase in FC. The lowest FC in 2022, at 50%, is that of the VFS2_C_In soil, which has had little enrichment in OM, while the others will reach a FC of 55 to almost 70%. CEC will also evolve, and an increase is observed for all soils following the 2021 values. In other words, the soils in this zone will have a higher CEC in 2022 than in 2021, but it will still be much lower than the CECs in VFS1_C and BFS_C. Overall, there has been an improvement in Compans soils, with a drop in pH and an increase in soil nutrient reserves, but the results are still very average. For the OM of the strips, for example, we remain closer to the values found in planted or forest soils with 7-8% OM (Kooch et al., 2020) than to the values of alternative structures (Badin et al., 2011; Deeb et al., 2018), most often exceeding 10% OM. The swale, 6 years old in 2022, continues to evolve towards values more conducive to biological development. Inlet/reference location and soil texture do not seem to have much influence on the evolution of the physico-chemical parameters of these soils.

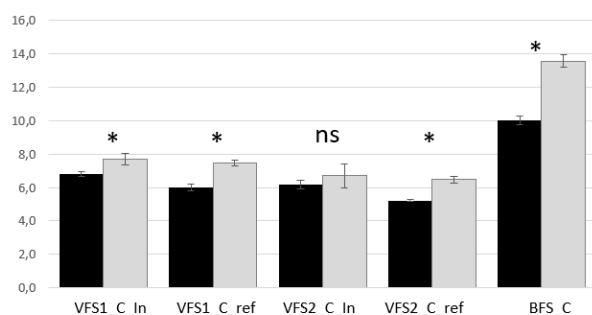
A: pH_{H2O}



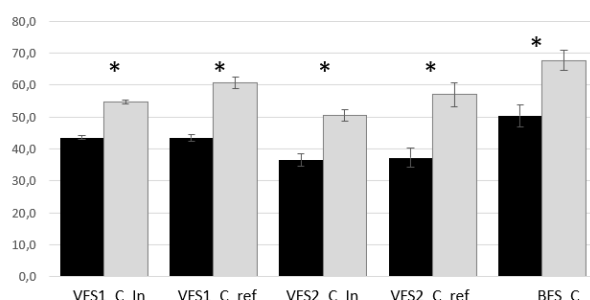
B: pH_{KCl}



C: OM



D: FC



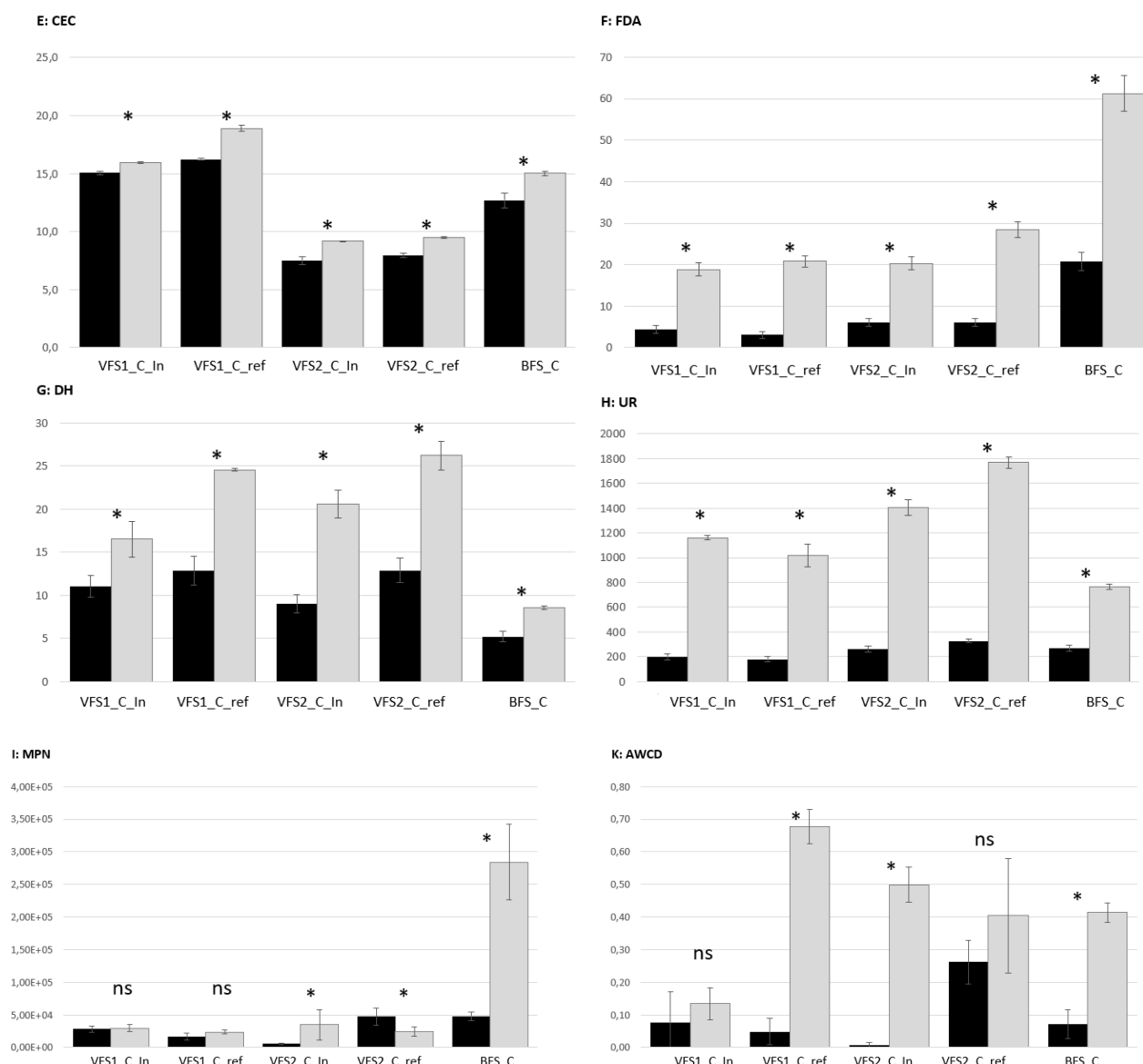


Figure 5: Mean physical and chemical characteristics of 2021 (dark histogram) and 2022 (light histogram) soils used for experiments (n=3, mean \pm SD). A = pH_{H2O}; B = pH_{KCl}; C = OM : organic matter (%); D = FC : field capacity (%); E = CEC : Cation exchange capacity (cmol+/kg); F = FDA (μ g/gSS/h); G = DH (μ g/gSS/h); H = UR (μ g/gSS/h); I = MPN (MPN/gSS); J = AWCD For each graph, the 2021/2022 results are examined with Conover-Iman test of multiple comparisons after Kruskal-Wallis non-parametric test. Significant summer/winter differences of the same soil are represented by (*) and (ns) when there is no significant difference.

Now if we look at the biological parameters of these 5 soils in 2022 compared to the 2021 results in **Fig. 5**. Starting with microbial biomass (**Fig. 5I**), a very strong increase in this biomass is observed in the swale with almost 3.0E+05 MPN/gSS in 2022 compared to 2021 with just 5.0E+04 MPN/gSS. There are significant differences in VFS2_C, with an increase in biomass in inlet zone and a decrease in reference zone. For VFS1_C, there is no significant difference between 2021 and 2022. It should be noted, however, that the values for VFS1_C and VFS2_C remain close from one year to the next, at around 10E+04 MPN/gSS. Biomass levels tend to stagnate in VFS1_C and VFS2_C, while a sharp increase is observed in BFS_C. A very strong increase in enzymatic activity can also be observed for all 5 soils and for all 3 enzymes tested. For FDA (**Fig. 5F**), activity almost triples for all 5 soils, giving an

activity of around 20 $\mu\text{g/gSS/h}$ for VFS1_C and VFS2_C, and 60 $\mu\text{g/gSS/h}$ for BFS_C. These values are close to Unger2013's figure of 40 $\mu\text{g/gSS/h}$ with vegetated filter strips. For DH (**Fig. 5G**), activity almost doubled for all soils, reaching close to 25 $\mu\text{g/gSS/h}$ for the most active. For UR (**Fig. 5H**), the activity of the bands will increase by a factor of 5 in 2022, while the activity of the swale will triple, reaching values ranging from 764 to 1766 $\mu\text{g/gSS/hr}$. This time, urease activity is much higher than that reported in the literature. The work of (Badji, 2011) shows an increase in urease activity after OM amendment of up to 477 $\mu\text{g/gSS/hr}$. A small increase in OM is observed in the results shown in **Fig. 5**, but this may have been sufficient to boost microbial activity. Finally, on the results of potential activity with Ecolog analysis (**Fig. 5K**), we can see 3 soils that strongly increased their activity: VFS1_C_ref, VFS2_C_In and BFS_C. There is no significant difference between 2021 and 2022 for VFS2_C_ref, but its activity in 2021 was already high. In the end, only VFS1_C_In remained unchanged in 2022. Looking at **Figure 6** with the use of different carbon sources between 2021 and 2022, we can see an evolution in the use of sources for the 5 soils. In the case of VFS1_C_In, which shows no increased activity, we can see a decrease in its metabolic diversity, with 2 preferred sources (carbohydrate and carboxylic acid) to the detriment of amino acids and polymers. The other soils, on the other hand, will increase their metabolic diversity. Whereas in 2021, these soils were using between 1 and 4 sources of C, they will now all be using all 5 possible sources.

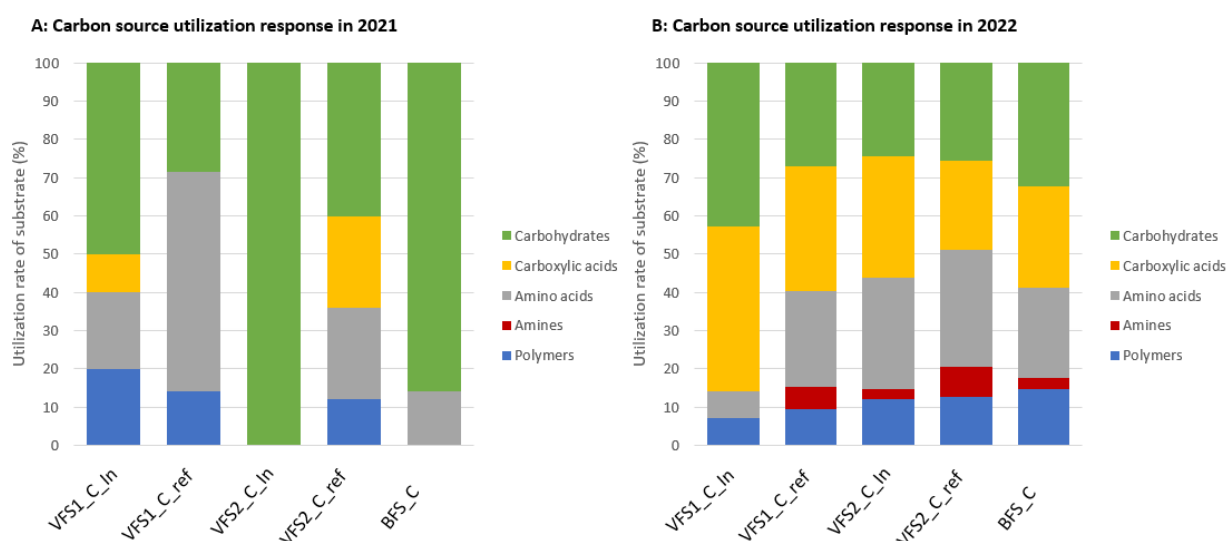


Figure 6: (A) Representation in % of the use of the 5 carbon sources of Biolog Ecoplate in 2021 according to 5 soils analyzed, (B) representation in % of the use of the 5 carbon sources of Biolog Ecoplate in 2022 according to 5 soils analyzed.

Looking at soil biomass and microbial activity, it is possible to see a clear evolution of these 5 soils. The soil inlet of VFS1_C shows perhaps the smallest increase in microbial activity, demonstrating the impact of hydrological location and texture on soil evolution over time. Soils inlet of hydrological inputs that are more subject to micropollutant inputs will find it harder to build up rich, varied populations. The 6-year-old swale appears to be continuing to evolve, building up a more diverse community that is certainly better adapted to the selection pressures of the environment. Next, what is interesting to study, and which constitutes the final part of the analyses for the 2021 campaign, is the genetic diversity of these soils, and to see if, for example, we have a more limited diversity for BFS_C.

Microbial communities were studied using soil from stormwater management structures at Compans. The microbial study was carried out in relation to various parameters such as site age, hydrological location, texture and years (2021, 2022) in order to gain a better understanding of how these structures function.

Biodiversity indices

The Shannon entropy, emphasizing the "richness" aspect of diversity, shows a fairly homogeneous trend among the samples. The bacteria richness component of diversity 2021 soils was between 9.04 to 10.11 and the 2022 soils diversity was between 7.15 to 9.74. The VFS1_C_ref soil sampled in 2022 is the soil with the lowest diversity (7.15), while the BFS_C soil sampled in 2021 is the richest (10.11). With the exception of the VFS1_C_ref soil sampled in 2022, whose diversity decreased in 2022, the bacterial richness of the other soils appears to have stagnated from one year to the next. The "fungal richness" component of diversity is weaker than bacterial richness. The "fungal richness" component of diversity in 2021 soils ranged from 6.05 to 6.71 and in 2022 soils from 6.76 to 8.03. Unlike bacterial richness, fungal richness increases from one year to the next.

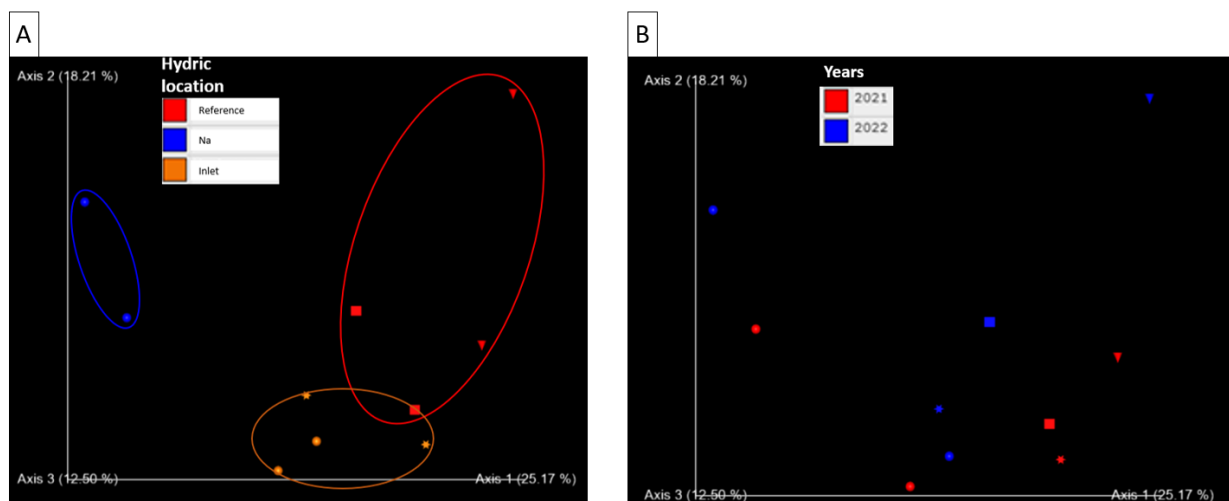


Figure 7: Beta diversity (bacteria) of the 10 soils study according to: A: soil location in relation to rainwater runoff; B: sampling year. The first two dimensions of a principal component analysis are plotted based on Bray-Curtis distances. Samples are color coded according to the conditions: A: red = Reference, orange = Inlet, blue = NA (without distinction); B: red = 2021 campaign, blue = 2022 campaign.

Samples were significantly separated according to hydric location (PERMANOVA, $p < 0.05$). Looking at the Bray-curtis distances in **Figure 7A**, it is possible to see 3 distinct groups separated according to hydric location. On the other hand, when we look at soils according to sampling year (**Fig. 7B**), the distinctions are less obvious.

Microbial community structure in stormwater management soils over time

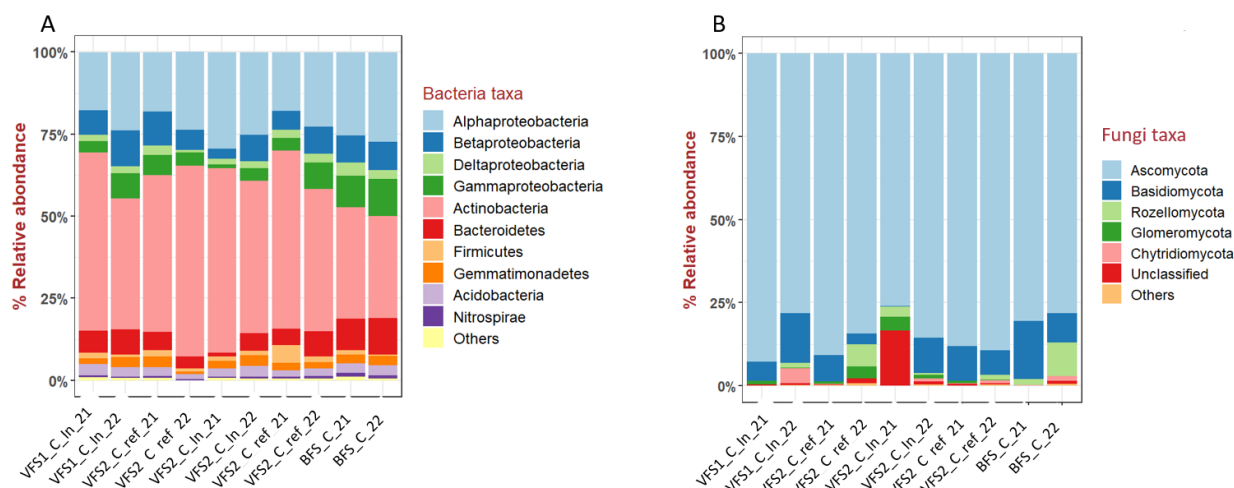


Figure 8: The average relative abundances of all the major phylum in 2021 and 2022 soils, Proteobacteria are divided in classes (with relative abundance higher than 1%). A: Bacteria taxa, B: Fungi taxa. The phylum with relative abundance lower than 1% were grouped as “others”.

For bacteria (**Fig. 8A**), the 2 most abundant phyla in 2021 (X_21) are Proteobacteria (30 to 47%) and Actinobacteria (33 to 56%). Soils in the Compans grass strips have a majority of Actinobacteria, while the Compans swale have a majority of Proteobacteria. Among the Proteobacteria, the Alphaproteobacteria class is the most abundant. Bacteroidetes represent 5 to 10% of bacteria taxa in all soils except VFS2_C_Up, which has only 1% of this phylum. Looking at the 2022 soils (X_22), a slight decrease in Actinobacteria was observed. Nevertheless, the overall composition of the bacterial community remains the same from one year to the next in phylum terms.

For fungi (**Fig. 8B**), the Ascomycota phylum (76 to 93%) is the most abundant for the 5 soils studied in 2021 (X_21). Basidiomycota (6 to 17%) was then the 2nd dominant phylum in most soils, except for VFS2_C_In (<1%). VFS2_C_In will have 16% of its abundance unclassified. When we look at the 2022 data (X_22), we can see the emergence of a phylum for 2 soils (Rozellomycota), while for VFS_C the unclassified part which was important in 2021 almost disappears.

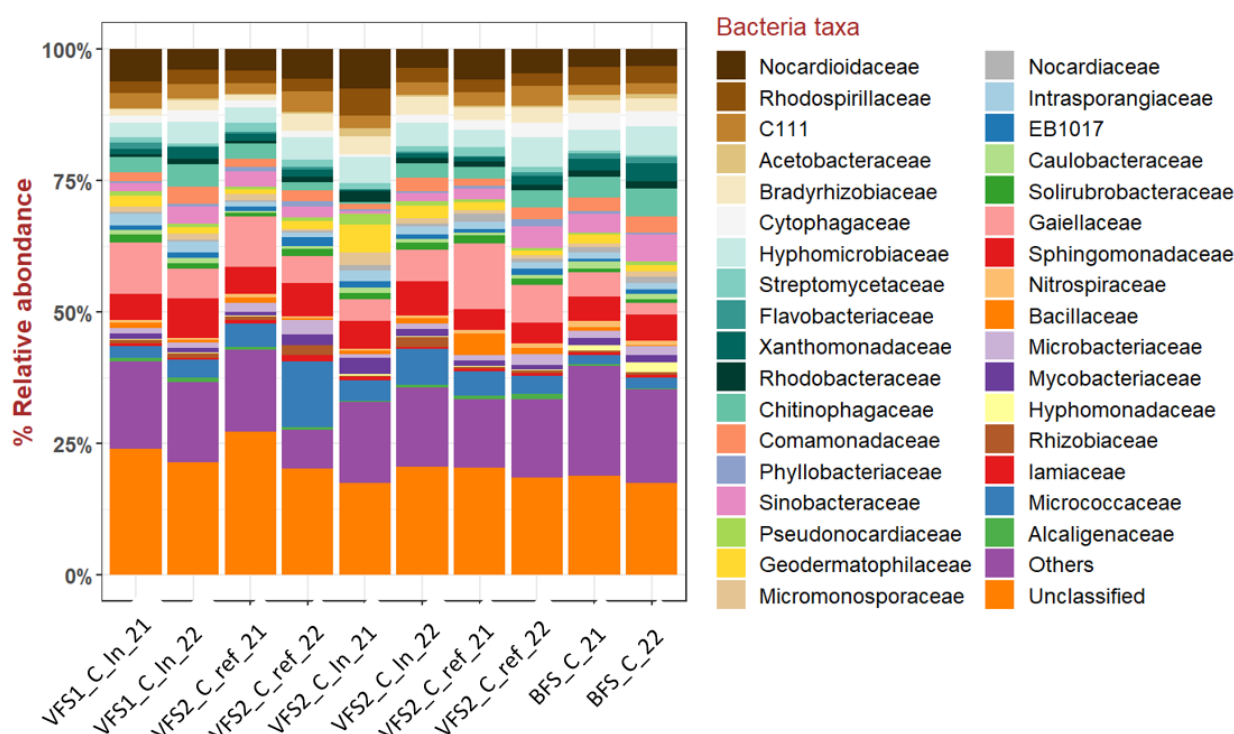


Figure 9: The average relative abundances of all the major family (with relative abundance higher than 1%) in samples in 2021 and 2022 soils. The family with relative abundance lower than 1% were grouped as “others”.

