**IMPACT OF THE DIFFERENT BIOREMEDIATION TREATMENTS ON THE STRUCTURE AND ACTIVITY OF FUNCTINAL COMMUNITY INVOLVED IN PCB-DEGRADATION**

Ines Petric1,2, David Bru2, Dubravka Hrsak1, and Fabrice Martin-Laurent2

1 Ruder Boskovic Institute, ZIMO, Bijenicka 54, 10 000 Zagreb, Croatia,

 *2 INRA, Université de Bourgogne, UMR MSE, 17 rue Sully, 21065 Dijon Cedex, France*

Even though production of polychlorinated biphenyls (PCBs) was banned more than 30 years ago, their persistence, toxicity and potential to accumulate in the food web, makes PCBs still ecological and health issues worldwide. Use of microorganisms for cleaning of PCB-contaminated environments has been proposed as a cost-effective and environmentally friendly strategy in comparison with physical-chemical treatments. Even though microbial strains able to co-metabolize PCBs under aerobic or anaerobic conditions have been isolated, in situ removal rates are exceptionally weak, therefore the challenge is to determine why this is so, and to find a way to realize full potential of PCB degraders. In order to better understand biological processes that facilitate PCB-bioremediation in contaminated soils, a small-scale bioremediation experiment was designed. Soil designated for bioremediation had been contaminated with PCBs for more than 10 years as a consequence of transformer station damaged during war event in Croatia. Small-scale field experiment employed three different strategies: (i) bioaugmentation of soil with PCB-degrading mixed culture TSZ7 (BAM treatment) or PCB-degrading strain Rhodococcus sp. Z6 (BAP treatments) and amendments (xylose, carvone and soya lecithin), and (ii) biostimulation of soil only with the amendments (BS treatment). Only natural compounds for both inducing PCB-degradation pathway and enhancing PCB bioavailability were used in the experiment. Study investigated the impact of the treatments (i) on the diversity and abundance of PCB-degrading bacteria (by quantitative PCR, cloning and sequencing of bphA and bphC sequences), (ii) on the PCB-degrading activity of soil microbiota and (by determining PCB residues using gas chromatography analysis) (iii) on the changes in total bacterial community structure (using soil DNA bar coding). Results showed low phylogenetic diversity among PCB-degraders in soils indicating Rhodococcus genus bacteria as the predominant one in all treated soils with the genetic potential to degrade PCBs. Higher levels of bphA and bphC sequences detected in remediated soils further implied that treatments led to the switch in the soil microbial community favoring the development of PCB-degrading Rhodococcus population, shown to represent up to 0.2 % of the total soil bacterial community. It was shown that treatments enhanced removal of PCBs from the soil with approximately 40% of the PCBs being transformed within first year of the experiment. After reaching this maximum further degradation was shown to be limited. Even thought biostimulation was indicated as a sufficient strategy for bioremediation of the targeted soil, the fact that bioaugmentation accelerated PCB-degradation process suggested that soil inoculation with PCB-degraders played a complementary role in the degradation process. Metabolically active soil bacteria were shown to be efficient in degrading structurally versatile PCB congeners present in soil, even ortho-substituted PCBs, known to be highly resistant to microbial degradation. Bar coding analysis of soil DNA extracts revealed that remediation deeply changed the global genetic structure of soil microbial communities. One could conclude that bioremediation treatments affected (i) the abundance of competent PCB-degraders in soil and/or (ii) the induction of microbial community catabolic genes and/or (iii) the bioavailability of PCBs in soil.

Même si la production de biphényles polychlorés (BPC) a été interdit plus de 30 ans, leur persistance, leur toxicité et le potentiel de s'accumuler dans la chaîne alimentaire, les PCB fait encore des questions écologiques et de santé dans le monde entier. L'utilisation des microorganismes pour le nettoyage des environnements contaminés par les BPC a été proposé comme une stratégie rentable et respectueuse de l'environnement en comparaison avec les traitements physico-chimiques. Même si des souches microbiennes capables de co-métaboliser les PCB dans des conditions aérobies ou anaérobies ont été isolées, des taux de retrait in situ sont exceptionnellement faibles, par conséquent, le défi est de déterminer pourquoi c'est ainsi, et à trouver un moyen de réaliser le plein potentiel de PCB dégradeurs . Afin de mieux comprendre les processus biologiques qui facilitent la biorestauration des PCB dans les sols contaminés, une expérience de bioremédiation petite échelle a été conçue. Sols désigné pour la biorestauration avaient été contaminés par les PCB depuis plus de 10 ans comme une conséquence de la station de transformateur endommagé pendant l'événement de guerre en Croatie. Expérience sur le terrain à petite échelle a employé trois stratégies différentes: (i) bioaugmentation de sol avec des PCB dégradants culture mixte TSZ7 (BAM traitement) ou PCB dégradants souche de Rhodococcus sp. Z6 (traitements BAP) et amendements (xylose, carvone et lécithine de soja), et (ii) de biostimulation du sol seulement avec les modifications (traitement BS). Seuls les composés naturels pour les deux voies de dégradation des PCB et de la biodisponibilité induisant l'amélioration des PCB ont été utilisés dans l'expérience. Étude a examiné l'impact des traitements (i) sur la diversité et l'abondance des bactéries dégradant PCB (par PCR quantitative, le clonage et le séquençage de BPHA et des séquences bphC), (ii) sur l'activité des PCB dégradants du microbiote du sol et (par détermination des résidus de BPC en utilisant une analyse chromatographie en phase gazeuse) (iii) sur les changements dans la structure de la communauté bactérienne totale (en utilisant une barre ADN de sol de codage). Les résultats ont montré une grande diversité phylogénétique faible chez les PCB dans les sols dégradeurs indiquant bactéries genre Rhodococcus comme celui prédominant dans tous les sols traités avec le potentiel génétique de dégrader les PCB. Des niveaux élevés de BPHA et des séquences bphC détecté dans les sols assainis encore implicitement que les traitements ont conduit à l'interrupteur de la communauté microbienne du sol en favorisant le développement de la population aux PCB Rhodococcus dégradant, montré pour représenter jusqu'à 0,2% de la communauté bactérienne totale du sol. Il a été montré que les traitements avec suppression améliorée des PCB dans le sol avec environ 40% des PCB se transforme pendant la première année de l'expérience. Après avoir atteint cette dégradation maximale supplémentaire a été montré à être limitée. Même la pensée biostimulation était indiquée comme une stratégie suffisante pour la biorestauration des sols ciblées, le fait que bioaugmentation accéléré la dégradation des PCB processus suggéré que l'inoculation du sol avec des PCB dégradeurs joué un rôle complémentaire dans le processus de dégradation. Métaboliquement actifs bactéries du sol se sont révélés efficaces dans la dégradation congénères de PCB structurellement polyvalent présents dans le sol, même ortho-substitués PCB, connus pour être très résistants à la dégradation microbienne. Le codage à barres de l'analyse des extraits d'ADN a révélé que le sol d'assainissement profondément modifié la structure génétique globale des communautés microbiennes du sol. On pourrait conclure que les traitements de biorestauration touchés (i) l'abondance de la compétence des PCB dans le sol dégradeurs et / ou (ii) l'induction de gènes cataboliques des communautés microbiennes et / ou (iii) de la biodisponibilité des BPC dans le sol.

**Keywords:** polychlorinated biphenyls, soil bioremediation, *bphA, bphC, Rhodococcus*