Further phylogenetic analysis of these soils revealed approximately thirty bacterial families (**Fig. 9**). The families present in soils are diverse. Looking at the soils of 2021 (X₂₁), although the trends are similar between soils, VFS2_C_In and BFS_C will be slightly different from the others. For example, BFS_C will have more Comamonadaceae, Chitinophagaceae, Xanthomonadaceae, Nitrospiraceae, Hyphomonadaceae and less Streptomyetaceae. VFS2_C_In will have a higher relative abundance of Bradyrhizobiaceae, Pseudonocardiaceae, Geodermatophilaceae and a lower relative abundance of Cytophagaceae, Chitinophagaceae, Sinobacteraceae, Microbacteriaceae. Putting these data together with the previous biological results, BFS_C had higher activity and VFS2_C_In had lower activity than the others, these genetic differences may be the explanation. There are other differences, this time depending on selected parameters such as hydric localization and texture. The Nocardioideaceae family will be more abundant in inlet zone of the 2 grass strips at 6 and 7%, compared with 4 and 5% respectively (same observation for the Caulobacteraceae family). In terms of texture, Rhodobacteraceae and Nocardiaceae are less abundant in VFS1_C, which consists of fine silt, than in VFS2_C, which consists of sandy silt. Now with 2022 soils (X₂₂), a decrease in the Gaiellaceae family abundance is present. For VFS1_C_ref and VFS2_C_In, an increase in Micrococcaceae and Rhizobiaceae abundance is also clearly visible.

Looking at the families more abundant with BFS_C than others in the bibliographies, we can see that they are linked to the biodegradation of PMs. Hyphomonadaceae has been shown to be involved in the biodegradation of microplastics and some species in the biodegradation of hydrocarbons (Chai et al., 2020; Roager and Sonnenschein, 2019). Comamonadaceae is a family implicated in the biodegradation of BTEX compounds and phenanthrene (Révész et al., 2020; Yi et al., 2022). The Chitinophagaceae family is involved in the biodegradation of PAHs (Singleton et al., 2016) and the Xanthomonadaceae family is involved in the biodegradation of MPs such as PCP and carbamazepine

(Lin et al., 2016; Thelusmond et al., 2016). The microorganisms present in this soil will have a broad spectrum of MP biodegradation and will be able to participate actively in soil bioremediation. This time, when we look at the microorganisms that stand out in the least active soil (VFS2_C_In), we return to the work of (Singleton et al., 2016) with the PAH biodegradation by the Bradyrhizobiaceae. The Geodermatophilaceae family will also be found in the bibliography (Bourceret et al., 2018) for PAH biodegradation, but in unplanted soils. It's true that in the VFS2_C_In soil in 2021, i.e., 1 year after clearing, the vegetation inlet was poor.

The main point is that we find bacterial families capable of PM biodegradation in this site's soils, and that these populations evolve over time. However, the communities present need to be linked to soil quality, because even if they are present, they won't necessarily be in a functionally active state. A qPCR analysis could have been a valuable means of differentiating between soils in terms of activity.

3.3. Relation between 2021 and 2022 campaign soils results

The PCA shown in **Fig. 10** illustrates the physico-chemical and biological results of the soils over the years. The first axis (Dim1) will explain 39.3% of the results and the second axis (Dim2) 27.1%. As shown in **Fig. 10B**, axis 1 is positively correlated with FDA, FC, UR, AWCD, OM, MPN and negatively correlated with water pH. Axis 2 is positively correlated with DH, Silt and negatively correlated with Sand. The variables CEC, pH KCl, CaCO₃ and Clay contribute little to these axes. Now, if we look at the individuals in **Fig. 10A**, we can see 2 distinct groups separated by year. The 2021 soil group is negatively correlated with axes 1 and 2, and the 2022 soil group is positively correlated with axes 1 and 2. BFS_C is, however, quite distant from the other soils in each year. These graphs clearly show the impact of soil evolution over time, with a positive correlation of physico-chemical and biological parameters in 2022 (and a negative one for water pH, which is normal as pH decreases towards neutrality).

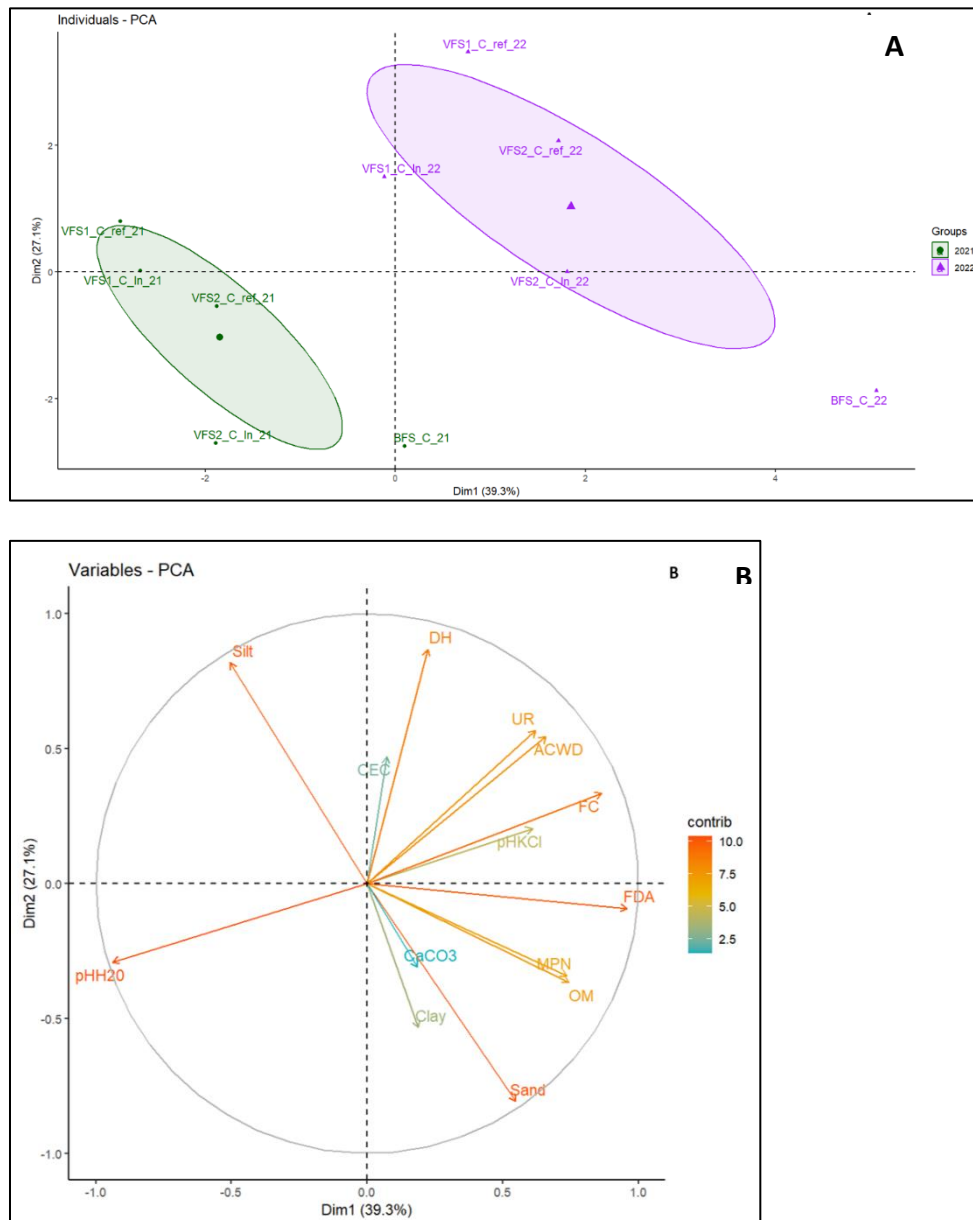


Figure 10: Soil properties PCA of 2021 and 2022 campaigns, (A) PCA of 2021 and 2022 individus showing the influence of time on site, the first and second axes explained 39% and 27% of the total variance. (B) PCA of 2021 and 2022 variables (organic matter (OM), pH, field capacity (FC), cation exchange capacity (CEC), Most Probable Number (MPN), fluorescein diacetate (FDA), dehydrogenase (DH), urease (UR), average well colour developpement (AWCD)), the first and second axes explained 39% and 27% of the total variance

4. Conclusion

As a reminder, the objective was to observe the evolution of the stormwater management structures at the source in Compans over time and in relation to various parameters such as seasons, human activities, and hydrological localization

After one year, we observe the evolution of these five soils as follows: there's an improvement in physico-chemical characteristics such as pH and organic matter, along with an enhancement in biomass and soil biological activity. We note some alterations in microbial communities. The observed

enhancement in enzymatic and potential activities (Biolog) doesn't solely result from a shift in communities but also from an improved soil condition, facilitating better expression of these communities. Some effects related to texture and water distribution emerge, albeit with minimal impact.

What particularly stands out from these findings is the overall condition of the soil in 2021, characterized by low organic matter content, microbial biomass, and activity. Although we observe improvement in these soils by 2022, it remains marginal. The clearing of the two grass strips in 2020 noticeably impacted the soil, affecting its physico-chemical characteristics and consequently the biological activities of soil organisms, particularly microorganisms. This poses a significant challenge as it hampers the functioning of these structures, limiting their ability to biodegrade micropollutants efficiently. Hence, it's imperative to strategize management approaches to mitigate this latency period, such as amending sites with nutrient-rich soil and implementing vegetation planting initiatives.

5. Acknowledgements

This research was carried out under the OPUR research program (<https://leesu.univ-paris-est.fr/opur/>). The authors gratefully acknowledge OPUR partners for their financial support, as well as the French territorial collectivities which collaborated in the present study, by allowing the authors to carry out soil samplings and measurements in their infiltration facilities.

Thanks to the team at CEA Cadarache for their collaboration in analyzing the sequencing data

Chapitre 6 : Conclusion générale et perspectives

1. Rappel des objectifs

L'objectif fondamental de cette thèse résidait dans l'analyse approfondie du fonctionnement microbiologique des ouvrages de gestion à la source des eaux pluviales urbaines, afin de mieux appréhender le potentiel de biodégradation des micropolluants organiques piégés dans leur sol. Une telle compréhension est essentielle pour optimiser à la fois leur conception et leur maintenance, et mieux évaluer leur performance à court et long terme. Cette étude s'inscrit dans une démarche globale d'amélioration des infrastructures vertes, intégrant les aspects écologiques et hydrologiques, afin de mieux répondre aux défis actuels liés à la gestion des eaux urbaines et à la durabilité des écosystèmes.

Les travaux menés dans cette thèse ont été structurés autour de trois grands axes, développés respectivement dans les chapitres 3, 4 et 5, chacun abordant une facette spécifique du fonctionnement de ces ouvrages.

Dans un premier temps, le travail de recherche s'est concentré sur l'étude comparative d'un panel diversifié d'ouvrages de gestion à la source des eaux pluviales, sélectionnés sur la base d'un ensemble de critères incluant notamment l'ancienneté de leur mise en service, la texture des sols, la composition et la densité du couvert végétal, ainsi que leur positionnement hydrologique et géographique. Ce sont de plus des ouvrages de gestion de ruissellement de voirie qui ont été ciblés et sur des sites avec un potentiel de contamination de ces ruissellement élevé. L'objectif de cette première phase était d'établir des corrélations entre les propriétés physico-chimiques des sols et leurs caractéristiques biologiques, notamment l'activité, la diversité microbienne et enzymatique. Cette approche comparative permet ainsi d'identifier des patterns récurrents ou des divergences spécifiques susceptibles d'influencer le fonctionnement de ces infrastructures. L'identification de ces facteurs pourrait, à terme, permettre de mieux prédire la performance de ces ouvrages dans différents contextes environnementaux.

Le second axe de recherche s'intéresse aux capacités intrinsèques de ces ouvrages à dégrader les micropolluants grâce à l'action des populations microbiennes indigènes présentes dans les sols. Deux expérimentations distinctes ont été mises en œuvre dans ce cadre pour évaluer l'efficacité de la biodégradation microbienne. La première expérimentation, réalisée en batch liquide, a permis de tester les capacités de biodégradation de 3 micropolluants (Bisphénol A, nonylphénol et octylphénol) sur l'ensemble des sols prélevés des ouvrages étudiés (11 sols prélevés de 5 ouvrages) dans la première partie de la thèse. La seconde expérimentation, plus spécifique, a consisté en une cinétique de biodégradation réalisée sur des colonnes de sol dopées en micropolluants organiques (BPA, OP, NP), se concentrant sur deux ouvrages présentant des caractéristiques particulièrement prometteuses en termes de potentiel de dépollution. Cette approche expérimentale a permis de mettre en évidence les dynamiques de biodégradation et de mieux comprendre les processus microbiens à l'œuvre dans ces systèmes.

Enfin, le troisième axe de cette thèse s'intéresse à l'évolution des ouvrages de gestion des eaux pluviales au cours du temps, avec une attention particulière portée à l'impact des interventions anthropiques sur leur fonctionnement. À travers l'étude d'un ouvrage particulier avant et après une opération de maintenance lourde (dérasement), ce travail vise à quantifier les effets de ces actions sur la dynamique biologique et physico-chimique des sols, offrant ainsi des pistes pour l'optimisation des pratiques d'entretien de ces infrastructures.

2. Principaux résultats

Les résultats expérimentaux obtenus au cours de cette thèse sont issus d'un ensemble rigoureux de quatre campagnes d'échantillonnages réalisées sur trois sites distincts : Dourdan, Vitry, et Compans, tous situés dans la région périphérique de Paris, en France. Ces campagnes ont permis de collecter des données de manière méthodique et approfondie, couvrant une période significative pour capturer les variations saisonnières et les dynamiques spatio-temporelles influençant la biologie des sols et les mécanismes de gestion des eaux pluviales.

Les sites sélectionnés ont été choisis selon plusieurs critères spécifiques, incluant leur capacité de récupération des eaux de ruissellement de voirie, la nature et l'intensité de la pollution à laquelle ces ouvrages sont exposés, ainsi que le couvert végétal. De plus, la texture des sols, variant du sable limoneux à l'argile, a constitué un paramètre clé pour évaluer la diversité des réponses biologiques observées. La durée de mise en service des ouvrages a également été prise en compte, offrant une perspective évolutive sur leur fonctionnement à différents stades de leur cycle de vie.

Les résultats obtenus sont synthétisés à travers trois projets d'articles, chacun traitant d'une dimension spécifique du fonctionnement des ouvrages de gestion des eaux pluviales, et dont les conclusions sont discutées de manière approfondie dans la dernière section de cette thèse. Ces articles présentent des analyses détaillées des données physico-chimiques, microbiologiques et de dégradation des polluants, permettant de mieux comprendre les interactions complexes entre les facteurs environnementaux et biologiques dans le contexte de ces infrastructures.

Ces travaux ont ainsi permis de dégager des tendances globales, tout en mettant en lumière des variations locales et spécifiques qui soulignent l'importance de la prise en compte des conditions environnementales propres à chaque site pour l'optimisation des ouvrages de gestion des eaux pluviales.

Chapitre 3 : Comparaisons de trois ouvrages de gestion des eaux pluviales au cours des saisons

Ce projet d'article porte sur l'étude des caractéristiques physico-chimiques et biologiques des sols de cinq ouvrages de gestion des eaux pluviales situés sur trois sites distincts : Dourdan, Vitry, et Compans, en Île-de-France. Les analyses physico-chimiques ont porté sur des indicateurs tels que le pH, la matière organique (MO), la capacité d'échange cationique (CEC), la granulométrie et la capacité au champ. En parallèle, des paramètres biologiques ont été mesurés, incluant la biomasse microbienne (par la mesure de la production primaire nette, NPP), l'activité enzymatique (tests FDA, déshydrogénase, uréase), ainsi que la diversité et l'activité potentielle microbienne à travers des analyses de plaques BIOLOG EcoPlate™ et la caractérisation de la diversité génétique bactérienne et fongique.

Pour affiner cette étude, les cinq ouvrages ont été subdivisés en 11 échantillons de sol, sélectionnés selon deux critères supplémentaires : la couverture végétale et la localisation hydrique. Cette dernière a été évaluée en comparant les zones proches de l'entrée des eaux de ruissellement avec des zones de référence, situées plus éloignées de l'arrivée des eaux. Le site de Dourdan, le plus ancien, est en service depuis 25 ans, tandis que celui de Vitry a 15 ans d'ancienneté. À Compans, les ouvrages sont plus récents, avec des bandes enherbées ayant subi un dérasement en juin 2020 (1 an d'ancienneté au moment de la première campagne en 2021) et une noue âgée de 5 ans.

Les principaux résultats révèlent une corrélation entre l'ancienneté des ouvrages et l'enrichissement des sols en matière organique et en biomasse microbienne. Les sites les plus anciens, à savoir Dourdan

et Vitry, se distinguent par une activité microbienne et enzymatique élevée, en particulier comparée aux sols de Compans, plus récents et significativement plus pauvres en matière organique et en biomasse. En outre, des différences marquées ont été observées en fonction de la localisation hydrique. Les sols situés à l'entrée des eaux de ruissellement, notamment à Dourdan et Vitry, montrent des niveaux d'activité biologique bien supérieurs à ceux des zones de référence. Enfin, l'impact de la végétation sur l'activité biologique est particulièrement notable sur le site de Vitry.

Chapitre 4 : Etude de la capacité de biodégradation des micropolluants par les microorganismes du sol des ouvrages de gestion des eaux pluviales

Une cinétique de biodégradation en batch liquide a été réalisée en utilisant les 11 échantillons de sols issus de la campagne d'échantillonnage de l'été 2021 décrite dans l'article I. L'objectif de cette expérience était d'évaluer les capacités microbiennes des communautés autochtones à dégrader certains micropolluants spécifiques, à savoir le bisphénol A (BPA), le nonylphénol (NP) et l'octylphénol (OP), et d'identifier les communautés les plus performantes en termes de biodégradation. Un milieu de culture liquide simplifié, basé sur le Basal Salt Medium (BSM), a été utilisé pour mener l'expérience, maintenue à 25°C sur une période de 17 jours. Les concentrations en micropolluants ajoutés au milieu ont été ajustées pour se rapprocher des niveaux observés dans les environnements naturels. Des témoins biotiques (sans ajout de micropolluants) et abiotiques (sans présence de microorganismes) ont été menés en parallèle pour servir de référence.

Tout au long de la cinétique, des mesures régulières ont été effectuées, incluant des analyses du pH, de la biomasse microbienne (NPP), de l'activité microbienne (plaque Ecologue), et des dosages des concentrations en micropolluants. En fin de cinétique, un séquençage des communautés bactériennes a été réalisé pour analyser l'évolution des populations microbiennes.

Les résultats obtenus ont montré des variations notables dans les capacités de biodégradation des micropolluants en fonction des sites et des échantillons de sols. Sur le site de Dourdan, la biodégradation complète des trois micropolluants a été observée. En revanche, sur le site de Vitry, trois sols sur quatre ont présenté une dégradation préférentielle du BPA, tandis que le quatrième sol a montré une capacité plus élevée à dégrader le NP et l'OP. Sur le site de Compans, seule la noue de 5 ans a montré une dégradation efficace des trois micropolluants, les autres sols de Compans étant inefficaces à cet égard.

À la fin de la cinétique, une réduction significative de la diversité bactérienne a été observée dans tous les sols par rapport aux témoins biotiques, indiquant une sélection microbienne liée à l'exposition aux micropolluants. Les communautés méthylotrophes se sont avérées prédominantes, avec des différences de profils selon les sols : dans les sols biodégradant efficacement les micropolluants, les familles **Methylophilaceae** étaient soit dominantes, soit accompagnées d'autres familles méthylotrophes ; dans les sols inefficaces, la famille **Methylobacteriaceae** dominait.

Une seconde phase de l'expérience a été réalisée avec les deux sols les plus performants : celui à l'entrée des eaux de ruissellement de Dourdan et la noue de Compans. Ces sols ont été soumis à une cinétique en colonne, simulant des conditions plus proches de la réalité environnementale. Comme dans l'expérience en batch liquide, les sols prélevés *in-situ* dans la zone la plus soumise au ruissellement ont été dopés avec le même cocktail de micropolluants et incubés à 25°C pendant 21 jours. Des témoins biotiques et abiotiques ont également été mis en place pour cette expérience. Les

analyses réalisées ont porté sur le pH, la concentration en micropolluants, la biomasse microbienne (NPP), l'activité enzymatique (FDA et plaques BIOLOG EcoPlate™), ainsi que la diversité bactérienne.

Les résultats de la cinétique en colonne ont révélé une stimulation de la croissance microbienne et de l'activité enzymatique dans les deux sols, en particulier à Dourdan. La biodégradation des micropolluants a été observée, mais aucune préférence marquée pour un type de micropolluant n'a été détectée. De plus, les témoins biotiques n'ont pas montré de biodégradation significative des micropolluants présents dans le sol des ouvrages, suggérant que ces derniers pourraient ne pas être facilement accessibles aux microorganismes. En effet, une partie des micropolluants pourrait être piégée dans les sols sous forme particulaire, soit adsorbée de manière stable sur des particules solides, soit intégrée dans la matrice des particules (comme celles des pneus). Ce processus limite ainsi la biodisponibilité des micropolluants et, par conséquent, leur biodégradation.

Chapitre 5 : Evolution au cours du temps des ouvrages de gestion des eaux pluviales situés à Compans

Cette partie s'est concentrée sur l'étude du site de Compans, qui comprend trois ouvrages de gestion des eaux pluviales distincts mais alimentés par les eaux de ruissellement de la même voirie, ce qui permet une analyse comparative approfondie tout en réduisant l'influence de biais environnementaux externes. Ces trois ouvrages sont composés d'une bande enherbée simple, d'une bande enherbée avec un substrat filtrant, et d'une noue également constituée d'un substrat filtrant. Les deux bandes enherbées ont subi un dérasement en juin 2020, un processus consistant à retirer les 10 premiers centimètres de sol sans remplacement. Cela a permis d'examiner les effets de cette pratique sur la dynamique des sols et leur activité microbiologique.

Des campagnes d'échantillonnage ont été menées en juin 2021, février 2022 et juillet 2022, et complétées par des données antérieures de juin 2019. Pour chaque campagne, une caractérisation détaillée des propriétés physico-chimiques (pH, matière organique [MO], capacité d'échange cationique [CEC], capacité au champ, granulométrie) et biologiques (biomasse microbienne [NPP], activité enzymatique [FDA, déshydrogénase, uréase], activité potentielle [plaques BIOLOG EcoPlate™], ainsi que la diversité génétique des communautés bactériennes et fongiques) a été réalisée.

Les résultats montrent l'impact significatif du dérasement de 2020 sur les deux bandes enherbées. Les sols, qui étaient en 2019 relativement riches en matière organique et caractérisés par une forte activité biologique, sont devenus très pauvres en 2021, avec une chute notable de la biomasse microbienne et une activité microbienne nettement réduite. Cette diminution de la fertilité biologique a été observée de manière homogène, quelle que soit la localisation hydrologique (entrée des eaux de ruissellement ou zones de référence).

Les sols des deux bandes enherbées, que ce soit au niveau des zones d'entrée du ruissellement ou de référence, ont montré des niveaux très bas de matière organique et de biomasse microbienne en 2021, accompagnés d'une activité enzymatique quasi inexistante. En comparaison, la noue, âgée de 5 ans a montré une activité microbienne plus soutenue, bien qu'elle se situe dans la moyenne des résultats obtenus pour ce type de structure.

Cependant, les résultats des campagnes de 2022 révèlent une reprise progressive de la matière organique et une augmentation significative de l'activité microbienne dans les sols des bandes enherbées. Des variations subtiles mais notables ont également été observées dans la structure des

communautés microbiennes, indiquant une possible réorganisation des populations microbiennes en réponse aux changements dans le sol.

Les faibles niveaux d'activité observés en 2021 semblent être attribuables à la difficulté des microorganismes à s'adapter à l'environnement devenu beaucoup plus pauvre après le dérasement. Il est probable que la lente récupération des sols en matière organique et en activité biologique soit liée à la réintroduction progressive de matières nutritives et à la résilience écologique des communautés microbiennes face à cette perturbation anthropique.

3. Discussion

Le premier objectif de cette thèse était d'examiner le comportement physico-chimique et biologique de plusieurs ouvrages de gestion des eaux pluviales afin de mieux comprendre leur fonctionnement et, à terme, d'optimiser leur conception et leur entretien. L'analyse des sols situés à l'entrée des eaux de ruissellement, qui reçoivent directement les eaux pluviales riches en micropolluants et en nutriments, a révélé que ces zones sont généralement les plus actives biologiquement, comme observé sur les sites de Dourdan et Vitry. Cette corrélation entre l'exposition directe aux eaux de ruissellement et une forte activité biologique est un point central pour comprendre la dynamique des sols dans ces ouvrages.

Toutefois, cette tendance n'est pas systématique. À Vitry, les quatre sols étudiés montrent des variations importantes en fonction de la végétation présente. En effet, contrairement à ce qui a été observé à Dourdan, certains sols situés plus loin des points d'entrée des eaux montrent une activité biologique comparable, voire supérieure, en raison de la présence d'arbres ou d'herbacées. Cela suggère que la végétation joue un rôle déterminant dans la modulation de l'activité biologique des sols, probablement en influençant à la fois la rétention d'eau et les apports en matière organique via la litière. Ces résultats soulignent l'importance de conduire des études plus approfondies sur l'impact des types de végétation choisis lors de la construction des ouvrages pour optimiser leur efficacité.

Le site de Compans a fourni une autre dimension à cette analyse en raison de l'intervention de maintenance effectuée en 2020, qui a consisté à déraser les 10 premiers centimètres de sol dans deux des ouvrages. Cette action a considérablement affecté le fonctionnement biologique des sols, comme en témoigne la chute drastique de la biomasse microbienne et de l'activité enzymatique observée lors des campagnes d'échantillonnage de 2021. Il a fallu environ deux ans pour que les sols retrouvent une activité microbienne acceptable.

L'accotement, de par sa géométrie (très faible décaissement par rapport à la route et faible pente) est sujet à une montée progressive du niveau de sol (par accumulation de sédiment mais aussi développement de la litière végétale), qui au bout de quelques années bloque l'écoulement des eaux de ruissellement induisant des risques pour les automobilistes et rendant le dérasement indispensable.

Compte tenu de l'impact très délétère de ce dérasement sur le fonctionnement biologique du système, il est souhaitable de revoir la géométrie du système pour limiter la fréquence de ces interventions voir s'en affranchir, ou alors de séparer les fonctions d'accotement (qui accueille les véhicules faisant des sorties de route) et la fonction gestion des eaux pluviales.

S'il s'agit d'une voirie urbaine avec une vitesse de circulation limitée, on peut remplacer l'accotement filtrant par une noue assez large et à faible pente directement accolée à la chaussée.

Dans le cas d'une voirie à plus forte vitesse de circulation où l'accotement est indispensable pour des questions de sécurité, l'accotement pourrait être réalisé en revêtement peu infiltrant et suivi d'une noue filtrante.

Des actions pourraient cependant être faites pour limiter les impacts du dérasement sur l'écosystème du sol. Il serait possible de faire des amendements organiques visant à rétablir plus rapidement la fertilité biologique des sols ou alors semer les sols après dérasement pourrait aussi aider les populations du sol. Cette réflexion est renforcée par l'exemple du site de Dourdan, où l'absence de travaux de maintenance majeurs a permis de maintenir une activité biologique très élevée sur le long terme. Cela suggère également que l'âge des ouvrages pourrait jouer un rôle clé dans la performance écologique de ces infrastructures.

En intégrant ces observations sur les caractéristiques physico-chimiques et biologiques des sols avec les résultats sur les capacités de biodégradation, on peut établir une relation directe entre l'activité microbienne et l'efficacité de la biodégradation des micropolluants. Le site de Dourdan, avec ses sols les plus riches en matière organique et en biomasse microbienne, a montré une capacité supérieure à biodégrader les micropolluants étudiés (BPA, NP et OP), en comparaison avec les sites de Vitry et de Compans. Les résultats intermédiaires obtenus à Vitry et dans la noue de Compans confirment cette relation, tandis que les bandes enherbées de Compans, qui présentaient les plus faibles niveaux de biomasse microbienne en 2021, ont montré une faible capacité de biodégradation, en cohérence avec les résultats obtenus lors des analyses physico-chimiques.

Dans les sols de départ, comme les micropolluants dans les structures sont présents à des concentrations environnementales, la pression de sélection permet une grande diversité microbienne. Les différences dans les communautés microbiennes sont surtout visibles entre les 3 sites. Mais Dourdan et Vitry semblent avoir une plus grande sélection de populations mieux adaptées aux sols contaminés. Suite à la biodégradation en batch liquide, une forte sélection est visible. Dourdan et Vitry par exemple, présentaient une dominance marquée de méthylotrophe (*Methylothera*, *Hydrogenophaga*, etc) Brunhoferova et al., 2022, Montenegro et al., 2021, Guo et al., 2020.

Cette forte sélection microbienne lors de la cinétique en batch liquide montre d'une part que ces populations sont présentes dans les sols et que leur développement va être stimulé en présence de fortes concentrations de micropolluants en phase dissoute. Mais d'autre part, cela montre aussi les limites de la biodégradation en batch liquide car ces populations ne sont pas dominantes dans les sols de départ. Les conditions d'essai du batch ne sont pas représentatives de celle du sol et conduisent à des réactions qui ne sont pas celles des conditions naturelles. On observe donc des communautés microbiennes qui ont un potentiel d'adaptation et un potentiel de biodégradation face aux micropolluants.

D'autre part, une autre hypothèse, soutenue par les résultats obtenus à Compans, est que la biodégradation des micropolluants ne dépend pas uniquement de la composition des communautés microbiennes, mais également des conditions environnementales qui optimisent leur activité. En effet, bien que la structure des communautés microbiennes à Compans ait peu changé entre 2021 et 2022, l'activité biologique a significativement augmenté, suggérant que l'amélioration de l'environnement (apports en nutriments, hydratation du sol, etc.) peut stimuler le métabolisme des microorganismes existants, même sans sélection microbienne marquée.

Ces deux mécanismes, la sélection microbienne et l'amélioration des conditions environnementales, peuvent interagir de manière complexe dans les différents ouvrages étudiés. Par exemple, à Dourdan, la longue période sans maintenance couplée à une exposition continue aux eaux pluviales pourrait avoir favorisé une stabilisation des conditions environnementales propices à l'activité des

microorganismes. À l'inverse, à Compans, la réhabilitation des sols après le dérasement semble davantage liée à une restauration des conditions physico-chimiques permettant la réactivation des communautés microbiennes présentes.

Pour la cinétique en colonne, l'ajout des micropolluants a eu peu d'impact sur les communautés microbiennes qui reste très diverses. Par rapport à la cinétique en batch liquide qui a soumis les populations à une très forte pression aboutissant à une réduction de la diversité génétique, les communautés en colonne sont plus représentatives de la réalité. Une biodégradation est observée dans les sols dopés mais pas dans les sols initiaux qui est pourtant contaminé. Ces cinétiques de biodégradation sont sans doute représentatives de la dégradation de la fraction des polluants apportés sous forme dissoute et adsorbée aux particules du sol. La question du devenir de la fraction particulaire des polluants se pose. Il semblerait qu'il y ait une fraction faiblement disponible pour les microorganismes et qui s'accumule dans le temps ?

En conclusion, cette thèse montre que la performance des ouvrages de gestion des eaux pluviales, tant en termes de fonctionnement biologique que de capacité à biodégrader les micropolluants, dépend d'une interaction complexe entre les propriétés physico-chimiques des sols, la structure des communautés microbiennes, la végétation et les pratiques de maintenance. Une meilleure compréhension de ces dynamiques, à travers des études supplémentaires sur le rôle de la végétation et l'optimisation des pratiques de maintenance, pourrait conduire à des recommandations concrètes pour améliorer la résilience et l'efficacité de ces infrastructures écologiques sur le long terme.

4. Perspectives

Pour compléter les analyses réalisées dans cette thèse, il serait pertinent d'explorer plus en profondeur le rôle des plantes dans le fonctionnement des ouvrages de gestion des eaux pluviales. Les plantes entretiennent des interactions complexes avec les microorganismes du sol, favorisant à la fois l'optimisation de leur activité et l'augmentation de leur résistance face aux stress environnementaux. L'étude des interactions plantes-microorganismes pourrait être approfondie en mettant en place des expérimentations en colonne avec des sols provenant des sites de Compans et Dourdan, mais intégrant des espèces végétales variées. Ces essais permettraient d'observer comment différentes plantes influencent la structure et l'activité des communautés microbiennes, particulièrement en termes de biodégradation des micropolluants.

En outre, il est largement reconnu que l'écosystème du sol ne se limite pas aux microorganismes et aux plantes. Les organismes plus grands, comme les vers de terre et autres macrofaunes du sol, jouent également un rôle clé dans la structuration du sol, la dégradation de la matière organique et l'amélioration de la porosité, ce qui peut indirectement influencer l'activité microbienne. Une perspective prometteuse serait donc d'élargir les études en incluant la macrofaune pour mieux comprendre l'ensemble de l'écosystème souterrain et ses contributions au fonctionnement optimal des ouvrages. Par exemple, l'ajout d'études sur les effets de la bioturbation par les vers de terre sur la redistribution des micropolluants et la stimulation de la biodiversité microbienne pourrait ouvrir de nouvelles voies d'investigation.

Il faut de plus noter la limite de la cinétique de biodégradation en colonnes qui ne contenait que 3 micropolluants organiques, ce qui est bien loin de la réalité dans les sols. Il est cependant compliqué de rajouter trop de micropolluants dans une cinétique, il pourrait être envisageable de chercher d'autres micropolluants à étudier. Mais sinon, il serait possible d'imaginer une étude in situ avec

l'étude du ruissellement de voirie réelle. Cette étude in situ pourrait également permettre l'étude microbienne avec un tronçon témoin (les microorganismes autochtones du sol sans rien d'autre), un tronçon avec les microorganismes autochtones booster par ajout par exemple d'une source de C et un tronçon qui pourraitensemencer avec des microorganismes sélectionnés en laboratoire (connus pour faire la biodégradation des micropolluants). Cela permettrait également de récupérer l'action de l'écosystème du sol en entier.

Il serait également possible de faire un suivi de la structure des communautés microbiennes du sol sur plusieurs années après la mise en œuvre d'un ouvrage afin de mieux observer les sélections microbiennes qui peuvent intervenir.

D'un point de vue moléculaire, une approche complémentaire consisterait à utiliser des techniques de qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) pour cibler des gènes spécifiques impliqués dans les mécanismes de biodégradation des micropolluants. L'identification et la quantification de ces gènes fonctionnels, par exemple ceux codant pour des enzymes comme les monooxygénases ou les hydrolases, donneraient des informations précises sur les populations microbiennes réellement impliquées dans ces processus. Cette approche génomique permettrait d'établir des comparaisons fines entre différents sols en termes d'activité microbienne spécifique et de mieux comprendre les dynamiques écologiques qui sous-tendent la dégradation des micropolluants.

En intégrant ces perspectives, les travaux futurs pourraient non seulement mieux caractériser les interactions complexes entre les plantes, la macrofaune et les microorganismes, mais aussi fournir des outils plus précis pour évaluer l'efficacité des ouvrages de gestion des eaux pluviales. Une telle approche globale, à l'échelle de l'écosystème, pourrait conduire à des recommandations concrètes pour la conception de solutions plus durables, résilientes et efficaces face aux pollutions émergentes.

Listes des tables et figures

Chapitre 1 : Etat des connaissances

Tableau 1 : Paramètres et valeurs seuils d'intensités obtenues par modélisation pour l'élimination des micropolluants dans l'eau proposés par le programme ScorePP

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques d'un ensemble de polluants ainsi que leur occurrence et concentration dans les eaux de ruissellements

Tableau 3 : Taux de conservation des amorces universelles dans les souches bactériennes

Tableau 4 : Effet de l'utilisation des terres du bassin versant sur le nombre de copies de gènes dans les sols des jardins et comparaison avec les sols des hautes terres

Tableau 5 : Effet du régime de végétation dominant présent dans les jardins de pluie sur le nombre de copies de gènes dans les sols jardins de pluie

Tableau 6 : Exemples de remédiation réussie des hydrocarbures dans le sol par l'utilisation combinée de plantes et de bactéries endophytes

Tableau 7 : Regroupement d'espèces microbiennes capables de faire la biodégradation du BPA

Tableau 8 : Dégradation de 100 mg/L d'alkylphénols par plusieurs champignons de pourriture blanche cultivés pendant 5 jours dans 20ml de milieu YMG

Figure 1 : Schéma représentant le cheminement des eaux pluviales en milieu urbain

Figure 2 : Exemples de structures d'infiltration végétalisées

Figure 3 : Schéma représentant les processus mis en jeu dans les ouvrages d'infiltration

Figure 4 : profils de concentration de plomb, de zinc et d'hydrocarbures totaux

Figure 5 : schéma des noues étudiées dans l'article de Rommel et al., 2019

Figure 6 : Schéma des mésocosmes étudiés dans les travaux de Leroy et al., 2015

Figure 7 : Schéma représentant les différentes interactions dans un sol : en gris, les interactions habituelles et en violet, les nouvelles interactions en présence de micropolluants

Figure 8 : Représentation schématique de la rhizosphère

Figure 9 : Abondance relative des phyla bactériens dominants observés dans les données de séquences métagénomiques Shotgun le long du gradient de précipitations

Figure 10 : Diversité fonctionnelle (indice de Shannon) du microbiome du sol le long du gradient de précipitations. Les lettres différentes indiquent des différences significatives entre les groupes au niveau significatif de $P < (A-SA : P = 0.02, A-HM : P = 0.002, \text{ et } M-HM : P = 0.02)$.

Figure 11 : Schéma du complexe ribosomique et du gène de l'ARNr 16S

Figure 12 : groupe de gènes de l'ARN ribosomal. Le groupe comprend trois gènes principaux (molécules d'ARNr 5.8S, 18S, et 25S ou 28S) intercalés entre des régions d'espacement (IGS – espacement intergénique, NTS – espacement non transcrit, ETS – espacement transcrit externe, ITS – espacement transcrit interne)

Figure 13 : Relation entre le nombre total initial de bactéries par flacon et le temps nécessaire pour atteindre le taux maximal de minéralisation (h)

Figure 14 : Abondance relative des phylotypes d'ADN et d'ARN dans les quatre types de sol, pour tous les phylums dont l'abondance globale est supérieure à 1%

Figure 15 : Profile view of groundwater plume, well clusters BM and BC well-screen elevations and BMS and BCS sampling elevations

Figure 16 : Changements dans la structure de la communauté bactérienne, distribution des groupes phylogénétiques bactériens et distribution des communautés bactériennes en fonction de l'utilisation de l'oxygène

Figure 17 : Observation des changements de la réponse métabolique de la communauté bactérienne en fonction des saisons

Figure 18 : Pot compartimenté composé d'un compartiment racinaire (RC) et d'un compartiment rhizosphérique (RHC) coupé en trois sections (S1, S2, S3) à la récolte

Figure 19 : Arbre phylogénétique basé sur la comparaison des séquences partielles du gène de l'ARNr 16S des bactéries dégradant le BPA

Figure 20 : Mécanismes de biodégradation du BPA (Spivack et al., 1994)

Figure 21 : Isolats bactériens capables de dégrader le BPA en conditions oxiques et leur origine (Im and Löffler, 2016)

Figure 22 : Schéma récapitulatif de la biodégradation des alkylphénols éthoxylés (Giger et al., 2009)

Figure 23 : Réaction de transformation de la fluorescéine diacétate en fluorescéine

Figure 24 : Visualisation des changements au sein des structures bactériennes et fongiques au cours du temps entre les 2 traitements (sol nu « BS » et planté « Msm ») à 3 moments (T0, T4 = 2 ans et T12 = 6 ans)

Chapitre 2 : Sites d'étude et méthodes d'analyse

Tableau 9 : Tableau regroupant les sites et sols étudiés

Tableau 10 : Tableau regroupant les concentrations en zinc dans le sol de la Noue de Compans à trois niveaux de profondeur : 0-5cm, 5-15cm, 15cm-fond.

Tableau 11 : Nombre des échantillons nécessaires par points de prélèvements

Tableau 12 : Nombre de colonnes par conditions et les pas de temps d'analyse exprimés en jour

Tableau 13 : Les différentes analyses faites en fonction des pas de temps exprimé en jour

Figure 25 : Détails des campagnes de prélèvements des sols sélectionnés pour étude

Figure 26 : Exemple de distribution spatiale du zinc (mg/kg) à la surface des ouvrages dans les sites de Dourdan, Vitry et Compans.

Figure 27 : Exemple de profils de contamination en zinc (mg/kg) dans les sites de Dourdan et Vitry

Figure 28 : Localisation du site de Compans, encadré rouge entourant la zone sélectionnée d'échantillonnage

Figure 29 : Photos du dérasement des bandes enherbées de Compans

Figure 30 : Schéma des points de prélèvement des sols composites du site de Compans

Figure 31 : Localisation du site de Vitry, encadré rouge entourant la zone sélectionnée d'échantillonnage

Figure 32 : Schéma des points de prélèvement des sols composites du site de Vitry

Figure 33 : Localisation du site de Dourdan, encadré rouge entourant la zone sélectionnée d'échantillonnage

Figure 34 : Schéma des points de prélèvement des sols composites du site de Dourdan

Figure 35 : Présentation du regroupement des sols échantillonnés en un sol composite au laboratoire

Figure 36 : Photo de l'installation de la pipette de Robinson

Figure 37 : Photo de l'état des sols avant et après passage au four à 550°C

Figure 38 : Représentation du fonctionnement du complexe argilo-humique et des paliers de la CEC

Figure 39 : Représentation d'une dilution en cascade

Figure 40 : Schéma et photo d'un exemple de culture en multiplaque (NPP)

Figure 41 : Schéma des substrats d'une plaque Biolog Ecoplate™

Figure 42 : Réaction de transformation de la fluorescéine diacétate en fluorescéine

Figure 43 : Gamme étalon de la mesure de l'absorbance de la FDA

Figure 44 : Réaction de transformation de l'urée en ammonium

Figure 45 : Gamme étalon de la mesure de l'absorbance de l'uréase

Figure 46 : Réaction de transformation du TPH en TPF

Figure 47 : Gamme étalon de la mesure de l'absorbance de la déshydrogénase

Figure 48 : Photo d'un gel agarose avec ADN prêt à migrer dans une électrophorèse

Figure 49 : Photo des batchs lors du lancement de la 3^{ème} cinétique de biodégradation liquide

Figure 50 : Photo de l'installation du micro-GC

Figure 51 : Photo des colonnes utilisées lors de la cinétique

Figure 52 : Photo de la saturation des colonnes pour la mise en route de la cinétique

Figure 53 : Photo des colonnes mises à incuber

Figure 54 : Schéma de l'installation des matras et des bombes dans le Multiwave

Chapitre 3 : Comparaisons de trois ouvrages de gestion des eaux pluviales au cours des saisons

Article 1: *Physico-chemical and microbiological study of soils from various at-source stormwater management facilities and seasonal impact on these soils*

Table A: Description of study sites

Table 1: Mean physical and chemical characteristics of summer soils used for experiments, part 1

Table 2: Mean physical and chemical characteristics of summer soils used for experiments, part 2

Table 3: Mean physical and chemical characteristics of winter soils used for experiments

Table 4: Mean biological characteristics of summer soils used for experiments

Table 5: Mean biological characteristics of winter soils used for experiments

Figure 1: Mean physical and chemical characteristics of summer (dark histogram) and winter (light histogram) soils used for experiments

Figure 2: Mean biological characteristics of summer (dark histogram) and winter (light histogram) soils used for experiments

Figure 3: Representation of Ecoplate biolog results

Figure 4: PCA and Correlogram (Spearman correlation) of soil properties

Figure 5: Beta diversity (bacteria) of the 22 soils study according to: A: the soil; B: site age; C: soil location in relation to rainwater runoff

Figure 6: The average relative abundances of all the major phylum in summer soils, Proteobacteria are divided in classes

Figure 7: The average relative abundances of all the major family (with relative abundance higher than 1%) in summer soils

Figure 8: LEfSe analysis of the soil's samples according to vegetation at Vitry

Chapitre 4 : Etude de la capacité de biodégradation des micropolluants par les microorganismes du sol des ouvrages de gestion des eaux pluviales

- Article 2: *Biodegradation of organic micropollutants (BPA, 4-NP and OP) by indigenous microbial communities in the soils of stormwater management facilities*

Table 1: Description of study sites

Table 2: Physico-chemical characteristics of micropollutants studied in biodegradation kinetics

Table 3: Mean pH (n=3, mean \pm SD) for test soils, biotic control and mean pH (n = 6, mean \pm SD) for abiotic control at the beginning (ti) and end (tf) of kinetics

Table 4: Sequences and diversity indices in this study

Figure 1: Phylogenetic tree based on comparison of the partial 16S rRNA gene sequences of BPA-degrading bacteria

Figure 2: Mean biological characteristics including microbial biomass during kinetics

Figure 3: Representation of Ecoplate biolog results reflecting the functional diversity of microbial communities

Figure 4: Representation of site-dependent percentage biodegradation for the 3 micropollutants during kinetics

Figure 5: Beta diversity of the 11 soils extract in response to micropollutant spiking at kinetic endpoint

Figure 6: The average relative abundances of major phyla, with a focus on Proteobacteria divided into classes

Figure 7: The average relative abundances of all the major family (with relative abundance higher than 1%) in samples without micropollutant and in samples acclimated with micropollutants

Figure 8: LEfSe analysis of the 11 soils samples according to sample conditions at kinetic endpoint

- Partie 2 : Cinétique de biodégradation en colonnes des sols de Dourdan et de la Noue

Tableau 1 : Concentration (en $\mu\text{g/g}$ extrait) des micropolluants organiques (BPA, NP1EC, OP, OP1EO, OP2EO, 4NP, NP1EO, NP2EO) dans les sols initiaux utilisés pour faire les cinétiques en colonnes

Tableau 2 : Représentation des différences significatives (lettres différentes) dans les concentrations des 3 MPs au cours de la cinétique pour Compans et Dourdan

Tableau 3 : Représentation des différences significatives (lettres différentes) dans les concentrations des 3 MPs au point initial de la cinétique pour Compans et Dourdan entre les 3 conditions testées

Tableau 4 : Séquences et indices de diversité dans cette étude.

Figure 1 : Evolution du pHeau et du pHKCl du sol de Dourdan

Figure 2 : Evolution du pHeau et du pHKCl du sol de Compans

Figure 3 : Evolution de la concentration ($\mu\text{g/g}$ extrait) des 3 micropolluants durant la cinétique (n = 3, moyenne \pm ET) dans les sols de Compans

Figure 4 : Evolution de la concentration en ($\mu\text{g/g}$ extrait) de 3 micropolluants durant la cinétique ($n = 3$, moyenne \pm ET) dans les sols de Dourdan

Figure 5 : Evolution de la biomasse microbienne des sols de Dourdan et de Compans

Figure 6 : Représentation de l'activité enzymatique microbienne des sols de Dourdan et de Compans

Figure 7 : Evolution de la diversité fonctionnelle des sols de Dourdan et de Compans

Figure 8 : Diversité bêta des sols étudiés en réponse au dopage en micropolluants.

Figure 9 : Diversité bêta des sols étudiés en réponse au dopage en micropolluants

Figure 10 : Représentation des abondances relatives moyennes des phylums majeurs et des protéobactéries, qui sont divisées en classes

Figure 11 : Représentation des abondances relatives moyennes des familles bactériennes dans les sols provenant des cinétiques en colonnes

Figure 12 : Analyse LEfSe de 6 échantillons de sols de BFS

Chapitre 5 : Evolution au cours du temps des ouvrages de gestion des eaux pluviales situés à Compans

Article 3: *Changes over time in the physical, chemical, and biological characteristics of the Compans stormwater management facility*

Table 1: Meteorological data for the 10 days preceding each sampling campaign in Paris

Table 2 : Organic micropollutant measurement ($\mu\text{g/g}$) in the 5 soils studied during summer 2022 campaign

Table 3: Mean physical, chemical characteristics of 2019, 2021, 2022 soils used for experiments

Table 4: Mean biological characteristics of 2019, 2021, 2022 soils used for experiments

Table 5: Mean biological characteristics of 2019, 2021, 2022 soils used for experiments

Table 6: Mean physical, chemical and biological characteristics of 2019, 2021, 2022 soils used for experiments

Table 7: Comparison of 5 Compans soils to obtain p-values with Friedman test

Figure 1: Compans site location

Figure 2: Photos showing the clearing of the Compans grass strips in June 2020

Figure 3: A: Plan of stormwater structure and flow ; B: Soil sampling points for the 5 composite soils

Figure 4: Mean physical and chemical characteristics of summer (dark histogram) and winter (light histogram) soils used for experiments

Figure 5: Mean physical and chemical characteristics of 2021 (dark histogram) and 2022 (light histogram) soils used for experiments

Figure 6: (A) Representation in % of the use of the 5 carbon sources of Biolog Ecoplate in 2021 according to 5 soils analyzed, (B) representation in % of the use of the 5 carbon sources of Biolog Ecoplate in 2022 according to 5 soils analyzed

Figure 7: Beta diversity (bacteria) of the 10 soils study according to: A: soil location in relation to rainwater runoff; B: sampling year

Figure 8: The average relative abundances of all the major phylum in 2021 and 2022 soils, Proteobacteria are divided in classes

Figure 9: The average relative abundances of all the major family (with relative abundance higher than 1%) in samples in 2021 and 2022 soils

Figure 10: Soil properties PCA of 2021 and 2022 campaigns

Annexes

Chapitre 2 : Sites d'étude et méthodes d'analyse

Annexe 1 : tableau loi de Stokes

La **loi de Stokes**, nommée en l'honneur de George Stokes est une loi donnant la force de frottements d'un fluide sur une sphère en déplacement dans un fluide. Si le nombre de Reynolds est inférieur à 0,1 (écoulement rampant), et si la sphère est suffisamment loin de tout obstacle ou paroi latérale (on considère une paroi éloignée d'au moins dix fois le rayon de la sphère). Alors la force qui s'exerce sur une sphère de rayon r est

$$\vec{F} = -6\pi\mu r\vec{v}, \text{ où } \mu \text{ est la } \underline{\text{viscosité}} \text{ du fluide (en Pa.s)}$$

Cette loi est utilisée pour calculer la vitesse de sédimentation, et ainsi mesurer les viscosités des liquides, et analyser les particules en suspension.

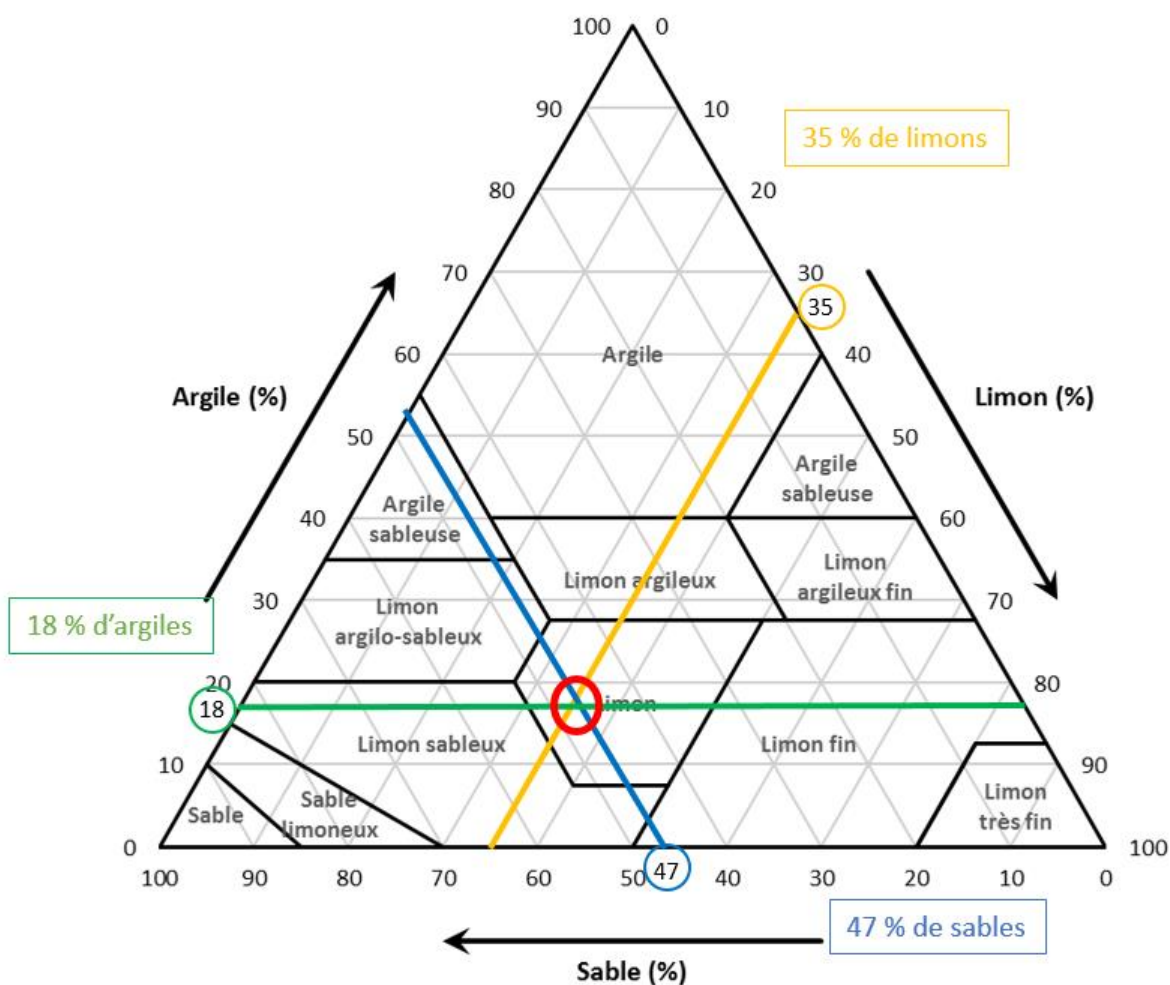
$$v = \frac{2r^2g\Delta(\rho)}{9\mu}, \text{ avec :}$$

- v , vitesse limite de chute (en m/s)
- r , rayon de la sphère (en m)
- g , accélération (m/s^2)
- $\Delta(\rho) = \rho_p - \rho_f$, différence de masse volumique particule/fluide (en kg/m^3)
- μ , viscosité du fluide (en $Pa.s$)

Température °C	Particules de 0,05mm de Ø, Arg. + Lim. fin + Lim. gros.		Particules de 0,02mm de Ø, Arg. + Lim. fin		Particules de 0,002 mm de Ø, Argiles	
	En min. et sec.		En min. et sec.		En h. et min	
	A 10cm	A 20cm	A 10cm	A 20cm	A 10cm	A 20cm
18	49''	1'37''	5'03''	10'06''	8h24'	16h48'
19	47''	1'34''	4'55''	9'50''	8h12'	16h24'
20	46''	1'32''	4'48''	9'36''	8h00'	16h00'
21	45''	1'30''	4'41''	9'21''	7h48'	15h36'
22	44''	1'28''	4'34''	9'08''	7h37'	15h14'
23	43''	1'26''	4'28''	8'56''	7h26'	14h52'
24	42''	1'24''	4'22''	8'44''	7h16'	14h'32
	1 ^{er} Prélèvement		2 nd prélèvement		3 ^{ème} prélèvement	

Temps de prélèvements en fonction de la température

Annexe 2 : triangle des textures



Annexe 3 : milieu Basal salt medium (BSM), peng et al 2015

Le milieu BSM contient :

- 2.1g/L de K_2HPO_4 , (phosphate de potassium)
- 0.4 g/L de KH_2PO_4 , (potassium dihydrogénophosphate)
- 0.5 g/L de NH_4NO_3 , (nitrate d'ammonium)
- 0.2 g/L de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, (sulfate de magnésium)
- 0.023 g/L de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, (chlorure de calcium)
- 0.002 g/L de $FeCl_3 \cdot 2H_2O$, (chlorure de fer)

Et le pH est neutralisé avec le NaOH à 7,3

Annexe 4 : Calculs menant aux choix des concentrations de dopage des colonnes (M.C. Gromaire)

Concentrations mesurées à Compans en 2017		BPA	OP	NP
C _{deq}	Ruissellement, concentration totale, maximum (ng/L)	1065	719	5208
	Ruissellement, concentration dissoute, maximum (ng/L)	696	224	752
	Ruissellement, teneur en polluant des MES			
	mediane (ng/g)	423	1166	4559
	maximum (ng/g)	1496	2895	10200
	Sédiment de voirie (ng/g)	200	144	2670
	Substrat filtrant (ng/g)			
	initial (2016)	<LQ (10)	<LQ (7)	158
	min surface (0 - 5 cm) 2017	23	9	331
	max surface (0-5 cm) 2017	81	70	712
	moyenne surface 2017	40	43	444

C _p	K _d évalué en batch au labo (L/kg)	Sol noue Compans ("neuf")	5	43	230
		Sédiment Bugeaud	17	66	783
	Concentration max adsorbable depuis le ruissellement dissous (ng/g) = K _d * C _{deq} /1000	Sol noue Compans ("neuf")	3	10	173
		Sédiment Bugeaud	12	15	589

Estimation des conditions de dopage

V	volume eau (L)	0,25
M _s	masse sol (kg)	0,2

On cherche la concentration initiale C_{dini} à mettre dans la solution pour atteindre à l'équilibre une concentration C_{deq} correspondant au ruissellement dissout

$$V * C_{dini} = V * C_{deq} + M_s * C_p * 1000$$

$$\text{et } C_p = K_d * C_{deq} / 1000$$

$$\text{donc } C_{dini} = M_s * C_p / V * 1000 + C_{deq} = M_s * K_d * C_{deq} + C_{deq}$$

Sol noue Compans (neuf)		BPA	OP	NP
C _{dini} (ng/L)		3480	7930	139120
C _{dini} (µg/L)		3	8	139
Avec un facteur multiplicatif de 10		BPA	OP	NP
C _{dopage} = 10 * C _{dini} (µg/L)		35	79	1391
C _p adsorbé (ng/g)		35	96	1730

Sédiment Bugeaud		BPA	OP	NP
Cdini (ng/L)		10162	12051	471805
Cdini (µg/L)		10	12	472
Avec un facteur		BPA	OP	NP
Cdopage = 10* Cdini (µg/L)		102	121	4718
Cp adsorbé (ng/g)		118	148	5888

Si on considère 75% de sol et 25% de sédiment

facteur multiplicatif de 10		BPA	OP	NP
Cdopage (µg/L)		52	90	2223
en arrondissant		50	100	2200

Chapitre 3 : Comparaisons de trois ouvrages de gestion des eaux pluviales au cours des saisons

Article 1: *Physico-chemical and microbiological study soil of various at-source stormwater management facilities and seasonal impact on these soils*

Figure S1: The average relative abundances of all the major phylum in summer/winter soils, Proteobacteria are divided in classes (with relative abundance higher than 1%)

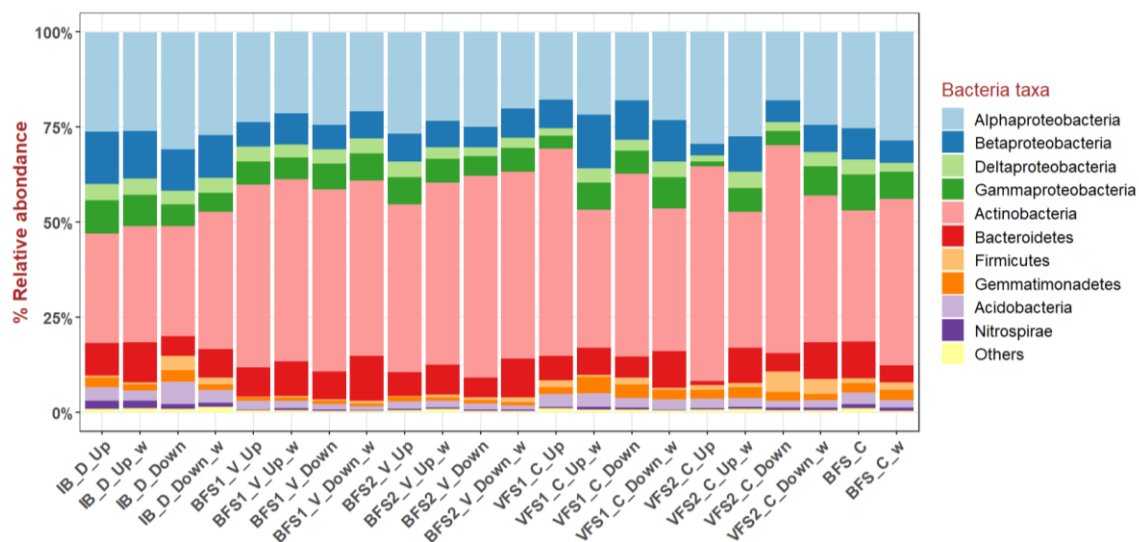
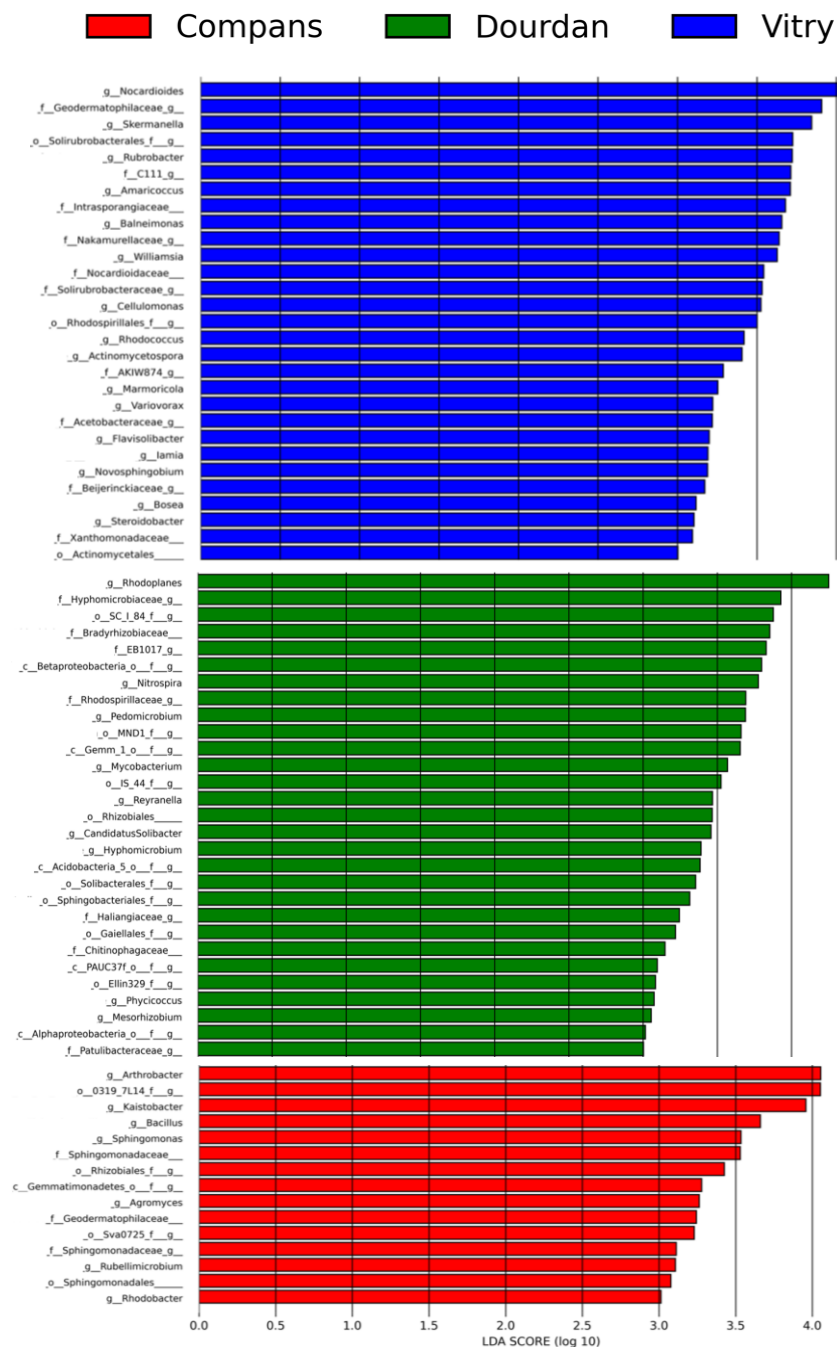


Figure S2: LEfSe analysis of the soil's samples according to sites.
Histograms of LDA scores of 16 S gene sequences



Chapitre 4 : Etude de la capacité de biodégradation des micropolluants par les microorganismes du sol des ouvrages de gestion des eaux pluviales

Article 2: *Biodegradation of organic micropollutants (BPA, 4-NP and OP) by indigenous microbial communities in the soils of stormwater management facilities*

Table S1: Significant differences (different letters) in AWCD between soils during kinetics

Site	SCM code	Location	AWCD Significant differences					
			Control t0	Test t0	Test t3	Test t7	Test tf	Control tf
Dour dan	IB_D	In	ad	a	c	bc	b	d
		ref	d	a	b	c	b	e
Vitry	BF S1 V _I	In	e	a	c	d	b	f
		ref	a	a	c	c	b	b
	BF S2 V _I	In	a	a	c	c	b	b
		ref	bd	ab	c	c	a	d
Compans	VF S1 C _I	In	a	a	b	b	b	c
		ref	c	a	c	d	b	e
	VF S2 C _I	In	d	a	b	c	a	e
		ref	a	ab	c	ab	cd	bd
	BFS_C	/	d	a	b	c	b	e

Table S2: Significant differences (different letters) in BPA biodegradation between soils during kinetics

Site	SCM code	Location	BPA Biodegradation Significant differences			
			Test t0	Test t3	Test t7	Test tf
Dour dan	IB_D	In	a	b	c	c
		ref	a	b	b	b
Vitry	BF S1 V _I	In	a	a	b	b
		ref	a	a	b	b
	BF S2 V _I	In	a	a	b	b
		ref	a	a	b	c
Compans	VF S1 C _I	In	a	a	a	a
		ref	a	a	a	a
	VF S2 C _I	In	a	a	a	a
		ref	a	a	b	b
	BFS_C	/	a	c	b	b

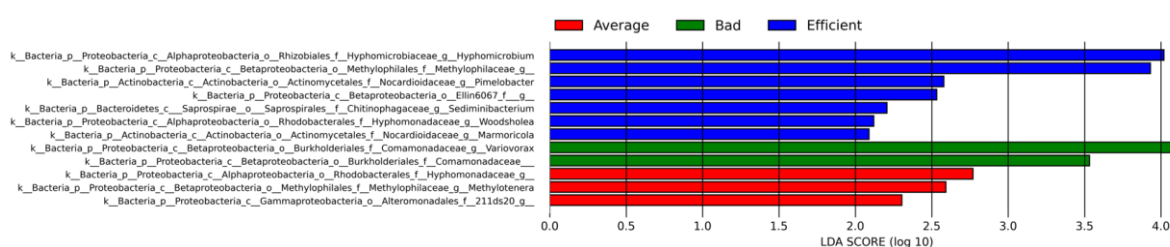
Table S3: Significant differences (different letters) in 4-NP biodegradation between soils during kinetics

Site	SCM code	Location	4-NP Biodegradation Significant differences			
			Test t0	Test t3	Test t7	Test tf
Dour dan	IB_D	In	a	b	c	d
		ref	a	b	b	b
Vitry	BF S1 V _I	In	a	b	ab	b
		ref	a	b	c	d
	BF S2 V _I	In	a	a	a	b
		ref	a	b	b	c
Compans	VF S1 C _I	In	a	a	a	b
		ref	a	a	a	a
	VF S2 C _I	In	a	a	a	a
		ref	a	a	a	a
	BFS_C	/	a	b	c	d

Table S4: Significant differences (different letters) in OP biodegradation between soils during kinetics

Site	SCM code	Location	OP Biodegradation Significant differences			
			Test t0	Test t3	Test t7	Test tf
Dour dan	IB_D	In	a	b	c	d
		ref	a	b	b	b
Vitry	BF S1 V _I	Up	a	a	ab	b
		ref	a	a	b	b
	BF S2 V _I	In	a	c	b	b
		ref	a	b	b	a
Compans	VF S1 C _I	In	a	a	a	a
		ref	a	a	a	a
	VF S2 C _I	In	a	a	a	a
		ref	a	a	b	c
	BFS_C	/	a	b	c	d

**Figure S1 : LEfSe analysis of the soil's samples according to BPA biodegradation capacity
Histograms of LDA scores of 16 S gene sequences**



Références bibliographiques

A

- Abatenh, E., Gizaw, B., Tsegaye, Z., Wassie, M., 2017. The Role of Microorganisms in Bioremediation- A Review. *Open J. Environ. Biol.* 2, 038–046. <https://doi.org/10.17352/ojeb.000007>
- Acir, I.-H., Guenther, K., 2018. Endocrine-disrupting metabolites of alkylphenol ethoxylates – A critical review of analytical methods, environmental occurrences, toxicity, and regulation. *Sci. Total Environ.* 635, 1530–1546. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.079>
- Adam, G., Duncan, H., 2001. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using ³H-urea diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biol.* 9.
- Adam, M., Ibrahim, I., Sulieman, M., Zeraatpisheh, M., Mishra, G., Brevik, E.C., 2021. Predicting Soil Cation Exchange Capacity in Entisols with Divergent Textural Classes: The Case of Northern Sudan Soils. *Air Soil Water Res.* 14, 117862212110423. <https://doi.org/10.1177/11786221211042381>
- Agbor, R.B., Antai, S.P., Department of Microbiology, University of Calabar, Calabar, Cross River State-Nigeria., Nkanang, A.J., Department of Microbiology, University of Calabar, Calabar, Cross River State-Nigeria., 2018. Microbial degradation of total petroleum hydrocarbon in crude oil polluted soil ameliorated with agro-wastes. *Glob. J. Earth Environ. Sci.* 3, 1–7. <https://doi.org/10.31248/GJEES2017.014>
- Ahel, M., Giger, W., 1993a. Aqueous solubility of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates. *Chemosphere* 26, 1461–1470. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(93\)90213-O](https://doi.org/10.1016/0045-6535(93)90213-O)
- Ahel, M., Giger, W., 1993b. Partitioning of alkylphenols and alkylphenol polyethoxylates between water and organic solvents. *Chemosphere* 26, 1471–1478. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(93\)90214-P](https://doi.org/10.1016/0045-6535(93)90214-P)
- Ali, H., Khan, E., 2019. Trophic transfer, bioaccumulation, and biomagnification of non-essential hazardous heavy metals and metalloids in food chains/webs—Concepts and implications for wildlife and human health. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* 25, 1353–1376. <https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1469398>
- Almeida, S., Raposo, A., Almeida - González, M., Carrascosa, C., 2018. Bisphenol A: Food Exposure and Impact on Human Health. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17, 1503–1517. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12388>
- Amossé, J., Bettarel, Y., Bouvier, C., Bouvier, T., Tran Duc, T., Doan Thu, T., Jouquet, P., 2013. The flows of nitrogen, bacteria and viruses from the soil to water compartments are influenced by earthworm activity and organic fertilization (compost vs. vermicompost). *Soil Biol. Biochem.* 66, 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.07.007>
- Anderson, J.P.E., Domsch, K.H., 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10, 215–221. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(78\)90099-8](https://doi.org/10.1016/0038-0717(78)90099-8)
- Andreoni, V., Cavalca, L., Rao, M.A., Nocerino, G., Bernasconi, S., Dell'Amico, E., Colombo, M., Gianfreda, L., 2004. Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. *Chemosphere* 57, 401–412. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.06.013>
- Anshuman Swain, Abhishek Bastiray, Kethepalli Jitendra, Ramakrushna Haibru, 2014. Estimation of Soil Microbial biomass using Substrate Induced Respiration: An Experimental Review Study with Loamy Soil of North Bangalore. <https://doi.org/10.13140/2.1.2139.9049>
- Armeni, L.E., 2010. The Efficiency of Vegetated Biofilters to Mitigate Highway Stormwater Runoff and the Fate of these Contaminants within the Bed 160.

B

- Badin, A.-L., 2011. Structural Stability, Microbial Biomass and Community Composition of Sediments Affected by the Hydric Dynamics of an Urban Stormwater Infiltration Basin.
- Badin, A.L., Monier, A., Volatier, L., Geremia, R.A., Delolme, C., Bedell, J.-P., 2011. Structural Stability, Microbial Biomass and Community Composition of Sediments Affected by the Hydric Dynamics of an Urban Stormwater Infiltration Basin: Dynamics of Physical and Microbial Characteristics of Stormwater Sediment. *Microb. Ecol.* 61, 885–897. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9829-4>
- Badji, M.A., 2011. DEPARTEMENT DE BIOLOGIE VEGETALE.
- Badri, D.V., Vivanco, J.M., 2009. Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ.* 32, 666–681. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01926.x>

- Bai, N., Abuduaini, R., Wang, S., Zhang, M., Zhu, X., Zhao, Y., 2017. Nonylphenol biodegradation characterizations and bacterial composition analysis of an effective consortium NP-M2. *Environ. Pollut.* 220, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.027>
- Baize, D., Girard, M.-C., 2008. *Référentiel pédologique 2008*.
- Baldwin, B.R., Nakatsu, C.H., Nebe, J., Wickham, G.S., Parks, C., Nies, L., 2009. Enumeration of aromatic oxygenase genes to evaluate biodegradation during multi-phase extraction at a gasoline-contaminated site. *J. Hazard. Mater.* 7.
- Barber, N.A., Chantos - Davidson, K.M., Amel Peralta, R., Sherwood, J.P., Swingle, W.D., 2017. Soil microbial community composition in tallgrass prairie restorations converge with remnants across a 27 - year chronosequence. *Environ. Microbiol.* 19, 3118–3131. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13785>
- Bashir, T., Zafar, S., Bashir, S., 2022. Phytoremediation of micropollutants, in: *Environmental Micropollutants*. Elsevier, pp. 365–386.
- Beck, D.A.C., Hendrickson, E.L., Vorobev, A., Wang, T., Lim, S., Kalyuzhnaya, M.G., Lidstrom, M.E., Hackett, M., Chistoserdova, L., 2011. An Integrated Proteomics/Transcriptomics Approach Points to Oxygen as the Main Electron Sink for Methanol Metabolism in *Methylobacterium mobilis*. *J. Bacteriol.* 193, 4758–4765. <https://doi.org/10.1128/JB.05375-11>
- Berg, G., Smalla, K., 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere: Plant species, soil type and rhizosphere communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>
- Bergé, A., 2013. Identification des sources d'alkylphénols et de phtalates en milieu urbain: comparaison des rejets à dominante urbaine (domestique) par rapport à des rejets purement industriels 295.
- Bergé, A., Cladière, M., Gasperi, J., Coursimault, A., Tassin, B., Moilleron, R., 2013. Meta-analysis of environmental contamination by phthalates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 8057–8076. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1982-5>
- Bergé, A., Cladière, M., Gasperi, J., Coursimault, A., Tassin, B., Moilleron, R., 2012a. Meta-analysis of environmental contamination by alkylphenols. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 3798–3819. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1094-7>
- Bergé, A., Cladière, M., Gasperi, J., Coursimault, A., Tassin, B., Moilleron, R., 2012b. Meta-analysis of environmental contamination by alkylphenols. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 3798–3819. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1094-7>
- Bezza, F.A., Chirwa, E.M.N., 2017. The role of lipopeptide biosurfactant on microbial remediation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil. *Chem. Eng. J.* 309, 563–576. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.10.055>
- Bhatt, P., Bhandari, G., Bilal, M., 2022. Occurrence, toxicity impacts and mitigation of emerging micropollutants in the aquatic environments: Recent tendencies and perspectives. *J. Environ. Chem. Eng.* 10, 107598. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107598>
- Bidaud, C., 1998. Biodégradation des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Approche microbiologique et application au traitement d'un sol pollué 279.
- Bidja Abena, M.T., Li, T., Shah, M.N., Zhong, W., 2019. Biodegradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in highly contaminated soils by natural attenuation and bioaugmentation. *Chemosphere* 234, 864–874. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.111>
- Binet, F., Kersanté, A., Munier-Lamy, C., Le Bayon, R.-C., Belgy, M.-J., Shipitalo, M.J., 2006. Lumbricid macrofauna alter atrazine mineralization and sorption in a silt loam soil. *Soil Biol. Biochem.* 38, 1255–1263. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.09.018>
- Björklund, K., Cousins, A.P., Strömvall, A.-M., Malmqvist, P.-A., 2009a. Phthalates and nonylphenols in urban runoff: Occurrence, distribution and area emission factors. *Sci. Total Environ.* 407, 4665–4672. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.040>
- Björklund, K., Cousins, A.P., Strömvall, A.-M., Malmqvist, P.-A., 2009b. Phthalates and nonylphenols in urban runoff: Occurrence, distribution and area emission factors. *Sci. Total Environ.* 407, 4665–4672. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.040>
- Blecken, G.-T., Zinger, Y., Deletić, A., Fletcher, T.D., Viklander, M., 2009. Influence of intermittent wetting and drying conditions on heavy metal removal by stormwater biofilters. *Water Res.* 43, 4590–4598. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.07.008>

- Blonska, E., Lasota, J., Gruba, P., 2016. Effect of temperate forest tree species on soil dehydrogenase and urease activities in relation to other properties of soil derived from loess and glaciofluvial sand. *Ecol Res* 31, 655–664.
- Bohlen, P.J., Edwards, C.A., 1995. Earthworm effects on N dynamics and soil respiration in microcosms receiving organic and inorganic nutrients. *Soil Biol. Biochem.* 27, 341–348. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(94\)00184-3](https://doi.org/10.1016/0038-0717(94)00184-3)
- Bollmann, U.E., Vollertsen, J., Carmeliet, J., Bester, K., 2014. Dynamics of biocide emissions from buildings in a suburban stormwater catchment – Concentrations, mass loads and emission processes. *Water Res.* 56, 66–76. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.033>
- Bourceret, A., Cébron, A., Tisserant, E., Poupin, P., Bauda, P., Beguiristain, T., Leyval, C., 2016. The Bacterial and Fungal Diversity of an Aged PAH- and Heavy Metal-Contaminated Soil is Affected by Plant Cover and Edaphic Parameters. *Microb. Ecol.* 71, 711–724. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0682-8>
- Bourceret, A., Leyval, C., Faure, P., Lorgeoux, C., Cébron, A., 2018. High PAH degradation and activity of degrading bacteria during alfalfa growth where a contrasted active community developed in comparison to unplanted soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 29556–29571. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2744-1>
- Branchu, P., Badin, A.-L., Bechet, B., Eisenlohr, L., Priol, T.L., Marseille, F., Trielli, E., 2013. Pollution d'origine routière et environnement de proximité. *Vertigo*. <https://doi.org/10.4000/vertigo.12775>
- Bressy, A., 2010. Flux de micropolluants dans les eaux de ruissellement urbaines: effets de différents modes de gestion à l'amont 333.
- Briand, C., Bressy, A., Ghassan, C., Deroubaix, J.-F., Deshayes, S., Deutsch, J.-C., Gasperi, J., Gromaire, M.-C., Le Roux, J., Moilleron, R., 2018. Que sait-on des micropolluants dans les eaux urbaines?
- Brohon, B., Delolme, C., Gourdon, R., 2001. Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biol. Biochem.* 33, 883–891. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00234-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00234-0)
- Brunhoferova, H., Venditti, S., Laczny, C.C., Lebrun, L., Hansen, J., 2022. Bioremediation of 27 Micropollutants by Symbiotic Microorganisms of Wetland Macrophytes. *Sustainability* 14, 3944. <https://doi.org/10.3390/su14073944>
- Buée, M., Reich, M., Murat, C., Morin, E., Nilsson, R.H., Uroz, S., Martin, F., 2009. 454 Pyrosequencing Analyses of Forest Soils Reveal an Unexpectedly High Fungal Diversity. *New Phytol.* 184, 449–456.
- Bueis, T., Turrión, M.B., Bravo, F., Pando, V., Muscolo, A., 2018. Factors determining enzyme activities in soils under *Pinus halepensis* and *Pinus sylvestris* plantations in Spain: a basis for establishing sustainable forest management strategies. *Ann. For. Sci.* 75, 34. <https://doi.org/10.1007/s13595-018-0720-z>
- Burns, R.G., DeForest, J.L., Marxsen, J., Sinsabaugh, R.L., Stromberger, M.E., Wallenstein, M.D., Weintraub, M.N., Zoppini, A., 2013. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biol. Biochem.* 58, 216–234. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.11.009>

C

- Campos, J.A., Peco, J.D., García-Noguero, E., 2019. Antigerminative comparison between naturally occurring naphthoquinones and commercial pesticides. Soil dehydrogenase activity used as bioindicator to test soil toxicity. *Sci. Total Environ.* 694, 133672. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133672>
- Caserta, D., Marco, M.P.D., Besharat, A.R., Costanzi, F., 2022. Endocrine Disruptors and Endometrial Cancer: Molecular Mechanisms of Action and Clinical Implications, a Systematic Review. *Int J Mol Sci.*
- Cébron, A., Beguiristain, T., Bongoua-Devisme, J., Denonfoux, J., Faure, P., Lorgeoux, C., Ouvrard, S., Parisot, N., Peyret, P., Leyval, C., 2015. Impact of clay mineral, wood sawdust or root organic matter on the bacterial and fungal community structures in two aged PAH-contaminated soils. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 13724–13738. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4117-3>

- Chaer, G., Fernandes, M., Myrold, D., Bottomley, P., 2009. Comparative Resistance and Resilience of Soil Microbial Communities and Enzyme Activities in Adjacent Native Forest and Agricultural Soils. *Microb. Ecol.* 58, 414–424. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9508-x>
- Chai, B., Li, X., Liu, H., Lu, G., Dang, Z., Yin, H., 2020. Bacterial communities on soil microplastic at Guiyu, an E-Waste dismantling zone of China. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 195, 110521. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110521>
- Chang, B.V., Chiang, B.W., Yuan, S.Y., 2007. Biodegradation of nonylphenol in soil. *Chemosphere* 66, 1857–1862. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.029>
- Chang, B.V., Yuan, S.Y., Chiou, C.C., 2011. Biodegradation of bisphenol-A in river sediment. *J. Environ. Sci. Health Part A* 46, 931–937. <https://doi.org/10.1080/10934529.2011.586246>
- Chang, E.-H., Chung, R.-S., Tsai, Y.-H., 2007. Effect of different application rates of organic fertilizer on soil enzyme activity and microbial population. *Soil Sci. Plant Nutr.* 53, 132–140. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0765.2007.00122.x>
- Chaperon, S., Sauvé, S., 2007. Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils. *Soil Biol. Biochem.* 39, 2329–2338. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.04.004>
- Charters, F.J., Cochrane, T.A., O’Sullivan, A.D., 2016. Untreated runoff quality from roof and road surfaces in a low intensity rainfall climate. *Sci. Total Environ.* 550, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.093>
- Chaudhry, Q., Blom-Zandstra, M., Gupta, S.K., Joner, E., 2005. Utilising the Synergy between Plants and Rhizosphere Microorganisms to Enhance Breakdown of Organic Pollutants in the Environment (15 pp). *Environ. Sci. Pollut. Res. - Int.* 12, 34–48. <https://doi.org/10.1065/espr2004.08.213>
- Chaussod, R., 1996. La qualité biologique des sols. *Étude Gest. Sols*.
- Chaussod, R., Breuil, M.C., 1996. La qualité biologique des sols , évaluation et implications. *Étude Gest. Sols* 3, 261–278.
- Chazarenc, F., Brisson, J., Merlin, G., 2010. Seasonal and Spatial Changes of Microorganism Communities in Constructed Wetlands: A Community Level Physiological Profiling Analysis. *Int. J. Chem. Eng.* 2010, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2010/490240>
- Cheng, M., Chen, D., Parales, R.E., Jiang, J., 2022. Oxygenases as Powerful Weapons in the Microbial Degradation of Pesticides 24.
- Chocat, B., 2008. Etat de l’art sur la gestion urbaine des eaux pluviales et leur valorisation 36.
- Choi, Y.J., Lee, L.S., 2017. Aerobic Soil Biodegradation of Bisphenol (BPA) Alternatives Bisphenol S and Bisphenol AF Compared to BPA. *Environ. Sci. Technol.* 51, 13698–13704. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03889>
- Chouli, E., 2006. ANALYSE DES CONDITIONS DE DEVELOPPEMENT DES TECHNIQUES ALTERNATIVES 266.
- Chunyan, X., Qaria, M.A., Qi, X., Daochen, Z., 2023. The role of microorganisms in petroleum degradation: Current development and prospects. *Sci. Total Environ.* 865, 161112. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161112>
- Cladière, M., 2012. Sources, transfert et devenir des alkylphénols et du bisphénol A dans le bassin amont de la Seine: cas de la région Île-de-France 255.
- Corgie, S.C., Joner, E.J., Leyval, C., 2003. Rhizospheric degradation of phenanthrene is a function of proximity to roots 8.
- Cydzik-Kwiatkowska, A., Bernat, K., Zielińska, M., Bułkowska, K., Wojnowska-Baryła, I., 2017. Aerobic granular sludge for bisphenol A (BPA) removal from wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 122, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.04.008>
- Cydzik-Kwiatkowska, A., Zielińska, M., 2018. Microbial composition of biofilm treating wastewater rich in bisphenol A. *J. Environ. Sci. Health Part A* 53, 385–392. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1404326>
- Cydzik-Kwiatkowska, A., Zielińska, M., Bernat, K., Bułkowska, K., Wojnowska-Baryła, I., 2020. Insights into mechanisms of bisphenol A biodegradation in aerobic granular sludge. *Bioresour. Technol.* 315, 123806. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123806>

D

- Datta, S., Rajnish, K.N., Samuel, M.S., Pugazhendhi, A., Selvarajan, E., 2020. Metagenomic applications in microbial diversity, bioremediation, pollution monitoring, enzyme and drug discovery. A review. *Environ. Chem. Lett.* 18, 1229–1241. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01010-z>
- David, N., Leatherbarrow, J.E., Yee, D., McKee, L.J., 2015. Removal Efficiencies of a Bioretention System for Trace Metals, PCBs, PAHs, and Dioxins in a Semiarid Environment. *J. Env. Eng* 9.
- De Weert, J., de la Cal, A., van den Berg, H., Murk, A., Langenhoff, A., Rijnaarts, H., Grotenhuis, T., 2008. BIOAVAILABILITY AND BIODEGRADATION OF NONYLPHENOL IN SEDIMENT DETERMINED WITH CHEMICAL AND BIOANALYSIS. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 778. <https://doi.org/10.1897/07-367.1>
- De Weert, J., Viñas, M., Grotenhuis, T., Rijnaarts, H., Langenhoff, A., 2010. Aerobic nonylphenol degradation and nitro-nonylphenol formation by microbial cultures from sediments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 761–771. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2394-9>
- Dechesne, M., Barraud, S., Bardin, J.-P., 2004. Spatial distribution of pollution in an urban stormwater infiltration basin. *J. Contam. Hydrol.* 72, 189–205. <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2003.10.011>
- Deeb, M., Groffman, P.M., Joyner, J.L., Lozefski, G., Paltseva, A., Lin, B., Mania, K., Cao, D.L., McLaughlin, J., Muth, T., Prithiviraj, B., Kerwin, J., Cheng, Z., 2018. Soil and microbial properties of green infrastructure stormwater management systems. *Ecol. Eng.* 125, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.10.017>
- Delgadillo-Mirquez, L., Lardon, L., Steyer, J.-P., Patureau, D., 2011. A new dynamic model for bioavailability and cometabolism of micropollutants during anaerobic digestion. *Water Res.* 45, 4511–4521. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.05.047>
- Delolme, C., Bedell, J.-P., Winiarski, T., Larmet, H., Neto, M., Muris, M., Perrodin, Y., 2005. Le compartiment microbien des sols soumis à l'infiltration des eaux pluviales urbaines. Description et rôle dans le transfert des métaux. *Houille Blanche* 33–38. <https://doi.org/10.1051/lhb:200503004>
- Deng, J., Gu, Y., Zhang, J., Xue, K., Qin, Y., Yuan, M., Yin, H., He, Z., Wu, L., Schuur, E.A.G., Tiedje, J.M., Zhou, J., 2015. Shifts of tundra bacterial and archaeal communities along a permafrost thaw gradient in Alaska. *Mol. Ecol.* 24, 222–234. <https://doi.org/10.1111/mec.13015>
- Deshayes, S., 2016. Identification des sources de phtalates et d'alkylphénols (polluants émergents) en milieu urbain et compréhension des processus d'élimination 253.
- Deshayes, S., Gasperi, J., Gromaire, M.-C., 2016. ROULÉPUR maîtrise de la contamination des eaux de voirie 52.
- Dhakal, K.P., Chevalier, L.R., 2016. Urban Stormwater Governance: The Need for a Paradigm Shift. *Environ. Manage.* 57, 1112–1124. <https://doi.org/10.1007/s00267-016-0667-5>
- DiBlasi, C.J., Li, H., Davis, A.P., Ghosh, U., 2009. Removal and Fate of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Pollutants in an Urban Stormwater Bioretention Facility. *Environ. Sci. Technol.* 43, 494–502. <https://doi.org/10.1021/es802090g>
- Domene, X., Ramírez, W., Solà, L., Alcañiz, J.M., Andrés, P., 2009. Soil pollution by nonylphenol and nonylphenol ethoxylates and their effects to plants and invertebrates. *J. Soils Sediments* 9, 555–567. <https://doi.org/10.1007/s11368-009-0117-6>
- Dominique, M., 2000. Origine et devenir de l'atrazine et de la dééthylatrazine présents dans les eaux souterraines destinées à l'alimentation, dans le département de l'Orne 56.
- Dornelles, H. de S., Motteran, F., Sakamoto, I.K., Silva, E.L., Varesche, M.B.A., 2020. 4-Nonylphenol degradation changes microbial community of scale-up Anaerobic Fluidized Bed Reactor. *J. Environ. Manage.* 267, 110575. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110575>
- dos Reis, F.C., Tornisiello, V.L., Pimpinato, R.F., Martins, B.A.B., Victória Filho, R., 2017. Leaching of Diuron, Hexazinone, and Sulfometuron-methyl Applied Alone and in Mixture in Soils with Contrasting Textures. *J. Agric. Food Chem.* 65, 2645–2650. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b05127>
- dos Santos, B., Ivantsova, E., Guzman, A.P., Martyniuk, C.J., 2022. Critical review of the toxicity mechanisms of bisphenol F in zebrafish (*Danio rerio*): Knowledge gaps and future directions. *Chemosphere* 297, 134132. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134132>
- Dukunde, A., Schneider, D., Schmidt, M., Veldkamp, E., Daniel, R., 2019. Tree Species Shape Soil Bacterial Community Structure and Function in Temperate Deciduous Forests. *Front. Microbiol.* 10, 1519. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01519>

Đurovcová, I., Kyzek, S., Fabová, J., Makuková, J., Gálová, E., Ševčovičová, A., 2022. Genotoxic potential of bisphenol A: A review. *Environ. Pollut.* 306, 119346. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119346>

E

- Eapen, S., Singh, S., D'Souza, S.F., 2007. Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. *Biotechnol. Adv.* 25, 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.05.001>
- Ehlers, L.J., Luthy, R.G., 2003. NATIONAL RESEARCH COUNCIL : Contaminant Bioavailability in Soil and Sediment 8.
- Eio, E.J., Kawai, M., Tsuchiya, K., Yamamoto, S., Toda, T., 2014. Biodegradation of bisphenol A by bacterial consortia. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 96, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.09.011>
- Elifantz, H., Kautsky, L., Mor-Yosef, M., Tarchitzky, J., Bar-Tal, A., Chen, Y., Minz, D., 2011. Microbial Activity and Organic Matter Dynamics During 4 Years of Irrigation with Treated Wastewater. *Microb. Ecol.* 62, 973–981. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9867-y>
- El-Nahhal, Y., Hamdona, N., 2017. Adsorption, leaching and phytotoxicity of some herbicides as single and mixtures to some crops. *J. Assoc. Arab Univ. Basic Appl. Sci.* 22, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.jaubas.2016.01.001>
- Emmert, E.A.B., Geleta, S.B., Rose, C.M., Seho-Ahiabile, G.E., Hawkins, A.E., Baker, K.T., Evans, A.S., Harris, M.E., Mrozinski, A.C., Folkoff, M.E., Anderson, P.D., Briand, C.H., 2021. Effect of land use changes on soil microbial enzymatic activity and soil microbial community composition on Maryland's Eastern Shore. *Appl. Soil Ecol.* 161, 103824. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2020.103824>
- Eriksson, E., Baun, A., Scholes, L., Ledin, A., Ahlman, S., Revitt, M., Noutsopoulos, C., Mikkelsen, P.S., 2007. Selected stormwater priority pollutants — a European perspective. *Sci. Total Environ.* 383, 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.05.028>

F

- Fardel, A., Peyneau, P.-E., Béchet, B., Lakel, A., Rodriguez, F., 2020. Performance of two contrasting pilot swale designs for treating zinc, polycyclic aromatic hydrocarbons and glyphosate from stormwater runoff. *Sci. Total Environ.* 743, 140503. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140503>
- Farenhorst, A., Topp, E., Bowman, B.T., Tomlin, A.D., 2000. Earthworms and the dissipation and distribution of atrazine in the soil pro[®]le. *Soil Biol.* 11.
- Fierer, N., Schimel, J.P., Holden, P.A., 2003. Variations in microbial community composition through two soil depth profiles. *Soil Biol. Biochem.* 35, 167–176. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00251-1](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00251-1)
- Fierer, N., Wood, S.A., Bueno De Mesquita, C.P., 2021. How microbes can, and cannot, be used to assess soil health. *Soil Biol. Biochem.* 153, 108111. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2020.108111>
- Flanagan, K., 2019. Retention and transport processes of particulate and dissolved micropollutants in stormwater biofilters treating road runoff. *Sci. Total Environ.* 13.
- Flanagan, K., 2018. Evaluation de la rétention et du devenir d'un panel diversifié de micropolluants dans un ouvrage de biofiltration des eaux de ruissellement de voirie 357.
- Flanagan, K., Tedoldi, D., Branchu, P., Gromaire, M.-C., 2017. Caractérisation du fonctionnement d'un ouvrage de gestion à la source du ruissellement de voirie: approche par modélisation hydrologique et par cartographie de la contamination du sol. *Houille Blanche* 10.
- Fletcher, T.D., Shuster, W., Hunt, W.F., Ashley, R., Butler, D., Arthur, S., Trowsdale, S., Barraud, S., Semadeni-Davies, A., Bertrand-Krajewski, J.-L., Mikkelsen, P.S., Rivard, G., Uhl, M., Dagenais, D., Viklander, M., 2015. SUDS, LID, BMPs, WSUD and more – The evolution and application of terminology surrounding urban drainage. *Urban Water J.* 12, 525–542. <https://doi.org/10.1080/1573062X.2014.916314>
- Fraser, A., Zhang, Y., Sakowski, E., Preheim, S., 2018. Dynamics and Functional Potential of Stormwater Microorganisms Colonizing Sand Filters. *Water* 10, 1065. <https://doi.org/10.3390/w10081065>
- Fu, P., Kawamura, K., 2010. Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. *Environ. Pollut.* 158, 3138–3143. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.06.040>

- Fujii, K., 2014. Soil acidification and adaptations of plants and microorganisms in Bornean tropical forests. *Ecol. Res.* 29, 371–381. <https://doi.org/10.1007/s11284-014-1144-3>
- Fukuda, K., Ogawa, M., Taniguchi, H., Saito, M., 2016. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *J. UOEH* 38, 223–232. <https://doi.org/10.7888/juoeh.38.223>

G

- Gałązka, A., Jankiewicz, U., 2022. Endocrine Disrupting Compounds (Nonylphenol and Bisphenol A)–Sources, Harmfulness and Laccase-Assisted Degradation in the Aquatic Environment. *Microorganisms* 10, 2236. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112236>
- Galloway, T.S., Lee, B.P., Burić, I., Steele, A.M., Bpa Schools Study Consortium, Kocur, A.L., Pandeth, A.G., Harries, L.W., 2018. Plastics Additives and Human Health: A Case Study of Bisphenol A (BPA), in: Harrison, R.M., Hester, R.E. (Eds.), *Plastics and the Environment*. The Royal Society of Chemistry, pp. 131–155. <https://doi.org/10.1039/9781788013314-00131>
- Gao, C., Zeng, Y.-H., Li, C.-Y., Li, L., Cai, Z.-H., Zhou, J., 2022. Bisphenol A biodegradation by *Sphingonoma* sp. YK5 is regulated by acyl-homoserine lactone signaling molecules. *Sci. Total Environ.* 802, 149898. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149898>
- Gao, M., 2020. Responses of bacterial communities in wheat rhizospheres in different soils to di-n-butyl and di(2-ethylhexyl)phthalate contamination 8.
- Garland, J.L., Mills, A.L., 1991. Classification and Characterization of Heterotrophic Microbial Communities on the Basis of Patterns of Community-Level Sole-Carbon-Source Utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2351–2359. <https://doi.org/10.1128/aem.57.8.2351-2359.1991>
- Gasperi, J., Le Roux, J., Deshayes, S., Ayrault, S., Bordier, L., Boudahmane, L., Budzinski, H., Caupos, E., Caubrière, N., Flanagan, K., Guillon, M., Huynh, N., Labadie, P., Meffray, L., Neveu, P., Partibane, C., Paupardin, J., Saad, M., Varnede, L., Gromaire, M.-C., 2022. Micropollutants in Urban Runoff from Traffic Areas: Target and Non-Target Screening on Four Contrasted Sites. *Water* 14, 394. <https://doi.org/10.3390/w14030394>
- Gasperi, J., Sebastian, C., Ruban, V., Delamain, M., Percot, S., Wiest, L., Mirande, C., Caupos, E., Demare, D., Kessoo, M.D.K., Saad, M., Schwartz, J.J., Dubois, P., Fratta, C., Wolff, H., Moilleron, R., Chebbo, G., Cren, C., Millet, M., Barraud, S., Gromaire, M.C., 2014. Micropollutants in urban stormwater: occurrence, concentrations, and atmospheric contributions for a wide range of contaminants in three French catchments. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 5267–5281. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2396-0>
- Giger, W., Gabriel, F.L.P., Jonkers, N., Wettstein, F.E., Kohler, H.-P.E., 2009. Environmental fate of phenolic endocrine disruptors: field and laboratory studies. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* 367, 3941–3963. <https://doi.org/10.1098/rsta.2009.0148>
- Gill, A.S., Lee, A., McGuire, K.L., 2017. Phylogenetic and Functional Diversity of Total (DNA) and Expressed (RNA) Bacterial Communities in Urban Green Infrastructure Bioswale Soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 83, e00287-17, e00287-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00287-17>
- Gomez, E., Ferreras, L., Toresani, S., 2006. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. *Bioresour. Technol.* 97, 1484–1489. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.06.021>
- Gooty, J.M., Srinivasulu, M., Mosquera, J.A.N., Llaguno, S.N.S., 2022. Occurrence and fate of micropollutants in surface waters, in: *Environmental Micropollutants*. Elsevier, pp. 233–269.
- Gopinath, K.A., Saha, S., Mina, B.L., Pande, H., Kundu, S., Gupta, H.S., 2008. Influence of organic amendments on growth, yield and quality of wheat and on soil properties during transition to organic production. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 82, 51–60. <https://doi.org/10.1007/s10705-008-9168-0>
- Grand Lyon, n.d. AMÉNAGEMENT ET EAUX PLUVIALES.
- Green, V.S., Stott, D.E., Diack, M., 2006. Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biol. Biochem.* 38, 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.020>
- Gregory, 1971. The Leeuwenhoek Lecture 1970 Airborne microbes: their significance and distribution. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 177, 469–483. <https://doi.org/10.1098/rspb.1971.0043>
- Gromaire, M.-C., Bak, A., Environnement, S.-D., Branchu, P., Bressy, A., 2020. Synthèse des résultats du projet et orientations opérationnelles.

- Gromaire-Mertz, M.C., Garnaud, S., Gonzalez, A., Chebbo, G., 1999. Characterisation of urban runoff pollution in Paris 8.
- Gruba, P., Mulder, J., 2015. Tree species affect cation exchange capacity (CEC) and cation binding properties of organic matter in acid forest soils. *Sci. Total Environ.* 511, 655–662. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.013>
- Guo, Y., Rene, E.R., Wang, J., Ma, W., 2020. Biodegradation of polyaromatic hydrocarbons and the influence of environmental factors during the co-composting of sewage sludge and green forest waste. *Bioresour. Technol.* 297, 122434. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122434>
- Gupta, K., Biswas, R., Sarkar, A., 2020. Advancement of Omics: Prospects for Bioremediation of Contaminated Soils, in: Shah, M.P. (Ed.), *Microbial Bioremediation & Biodegradation*. Springer Singapore, Singapore, pp. 113–142.

H

- Hahladakis, J.N., Iacovidou, E., Gerassimidou, S., 2023. An overview of the occurrence, fate, and human risks of the bisphenol - A present in plastic materials, components, and products. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 19, 45–62. <https://doi.org/10.1002/ieam.4611>
- Haripriyan, U., Gopinath, K.P., Arun, J., Govarthan, M., 2022. Bioremediation of organic pollutants: a mini review on current and critical strategies for wastewater treatment. *Arch. Microbiol.* 204, 286. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02907-9>
- Harmsen, J., 2007. Measuring Bioavailability: From a Scientific Approach to Standard Methods. *J. Environ. Qual.* 36, 1420–1428. <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0492>
- Harzallah, B., Bousseboua, H., Jouanneau, Y., 2017. Diversity shift in bacterial phenol hydroxylases driven by alkyl-phenols in oil refinery wastewaters. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 14376–14386. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8950-4>
- Hedegaard, M.J., Deliniere, H., Prasse, C., Dechesne, A., Smets, B.F., Albrechtsen, H.-J., 2018. Evidence of co-metabolic bentazone transformation by methanotrophic enrichment from a groundwater-fed rapid sand filter. *Water Res.* 129, 105–114. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.073>
- Hendrickx, B., Junca, H., Vosahlova, J., Lindner, A., Rüegg, I., Bucheli-Witschel, M., Faber, F., Egli, T., Mau, M., Schlömann, M., Brennerova, M., Brenner, V., Pieper, D.H., Top, E.M., Dejonghe, W., Bastiaens, L., Springael, D., 2006. Alternative primer sets for PCR detection of genotypes involved in bacterial aerobic BTEX degradation: Distribution of the genes in BTEX degrading isolates and in subsurface soils of a BTEX contaminated industrial site. *J. Microbiol. Methods* 64, 250–265. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.018>
- Henin, S., Gras, R., Monnier, G., 1969. Le profil cultural, l'état physique du sol et ses conséquences. Elsevier Masson 332.
- Hensen, B., Lange, J., Jackisch, N., Zieger, F., Olsson, O., Kümmerer, K., 2018. Entry of biocides and their transformation products into groundwater via urban stormwater infiltration systems. *Water Res.* 144, 413–423. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.07.046>
- Huang, C., Xu, P., Zeng, G., Huang, D., Lai, C., Cheng, M., Deng, L., Zhang, C., Wan, J., Liu, L., 2017. The rapid degradation of bisphenol A induced by the response of indigenous bacterial communities in sediment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101, 3919–3928. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8154-3>
- Huang, L., Gao, X., Liu, M., Du, G., Guo, J., Ntakirutimana, T., 2012. Correlation among soil microorganisms, soil enzyme activities, and removal rates of pollutants in three constructed wetlands purifying micro-polluted river water. *Ecol. Eng.* 46, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2012.06.004>
- Huber, M., Welker, A., Helmreich, B., 2016. Critical review of heavy metal pollution of traffic area runoff: Occurrence, influencing factors, and partitioning. *Sci. Total Environ.* 541, 895–919. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.033>
- Husain, Q., Qayyum, S., 2013. Biological and enzymatic treatment of bisphenol A and other endocrine disrupting compounds: a review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 33, 260–292. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.694409>

I

- Ike, M., Jin, C.S., Fujita, M., 2018. Biodegradation of bisphenol A in the aquatic environment 8.

Im, J., Löffler, F.E., 2016. Fate of Bisphenol A in Terrestrial and Aquatic Environments. *Environ. Sci. Technol.* 50, 8403–8416. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00877>

J

Jalali, P., Rabotyagov, S., 2020. Quantifying cumulative effectiveness of green stormwater infrastructure in improving water quality. *Sci. Total Environ.* 731, 138953. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138953>

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. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719-1728.2006>

Jat, H.S., Datta, A., Choudhary, M., Sharma, P.C., Dixit, B., Jat, M.L., 2021. Soil enzymes activity: Effect of climate smart agriculture on rhizosphere and bulk soil under cereal based systems of north-west India. *Eur. J. Soil Biol.* 103, 103292. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2021.103292>

Jia, Y., Eltoukhy, A., Wang, J., Li, X., Hlaing, T.S., Aung, M.M., Nwe, M.T., Lamraoui, I., Yan, Y., 2020. Biodegradation of Bisphenol A by *Sphingobium* sp. YC-JY1 and the Essential Role of Cytochrome P450 Monooxygenase. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3588. <https://doi.org/10.3390/ijms21103588>

Jiang, Y., Shi, X., Ng, H.Y., 2021. Aerobic granular sludge systems for treating hypersaline pharmaceutical wastewater: Start-up, long-term performances and metabolic function. *J. Hazard. Mater.* 412, 125229. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125229>

Johnston, A.E., 1986. Soil organic matter, effects on soils and crops. *Soil Use Manag.* 2, 97–105. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.1986.tb00690.x>

Jonkers, N., Knepper, T.P., de Voogt, P., 2001. Aerobic Biodegradation Studies of Nonylphenol Ethoxylates in River Water Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 35, 335–340. <https://doi.org/10.1021/es000127o>

Joyner, J.L., Kerwin, J., Deeb, M., Lozefski, G., Prithiviraj, B., Paltseva, A., McLaughlin, J., Groffman, P., Cheng, Z., Muth, T.R., 2019. Green Infrastructure Design Influences Communities of Urban Soil Bacteria. *Front. Microbiol.* 10, 982. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00982>

K

Kaczyńska, G., Borowik, A., Wyszowska, J., 2015. Soil Dehydrogenases as an Indicator of Contamination of the Environment with Petroleum Products. *Water Air Soil Pollut.*

Kandeler, E., Gerber, H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 6, 68–72. <https://doi.org/10.1007/BF00257924>

Kang, J.-H., Kondo, F., 2002. Effects of bacterial counts and temperature on the biodegradation of bisphenol A in river water. *Chemosphere* 49, 493–498. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00315-6](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00315-6)

Keeney, D.R., Nelson, D.W., 1982. Nitrogen-inorganic forms. In Page AL, Miller RH, Keeney DR (eds) *Methods of soil analysis, part 2*. Madison Wisc Agron. 9, 643–698.

Kersanté, A., Martin-Laurent, F., Soulas, G., Binet, F., 2006. Interactions of earthworms with Atrazine-degrading bacteria in an agricultural soil: Interactions of earthworms with Atrazine-degrading bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57, 192–205. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00108.x>

Khaledian, Y., Brevik, E.C., Pereira, P., Cerdà, A., Fattah, M.A., Tazikeh, H., 2017. Modeling soil cation exchange capacity in multiple countries. *CATENA* 158, 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2017.07.002>

Khan, S., Afzal, M., Iqbal, S., Khan, Q.M., 2013. Plant–bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils 16.

Kisand, V., Cuadros, R., Wikner, J., 2002. Phylogeny of Culturable Estuarine Bacteria Catabolizing Riverine Organic Matter in the Northern Baltic Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 379–388. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.379-388.2002>

Kizilkaya, R., Askin, T., Bayraklı, B., Sağlam, M., 2004. Microbiological characteristics of soils contaminated with heavy metals. *Eur. J. Soil Biol.* 40, 95–102.

Klaubauf, S., Inselsbacher, E., Zechmeister-Boltenstern, S., Wanek, W., Gottsberger, R., Strauss, J., Gorfer, M., 2010. Molecular diversity of fungal communities in agricultural soils from Lower Austria. *Fungal Divers.* 44, 65–75. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0053-1>

- Klečka, G.M., Gonsior, S.J., West, R.J., Goodwin, P.A., Markham, D.A., 2001. Biodegradation of bisphenol a in aquatic environments: River die-away. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2725–2735.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620201211>
- Koner, S., Chen, J.-S., Hsu, B.-M., Rathod, J., Huang, S.-W., Chien, H.-Y., Hussain, B., Chan, M.W.Y., 2022. Depth-resolved microbial diversity and functional profiles of trichloroethylene-contaminated soils for Biolog EcoPlate-based biostimulation strategy. *J. Hazard. Mater.* 424, 127266.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127266>
- Kooch, Y., Ehsani, S., Akbarinia, M., 2020. Stratification of soil organic matter and biota dynamics in natural and anthropogenic ecosystems. *Soil Tillage Res.* 200, 104621.
<https://doi.org/10.1016/j.still.2020.104621>
- Kopecky, J., Kyselkova, M., Omelka, M., Cermak, L., Novotna, J., Grundmann, G.L., Moëgne-Loccoz, Y., Sagova-Mareckova, M., 2011. Actinobacterial community dominated by a distinct clade in acidic soil of a waterlogged deciduous forest. *FEMS Microbiol. Ecol.* 78, 386–394.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01173.x>
- Kucharski, J., Jastrzębska, E., 2006. Effect of heating oil on the activity of soil enzymes and the yield of yellow lupine. *Plant Soil Environ.* 52, 220–226. <https://doi.org/10.17221/3431-PSE>
- Kumar, S., Chaudhuri, S., Maiti, S.K., 2013. Soil Dehydrogenase Enzyme Activity in Natural and Mine Soil - A Review. *Middle-East J. Sci. Res.* 137 898–906.

L

- Lambo, A.J., Patel, T.R., 2006. Cometabolic Degradation of Polychlorinated Biphenyls at Low Temperature by Psychrotolerant Bacterium *Hydrogenophaga* sp. IA3-A. *Curr. Microbiol.* 53, 48–52.
<https://doi.org/10.1007/s00284-005-0194-8>
- Lamprea, K., Bressy, A., Mirande-Bret, C., Caupos, E., Gromaire, M.-C., 2018. Alkylphenol and bisphenol A contamination of urban runoff: an evaluation of the emission potentials of various construction materials and automotive supplies. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 21887–21900.
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-2272-z>
- Lapworth, D.J., Gooddy, D., Harrison, I., Hookey, J., 2005. Pesticides and their metabolites in groundwater - diuron in the Isle of Thanet chalk aquifer of southeast England. *Br. Geol. Surv.*
- Lardy-Fontan, P.S., 2008. ECOLE DOCTORALE SCIENCES CHIMIQUES 483.
- LeFevre, G.H., Hozalski, R.M., Novak, P.J., 2012. The role of biodegradation in limiting the accumulation of petroleum hydrocarbons in raingarden soils. *Water Res.* 46, 6753–6762.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.040>
- LeFevre, G.H., Paus, K.H., Natarajan, P., Gulliver, J.S., Novak, P.J., Hozalski, R.M., 2015. Review of Dissolved Pollutants in Urban Storm Water and Their Removal and Fate in Bioretention Cells. *J. Environ. Eng.* 141, 04014050. [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000876](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000876)
- Lei, Y., Wagner, T., Rijnaarts, H., De Wilde, V., Langenhoff, A., 2023. The removal of micropollutants from treated effluent by batch-operated pilot-scale constructed wetlands. *Water Res.* 230, 119494.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2022.119494>
- Leroy, M.C., Legras, M., Marcotte, S., Moncond'huy, V., Machour, N., Le Derf, F., Portet-Koltalo, F., 2015. Assessment of PAH dissipation processes in large-scale outdoor mesocosms simulating vegetated road-side swales. *Sci. Total Environ.* 520, 146–153.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.020>
- L'état des sols de France, 2011.
- Liang, J., Gao, S., Wu, Z., Rijnaarts, H.H.M., Grotenhuis, T., 2021. DNA-SIP identification of phenanthrene-degrading bacteria undergoing bioaugmentation and natural attenuation in petroleum-contaminated soil. *Chemosphere* 266, 128984.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128984>
- Lima, D.L.D., Schneider, R.J., Esteves, V.I., 2012. Sorption behavior of EE2 on soils subjected to different long-term organic amendments. *Sci. Total Environ.* 423, 120–124.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.014>
- Lin, Z., Bai, J., Zhen, Z., Lao, S., Li, W., Wu, Z., Li, Y., Spiro, B., Zhang, D., 2016. Enhancing pentachlorophenol degradation by vermicomposting associated bioremediation. *Ecol. Eng.* 87, 288–294. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.12.004>

- Liu, J., Wang, Z., Hu, F., Xu, C., Ma, R., Zhao, S., 2020. Soil organic matter and silt contents determine soil particle surface electrochemical properties across a long-term natural restoration grassland. *CATENA* 190, 104526. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104526>
- Liu, X., Wang, Z., Zhang, X., Wang, J., Xu, G., Cao, Z., Zhong, C., Su, P., 2011. Degradation of diesel-originated pollutants in wetlands by *Scirpus triquetus* and microorganisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1967–1972. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.06.005>
- Lu, R., Cao, X., Zheng, X., Zeng, Y., Jiang, Y., Mai, B., 2023. Biomagnification and elimination effects of persistent organic pollutants in a typical wetland food web from South China. *J. Hazard. Mater.* 457, 131733. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131733>
- Luo, H., Liu, C., He, D., Xu, J., Sun, J., Li, J., Pan, X., 2022. Environmental behaviors of microplastics in aquatic systems: A systematic review on degradation, adsorption, toxicity and biofilm under aging conditions. *J. Hazard. Mater.* 423, 126915. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126915>
- Lyon, G., 2008. Aménagement et eaux pluviales sur le territoire du Grand Lyon 31.

M

- Mackelprang, R., Grube, A.M., Lamendella, R., Jesus, E. da C., Copeland, A., Liang, C., Jackson, R.D., Rice, C.W., Kapucija, S., Parsa, B., Tringe, S.G., Tiedje, J.M., Jansson, J.K., 2018. Microbial Community Structure and Functional Potential in Cultivated and Native Tallgrass Prairie Soils of the Midwestern United States. *Front. Microbiol.* 9, 1775. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01775>
- Manriquez, B., Muller, D., Prigent-Combaret, C., 2021. Experimental Evolution in Plant-Microbe Systems: A Tool for Deciphering the Functioning and Evolution of Plant-Associated Microbial Communities. *Front. Microbiol.* 12, 619122. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.619122>
- Mao, Z., Zheng, X.-F., Zhang, Y.-Q., Tao, X.-X., Li, Y., Wang, W., 2012. Occurrence and Biodegradation of Nonylphenol in the Environment. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 491–505. <https://doi.org/10.3390/ijms13010491>
- Marshall, A., Phillips, L., Longmore, A., Tang, C., Heidelberg, K., Mele, P., 2018. Primer selection influences abundance estimates of ammonia oxidizing archaea in coastal marine sediments. *Mar. Environ. Res.* 140, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.06.001>
- Matamoros, V., Salvadó, V., 2012. Evaluation of the seasonal performance of a water reclamation pond-constructed wetland system for removing emerging contaminants. *Chemosphere* 86, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.09.020>
- Matsumura, Y., Hosokawa, C., Sasaki, M., Akahira, A., Fukunaga, K., Ikeuchi, T., Oshiman, K., Tsuchido, T., 2009. Isolation and characterization of novel bisphenol A degrading bacteria from soils. *Biocontrol Sci.* 14, 161–169.
- McFarland, A.R., Larsen, L., Yeshitela, K., Engida, A.N., Love, N.G., 2019. Guide for using green infrastructure in urban environments for stormwater management. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 5, 643–659. <https://doi.org/10.1039/C8EW00498F>
- Meharg, A.A., 1996. Bioavailability of atrazine to soil microbes in the presence of the earthworm *Lumbricus terrestris* (L.). *Soil Biol. Biochem.* 28, 555–559. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00165-4](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00165-4)
- Michałowicz, J., 2014. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 738–758. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.003>
- Mikkelsen, P.S., Häfliger, M., Ochs, M., Jacobsen, P., Tjell, J.C., Boller, M., 1997. Pollution of soil and groundwater from infiltration of highly contaminated stormwater – A case study 6.
- Miller, J.D., Kim, H., Kjeldsen, T.R., Packman, J., Grebby, S., Dearden, R., 2014. Assessing the impact of urbanization on storm runoff in a peri-urban catchment using historical change in impervious cover. *J. Hydrol.* 515, 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2014.04.011>
- Minasny, B., McBratney, A.B., Wadoux, A.M.J.-C., Akoeb, E.N., Sabrina, T., 2020. Precocious 19th century soil carbon science. *Geoderma Reg.* 22, e00306. <https://doi.org/10.1016/j.geodrs.2020.e00306>
- Mitchell, J.I., Zuccaro, A., 2006. Sequences, the environment and fungi. *Mycologist* 20, 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.mycol.2005.11.004>
- Mkhinini, M., Boughattas, I., Alphonse, V., Livet, A., Giusti-Miller, S., Banni, M., Bousserhine, N., 2020. Heavy metal accumulation and changes in soil enzymes activities and bacterial functional diversity under long-term treated wastewater irrigation in East Central region of Tunisia

- (Monastir governorate). *Agric. Water Manag.* 235, 106150.
<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2020.106150>
- Moëgne-Loccoz, Y., Mavingui, P., Combes, C., Normand, P., Steinberg, C., 2015. Microorganisms and Biotic Interactions, in: Bertrand, J.-C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., Normand, P., Sime- Ngando, T. (Eds.), *Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 395–444.
- Moghadam, S.V., Jafarzadeh, A., Matta, A., Dessouky, S., Hutchinson, J., Kapoor, V., 2023. Evaluation of nitrogen removal, functional gene abundance and microbial community structure in a stormwater detention basin. *J. Environ. Manage.* 325, 116669.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116669>
- Mohamed, N., Abdelmajid, H., 2016. Réhabilitation des écosystèmes métallifères par l'utilisation des micro- organismes. (Metalliferous ecosystems Rehabilitation using micro- organisms) 12.
- Montenegro, I.P.F.M., Mucha, A.P., Tomasino, M.P., Gomes, C.R., Almeida, C.M.R., 2021. Alkylphenols and Chlorophenols Remediation in Vertical Flow Constructed Wetlands: Removal Efficiency and Microbial Community Response. *Water* 13, 715. <https://doi.org/10.3390/w13050715>
- Moon, D.-S., Song, H.-G., 2012. Degradation of Alkylphenols by White Rot Fungus *Irpex lacteus* and Its Manganese Peroxidase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 168, 542–549.
<https://doi.org/10.1007/s12010-012-9795-4>
- Mtibaà, R., Olicón-Hernández, D.R., Pozo, C., Nasri, M., Mechichi, T., González, J., Aranda, E., 2018. Degradation of bisphenol A and acute toxicity reduction by different thermo-tolerant ascomycete strains isolated from arid soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156, 87–96.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.077>
- Müller, A., Österlund, H., Marsalek, J., Viklander, M., 2020. The pollution conveyed by urban runoff: A review of sources. *Sci. Total Environ.* 709, 136125.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136125>
- Muscolo, A., Panuccio, M.R., Mallamaci, C., Sidari, M., 2014. Biological indicators to assess short-term soil quality changes in forest ecosystems. *Ecol. Indic.* 45, 416–423.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.04.047>

N

- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Renella, G., Puglisi, E., Ceccanti, B., Masciandaro, G., Fornasier, F., Moscatelli, M.C., Marinari, S., 2012. Soil enzymology: classical and molecular approaches. *Biol. Fertil. Soils* 48, 743–762. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0723-0>
- Nannipieri, P., Johnson, R.L., Paul, E.A., 1978a. Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 10, 223–229. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(78\)90100-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(78)90100-1)
- Nannipieri, P., Johnson, R.L., Paul, E.A., 1978b. Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 10, 223–229. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(78\)90100-1](https://doi.org/10.1016/0038-0717(78)90100-1)
- Napier, F., Jefferies, C., Heal, K.V., Fogg, P., Arcy, B.J.D., Clarke, R., 2009. Evidence of traffic-related pollutant control in soil-based Sustainable Urban Drainage Systems (SUDS). *Water Sci. Technol.* 60, 221–230. <https://doi.org/10.2166/wst.2009.326>
- Natal-da-Luz, T., Lee, I., Verweij, R.A., Morais, P.V., Van Velzen, M.J.M., Sousa, J.P., Van Gestel, C.A.M., 2012. Influence of earthworm activity on microbial communities related with the degradation of persistent pollutants. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 794–803. <https://doi.org/10.1002/etc.1738>
- Németh, I., Molnár, S., Vaszita, E., Molnár, M., 2021. The Biolog EcoPlate™ Technique for Assessing the Effect of Metal Oxide Nanoparticles on Freshwater Microbial Communities. *Nanomaterials* 11, 1777. <https://doi.org/10.3390/nano11071777>
- Ning, Y., Zhou, H., Zhou, D., 2019. Study on the microbial community in earthworm and soil under cadmium stress based on contour line analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 20989–21000.
<https://doi.org/10.1007/s11356-019-05207-w>
- Niwa, R., Yoshida, S., Furuya, N., Tsuchiya, K., Tsushima, S., 2011. Method for simple and rapid enumeration of total epiphytic bacteria in the washing solution of rice plants. *Can. J. Microbiol.* 57, 62–67. <https://doi.org/10.1139/W10-101>
- Nowak, M., Soboń, A., Litwin, A., Różalska, S., 2019. 4-n-nonylphenol degradation by the genus *Metarhizium* with cytochrome P450 involvement. *Chemosphere* 220, 324–334.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.114>

Nunan, N., Wu, K., Young, I.M., Crawford, J.W., Ritz, K., 2003. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 13.

P

Paijens, C., Bressy, A., Frère, B., Moilleron, R., 2020. Biocide emissions from building materials during wet weather: identification of substances, mechanism of release and transfer to the aquatic environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 3768–3791. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06608-7>

Paissé, S., Coulon, F., Goñi-Urriza, M., Peperzak, L., McGenity, T.J., Duran, R., 2008. Structure of bacterial communities along a hydrocarbon contamination gradient in a coastal sediment: Bacterial communities along a hydrocarbon gradient. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66, 295–305. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00589.x>

Pauget, B., Gimbert, F., Scheifler, R., Coeurdassier, M., de Vaufléury, A., 2012. Soil parameters are key factors to predict metal bioavailability to snails based on chemical extractant data. *Sci. Total Environ.* 431, 413–425. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.05.048>

Paulus, W., 2005. 1 Introduction to microbicides. *Dir. Microbicides Prot. Mater.* 6.

Payne, E.G.I., Pham, T., Cook, P.L.M., Fletcher, T.D., Hatt, B.E., Deletic, A., 2014. Biofilter design for effective nitrogen removal from stormwater – influence of plant species, inflow hydrology and use of a saturated zone. *Water Sci. Technol.* 69, 1312–1319. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.013>

Payne, E.G.I., Pham, T., Deletic, A., Hatt, B.E., Cook, P.L.M., Fletcher, T.D., 2018. Which species? A decision-support tool to guide plant selection in stormwater biofilters. *Adv. Water Resour.* 113, 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.advwatres.2017.12.022>

Peng, Y.-H., Chen, Y.-J., Chang, Y.-J., Shih, Y., 2015. Biodegradation of bisphenol A with diverse microorganisms from river sediment. *J. Hazard. Mater.* 286, 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.051>

Pereira, C.S., 2017. Influence de la matière organique dissoute d'origine urbaine sur la spéciation des micropolluants: de la station d'épuration au milieu récepteur 300.

Pietri, J.C.A., Brookes, P.C., 2008. Relationships between soil pH and microbial properties in a UK arable soil. *Soil Biol.* 6.

Piotrowska, A., Długosz, J., 2012. Spatio-temporal variability of microbial biomass content and activities related to some physicochemical properties of Luvisols. *Geoderma* 173–174, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.12.014>

Preston-Mafham, J., Boddy, L., Randerson, P.F., 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles – a critique. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42, 1–14. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00990.x>

R

Ranjard, L., Richaume, A., 2001. Quantitative and qualitative microscale distribution of bacteria in soil. *Res. Microbiol.* 152, 707–716. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(01\)01251-7](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(01)01251-7)

Rasche, F., Knapp, D., Kaiser, C., Koranda, M., Kitzler, B., Zechmeister-Boltenstern, S., Richter, A., Sessitsch, A., 2011. Seasonality and resource availability control bacterial and archaeal communities in soils of a temperate beech forest. *ISME J.* 5, 389–402. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.138>

Reiß, F., Kiefer, N., Noll, M., Kalkhof, S., 2021. Application, release, ecotoxicological assessment of biocide in building materials and its soil microbial response. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 224, 112707. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112707>

Ren, X., Zeng, G., Tang, L., Wang, J., Wan, J., Liu, Y., Yu, J., Yi, H., Ye, S., Deng, R., 2018. Sorption, transport and biodegradation – An insight into bioavailability of persistent organic pollutants in soil. *Sci. Total Environ.* 610–611, 1154–1163. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.089>

Rentachintala, L.R.N.P., Reddy, M.G.M., Mohapatra, P.K., 2022. Urban stormwater management for sustainable and resilient measures and practices: a review. *Water Sci. Technol.* 85, 1120–1140. <https://doi.org/10.2166/wst.2022.017>

Requasud, n.d. <https://www.requasud.be/>.

Révész, F., Farkas, M., Kriszt, B., Szoboszlai, S., Benedek, T., Táncsics, A., 2020. Effect of oxygen limitation on the enrichment of bacteria degrading either benzene or toluene and the identification of

- Malikia spinosa (Comamonadaceae) as prominent aerobic benzene-, toluene-, and ethylbenzene-degrading bacterium: enrichment, isolation and whole-genome analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 31130–31142. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09277-z>
- Rios-Miguel, A.B., Van Bergen, T.J.H.M., Zillien, C., Ragas, A.M.J., Van Zelm, R., Jetten, M.S.M., Hendriks, A.J., Welte, C.U., 2023. Predicting and improving the microbial removal of organic micropollutants during wastewater treatment: A review. *Chemosphere* 333, 138908. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138908>
- Roager, L., Sonnenschein, E.C., 2019. Bacterial Candidates for Colonization and Degradation of Marine Plastic Debris. *Environ. Sci. Technol.* 53, 11636–11643. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b02212>
- Robert-Sainte, P., Gromaire, M.C., de Gouvello, B., Saad, M., Chebbo, G., 2009. Annual Metallic Flows in Roof Runoff from Different Materials: Test-Bed Scale in Paris Conurbation. *Environ. Sci. Technol.* 43, 5612–5618. <https://doi.org/10.1021/es9002108>
- Rommel, S.H., Ebert, V., Huber, M., Drewes, J.E., Helmreich, B., 2019. Spatial distribution of zinc in the topsoil of four vegetated infiltration swales treating zinc roof runoff. *Sci. Total Environ.* 672, 806–814. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.016>
- Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), 2014. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1>
- Rotaru, C., Woodard, T.L., Nevin, K.P., 2011. Bacterial Diversity in Soil Exposed to Highway Runoff and De-icing Agents. *Geomicrobiol. J.* 28, 359–370. <https://doi.org/10.1080/01490451.2010.504608>
- Runes, H.B., Jenkins, J.J., Moore, J.A., Bottomley, P.J., Wilson, B.D., 2003. Treatment of atrazine in nursery irrigation runoff by a constructed wetland. *Water Res.* 37, 539–550. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(02\)00310-X](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(02)00310-X)

S

- Sage, J., 2016. Concevoir et optimiser la gestion hydrologique du ruissellement pour une maîtrise à la source de la contamination des eaux pluviales urbaines 394.
- Sarma, H., Nava, A.R., Manriquez, A.M.E., Dominguez, D.C., Lee, W.-Y., 2019. Biodegradation of bisphenol A by bacterial consortia isolated directly from river sediments. *Environ. Technol. Innov.* 14, 100314. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.01.008>
- Sasaki, M., Tsuchido, T., Matsumura, Y., 2008. Molecular cloning and characterization of cytochrome P450 and ferredoxin genes involved in bisphenol A degradation in *Sphingomonas bisphenolicum* strain AO1. *J. Appl. Microbiol.* 105, 1158–1169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03843.x>
- Sauve, A., Glatard, F., Faucon, P., Damas, O., 2014. Aménagement et choix des végétaux des ouvrages de gestion des eaux pluviales de proximité Rapport final 48.
- Schimel, J., Balser, T.C., Wallenstein, M., 2007. MICROBIAL STRESS-RESPONSE PHYSIOLOGY AND ITS IMPLICATIONS FOR ECOSYSTEM FUNCTION. *Ecology* 88, 1386–1394. <https://doi.org/10.1890/06-0219>
- Scholes, L., Revitt, M., Gasperi, J., Donner, E., 2008. Priority pollutant behaviour in stormwater Best Management Practices (BMPs) 61.
- Sebastian, C., 2013. Urban stormwater detention basin : performance in terms of micropollutant trapping (Thèse de doctorat). INSA de Lyon.
- Shao, Y., Chen, Z., Hollert, H., Zhou, S., Deutschmann, B., Seiler, T.-B., 2019. Toxicity of 10 organic micropollutants and their mixture: Implications for aquatic risk assessment. *Sci. Total Environ.* 666, 1273–1282. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.047>
- Sharma, P., Bano, A., Yadav, S., Singh, S.P., 2023. Biocatalytic Degradation of Emerging Micropollutants. *Top. Catal.* <https://doi.org/10.1007/s11244-023-01790-y>
- Shchegolikhina, A., Marschner, B., 2013. Effects of sterile storage, cation saturation and substrate additions on the degradability and extractability of nonylphenol and phenanthrene in soil. *Chemosphere* 93, 2195–2202. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.08.006>
- Singh, P., Kumar, A., Borthakur, A., 2020. Abatement of environmental pollutants: trends and strategies.
- Singh, R.P., Fu, DaFang, Fu, DaNeng, Juan, H., 2014. Pollutant Removal Efficiency of Vertical Sub-surface Upward Flow Constructed Wetlands for Highway Runoff Treatment. *Arab J Sci Eng* 8.

- Singleton, D.R., Adrion, A.C., Aitken, M.D., 2016. Surfactant-induced bacterial community changes correlated with increased polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 10165–10177. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7867-z>
- Smith, S., Tiedje, J.M., 1979. PHASES OF DENITRIFICATION FOLLOWING OXYGEN DEPLETION IN SOIL 7.
- Smolders, E., Oorts, K., Sprang, P.V., Schoeters, I., Janssen, C.R., McGrath, S.P., McLaughlin, M.J., 2009. TOXICITY OF TRACE METALS IN SOIL AS AFFECTED BY SOIL TYPE AND AGING AFTER CONTAMINATION: USING CALIBRATED BIOAVAILABILITY MODELS TO SET ECOLOGICAL SOIL STANDARDS. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1633. <https://doi.org/10.1897/08-592.1>
- Soares, A., Guieysse, B., Delgado, O., Mattiasson, B., 2003. Aerobic biodegradation of nonylphenol by cold-adapted bacteria.
- Solly, E.F., Weber, V., Zimmermann, S., Walthert, L., Hagedorn, F., Schmidt, M.W.I., 2020. A Critical Evaluation of the Relationship Between the Effective Cation Exchange Capacity and Soil Organic Carbon Content in Swiss Forest Soils. *Front. For. Glob. Change* 3, 98. <https://doi.org/10.3389/ffgc.2020.00098>
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., Remans, R., 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 425–448. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x>
- Spivack, J., Leib, T.K., Lobos, J.H., 1994. Novel pathway for bacterial metabolism of bisphenol A. Rearrangements and stilbene cleavage in bisphenol A metabolism. *J. Biol. Chem.* 269, 7323–7329. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)37287-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)37287-3)
- Spósito, G., 2008. The chemistry of soils, second edition., Oxford University Press.
- Stachel, B., Holthuis, J.-U., Schulz, W., Seitz, W., Weber, W.H., Tegge, K.-T., Dobner, I., 2010. Treatment Techniques and Analysis of Stormwater Run-off from Roads in Hamburg, Germany, in: Fatta-Kassinos, D., Bester, K., Kümmerer, K. (Eds.), *Xenobiotics in the Urban Water Cycle: Mass Flows, Environmental Processes, Mitigation and Treatment Strategies*, Environmental Pollution. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 445–461. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3509-7_24
- Staples, C.A., Adams, W.J., Parkerton, T.F., Gorsuch, J.W., Biddinger, G.R., Reinert, K.H., 1997. Aquatic toxicity of eighteen phthalate esters. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 875–891. <https://doi.org/10.1002/etc.5620160507>
- Subramanian, V., Yadav, J.S., 2009. Role of P450 Monooxygenases in the Degradation of the Endocrine-Disrupting Chemical Nonylphenol by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5570–5580. <https://doi.org/10.1128/AEM.02942-08>

T

- Tachon, S., Michelon, D., Chambellon, E., Cantonnet, M., Mezange, C., Henno, L., Cachon, R., Yvon, M., 2009. Experimental conditions affect the site of tetrazolium violet reduction in the electron transport chain of *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 155, 2941–2948. <https://doi.org/10.1099/mic.0.029678-0>
- Tao, K., Tian, H., Fan, J., Li, D., Liu, C., Megharaj, M., Li, H., Hu, M., Jia, H., He, W., 2021. Kinetics and catalytic efficiency of soil fluorescein diacetate hydrolase under the pesticide parathion stress. *Sci. Total Environ.* 771, 144835. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144835>
- Tedoldi, D., 2017a. Mesure et modélisation de la contamination du sol dans les ouvrages de gestion à la source du ruissellement urbain (Thèse de doctorat). Université Paris-Est.
- Tedoldi, D., 2017b. Mesure et modélisation de la contamination du sol dans les ouvrages de gestion à la source du ruissellement urbain 259.
- Tedoldi, D., 2016. Impact of runoff infiltration on contaminant accumulation and transport in the soil/filter media of Sustainable Urban Drainage Systems: A literature review 24.
- Tedoldi, D., Chebbo, G., Pierlot, D., Branchu, P., Kovacs, Y., Gromaire, M.-C., 2017. Spatial distribution of heavy metals in the surface soil of source-control stormwater infiltration devices – Inter-site comparison. *Sci. Total Environ.* 579, 881–892. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.226>
- Tedoldi, D., Chebbo, G., Pierlot, D., Kovacs, Y., Gromaire, M.-C., 2016. Impact of runoff infiltration on contaminant accumulation and transport in the soil/filter media of Sustainable Urban Drainage Systems: A literature review. *Sci. Total Environ.* 569–570, 904–926. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.215>

- Telke, A.A., Kalyani, D.C., Jadhav, U.U., Parshetti, G.K., Govindwar, S.P., 2009. Purification and characterization of an extracellular laccase from a *Pseudomonas* sp. LBC1 and its application for the removal of bisphenol A. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 61, 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.08.001>
- Ten, L.N., Okiria, J., Lee, J.-J., Lee, S.-Y., Park, S., Lee, D.S., Kang, I.-K., Kim, M.K., Jung, H.-Y., 2018. *Spirosoma terrae* sp. nov., Isolated from Soil from Jeju Island, Korea. *Curr. Microbiol.* 75, 492–498. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1408-6>
- Thelusmond, J.-R., Strathmann, T.J., Cupples, A.M., 2016. The identification of carbamazepine biodegrading phylotypes and phylotypes sensitive to carbamazepine exposure in two soil microbial communities. *Sci. Total Environ.* 571, 1241–1252. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.154>
- Tong, T., Li, R., Chai, M., Wang, Q., Yang, Y., Xie, S., 2021. Metagenomic analysis of microbial communities continuously exposed to Bisphenol A in mangrove rhizosphere and non-rhizosphere soils. *Sci. Total Environ.* 792, 148486. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148486>
- Tripathi, B.M., Kim, H.M., Jung, J.Y., Nam, S., Ju, H.T., Kim, M., Lee, Y.K., 2019. Distinct Taxonomic and Functional Profiles of the Microbiome Associated With Different Soil Horizons of a Moist Tussock Tundra in Alaska. *Front. Microbiol.* 10, 1442. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01442>
- Tripathi, B.M., Moroenyane, I., Sherman, C., Lee, Y.K., Adams, J.M., Steinberger, Y., 2017. Trends in Taxonomic and Functional Composition of Soil Microbiome Along a Precipitation Gradient in Israel. *Microb. Ecol.* 74, 168–176. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0931-0>
- Tuan, N.N., Hsieh, H.-C., Lin, Y.-W., Huang, S.-L., 2011. Analysis of bacterial degradation pathways for long-chain alkylphenols involving phenol hydroxylase, alkylphenol monooxygenase and catechol dioxygenase genes. *Bioresour. Technol.* 102, 4232–4240. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.067>
- Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P.W., Palmer, J.D., 1999. Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
- Tyagi, B., Kumar, N., 2021. Bioremediation: principles and applications in environmental management, in: *Bioremediation for Environmental Sustainability*. Elsevier, pp. 3–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820524-2.00001-8>
- Tyagi, M., Da Fonseca, M.M.R., De Carvalho, C.C.C.R., 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation* 22, 231–241. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9394-4>

U

- Unger, I.M., Goynes, K.W., Kremer, R.J., Kennedy, A.C., 2013. Microbial community diversity in agroforestry and grass vegetative filter strips. *Agrofor. Syst.* 87, 395–402. <https://doi.org/10.1007/s10457-012-9559-8>

V

- Varraut, G., Rocher, V., Bracmort, G., Louis, Y., Matar, Z., 2012. Vers une nouvelle méthode de détermination des métaux labiles dans les milieux aquatiques. *Tech. Sci. Méthodes* 56–66. <https://doi.org/10.1051/tsm/201204056>
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., Nasrulhaq Boyce, A., 2016. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability—A Review. *Molecules* 21, 573. <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
- Vijayaraghavan, K., Biswal, B.K., Adam, M.G., Soh, S.H., Tsen-Tieng, D.L., Davis, A.P., Chew, S.H., Tan, P.Y., Babovic, V., Balasubramanian, R., 2021. Bioretention systems for stormwater management: Recent advances and future prospects. *J. Environ. Manage.* 292, 112766. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112766>

W

- Waigi, M.G., Kang, F., Goikavi, C., Ling, W., Gao, Y., 2015. Phenanthrene biodegradation by sphingomonads and its application in the contaminated soils and sediments: A review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 104, 333–349. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.06.008>

- Wang, J., Zhang, L., He, Y., Ji, R., 2024. Biodegradation of phenolic pollutants and bioaugmentation strategies: A review of current knowledge and future perspectives. *J. Hazard. Mater.* 469, 133906. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133906>
- Wang, X., Chen, J., Ji, R., Liu, Y., Su, Y., Guo, R., 2019. Degradation of Bisphenol S by a Bacterial Consortium Enriched from River Sediments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 103, 630–635. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02699-7>
- Wang, Z., Yang, Y., Dai, Y., Xie, S., 2015. Anaerobic biodegradation of nonylphenol in river sediment under nitrate- or sulfate-reducing conditions and associated bacterial community. *J. Hazard. Mater.* 286, 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.057>
- Wang, Z., Yang, Y., Sun, W., Xie, S., Liu, Y., 2014. Nonylphenol biodegradation in river sediment and associated shifts in community structures of bacteria and ammonia-oxidizing microorganisms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.019>
- Weiss, P.T., LeFevre, G., Gulliver, J.S., 2008. Contamination of Soil and Groundwater Due to Stormwater Infiltration Practices.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J., 1990. AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS, in: *PCR Protocols*. Elsevier, pp. 315–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wick, A., Fink, G., Ternes, T.A., 2010. Comparison of electrospray ionization and atmospheric pressure chemical ionization for multi-residue analysis of biocides, UV-filters and benzothiazoles in aqueous matrices and activated sludge by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 2088–2103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.079>
- Wicke, D., Matzinger, A., Sonnenberg, H., Caradot, N., Schubert, R.-L., Dick, R., Heinzmann, B., Dünnbier, U., Von Seggern, D., Rouault, P., 2021. Micropollutants in Urban Stormwater Runoff of Different Land Uses. *Water* 13, 1312. <https://doi.org/10.3390/w13091312>
- Wikström, A.A., 2015. Potential Sources of Stormwater Pollutants: Leaching of Metals and Organic Compounds from Roofing Materials. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1239.1281>
- Wittmer, I.K., Bader, H.-P., Scheidegger, R., Singer, H., Lück, A., Hanke, I., Carlsson, C., Stamm, C., 2010. Significance of urban and agricultural land use for biocide and pesticide dynamics in surface waters. *Water Res.* 44, 2850–2862. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.01.030>
- Wolińska, A., Gałązka, A., Kuźniar, A., Goraj, W., Jastrzębska, N., Grządziel, J., Stępniewska, Z., 2018. Catabolic Fingerprinting and Diversity of Bacteria in Mollic Gleysol Contaminated with Petroleum Substances. *Appl. Sci.* 8, 1970. <https://doi.org/10.3390/app8101970>
- Wu, K., Dumat, C., Li, H., Xia, H., Li, Z., Wu, J., 2019. Responses of soil microbial community and enzymes during plant-assisted biodegradation of di-(2-ethylhexyl) phthalate and pyrene. *Int. J. Phytoremediation* 21, 683–692. <https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1556586>
- Wu, M., Li, W., Dick, W.A., Ye, X., Chen, K., Kost, D., Chen, L., 2017. Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination. *Chemosphere* 169, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.059>
- Wyszkowska, J., Kucharski, J., Wałdowska, E., 2002. The influence of diesel oil contamination on soil enzymes activity. *Plant Soil Environ.* 48, 58–62. <https://doi.org/10.17221/4360-PSE>

X

- Xing, J., Zhang, S., Zhang, M., Hou, J., 2022. A critical review of presence, removal and potential impacts of endocrine disruptors bisphenol A. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 254, 109275. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2022.109275>

Y

- Yang, Y., Wang, J., Liao, J., Xie, S., Huang, Y., 2014. Distribution of Naphthalene Dioxygenase Genes in Crude Oil-Contaminated Soils. *Microb. Ecol.* 68, 785–793. <https://doi.org/10.1007/s00248-014-0457-7>
- Yang, Z., Shi, Y., Zhang, Y., Cheng, Q., Li, X., Zhao, C., Zhang, D., 2018. Different pathways for 4-n-nonylphenol biodegradation by two *Aspergillus* strains derived from estuary sediment: Evidence from metabolites determination and key-gene identification. *J. Hazard. Mater.* 359, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.07.058>

- Yi, M., Zhang, L., Qin, C., Lu, P., Bai, H., Han, X., Yuan, S., 2022. Temporal changes of microbial community structure and nitrogen cycling processes during the aerobic degradation of phenanthrene. *Chemosphere* 286, 131709. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131709>
- Ying, G.-G., Williams, B., Kookana, R., 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environ. Int.* 12.
- Yousefi-Ahmadipour, A., Bozorgi-Koshalshahi, M., Mogharabi, M., Amini, M., Ghazi-Khansari, M., Faramarzi, M.A., 2016. Laccase-catalyzed treatment of ketoconazole, identification of biotransformed metabolites, determination of kinetic parameters, and evaluation of micro-toxicity. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 133, 77–84. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.07.015>
- Yuan, S.Y., Yu, C.H., Chang, B.V., 2004. Biodegradation of nonylphenol in river sediment. *Environ. Pollut.* 127, 425–430. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.08.010>
- Yuan, X., Cui, K., Chen, Y., Xu, W., Li, P., He, Y., 2023. Response of microbial community and biological nitrogen removal to the accumulation of nonylphenol in sequencing batch reactor. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 20, 12669–12680. <https://doi.org/10.1007/s13762-023-04825-9>

Z

- Zabaloy, M.C., Garland, J.L., Gómez, M.A., 2008. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Appl. Soil Ecol.* 40, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2008.02.004>
- Zaborowska, M., Wyszowska, J., Borowik, A., 2020. Soil Microbiome Response to Contamination with Bisphenol A, Bisphenol F and Bisphenol S. *Int J Mol Sci* 28.
- Zarezadeh, V., Lung, T., Dorman, T., Shipley, H.J., Giacomoni, M., 2018. Assessing the performance of sand filter basins in treating urban stormwater runoff. *Environ. Monit. Assess.* 190, 697. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-7069-5>
- Zgheib, S., 2009. Flux et sources des polluants prioritaires dans les eaux urbaines en lien avec l’usage du territoire 360.
- Zgheib, S., Moilleron, R., Chebbo, G., 2012. Priority pollutants in urban stormwater: Part 1 – Case of separate storm sewers. *Water Res.* 46, 6683–6692. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.012>
- Zgheib, S., Moilleron, R., Saad, M., Chebbo, G., 2011. Partition of pollution between dissolved and particulate phases: What about emerging substances in urban stormwater catchments? *Water Res.* 45, 913–925. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.09.032>
- Zhang, L., Cheng, Y., Qian, Y., Ding, T., Li, J., 2022. Bisphenol S degradation in soil and the dynamics of microbial community associated with degradation. *Sci. Total Environ.* 846, 157451. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157451>
- Zhang, W., Yin, K., Chen, L., 2013. Bacteria-mediated bisphenol A degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 5681–5689. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4949-z>
- Zhang, Y., Zhu, S., Xiao, R., Wang, J., Li, F., 2008. Vertical transport of polycyclic aromatic hydrocarbons in different particle-size fractions of sandy soils. *Environ. Geol.* 53, 1165–1172. <https://doi.org/10.1007/s00254-007-0706-x>
- Zhou, L., Sang, S., Li, J., Li, Y., Wang, D., Gan, L., Zhao, Z., Wang, J., 2023. From waste to resource: Metagenomics uncovers the molecular ecological resources for plastic degradation in estuaries of South China. *Water Res.* 242, 120270. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120270>

« Devenir des micropolluants organiques dans les sols des ouvrages de gestion à la source des eaux pluviales : interactions diversité microbienne et biodégradabilité des micropolluants »

Résumé

Suite à l'augmentation massive des surfaces imperméables depuis l'ère industrielle, plusieurs problèmes ont vu le jour. Premièrement, des problèmes de gestion des eaux pluviales au sein des villes apparaissent avec des situations de surcharge des réseaux et d'inondations. Deuxièmement, le transfert des eaux pluviales sur une longue distance pour être rejetées de la ville va entraîner une contamination de ces eaux en micropolluants et cela va également amener à la contamination du milieu receveur. Pour éviter cela un nouveau paradigme à vue le jour qui repose à traiter les eaux pluviales le plus proche possible de son point de chute. Afin de répondre à ces exigences, de nouvelles structures alternatives ont vu le jour qui vont permettre de mimer le cycle naturel de l'eau et de réduire au maximum le trajet des eaux pluviales afin de contrôler au mieux les flux de polluants. L'objectif étant maintenant d'étudier ces structures pour mieux comprendre leur fonctionnement et vérifier qu'elles répondent aux exigences de leur création.

Ce travail de thèse s'intègre dans la phase 5 du programme OPUR s'intéresse donc à l'étude du fonctionnement biologique et la performance des sols des ouvrages de gestion des eaux pluviales. Plus précisément à l'interaction qu'il y a entre les microorganismes et les micropolluants présents dans les sols de ces ouvrages. Comprendre l'implication des microorganismes dans la biodégradation de ce micropolluants étant un objectif à atteindre. Pour cela, trois sites contenant au total 5 ouvrages vont être utilisés pour ces travaux de thèse. Ces sites ont été choisis en fonction de critères particuliers comme la durée de mise en service (site ancien, moyen et jeune), la texture du sol, le type de pollution (de voirie). Les ouvrages ont ensuite été échantillonnés en fonction de la présence ou non de végétation et de la sollicitation hydrique). La zone d'arrivée de l'eau dans les ouvrages sera considérée comme la zone « apport » tandis que la partie de l'ouvrage à distance de l'arrivée hydrique sera considérée comme la zone de « référence ». L'étude de 11 sols provenant de ces 3 sites permettra une comparaison de l'état des sols, de l'activité biologique et puis des capacités de biodégradation microbienne afin de mieux comprendre le fonctionnement biologique de ces ouvrages. Des campagnes d'échantillonnage en été et en hiver ont été réalisées pour aussi apprécier l'impact des saisons sur les communautés microbiennes de ces sols particuliers. Une caractérisation physico-chimique (pH, MO, CEC, capacité au champ, granulométrie) et biologique (biomasse « NPP », activité enzymatique « FDA, déshydrogénase et uréase », activité potentielle « plaque Ecologue », diversité bactérienne et fongique) a été faite à chacune de ces campagnes. Puis des cinétiques de biodégradation en batch liquide et en colonne ont été réalisées pour évaluer la performance de biodégradation des microorganismes autochtones des sols des ouvrages face à un cocktail de micropolluants : BPA, NP et OP.

Les résultats des travaux de cette thèse ont mis en évidence l'aspect important de la durée de mise en service des structures pour avoir des activités microbiennes et des performances de biodégradation importantes dans les sols. Les zones des ouvrages situées dans la zone apport donc qui sont soumises à un apport en eaux pluviales important sont les zones les plus actives. Des préférences de biodégradation des micropolluants ainsi que des vitesses de biodégradation apport/référence au sein d'un même site sont aussi observées au cours de la cinétique en batch liquide. Les études sur la diversité génétique ont aussi montré des structures microbiennes différentes entre les sites et également avec les sols les plus actifs pour la biodégradation des micropolluants. Ces travaux ont aussi pu montrer que les actions d'entretien des ouvrages ont un impact négatif non négligeable sur les sols de ces structures.

Pour conclure, ces travaux permettent de mieux comprendre le fonctionnement biologique qui s'opère au sein des sols des ouvrages et leur implication sur le devenir des micropolluants. A terme, ces travaux participeront à la réflexion pour améliorer la mise en place de ces structures et leur optimisation ainsi que leur entretien.

Mots clés : ouvrages de gestion des eaux pluviales, microorganismes, micropolluants, sol